

José Daniel Camino Camino

Caracterización de los
mecanismos y factores clave en la
nucleación primaria de α -
sinucleína asociada a la
agregación amiloide en la
enfermedad de Parkinson

Director/es

Cremades Casasin, Nunilo

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS Y
FACTORES CLAVE EN LA NUCLEACIÓN
PRIMARIA DE A-SINUCLEÍNA ASOCIADA A LA
AGREGACIÓN AMILOIDE EN LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON

Autor

José Daniel Camino Camino

Director/es

Cremades Casasin, Nunilo

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2021



Universidad Zaragoza

TESIS DOCTORAL

Caracterización de los mecanismos y factores clave en la nucleación primaria de α -sinucleína asociada a la agregación amiloide en la enfermedad de Parkinson

Memoria presentada por José Daniel Camino Camino para optar al grado de doctor por la Universidad de Zaragoza

Directora
Dra. Nunilo Cremades Casasín

Abril de 2020

Instituto de Biocomputación Física de Sistemas Complejos
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular



Programa de doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

La Dra. Nunilo Cremades Casasín, profesora del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral con título “**Caracterización de los mecanismos y factores clave en la nucleación primaria de α -sinucleína asociada a la agregación amiloide en la enfermedad de Parkinson**” ha sido realizada por José Daniel Camino Camino en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección, y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de doctor en Ciencias.

Zaragoza, abril de 2021

Fdo. Nunilo Cremades Casasin

Agradecimientos

Nadie elige nacer. El primer y más importante acto de nuestra vida, Existir, nos es impuesto por nuestros padres. A ellos en primer lugar, y más que a nadie, quiero agradecerles todo. Si bien fue decisión suya que yo fuese arrojado a este Mundo, se han ocupado de hacérmelo lo más ligero posible. Desde niño siempre quise ser como mi padre, hasta llegar a cambiar mi nombre cuando pude para llamarme como él, y, aunque al crecer los senderos de la vida te llevan por donde menos lo esperas, siempre ha seguido siendo mi referencia y mi meta. Y si mi padre ha sido mi futuro, un ejemplo en que reflejarme, mi madre ha sido mi presente, una confidente y consejera. A ella debo lo más íntimo de mi ser, gracias a todo su infinito amor y paciencia, y a que siempre ha sabido ampararme cuando yo mismo creía que no podía seguir adelante. Ambos han hecho de mí lo soy a base de ejemplo y confianza. Pero yo, aparte de con mis progenitores, tengo la suerte de contar con una “segunda madre”, mi tita Brígida. A ella, matriarca de la familia, le debo casi tanto como a la primera. Siempre ha sido el faro que, con su luz ha, sabido guiarnos a todos nosotros desde que otro más antiguo se apagara. Su amor, consejo y guía han llenado mi vida desde que me alcanza la memoria. Aunque yo, para ser sinceros, siempre he vivido entre mis abuelos, de ellos aprendí más que de nadie. De ellos y de mis chachos, José y Pilar, a los que quise como a unos abuelos más. Mi infancia pasó jugando con mis primos y yendo al campo con mi abuelo Pepe o estando en su casa jugando en el jardín con los gatos, o en el corral de mi abuelo José con las gallinas. A ambos les debo tanto... al primero, junto con mi abuela Eneudaria, gran parte de mi crianza cuando era niño; y al segundo una relación casi paterno-filial que comenzó después de la muerte de mi abuela Lourdes y que duró hasta su propia muerte 6 meses después. Y aunque parezca poco tiempo, son los meses que más marcaron mi adolescencia. A mi abuela Lourdes, si bien me cuidó siempre que mi madre no pudo, lo que más le tengo que agradecer es el ejemplo de bondad y generosidad infinitas que fue su vida. Por ello siempre fue muy querida por todo el mundo, y si alguna vez he conocido un ejemplo vivo de santidad, sin duda, ha sido en ella. Y aunque al comienzo de mi adolescencia los fui perdiendo a todos, salvo a mi abuelo Pepe, como un regalo del destino, se acercaron a mi vida mis Chachos. Los dos pronto se convirtieron en dos nuevos abuelos y con ellos pasé todas las noches del domingo desde que muriera mi abuelo José hasta que vine a Zaragoza a hacer la tesis. En mi chacho José encontré a la que creo que ha sido la persona más inteligente que he conocido nunca, con una memoria prodigiosa, pese a que, por circunstancias de lugar y época, no pudo estudiar más allá de la enseñanza primaria. Sus historias y sabiduría inundaron mi imaginación y me hicieron disfrutar las noches de domingo. A él quiero dedicarle muy especialmente esta tesis, pues pude ver como ese prodigio que era su mente se enturbiaba por culpa de la enfermedad de los cuerpos de Lewy, llegando a

convertirse en una triste sombra de lo que un día fue. Si bien ya conocí en mi infancia que existía una enfermedad llamada mal de Alzheimer, que hizo a mi abuela Eneudaria “olvidar algunas cosas y despistarse” durante años, y pude ver los efectos físicos de la enfermedad de Parkinson en mi abuela Lourdes, no fue hasta que vi los estragos que hacía en mi chacho la acumulación de mi “querida” α -sinucleína, que descubrí la verdadera dimensión de la pérdida cognitiva en un individuo. Si los hallazgos presentados en esta tesis contribuyesen en alguna medida a evitar o al menos mejorar el pronóstico de los futuros enfermos de sinucleopatías, tanto esfuerzo y trabajo habrá servido para algo más que la satisfacción de mi curiosidad. Para finalizar los agradecimientos a mi familia, también quiero recordar a mis hermanas, que son cuatro, aunque sólo una sea carnal. Porque mis primas siempre fueron mis únicas hermanas hasta que, siendo yo ya grandecillo, nació mi hermanita, *mi María*, y tres meses después *mi Beatriz*. A mi hermanita quiero agradecerle todo lo que ha aportado a mi vida, desde que llegó cuando yo tenía siete años, hasta el día de hoy; y también le quiero agradecer que haya revisado la última versión de esta tesis, que por algo es química como yo.

Quiero agradecerles también a mis amigos: Víctor, Francisco, Paco, Vellido, Roberto, Ana, José Manuel, Laura, los Cales, el Abogado... por todo lo que me han aportado, en especial a los cinco primeros, que han enriquecido tanto mi corazón como mi intelecto. Y si hoy puedo estar aquí, escribiendo esta tesis y viviendo esta vida, es porque *mi Víctor* supo ayudarme y ampararme cuando yo mismo dejé de creer en mí. El y mi madre me alumbraron cuando perdí mi camino y por ello contraí con él una deuda que vale una vida.

También quiero agradecerle a mi amigo y mentor Antonio Parody su absoluta confianza en mí y su continuo apoyo en todo momento. No sólo me acogió en su laboratorio cuando me encontraba terminando Química, sino que me introdujo en el mundo de la biofísica y me dio las bases necesarias para después poder empezar en Zaragoza con el doctorado que quería hacer. Ha sido un padrino que me ha ayudado a comenzar mi carrera científica y que apostó por mí en un momento en que se me empezaron a cerrar todas las puertas. Todo lo que he conseguido y siga consiguiendo en Ciencia será absolutamente gracias a él, y por ello nunca tendré suficientes palabras de agradecimiento.

Se suele agradecer al organismo que paga tu doctorado, pero, a decir verdad, yo a quien sinceramente le agradezco mi doctorado es a mi mentora y directora, Nunilo Cremades, que confió en mí y, con paciencia y tesón, ha sabido guiarme y enseñarme lo que sé de

investigación. A ella le debo mi tesis, mis publicaciones y todo lo que he conseguido en el mundo de la Ciencia, gracias a la oportunidad que un día me brindó y a su continua ayuda. Así que por ello y por ser muy “madre” conmigo, muchísimas gracias Nunilo.

Cuando vine a Zaragoza no conocía a nadie en esta ciudad, y tampoco había vivido fuera de mi casa, pero tuve la suerte de dar con unas compañeras de piso inmejorables. María, Yami, Cris y Rafa me hicieron sentir como en un nuevo hogar. A ellas, y en especial a María y a Rafa quiero agradecerles su acogimiento y amistad. También a todos mis compañeros de laboratorio, que, si bien me han ayudado y enseñado todo lo que he necesitado, sobre todo me han regalado su amistad. Cuando llegué, pronto Jorge, Mati, Pedro, Maria, Sandra, Juanjo, Rafa, Ernesto, Silvia y todos los demás me incorporaron a sus planes y sus vidas como uno más, y me hicieron sentir que aquí no estaba solo. Después fueron llegando más y más amigos al laboratorio: Pablo, mi “hermano de grupo”, que me permitió unirme a sus múltiples actividades, Víctor, Ana García, David, Ana Jiménez, Pabliño, Diego, Andrés, Javi, Laura, David Polanco, Sandra, Carlos V... Y Violeta, *mi Flor*, a ella le quiero agradecer que no sólo me dio su amistad sino una verdadera familia aquí en Zaragoza. Hemos compartido ilusión, viajes, aventuras, momentos buenos y no tan buenos, y sobre todo nos hemos sabido confortar mutuamente y querernos. Por todo ello, gracias.

Una de las ventajas de hacer un doctorado es que te lleva a hacer estancias en otros laboratorios y a ampliar tus horizontes. Eso me llevó a Bilbao, donde pude conocer a Félix Goñi, que me admitió en su grupo durante 2 meses en mi primer año de tesis y después en diferentes momentos de la misma. A él le quiero y tengo que agradecer su apoyo, tanto científico como personal, y la inestimable oportunidad que me brindó acogiéndome como a uno más en su laboratorio. Allí aprendí muchísimo, todo gracias a mi amigo y maestro Txus, al que le debo lo que sé de lípidos; y también gracias a Igor, que me enseñó espectroscopía de infrarrojo. Pero no sólo pude aprender sobre lipídica, espectroscopía de infrarrojo y a usar un tensiómetro de Langmuir, sino que tuve buenos maestros que me enseñaron Euskadi y la cultura euskalduna: Bingen, Etxaniz, Arantxa... Y muchos amigos que me mostraron Bilbao y como divertirse: Emilio, Yaiza, Ornella, Ariana, Pablo, María, Arizt, Curro, Araceli. Pero entre todos ellos quiero agradecer muy especialmente a *mi Marina*, una de las personas más maravillosas que he conocido y que desde el primer momento me integró en el grupo del laboratorio que salía los jueves de pintxos por Bilbo y que me ha invitado todos los años a su casa para poder acudir puntualmente a la sagardotegi con todos los amigos de Biofisika.

Indice

| | |
|--|----|
| Listado de artículos publicados | 17 |
| Listado de abreviaturas..... | 21 |
| Resumen | 27 |
| 1. Introducción | 31 |
| 1.1. Plegamiento de proteínas..... | 33 |
| 1.1.1. Papel del agua en la estructura y plegamiento de proteínas..... | 34 |
| 1.2. Proteínas intrínsecamente desordenadas | 35 |
| 1.3. Mal plegamiento y agregación amiloide de proteínas | 37 |
| 1.3.1. Mecanismos de agregación amiloide | 40 |
| 1.3.2. Seguimiento del proceso de agregación amiloide mediante la sonda fluorescente tioflavina T..... | 42 |
| 1.3.3. Papel del agua en el proceso de agregación amiloide | 43 |
| 1.3.4. La separación de fases líquido-líquido como mediadora de la nucleación primaria..... | 46 |
| 1.4. Estructura de los agregados amiloides..... | 47 |
| 1.4.1. Características estructurales de las especies oligoméricas pre-fibrilares | 49 |
| 1.4.2. Toxicidad de los agregados amiloides | 51 |
| 1.5. Amiloidosis o enfermedades relacionadas con la agregación amiloide de proteínas..... | 53 |
| 1.5.1. Enfermedad de Parkinson..... | 54 |
| 1.6. α -Sinucleína | 57 |
| 1.6.1. Características del monómero de α -sinucleína | 58 |
| 1.6.2. Características de los agregados amiloides de α -sinucleína | 63 |
| 1.6.3. Características de las especies oligoméricas pre-fibrilares de α -sinucleína | 65 |
| 1.7. Mecanismos de nucleación primaria en α -sinucleína | 66 |
| 2. Objetivos..... | 69 |
| 3. Materiales y métodos | 73 |
| 3.1. Preparación de las muestras de proteína..... | 75 |
| 3.1.1. Expresión y purificación de las diferentes variantes de α -sinucleína | 75 |
| 3.1.2. Preparación de núcleos de fibras amiloides para experimentos de siembra..... | 77 |
| 3.2. Caracterización biofísica | 78 |
| 3.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Lauril Sulfato Sódico (SDS-PAGE)..... | 78 |
| 3.2.2. Espectroscopía de fluorescencia..... | 78 |
| 3.2.3. Cinéticas de agregación..... | 79 |
| 3.2.4. Cinéticas de agregación en placas con tapones hidrofílicos | 80 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.2.5. | Cálculo del rendimiento de la agregación al final de la reacción | 81 |
| 3.2.6. | Análisis de las cinéticas de agregación | 81 |
| 3.2.7. | Dispersión dinámica de luz | 81 |
| 3.2.8. | Espectroscopía de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano..... | 82 |
| 3.2.9. | Espectroscopía de infrarrojo | 83 |
| 3.2.10. | Estimación de la fracción de lámina β paralela y antiparalela en los agregados al final de las reacciones de agregación a diferentes concentraciones de MeOH por análisis global de espectros de infrarrojo | 84 |
| 3.2.11. | Estudios de estabilidad de agregados de α -sinucleína | 84 |
| 3.2.12. | Difracción de rayos X | 85 |
| 3.2.13. | Microscopía de fuerza atómica | 86 |
| 3.2.14. | Medida de tensiones superficiales | 86 |
| 3.2.15. | Sistema de microfluídica..... | 87 |
| 3.3. | Experimentos bioquímicos..... | 88 |
| 3.3.1. | Preparación de vesículas unilaminares pequeñas | 88 |
| 3.3.2. | Medida de la concentración de los agentes de aglomeración macromolecular . | 88 |
| 3.3.3. | Estimación de la concentración efectiva de proteína o de la fuerza iónica en soluciones con agentes de aglomeración macromolecular | 89 |
| 4. | Resultados..... | 91 |
| 4.1. | Bloque I: Caracterización de las diferentes rutas de nucleación primaria de α -sinucleína: En la búsqueda de condiciones que favorezcan la nucleación homogénea de la proteína..... | 93 |
| 4.1.1. | Las condiciones comúnmente utilizadas para la agregación de α -sinucleína <i>in vitro</i> requieren de interfases hidrofóbicas/hidrofílicas | 94 |
| 4.1.2. | La adición de concentraciones moderadas de alcohol acelera la nucleación amiloide de α -sinucleína | 98 |
| 4.1.3. | La adición de altas concentraciones de sales, particularmente sales cosmotrópicas, conducen a la aceleración de la nucleación de α -sinucleína | 105 |
| 4.1.4. | La adición de agentes de aglomeración macromolecular también acelera la nucleación primaria de α -sinucleína | 108 |
| 4.1.5. | α -sinucleína forma agregados amiloides sin la presencia de una superficie de nucleación activa en condiciones de hidratación limitadas | 110 |
| 4.1.6. | α -Sinucleína forma preferentemente agregados amiloides con lámina β paralela por nucleación heterogénea y agregados amiloides con lámina β antiparalela por nucleación homogénea | 116 |
| 4.1.7. | La agregación a través de una nucleación homogénea da lugar a agregados amiloides con diferente estabilidad termodinámica con respecto a los agregados generados por nucleación heterogénea | 120 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.1.8. | Los agregados formados dentro de los condensados biomoleculares de α -sinucleína generadas por separación de fase líquido-líquido se asemejan a los generados por nucleación homogénea | 124 |
| 4.2. | Bloque II: Estudio del mecanismo de nucleación primaria de α -sinucleína mediada por interfaces..... | 127 |
| 4.2.1. | Diseño de las variantes de sinucleína empleadas en este trabajo | 128 |
| 4.2.2. | Capacidad de nucleación de las diferentes variantes de sinucleína en la interfase aire/agua..... | 133 |
| 4.2.3. | La afinidad de α -sinucleína por la interfase aire/agua y su capacidad para saturarla depende de la región de la proteína que adquiere hélice anfipática e interacciona con la interfase | 134 |
| 4.2.4. | Papel de la orientación de las moléculas de proteína en la interfase en el mecanismo de nucleación primaria heterogénea | 135 |
| 4.2.5. | Nucleación heterogénea en vesículas lipídicas: Efecto de la carga iónica del lípido con respecto a su hidrofobicidad en la agregación de α -sinucleína | 137 |
| 5. | Discusión..... | 139 |
| 5.1. | Bloque I: Caracterización de las diferentes rutas de nucleación primaria de α -sinucleína: En la búsqueda de condiciones que favorezcan la nucleación homogénea de la proteína | 141 |
| 5.2. | Bloque II: Estudio del mecanismo de nucleación primaria de α -sinucleína mediada por interfaces..... | 149 |
| 6. | Conclusiones | 155 |
| 6.1. | Bloque I: Caracterización de las diferentes rutas de nucleación primaria de α -sinucleína: En la búsqueda de condiciones que favorezcan la nucleación homogénea de la proteína | 157 |
| 6.2. | Bloque II: Estudio del mecanismo de nucleación primaria de α -sinucleína mediada por interfaces..... | 158 |
| 7. | Bibliografía | 159 |
| 8. | Anexos | 201 |
| | Anexo I: The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates. | 203 |
| | Anexo II: Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species and Their Possible Roles in Disease..... | 219 |
| | Anexo III: The role of water in the primary nucleation of protein amyloid aggregation...231 | |
| | Anexo IV: Defining α -synuclein species responsible for Parkinson disease phenotypes in mice..... | 261 |
| | Anexo V: The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces neuronal dysfunction | 279 |

Listado de artículos publicados

Publicaciones directamente relacionadas con el presente trabajo:

- 1) José D. Camino, Pablo Gracia, Serene W. Chen, Jesús Sot, Igor de la Arada, Víctor Sebastián, José L. R. Arrondo, Félix M. Goñi, Christopher M. Dobson and Nunilo Cremades. The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates. *Chem Sci* **11**, 11902–11914 (2020).....(Anexo I)
- 2) Pablo Gracia, José D. Camino, Laura Volpicelli-Daley and Nunilo Cremades. Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species and Their Possible Roles in Disease. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).....(Anexo II)
- 3) José D. Camino, Pablo Gracia, Nunilo Cremades. The role of water in the primary nucleation of protein amyloid aggregation. *Biophysical Chemistry* **269**, 106520 (2021)....
.....(Anexo III)

Otras publicaciones del autor derivadas de colaboraciones establecidas en el marco de la tesis:

- 1) Jessica M. Froula, Marta Castellana-Cruz, Nadia M. Anabtawi, José D. Camino, Serene W. Chen, Drake R. Thrasher, Jennifer Freire, Allen A. Yazdi1, Sheila Fleming, Christopher M. Dobson, Janet R. Kumita, Nunilo Cremades, and Laura A. Volpicelli-Daley. Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J Biol Chem* **294**, 10392–10406 (2019).....(Anexo IV)
- 2) Roberta Cascella, Serene W. Chen, Alessandra Bigi, José D. Camino, Christopher M. Dobson, Fabrizio Chiti, Nunilo Cremades, Cristina Cecchi. The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells. *Nat Commun* **12**, 1814 (2021).....(Anexo V)
- 3) Aitor Franco, Pablo Gracia, Adai Colom, José D. Camino, Jose Angel Fernández-Higuero, Natalia Orozco, Alexander, Leonor Saiz, Nunilo Cremades, Jose M.G. Vilar, Adelina Prado, Arturo Muga. All-or-none amyloid disassembly via chaperone-triggered fibril unzipping favors clearance of alpha-synuclein toxic species. En revisión.

Listado de abreviaturas

| | |
|------------|---|
| α S | Alfa-sinucleína |
| β S | Beta-sinucleína |
| γ S | Gamma-sinucleína |
| AFM | Microscopía de fuerza atómica |
| ALS | Esclerosis lateral amiotrófica |
| Amp | Ampicilina |
| ANS | Sulfato 8-anilinaftaleno |
| A/W | Aire/agua (interfase) |
| C α | Carbono α |
| C β | Carbono β |
| CD | Dicroísmo circular (espectroscopía) |
| Crio-EM | Crio-microscopía electrónica |
| C-terminal | Carboxilo terminal (extremo de una proteína) |
| DIC | Contraste de interferencia diferencial (microscopía) |
| DLB | Demencia con cuerpos de Lewy |
| DLS | Dispersión dinámica de luz |
| DLPS | 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfo-Lserina |
| DMPS | 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina |
| EGCG | Epigallocatequina-3-galato |
| E/M | Relación excímero/monómero |
| EPR | Resonancia paramagnética de electrones (espectroscopía) |
| ER | Retículo endoplasmático |
| EtOH | Etanol |
| Gn·HCl | Cloruro de guanidinio |
| HEPES | Acido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico |
| HetNOEs | Efecto nuclear Overhause heteronuclear |
| H/H | Hidrofóbica/hidrofílica (interfase) |

| | |
|-----------------|--|
| IDP | Proteína intrínsecamente desordenada |
| IDR | Región intrínsecamente desordenada |
| IR | Infrarrojo (espectroscopía) |
| i-PropOH | Iso-propanol |
| LB | Luria Bertani (medio) |
| LBs | Cuerpos de Lewy |
| LLPS | Separación de fase líquido-líquido |
| LN _s | Neuritas de Lewy |
| MD | Dinámica molecular (simulaciones) |
| MeOH | Metanol |
| MPD | 2-metil-2,4-pentanodiol |
| MSA | Atrofia multisistémica |
| NAC | Componente beta-no-amiloide |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NMR | Resonancia magnético nuclear (espectroscopía) |
| N-terminal | Amino terminal (extremo de una proteína) |
| PAP | Fosfatasa ácida prostática |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PD | Enfermedad de Parkinson |
| PEEK | Polieteretercetona |
| PEG | Polietilén glicol |
| PMCA | Amplificación cíclica del mal-plegamiento de proteínas |
| PMD | Enfermedad por mal-plegamiento de proteínas |
| PMMA | Polimetilmetacrilato |
| PrP | Proteína priónica |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| R _h | Radio hidrodinámico |

| | |
|------------------|--|
| SDS | Lauril Sulfato Sódico |
| SEC | Cromatografía de exclusión molecular |
| SNpc | Parte compacta de la sustancia negra |
| ssNMR | Resonancia magnética nuclear de estado sólido (espectroscopía) |
| SOD1 | Superóxido dismutasa |
| SUV | Vesícula unilaminar pequeña |
| T2D | Diabetes mellitus tipo II |
| TFE | 2,2,2-Trifluoroethanol |
| ThT | Tioflavina T |
| T _{lag} | Fase de latencia |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| TSEs | Encefalopatías espongiformes transmisibles |
| UV | Ultra-violeta |
| WT | Tipo salvaje |

Resumen

α -sinucleína (α S) es una proteína neuronal presináptica intrínsecamente desordenada cuyo mal plegamiento y agregación en forma de fibras amiloides es el sello distintivo de diferentes trastornos neurodegenerativos conocidos como sinucleinopatías. Entre estos trastornos cabe destacar especialmente la enfermedad de Parkinson, asociada típicamente al envejecimiento y que constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo.

Crecientes evidencias experimentales sugieren que α S puede generar diferentes tipos de polimorfos amiloides con diferentes toxicidades y grados de infectividad, lo que sugiere un vínculo potencial entre la estructura y la patología de estas especies. Comparaciones estructurales entre polimorfos han sugerido recientemente que los polimorfos de α S que se han generado *in vitro* hasta ahora difieren notablemente de los que se obtienen a partir de extractos de cerebro de pacientes, lo que sugiere que las condiciones utilizadas hasta la fecha para inducir agregación de la proteína *in vitro* no recapitulan los mecanismos y rutas amiloides que tienen lugar *in vivo*, siendo éstos aún desconocidos. En este sentido sólo se han explorado hasta la fecha condiciones de agregación de α S *in vitro* en las que el proceso se inicia mediante nucleación heterogénea a través de interfases hidrofóbicas/hidrofílicas, quedando por esclarecer si α S es capaz de autoensamblarse a través de una nucleación homogénea.

En esta tesis se ha logrado ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares y los factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, que desencadenan el autoensamblaje de α S, así como caracterizar diferentes rutas de agregación amiloide de esta proteína y los polimorfos generados a través de las mismas. Hemos podido descubrir que el grado de hidratación de la proteína es un factor decisivo para el control de la velocidad de nucleación, siendo excesivamente lenta en condiciones de alta hidratación o acelerándose en varios órdenes de magnitud al reducirse la actividad de agua. Además, el grado de hidratación también dictamina la preferencia por el tipo de nucleación primaria, siendo la nucleación homogénea el proceso más favorable en condiciones de hidratación limitadas, como las que tendrían lugar en el interior de condensados biomoleculares generados por separación de fases líquido-líquido. Dependiendo del tipo de nucleación más favorable según las condiciones en las que se encuentra α S, se formarán polimorfos estructurales amiloides drásticamente diferentes, que difieren en todos los niveles posibles de variabilidad estructural, desde su contenido estructural secundario y orientación peptídica hasta la organización cuaternaria de

los protofilamentos constituyentes. Por otro lado, hemos identificado el papel que juegan las diferentes regiones de α S en el mecanismo de nucleación primaria heterogénea, hallando la existencia de dos regiones clave, una en torno a los residuos 1-20 y que se encuentra involucrada en la interacción de la proteína con las interfases y otra en torno a los residuos 70-90 que se haya involucrada en el establecimiento de los puentes de hidrógeno intermoleculares que darán lugar a la formación del núcleo amiloide. Así mismo, hemos logrado comprender la importancia, para la nucleación primaria heterogénea, de la configuración de la cadena peptídica, y concretamente de la región NAC, al adsorberse a superficies hidrofóbicas y el papel que juega la región C-terminal en modularla.

Estos hallazgos contribuyen en gran medida a comprender el complejo paisaje conformacional de la agregación amiloide de α S y abren la puerta al estudio de nuevas rutas de agregación amiloide que pueden tener una mayor relevancia fisiológica.

1. Introducción

1.1. Plegamiento de proteínas

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos unidos por enlaces covalentes (enlaces peptídicos), que, en un gran número de casos, en condiciones fisiológicas nativas, tienden a adoptar una estructura tridimensional compacta con una disposición precisa y única en el espacio, la cual determina su función¹. El proceso por el cual una proteína adopta su estructura nativa funcional, se conoce como plegamiento y en muchos casos lo hace de forma espontánea, sin necesidad de otros accesorios celulares, lo que supone uno de los ejemplos de autoensamblaje más relevantes en la Naturaleza^{1,2}. La estructura tridimensional concreta que adopta una proteína viene determinada por su secuencia primaria de aminoácidos (cadena polipeptídica), en concreto por el tipo y disposición de los aminoácidos y por las interacciones no covalentes entre ellos, principalmente puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones entre grupos aromáticos, así como con el solvente, que en gran medida determinan el empaquetamiento hidrofóbico del núcleo de plegamiento^{3,4}. La proteína se plegará en su configuración de mínima energía, para minimizar la cantidad de energía libre a su alrededor, de acuerdo a las leyes de la termodinámica, por ejemplo, evitando la exposición de grupos hidrofóbicos al solvente acuoso y de ese modo aumentando la entropía del agua⁵.

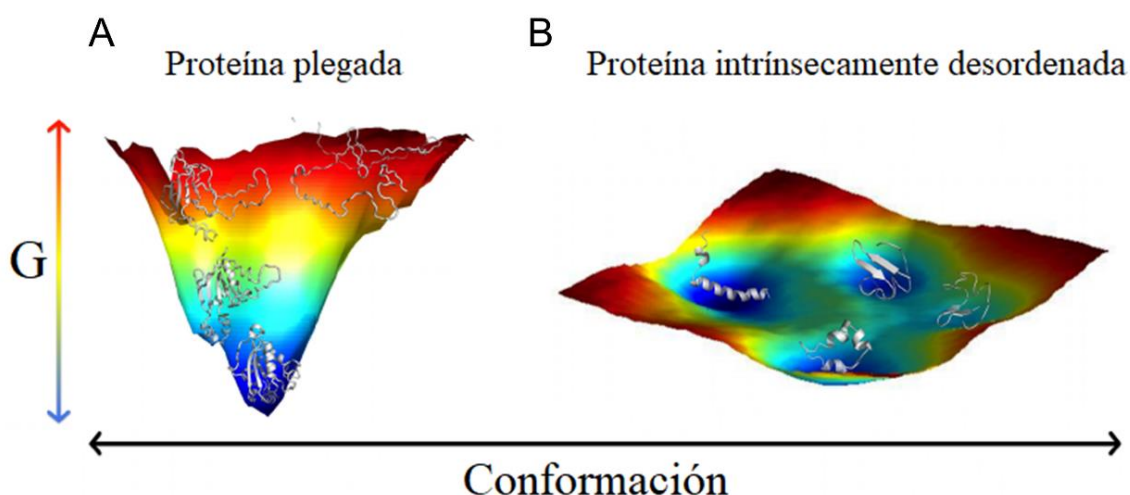


Figura 1.1. Representaciones esquemáticas de los paisajes energéticos de una proteína globular y de una intrínsecamente desordenada. (A) Ejemplo de un posible “túnel o embudo de plegamiento” característico de una proteína globular. (B) Paisaje energético típico de una proteína desestructurada en su estado nativo. Figura adaptada de Burger *et al.*⁶.

En la búsqueda de la conformación termodinámicamente más estable, la proteína podría adoptar aleatoriamente todas las posibles configuraciones de su cadena polipeptídica, y dado el número total de posibles conformaciones (por ejemplo 20^{100} conformaciones para una proteína compuesta por 100 aminoácidos), el tiempo que le llevaría transitar por su paisaje

conformacional, de forma aleatoria, hasta llegar al estado nativo funcional sería tan elevado que haría este proceso cinéticamente inviable^{7,8}. Sin embargo, la proteína, en su proceso de plegamiento, sólo rastreará aquellas posibles conformaciones energéticamente accesibles, hasta encontrar el estado termodinámicamente más estable del sistema; es lo que se conoce como “túnel o embudo de plegamiento”^{3,9-11} (Fig. 1.1 A). Si una proteína no forma correctamente su estructura nativa, esta no podrá realizar su función biológica; por lo que determinar la estructura y la disposición conformacional de proteínas y complejos de proteínas es esencial para comprender tanto su función biológica como su relación con ciertas patologías¹².

1.1.1. Papel del agua en la estructura y plegamiento de proteínas

Las proteínas han evolucionado en soluciones acuosas durante millones de años, siendo el agua el lugar de origen de la vida en nuestro planeta; lo que hace del agua, y sus propiedades específicas, un elemento absolutamente indispensable para la vida en la Tierra. El papel del agua es fundamental para entender el comportamiento de moléculas biológicas como las proteínas o los ácidos nucleicos. Las moléculas de agua que solvatan la proteína (capa de hidratación), son cruciales para mediar el plegamiento, estructura y función de las proteínas en el medio biológico. La capa de hidratación de las proteínas se extiende típicamente en torno a 5-10 Å desde la superficie de la proteína, y las moléculas de agua en este entorno, debido a sus interacciones con la superficie de la proteína, muestran propiedades diferentes en comparación con el agua en el seno de la solución^{13,14}. Se ha observado que el agua de la capa de hidratación tiene tiempos de reorientación más lentos y, por lo tanto, una dinámica más lenta que el agua del seno de la solución. De hecho, la capa de hidratación puede estar muy estructurada, con algunas moléculas de agua tan fuertemente unidas a la superficie de la proteína que llegan a cristalizar juntas durante el proceso de cristalización de esta y, por lo tanto, ocasionalmente se consideran que forman parte de la estructura de la proteína¹⁴.

La funcionalidad de la proteína está relacionada con su movilidad, que, a su vez, está acoplada al movimiento del agua. Las fluctuaciones del solvente en el seno de la solución controlan la forma y los movimientos globales de las proteínas, mientras que las fluctuaciones de la dinámica de la capa de hidratación modulan los movimientos internos de las proteínas, que son los que en última instancia determinan la función de las mismas. El agua, además, juega un papel clave en el proceso de plegamiento de las proteínas, asegurando que los residuos hidrofóbicos se encuentren predominantemente enterrados en el interior de la proteína y las moléculas de agua excluidas del núcleo hidrofóbico, lo que da como resultado un núcleo

proteico esencialmente seco y empaquetado en la gran mayoría de los casos^{4,15-17}. De manera simultánea, el plegamiento de la proteína va acompañado de una gran disminución en el área superficial accesible al agua, lo que lleva a que muchas de las moléculas de agua que formaban parte de la capa de hidratación de la proteína en su estado desplegado sean liberadas al seno de la solución haciendo el proceso de plegado entrópicamente más favorable^{18,19}. Además, el agua participa en la estabilización de la estructura plegada mediante el establecimiento de interacciones directas mediante puentes de hidrógeno con la superficie de la proteína, a veces generando redes de puentes de hidrógeno, o de forma más indirecta mediante el cribado de interacciones electrostáticas, o mediante la estabilización de cavidades hidrofóbicas esenciales para la función biológica en algunas proteínas²⁰.

1.2. Proteínas intrínsecamente desordenadas

No todas las proteínas se encuentran plegadas, formando una estructura globular, en su estado fisiológico. Un gran número de proteínas no adquieren una estructura terciaria definida, ni incluso secundaria, en su estado nativo, sino que se encuentran desordenadas y aun así desarrollan su función biológica. A estas proteínas se las denomina proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, por sus siglas en inglés)^{21,22}. De hecho, se sabe que alrededor de un tercio (23-28%) del proteoma en eucariotas²³ y más del 70% de las proteínas de señalización²⁴ se encuentran completamente desordenadas o de forma parcial, con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs, por sus siglas en inglés) de más de treinta residuos de longitud. Esto es debido a las particularidades de la secuencia primaria de este tipo de proteínas, caracterizada por una baja hidrofobicidad, así como la presencia de regiones de baja complejidad (LCRs, por sus siglas en inglés) y en algunos casos con regiones de carga neta opuesta alternante^{21,22}. Estas LCRs, características de algunos tipos de IDPs, son fragmentos de secuencia en los que hay una baja complejidad compositiva de aminoácidos en comparación con las secuencias típicas de proteínas globulares^{25,26}. Estas proteínas o regiones carecen de residuos que promuevan el orden estructural, como el triptófano, fenilalanina, cisteína, o tirosina, y contienen un alto número de residuos que promueven el desorden, como la prolina, glicina, arginina o lisina. En ocasiones, presentan unidades estructurales repetitivas, donde comúnmente se repiten residuos de glutamina, serina, prolina o residuos ácidos²⁶. Estas repeticiones a veces tienen una función biológica aparente, como en el caso de las repeticiones de glutamina y alanina que son frecuentes en proteínas de unión a ADN^{27,28}. Sin embargo, la expansión de estas repeticiones puede resultar en enfermedades neurológicas como la enfermedad de Huntington^{29,30}. De

hecho, un número importante de IDPs que contienen LCRs se han relacionado con enfermedades neurológicas y con ciertos tipos de cáncer³¹.

Las IDPs muestran una gran diversidad estructural³², pudiendo alcanzar conformaciones desestructuradas totalmente extendidas o adoptar conformaciones colapsadas globalmente, en algunos casos con regiones de estructura secundaria fluctuante (conformaciones de glóbulo fundido)³³. De hecho, su paisaje energético es relativamente plano, pero accidentado, con múltiples mínimos locales con similar energía, separados por pequeñas barreras energéticas³⁴ (Fig. 1.1 B). Como consecuencia de este tipo de paisaje conformacional, variaciones moderadas en temperatura, pH o fuerza iónica pueden provocar cambios estructurales significativos³⁵. La ausencia de estructura ordenada hace que de forma general las IDPs no tengan actividad enzimática ya que, normalmente, la organización espacial de los residuos del sitio activo, pertenecientes a regiones distantes en la secuencia primaria, requiere de la adquisición de una estructura tridimensional rígida que este tipo de proteínas no pueden proporcionar³⁶. No obstante, la plasticidad estructural que les caracteriza les permite adoptar diferentes conformaciones estructurales a través de transiciones de desorden a orden con el fin de interactuar con otras macromoléculas^{21,37,38}. De hecho, la versatilidad de las IDPs para adaptarse a múltiples parejas de unión hace de ellas unas excelentes “proteínas centrales” o “proteínas eje” (definidas como aquellas que interactúan con más de 10 macromoléculas, normalmente proteínas) en redes complejas de proteínas^{37,39}. Se ha visto que, en general, las proteínas centrales tienen un mayor grado de desorden, lo que se ha relacionado con su función⁴⁰. De esta manera, la versatilidad estructural de estas proteínas o regiones desordenadas les permite adquirir la conformación estructural más adecuada para favorecer su interacción con una macromolécula específica, la cual será diferente dependiendo de la macromolécula con la que tenga que interactuar en cada momento. Estas secuencias desordenadas pueden actuar como unión de dos dominios globulares, confiriendo a estos un espaciador flexible en proteínas multidominio, o como proteínas de unión con alta especificidad a varias dianas/parejas que puede ser ADN, ARN, otra proteína o una variedad de ligandos pequeños. También pueden modificar la actividad de la proteína a la que se asocian, o ayudar en el ensamblaje de grandes complejos multiproteicos como el ribosoma, el citoesqueleto, el complejo de preiniciación de la transcripción, la cromatina e incluso la matriz extracelular^{34,36,41}. En algunos casos, las IDPs pueden adquirir una conformación parcialmente plegada al interactuar con otras macromoléculas y así realizar su función biológica²¹, aunque en otros casos, puede permanecer totalmente desordenada en el complejo⁴². En otras ocasiones, sin embargo, la gran plasticidad

estructural de estas proteínas o regiones puede facilitar su autoensamblaje en agregados amiloides con una estructura en lámina β , que más adelante definiremos⁴³.

Un tipo especial de LCR con esta preferencia de asociación en estructuras amiloides son los dominios tipo prión, típicamente ricos en residuos polares no cargados como glutamina y asparragina^{44,45}. Estos dominios además son frecuentes en proteínas que pueden formar condensados biomoleculares, también denominados orgánulos sin membrana, mediante procesos de separación de fases líquido-líquido^{46,47} (LLPS, por sus siglas en inglés). De hecho, la formación de condensados biomoleculares podría ser un proceso anterior y necesario para la nucleación de ciertos agregados amiloides patológicos en el interior celular⁴⁸.

1.3. Mal plegamiento y agregación amiloide de proteínas

Se pueden dar, de forma natural, procesos de mal plegamiento durante el proceso de plegamiento de proteínas, a través de rutas alternativas iniciadas por la formación o acumulación de estructuras metaestables intermedias. Estas estructuras representan trampas cinéticas con un mínimo de energía local dentro del embudo de plegamiento de las proteínas⁴³ (Fig. 1.1 A y Fig. 1.2) y pueden presentar características idóneas, como por ejemplo la exposición de regiones hidrofóbicas, que llevan a su autoensamblaje y la formación de agregados insolubles tipo amiloide. El proceso de agregación amiloide en estos casos, por tanto, es generalmente precedido por un desplegamiento parcial de la proteína, en el que ciertos dominios de la proteína parcialmente desplegados exploran conformaciones alternativas con propensión a adoptar estructura en lámina β , promovido por mutaciones o ciertos ambientes celulares⁴⁹. Este sería el caso de la superóxido dismutasa (SOD1), relacionada con la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés)⁵⁰. Por otro lado, un gran número de proteínas que forman agregados amiloides, tanto funcionales como patológicos, se encuentran altamente desordenadas y para este tipo de proteínas los mecanismos por los que inicia su autoensamblaje están menos establecidos que para las proteínas plegadas. En algunos casos, se ha propuesto que, debido a su alta flexibilidad estructural, es posible que se puedan formar estructuras en lámina β propensas a la agregación dentro de sus fluctuaciones estructurales transitorias⁵¹, las cuales se verían favorecidas en ciertos ambientes. Un ejemplo de IDP amiloidogénica es la α -sinucleína (α S), relacionada con la enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés)⁵².

El término "amiloide" fue acuñado originalmente por Rudolph Virchow en 1854, quien encontró densas inclusiones en muestras de cerebro que podían teñirse con yodo y, por lo tanto,

las denominó almidón (amiloide). En 1859 Friedreich, y Kekule luego, demostraron que estas inclusiones estaban compuestas por proteínas en lugar de carbohidratos, por lo que fueron los que primero definieron amiloide como agregados de proteínas⁵³. El proceso de agregación amiloide de proteínas conduce a un aumento en la proporción de láminas β en la estructura de la proteína que agrega, independientemente de su secuencia de aminoácidos y de su topología en el estado nativo funcional, resultando típicamente en estructuras fibrilares muy regulares y altamente estables.

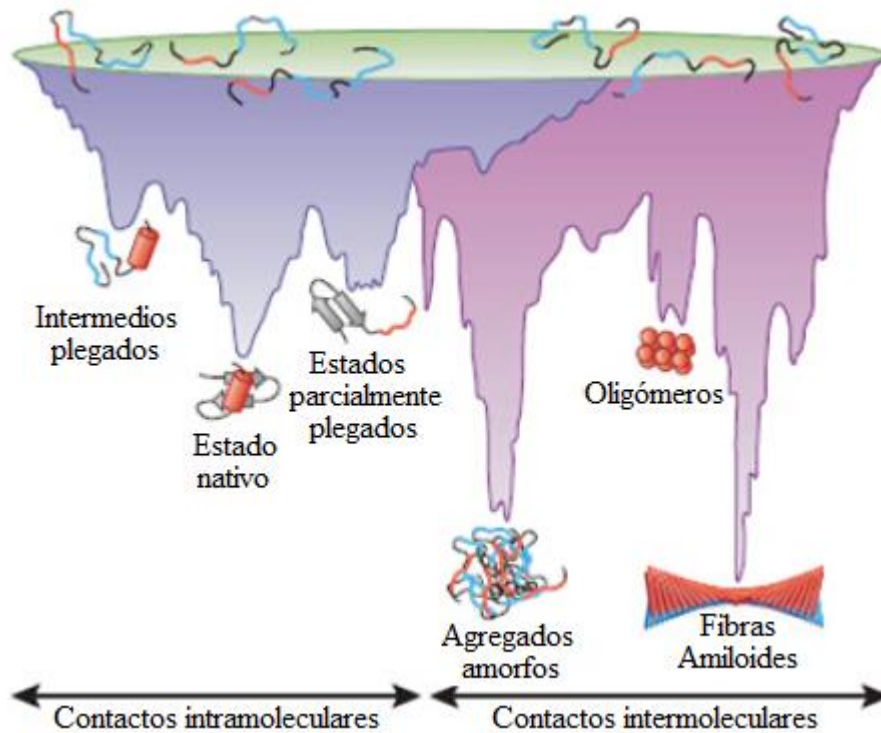


Figura 1.2. Representación esquemática de la relación entre los paisajes energéticos de los procesos de plegamiento y agregación en una proteína globular. Ejemplo de un posible paisaje energético característico de una proteína globular, en el que se puede observar en azul el “túnel o embudo de plegado” de una proteína hacia su estado nativo, mediante contactos intramoleculares, y en morado el paisaje energético que lleva a su mal plegamiento y agregación, a través de contactos intermoleculares. Figura adaptada de Salahuddin 2015⁵⁴.

Se ha propuesto que la formación de agregados amiloides no es un evento raro restringido a unas pocas proteínas, sino que cada cadena polipeptídica tiene una cierta tendencia a formar estructura en lámina β amiloide como alternativa a su estado nativo (Fig. 1.2), lo que hace que sea una propiedad general de las proteínas⁵⁵. Efectivamente, a lo largo del tiempo se estuvo pensando que el estado nativo funcional de una proteína, ya sea una proteína estructurada o una IDP, era la conformación más estable que ésta podía adoptar. Por el contrario, en la actualidad, se considera que el estado nativo funcional de las proteínas es un estado meta-estable aislado de la conformación amiloide por grandes barreras energéticas (Fig.

1.2), que sería el estado termodinámicamente más estable, incluso en condiciones fisiológicas^{56,57}. De hecho, se ha logrado demostrar teóricamente que la conformación amiloide es la estructura termodinámicamente más estable para todos los polipéptidos posibles, tanto en vacío como en entornos acuosos, mediante cálculos por primeros principios⁵⁸; y también se ha podido demostrar experimentalmente para multitud de proteínas y péptidos⁵⁷. No obstante, pese a que cualquier proteína tiene la potencia de adquirir estructura amiloide, lo cierto es que unas secuencias polipeptídicas tienen más facilidad que otras. Las secuencias amiloidogénicas tienden a carecer de prolinas y glicinas, presumiblemente porque desestabilizan la estructura en lámina β ⁵⁹, y suelen contener residuos hidrofóbicos⁶⁰ o dominios tipo prión⁶¹. Se ha demostrado también que tripéptidos de ciertos residuos aminoacídicos⁶², e incluso aminoácidos aislados como fenilalanina⁶³, cisteína o metionina⁶⁴ son capaces de formar fibras amiloides *in vitro*.

En el caso de polipéptidos naturales desestructurados, se ha demostrado que la longitud de la cadena polipeptídica juega un papel importante en la estabilidad del estado amiloide respecto del estado nativo funcional de la proteína. En un estudio reciente⁵⁷ se observó que, para péptidos cortos, el estado amiloide es mucho más estable y que la diferencia de energía entre el estado amiloide y nativo se reduce al aumentar la longitud de la cadena polipeptídica. Esto explicaría por qué las fibras amiloides patógenas *in vivo* están formadas, en gran medida, por péptidos, fragmentos de proteínas o pequeñas proteínas. Probablemente, este comportamiento se deba a las limitaciones topológicas asociadas con la incorporación de largas cadenas polipeptídicas en el agregado amiloide, y daría una posible razón por la cual la evolución biológica ha tendido a generar proteínas de gran tamaño. Esta propensión intrínseca de las cadenas polipeptídicas a formar agregados amiloides, no obstante, es modulada por varios factores como las condiciones en las que se encuentra la proteína, su concentración, o la presencia de ciertas mutaciones en su secuencia. Dado que la conversión de proteínas de su estado soluble a una conformación amiloide implica la formación de interacciones intermoleculares, la estabilidad termodinámica del estado amiloide aumenta con la concentración de la proteína. Esto hace que haya, por tanto, una concentración de proteína en unas condiciones determinadas en la que la estabilidad del estado amiloide sea la misma que la del estado nativo, y por encima de esta concentración de proteína crítica, la proteína adoptará la conformación amiloide a menos que existan barreras cinéticas altas para la conversión estructural⁶⁵. Para proteínas cuya concentración *in vivo* está próxima a la concentración crítica,

pequeñas perturbaciones en los niveles de expresión de proteínas pueden conducir a la formación de fibras amiloides en la célula.

1.3.1. Mecanismos de agregación amiloide

El proceso por el cual una proteína monomérica pasa de su estado nativo al estado amiloide implica, por parte de esta, un proceso de autoensamblaje asociado a una reordenación molecular y estructural compleja. Se pueden distinguir tres grupos distintos de especies proteicas una vez que ha comenzado el proceso de autoensamblaje: monómeros, oligómeros y especies fibrilares (Fig. 1.3 C). Cada uno de estos conjuntos abarca una serie de especies individuales, particularmente en el caso de los oligómeros intermedios de la reacción, que globalmente pueden mostrar una heterogeneidad muy alta en términos tanto de tamaño como de estructura⁶⁶. La agregación de una proteína generalmente sigue un proceso de polimerización dependiente de nucleación (Fig. 1.3 C), donde el primer paso es la formación de núcleos competentes que luego pueden polimerizar reclutando nuevos monómeros⁶⁷. La formación de los primeros núcleos amiloides a partir del ensamblaje de monómeros normalmente requiere superar una barrera de energía muy alta^{68,69} (Fig. 1.3 B). Es por este motivo, que para la gran mayoría de las proteínas amiloidogénicas en condiciones diluidas *in vitro*, la cinética de formación de agregados amiloides se caracteriza por un paso de nucleación lento, que generalmente limita la velocidad total del proceso^{67,70,71}. La nucleación, cuando se da sin la participación de agregados amiloides previos, se denomina nucleación primaria^{67,72,73} (Fig. 1.3 A). Por otro lado, la formación de núcleos competentes puede favorecerse por la existencia previa de agregados amiloides, dándose un proceso de catálisis del autoensamblaje del monómero sobre la superficie de estos, lo que se conoce como nucleación secundaria^{74,75} (Fig. 1.3 A c).

El mecanismo de agregación amiloide de IDPs más aceptado, conocido como mecanismo de conversión conformacional nucleada fue originalmente propuesto por el grupo de Susan Lindquist⁷⁶ para el caso del prionoide Sup35. Algunas otras IDPs y proteínas con IDRs que siguen este modelo en condiciones típicas *in vitro* son el péptido A β ₄₂⁷⁷, la proteína priónica (PrP)⁷⁸, huntingtina exon 1⁷⁹, amilina⁸⁰ o α S⁸¹. En este mecanismo, la proteína monomérica comienza formando especies oligoméricas relativamente desordenadas, que comienzan a adquirir una mínima estructura en lámina β mediante una lenta conversión estructural⁸¹. Estos oligómeros con cierta estructura en lámina β reclutan nuevos monómeros

en un proceso de elongación que conlleva un incremento de la estructura en lámina β global, resultando en oligómeros más estables, hasta formar los primeros núcleos amiloides competentes. Es en este momento cuando, generalmente, los procesos de elongación de estos núcleos amiloides por la adición de nuevas moléculas de proteína monomérica⁷⁰ (Fig. 1.3 A b) o de nucleación secundaria sobre la superficie de estos núcleos^{74,75} (Fig. 1.3 A c) dominan la reacción⁶⁷, lo que da como resultado las características cinéticas sigmoidales con una larga fase de latencia seguida de una fase de crecimiento exponencial hasta alcanzar el equilibrio (Fig. 1.3 C). Este modelo también parece ser relevante para la agregación de algunas proteínas globulares, donde el proceso se inicia desde conformaciones similares a las conformaciones nativas. En estos casos, las cadenas polipeptídicas pueden mantener la estructura nativa del monómero en los oligómeros inicialmente formados, para después adquirir una estructura de lámina β en etapas posteriores del proceso de autoensamblaje⁸²⁻⁸⁵.

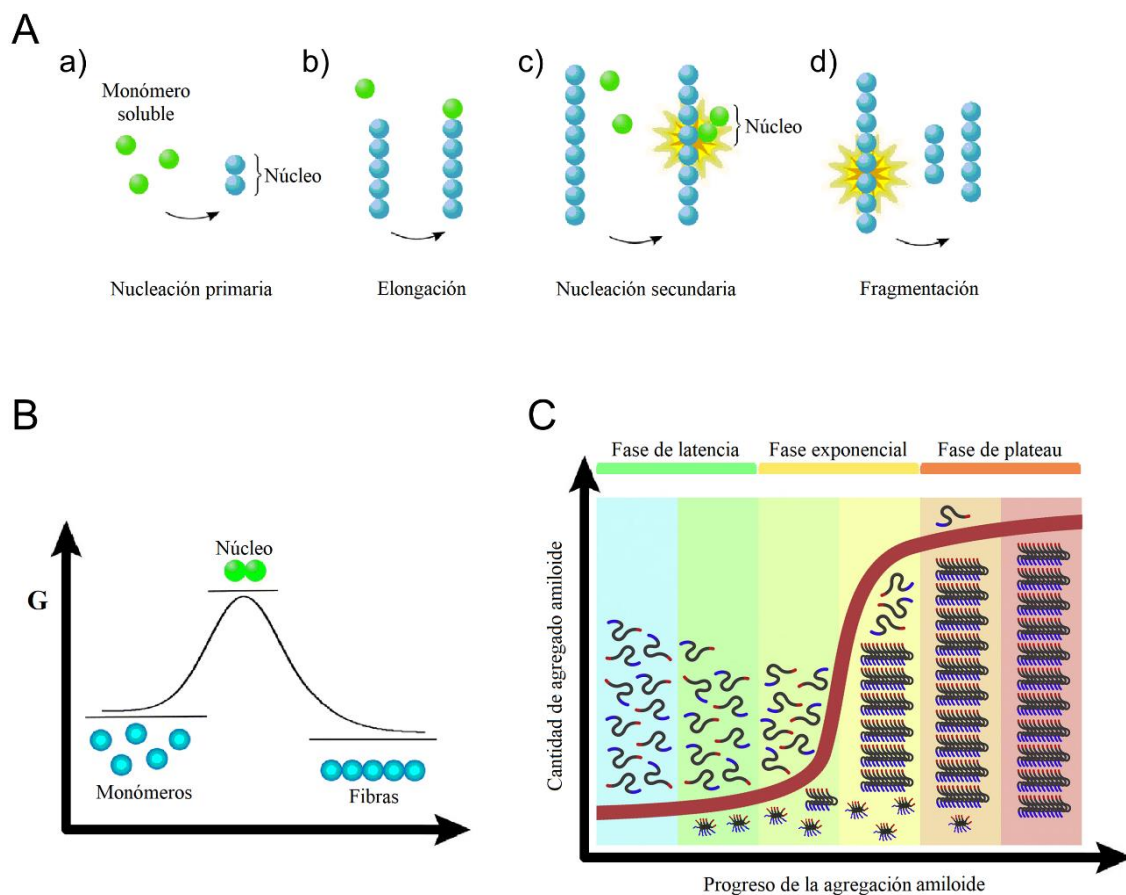


Figura 1.3. Esquema de los procesos microscópicos que pueden dominar diferentes etapas de la agregación, diagrama energético de la nucleación primaria y curva cinética característica del proceso de agregación amiloide. (A) Procesos microscópicos subyacentes a la formación de agregados amiloides: nucleación primaria a partir de monómeros en solución (a), elongación por adición de monómeros a agregados existentes (b), nucleación secundaria de monómeros catalizada en la superficie de agregados amiloides existentes (c) y fragmentación de fibras (d). (B) Diagrama de energía libre (G) de la formación de fibras amiloides, en donde el núcleo es el estado con mayor energía libre, las fibras y los monómeros pueden tener una energía libre similar, y la concentración total de monómero determina qué estado domina en el equilibrio. (C) Esquema cinético característico de un proceso de agregación amiloide,

en el que existe una fase de latencia, una fase exponencial y una etapa de agotamiento de monómero, caracterizada por una fase de plateau que viene definida por el equilibrio entre las especies. Figura adaptada de Arosio *et al.*⁶⁷ y Marvian *et al.*⁸⁶.

Además de procesos de elongación y nucleación secundaria, pueden existir otros procesos secundarios adicionales que influyen en la cinética de agregación amiloide. Una vez que se forman las primeras fibras, estas pueden fragmentarse, aumentando así el número de extremos de agregados fibrilares accesibles para la elongación⁸⁷. Este mecanismo se llama fragmentación de fibras (Fig. 1.3 A d) y conduce a un aumento en la velocidad de agregación, ya que las fibras pequeñas actúan como semillas de agregación altamente eficientes⁸⁸.

1.3.2. Seguimiento del proceso de agregación amiloide mediante la sonda fluorescente tioflavina T

Resultan cruciales, para el estudio del proceso de agregación amiloide *in vitro*, los métodos que permiten la detección de agregados amiloides y su seguimiento con el tiempo. Como se dijo anteriormente, Rudolph Virchow logró en 1854 el primer método de tinción y detección de agregados amiloides en muestras histológicas. Este método usaba una tinción con yodo, lo que plantea el problema de no ser específica para los agregados de proteínas amiloides, ya que suele ser un método de tinción para el almidón. No fue hasta 1927 que Divry y Florkin descubrieron un método de tinción específico de amiloide, la tinción con rojo Congo⁸⁹, que sigue usándose hasta nuestros días como técnica estándar de tinción de agregados amiloide en muestras histológicas. No obstante, en la actualidad, especialmente para detectar la agregación amiloide *in vitro*, se usa comúnmente el método descubierto en 1959 por Vassar y Culling⁹⁰ que emplea la molécula fluorescente tioflavina T (ThT, por sus siglas en inglés). Esta molécula tiene la capacidad de unirse a las fibras amiloides y de aumentar con ello su rendimiento cuántico de fluorescencia muy significativamente, en comparación al que presenta en su estado libre debido a procesos de apantallamiento de fluorescencia. El aumento de intensidad de fluorescencia, además, es proporcional a la masa de agregados amiloides en la solución^{91,92}. Las especies amiloides capaces de unir ThT con suficiente afinidad como para producir este incremento en el rendimiento cuántico de fluorescencia son, generalmente, las especies finales de la reacción de agregación⁹³. Es por esto que las cinéticas típicas de agregación amiloide seguidas mediante fluorescencia de ThT reflejan una característica fase de latencia, que se da al comienzo de la agregación amiloide y en donde las especies mayoritarias son monómero y, en mucha menor proporción, especies oligoméricas y núcleos fibrilares (típicamente menos del 5-10% en masa), lo que lleva a que no se aprecie aumento de señal de fluorescencia de ThT

(Fig. 1.3 C). En el momento en el que se forman un número significativo de núcleos amiloides competentes, la generación de agregados amiloides es exponencial, como normalmente se aprecia en las cinéticas seguidas por ThT (Fig. 1.3 C). Una vez que se da un equilibrio en la agregación, únicamente la ThT que se encuentre unida a agregados amiloides dará una emisión fluorescente elevada, de tal manera que cesará el incremento de la señal de sonda con el cese de la formación de agregado, dándose la clásica fase de plateau (Fig. 1.3 C).

1.3.3. Papel del agua en el proceso de agregación amiloide

Al contrario que en otros muchos procesos en los que intervienen proteínas, las interpretaciones de estudios tanto experimentales como computacionales de los procesos de agregación de proteínas suelen hacerse desde una perspectiva centrada en las proteínas, obviando el papel del agua que las rodea. Sin embargo, cada vez se aprecia más la necesidad de su consideración para comprender los diferentes procesos de la formación de fibras amiloides⁹⁴⁻⁹⁶. El papel del agua no se puede limitar a una de las múltiples etapas en las que dividimos la cascada amiloide, sino que, por el contrario, probablemente desempeñe diversas funciones en las diferentes etapas de la agregación. Se apunta a que, tanto el crecimiento de las fibras como el ensamblaje de protofilamentos pueden ser favorecidos termodinámicamente por un cambio favorable en la entropía asociado con la liberación de moléculas de agua confinadas desde la superficie de la proteína al seno de la solución; lo que ha sido apoyado tanto por estudios experimentales como computacionales para diversos péptidos y proteínas⁹⁷⁻¹⁰¹. En el caso del proceso de elongación fibrilar, se ha descrito la expulsión al medio de parte del agua de la capa de hidratación del monómero a la vez que se da su reconfiguración en el proceso de unión a un agregado amiloide preexistente; esta liberación de agua permite el bloqueo del monómero a la semilla fibrilar¹⁰². De una manera similar, el ensamblaje de los protofilamentos para formar la fibra madura pasa por la liberación de las moléculas de agua de la capa de hidratación de la superficie de interacción de los protofilamentos para generar una interfase seca^{98,103}.

Estos estudios mencionados, y las conclusiones que aportan, ofrecen una información muy útil a la hora de entender el papel del agua en la elongación de las fibras y la formación de la fibra madura, pero no entran en los procesos de nucleación primaria. Realmente, sólo un pequeño número de estudios han abordado los efectos del agua sobre la nucleación primaria en la agregación amiloide^{94,95,104}. La mayoría de estos estudios se han realizado mediante

simulaciones computacionales. Por ejemplo, para el péptido A β (A β 1-42), mediante una combinación de simulaciones por dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés) con análisis de termodinámica fluctuante, se encontró que la interacción de la proteína con el agua circundante, esto es la energía libre de solvatación, juega un papel crítico en su agregación; sugiriendo que esta energía libre de solvatación es la fuerza impulsora de la dimerización en el seno de la solución¹⁰⁵. Los estudios experimentales que han considerado el papel del agua en los procesos de agregación de proteínas son incluso más escasos, dadas las dificultades experimentales para controlar directamente la actividad del agua durante el proceso de autoensamblaje de proteínas. En un estudio muy interesante se observó cómo variaban las cinéticas de agregación de los péptidos amiloides A β ₁₆₋₂₂ y Sup35₇₋₁₃ dependiendo de su grado de hidratación mediante su encapsulamiento en micelas inversas de diferente tamaño, lo que permitía el control de la cantidad de moléculas de agua por molécula de péptido¹⁰⁶. Su principal conclusión es que la deshidratación de las proteínas promueve su agregación al reducir la capa de agua que brinda protección a los péptidos monoméricos. Experimentos llevados a cabo añadiendo co-solventes a la solución de α S, en particular trifluoroetanol (TFE), demostraron que la agregación mejoraba particularmente en condiciones en las que se minimizaban las interacciones protectoras entre proteína y solvente¹⁰⁷. Se propuso que en las condiciones en que se disminuyen estas interacciones protectoras con el agua, se favorecen las interacciones proteicas tanto intramoleculares como intermoleculares. Más recientemente, investigando el papel que desempeña la capa de hidratación en las estructuras de α S en estado monomérico, oligomérico y fibrilar, se ha podido observar que la mitad de la fracción de agua de solvatación móvil de α S monomérica se pierde tras la formación de oligómeros o fibras¹⁰⁸. Este efecto se ha propuesto también para otras proteínas, como tau^{99,100}, PrP¹⁰⁹ e insulina¹¹⁰, las cuales experimentan la expulsión de moléculas de agua confinadas en la superficie del monómero tras la formación del agregado amiloide.

El efecto de los procesos de desolvatación en la agregación amiloide, además, podría explicar una de las razones por las que las IDPs parecen ser más propensas a este proceso que las proteínas globulares. Las IDPs presentan una mayor área de superficie accesible al disolvente en comparación con las proteínas globulares plegadas. Además, presentan moléculas de agua atrapadas alrededor de los segmentos hidrofóbicos expuestos al solvente y, en los casos de típicas IDPs amiloidogénicas, también en el interior de conformaciones de tipo glóbulo colapsado adoptadas en condiciones que promueven la agregación⁹⁶. Todo ello conduciría a una gran contribución favorable de la entropía de solvatación a la energía libre total de

agregación amiloide por la liberación de moléculas de agua al seno de la solución durante el proceso de autoensamblaje¹⁰¹. Se ha reportado que ciertas IDPs amiloidogénicas, como Sup35, polyQ, tau y α S, adoptan una conformación de glóbulo colapsado en condiciones que favorecen la agregación amiloide¹¹¹⁻¹¹⁴; aunque para el caso de la proteína tau, también se ha propuesto que su agregación está relacionada con la estabilización de conformaciones extendidas^{115,116}. Esta contribución entrópica de los procesos de desolvatación favorecería termodinámicamente la agregación amiloide en las IDPs en comparación a las proteínas plegadas, las cuales, por otro lado, poseen barreras de energía libre de desplegamiento adicionales para que tenga lugar la nucleación⁴⁹. Además, las propiedades de las moléculas de agua de hidratación de las IDPs son notablemente diferentes a las de las proteínas globulares. Las primeras presentan una dinámica mucho más rápida, lo que a su vez se refleja en una dinámica más rápida de estas proteínas^{117,118}. Esto explica que la capa de hidratación de las IDPs sea más susceptible a los cambios en la solución, y que pequeñas variaciones en las condiciones de la solución afecten fuertemente a su capa de hidratación y al conjunto conformacional de las IDPs. De hecho, esta característica de las IDPs puede que esté ligada a su plasticidad funcional y se ha propuesto que estos cambios en el medio podrían favorecer configuraciones más propensas a la agregación que otras¹¹⁹.

La mayor tendencia de las IDPs a agregar, por la contribución entrópica que se produce con la liberación al medio de las moléculas de agua atrapadas, vendrá condicionada por su secuencia de aminoácidos y el carácter de estos. La abundancia de residuos polares y cargados característica de las IDPs da lugar a un mayor número de interacciones entre las cadenas polipeptídicas y las moléculas de agua de solvatación. Esto condiciona la barrera de energía de desolvatación que debe de superarse para el autoensamblaje inicial de la proteína, ya que las interacciones que se producen entre los residuos polares y las moléculas de agua de solvatación son mayores que los apolares con estas, haciendo que las proteínas más hidrofílicas se encuentren más solvatadas. Esto pudo ser observado por simulaciones de MD, que mostraron como la formación de protofilamentos es 1.000 veces más lenta para un polipéptido altamente hidrófilo que para uno altamente hidrófobo⁹⁸. Así pues, puede verse como el agua tiene, al menos, un doble efecto sobre la nucleación primaria en la agregación amiloide. Por un lado, la iniciación del autoensamblaje estaría termodinámicamente favorecida en soluciones acuosas debido a la gran contribución de la entropía de solvatación, de modo que cuanto más solvatada está la conformación monomérica, más favorable termodinámicamente es su autoensamblaje. Pero, por otro lado, la velocidad de autoensamblaje inicial, asociada con la barrera de energía

que las moléculas de proteína deben superar para la nucleación, podría ser muy alta para las IDPs altamente solvatadas, como lo indican varias observaciones experimentales^{106,120}.

1.3.4. La separación de fases líquido-líquido como mediadora de la nucleación primaria

El proceso de LLPS es un proceso que se ha estudiado tradicionalmente en física de polímeros, especialmente, en mezclas acuosas de dos o más componentes poliméricos, principalmente sintéticos¹²¹. Hace unos pocos años, se ha demostrado que este proceso se da también entre proteínas o entre proteínas y ácidos nucleicos, tanto en el tubo de ensayo como dentro de las células^{122,123}. Estas proteínas pueden ser bien proteínas globulares modulares, multivalentes, o ciertos tipos de IDPs que, en muchos casos, se asocian con moléculas de ARN/ADN de forma transitoria y multivalente¹²⁴⁻¹²⁶. El proceso de LLPS es un proceso reversible por el que una solución homogénea se separa en dos fases líquidas distintas, una condensada y otra diluida, donde la fase condensada mantiene las propiedades de líquido debido a la naturaleza multivalente y transitoria de las interacciones de sus componentes. En el contexto celular, a la fase densa, rica en proteína, que se genera por este proceso de LLPS, en forma de gota líquida, se le denomina condensado biomolecular u orgánulo sin membrana^{127,128}. La formación de estos orgánulos, así como su contenido y la proporción relativa de este, se encuentra estrechamente regulada por la célula en condiciones fisiológicas¹²⁶, ya que éstos orgánulos realizan funciones esenciales en ella, tanto en la catálisis bioquímica, la regulación de la transcripción de ARN, el ciclo celular o el control de la autofagia¹²⁹, como en la organización citoesquelética¹²⁵. Estos condensados se pueden formar tanto por segregación, cuando se componen por macromoléculas idénticas que maximizan así las interacciones favorables entre ellas y minimizan las interacciones con el solvente; como por asociación, en donde diferentes tipos de macromoléculas se separan de la fase diluida maximizando así las interacciones favorables entre ellas. Este comportamiento se explica típicamente por la teoría de Flory-Huggins, que propone que la fuerza impulsora que da lugar a los procesos de LLPS en soluciones acuosas es la relación de fuerzas entre las interacciones entre macromoléculas por un lado y entre las macromoléculas y el agua por otro lado^{130,131}. Sin embargo, también se ha propuesto que el ordenamiento de las moléculas de agua de hidratación en estas proteínas también es clave para su separación de fases^{130,131}, por lo que el aumento de la entropía del disolvente por la liberación de moléculas de agua desde la superficie del soluto al seno de la solución, al separarse de fase y generar una fase condensada, probablemente juegue un papel importante en este proceso¹³². De esta manera, se ha propuesto que la alteración de las

propiedades del agua inducidas por las IDPs podría modular la separación de fases en la célula^{133,134}. De hecho, se ha postulado que el proceso de LLPS es una propiedad más asociada a las IDPs y a proteínas con IDRs para permitirles la realización de diversas funciones en el medio celular^{135,136}. Por tanto, las alteraciones en el comportamiento de separación de fases de los componentes biomoleculares o un fallo en la regulación de la formación/disolución de estos condensados biomoleculares puede provocar efectos patológicos. Una de estas consecuencias no deseadas es la transición de líquido a sólido de los condensados biomoleculares, lo que dará lugar a la formación de hidrogeles, en donde el intercambio de sus componentes con el medio/fase diluida y el movimiento interno de las macromoléculas constituyentes son mucho menores, dándose lugar de forma simultánea, en muchos casos, a la formación de agregados amiloides¹²⁶.

Evidencias experimentales recientes sugieren un papel de estos condensados biomoleculares de IDPs amiloidogénicas en su agregación *in vivo* y en la inducción de patología¹³⁷⁻¹⁴⁰. Entre las proteínas amiloidogénicas asociadas con enfermedad a las que experimentalmente se ha observado que su agregación amiloide puede venir precedida por un proceso de LLPS podemos encontrar a tau¹⁴¹, TDP-43¹⁴², FUS⁴⁶ y, más recientemente, a α S¹⁴³⁻¹⁴⁵, aunque esta relación entre los procesos de LLPS y la agregación amiloide *in vivo* está por establecerse de manera más robusta.

1.4. Estructura de los agregados amiloides

Todos los agregados amiloides se caracterizan por poseer una arquitectura genérica que es rica en estructura en lámina β y con unas características estructurales distintivas que son en gran medida independientes de la secuencia de la proteína^{12,55}. Los agregados amiloides son típicamente estructuras fibrilares largas, no ramificadas, de sólo unos pocos nanómetros de diámetro y compuestas generalmente por dos o tres protofilamentos que se enrollan entre sí (Fig. 1.4 D). Estos protofilamentos individuales están compuestos por moléculas de proteína apiladas una encima de otra, en forma de hebras β perpendiculares al eje de las fibras, lo que genera láminas β intermoleculares que recorren la longitud del agregado (Fig. 1.4 A). La separación entre las hebras que forman las láminas β a lo largo del eje de las fibras es independiente de la secuencia de aminoácidos del polipéptido y por ello es constante, con un valor cercano a 4.7 Å. Este valor viene determinado por las interacciones por puentes de hidrógeno intermoleculares entre grupos de la cadena principal, de ahí que su valor sea muy

constante. Por el contrario, el espaciado entre láminas β (en la dirección perpendicular al eje de las fibras) es variable dentro de un rango que típicamente oscila entre 9 y 11 Å, y viene determinado por las interacciones intramoleculares, por lo que es altamente dependiente de la naturaleza de las cadenas laterales^{146,147} (Fig. 1.4 C). Esta estructura es conocida, por tanto, como estructura en lámina β cruzada¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Una característica observada en muchas estructuras resueltas de fibras amiloides es la interdigitación entre láminas β de los protofilamentos, conocida como cremallera estérica¹⁴⁹, generando interfases secas en las fibras maduras. Dependiendo de la disposición de las láminas β en el empaquetamiento de la fibra, la estructura de ésta variará, generando diferentes polimorfos de estructura amiloide. La complementariedad y el empaquetamiento de las hebras β , así como la matriz continua de puentes de hidrógeno que se forma a lo largo de la dirección del eje de las fibras en la estructura lámina β cruzada explica la alta estabilidad de la estructura amiloide en relación con otras estructuras proteicas¹⁵².

A lo largo del proceso de autoensamblaje de cualquier cadena polipeptídica, pese al carácter genérico de la arquitectura β cruzada, pueden darse alteraciones en la organización jerárquica de las fibras amiloides. Estas variaciones pueden darse en diferentes etapas del proceso de autoensamblaje, lo que resulta en variaciones tanto a nivel molecular como ultraestructural de la fibra^{150,153,154}. Éstas pueden ir desde la longitud de las hebras β , su configuración y disposición en láminas β (paralela frente a antiparalela y en registro frente a fuera de registro), el número y grado de empaquetamiento de las láminas β en protofilamentos, hasta el ensamblaje de estos en filamentos y finalmente fibras maduras^{150,153,154} (Fig. 1.4 A). La configuración de las hebras β en el núcleo de las fibras es un tema recurrente en el análisis de las diversas estructuras de los polimorfos. Las hebras generalmente interactúan para formar láminas β con una disposición en registro paralela, esto es que todas las hebras individuales tienen la misma orientación amino terminal (N-terminal) a carboxilo terminal (C-terminal) y el residuo i de una hebra interactúa con el residuo equivalente i de la siguiente hebra. Esta configuración se ha observado hasta la fecha en todos los polimorfos de fibras de A β 40 y A β 42 caracterizadas hasta ahora¹⁵⁵⁻¹⁶¹ (a excepción de algún mutante patológico, donde se ha reportado otra configuración), de α S¹⁶²⁻¹⁶⁶, tau^{167,168}, amilina^{169,170}, β 2-microglobulina¹⁷¹, y de varios fragmentos de PrP¹⁷²⁻¹⁷⁴. La configuración en registro paralela maximiza el número de puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas a lo largo del eje de las fibras, a diferencia de la configuración fuera de registro, que necesariamente da lugar interacciones alternativas de residuos hidrófobos-hidrófilos en la dirección de las fibras y, por lo tanto, es probable que dé lugar a estructuras menos estables. Esta es la razón por la que la disposición en registro paralela

se ha propuesto como la favorecida, tanto termodinámica como cinéticamente, en la mayoría de los polimorfos¹⁵⁴. También se han encontrado configuraciones antiparalelas en polimorfos de algunas proteínas como es el caso de calcitonina¹⁷⁵, algunos polimorfos de transtiretina^{83,176} y el mutante D23N de A β 40¹⁷⁷.

Parece que, pese a que la contribución de las interacciones entre los grupos de la cadena lateral a la energía total de la estructura amiloide son menos relevantes, podrían ser cruciales para la definición del tipo de polimorfo amiloide preferido durante el proceso de nucleación¹⁴⁷. Además, la preferencia por uno u otro polimorfo vendría dada por las condiciones de la solución^{178,179} o por ciertas mutaciones^{180,181}. En algunas condiciones, para ciertos polipéptidos, se ha observado la coexistencia de más de un polimorfo a la vez^{182,183}. La estabilidad termodinámica de los diferentes polimorfos analizados no varía en gran medida, y es, por tanto, la relación de velocidades de los diferentes procesos de autoensamblaje la que parece que determina el o los polimorfos que se forman en esas condiciones, así como la abundancia relativa de estos. La razón es que, dentro de todos los polimorfos termodinámicamente estables en un determinado ambiente y que podrían formarse, las barreras energéticas de las diferentes etapas del proceso de agregación harán que unas rutas de agregación sean cinéticamente más favorables que otras; lo que llevará a que prevalezcan los polimorfos de las rutas con cinéticas más rápidas^{184,185}. Dependiendo de los tipos celulares e incluso en de los diferentes microambientes dentro de la misma célula, sería muy plausible, por tanto, que se pudieran formar polimorfos amiloides alternativos.

1.4.1. Características estructurales de las especies oligoméricas pre-fibrilares

En el proceso de formación de agregados amiloides se produce una serie de especies intermedias conocidas como oligómeros. Estos son extremadamente difíciles de aislar y estudiar debido a su naturaleza transitoria y a su baja población en cualquier momento de la reacción (en torno al 5-10% como máximo). Poseen una alta heterogeneidad de tamaños (desde dímeros hasta multímeros de orden superior), de contenido en lámina β (desde especies desordenadas hasta un contenido en lámina β similar al observado en las especies fibrilares) y estabilidad variable, al menos durante las primeras etapas de la reacción de agregación (especialmente en la fase de latencia)^{67,81}. Además, el proceso de autoensamblaje de la proteína para formar el agregado amiloide puede darse a través de una multiplicidad de rutas, que dependerán de factores como las condiciones de la solución o de la introducción de

mutaciones¹⁸⁶⁻¹⁸⁹, y cada una de las cuales genera una multiplicidad de especies oligoméricas^{93,182,190,191}. Consecuentemente, se han reportado una gran variedad de estructuras y morfologías de oligómeros generados durante la agregación amiloide de proteínas y péptidos. Desde oligómeros desestructurados^{81,192} (Fig. 1.4 B I), a oligómeros con estructura regular y con morfologías esféricas o alargadas¹⁹³ (Fig. 1.4 B II), en forma tubular o con forma de anillo^{93,194-198} (Fig. 1.4 B III), así como oligómeros con un núcleo sólido¹⁹⁹ o con una cavidad interna como la que presentan los anulares o tubulares.

Con el fin de estudiar en mayor detalle las estructuras de estas especies oligoméricas que se dan de forma transitoria y en baja proporción durante la reacción de agregación, se han desarrollado protocolos para lograr atrapar cinéticamente ciertas especies y poder aislarlas^{66,93,198,200-202}. Algunas de las estrategias usadas hasta la fecha para atrapar estas especies involucran un cambio en las condiciones fisicoquímicas bajo las cuales ocurre la agregación con el fin de promover rutas amiloides alternativas, mientras que otras involucran la modificación covalente de la proteína o la adición de compuestos químicos capaces de interactuar con ciertos tipos de oligómeros e inhibir su elongación y conversión en fibras²⁰³. Caben destacar las estrategias que involucran un paso clave de liofilización de la muestra de proteína y, por tanto, de una deshidratación significativa de las moléculas de proteína, con las que se ha logrado atrapar y enriquecer muestras que contienen un tipo de especies oligoméricas particularmente tóxicas, que en algunos casos se demostró que presentaban propiedades análogas a un tipo estructural de oligómeros generados durante la formación de fibras amiloides^{204,205,202,206,199,93,207}. Diversos estudios apuntan a que los oligómeros asociados a toxicidad tienen una gran superficie hidrofóbica expuesta al solvente^{112,201,208,209}, con un núcleo estructurado ordenado, típicamente en lámina β ²¹⁰. Para el caso de los oligómeros citotóxicos del péptido A β , se han encontrado varias estructuras ricas en láminas β asociadas a especies tóxicas, por ejemplo, una estructura en lámina β antiparalela^{205,211,212}, una conformación de barril β ²¹³ y una con una arquitectura β cruzada similar a las fibras de amiloide²¹⁴. En cuanto a α S, también se han podido observar formas oligoméricas ricas en láminas β antiparalelas asociadas a citotoxicidad^{81,93,202}, lo que contrasta con la estructura en láminas β paralelas propia de las fibras de esta proteína.

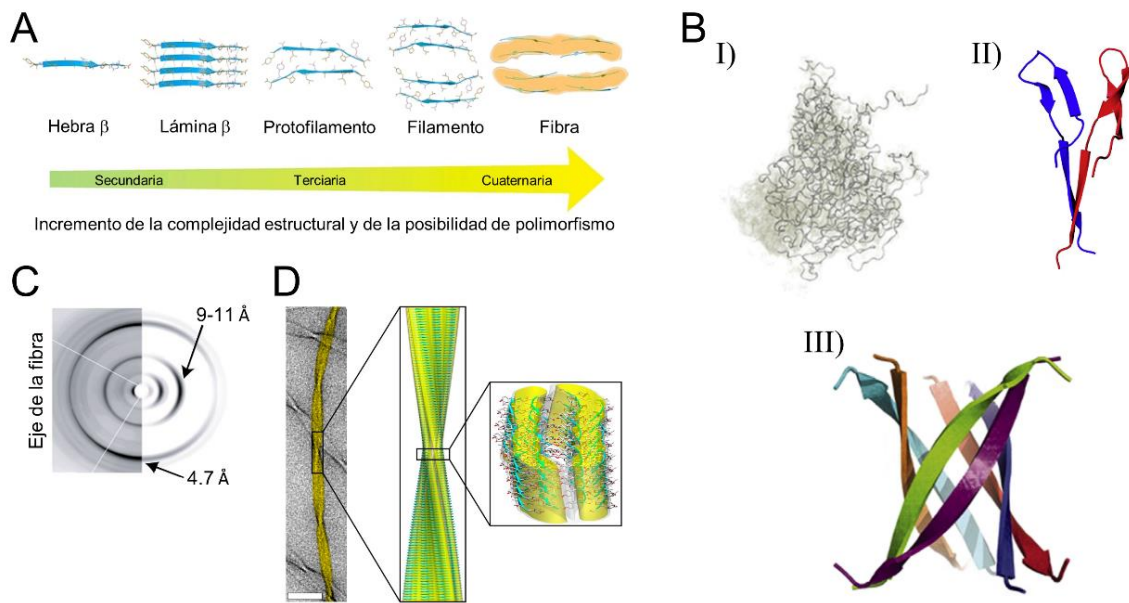


Figura 1.4. Estructuras de las diferentes especies existentes en el proceso de agregación amiloide. (A) Estructuras a resolución atómica de la jerarquía de motivos implicados en el autoensamblaje de las fibrillas amiloides y su polimorfismo. (B) Estructura de diferentes especies oligoméricas amiloides: oligómero desordenado (I) de α S, globular (II) de $A\beta_{42}$ y anular o tubular (III) de α Cristalina. (C) Patrón de difracción de rayos X característico de un agregado con una arquitectura típicamente de lámina β cruzada. (D) Arquitectura de un característico polimorfo amiloide en el que la fibra está compuesta por tres filamentos, cada uno de ellos a su vez formados por pares de protofilamentos con estructura β cruzada, cada uno compuesto por pares de láminas β que interactúan con otros protofilamentos a través de interacciones específicas mediadas por agua establecidas entre las cadenas laterales de los residuos de la proteína que forma el núcleo de la fibra. Esta imagen fue obtenida mediante la combinación de imágenes criomicroscopía electrónica (cryo-EM, por sus siglas en inglés) con análisis de resonancia magnética nuclear de estado sólido (ssNMR, por sus siglas en inglés). La barra de escala en la imagen de cryo-EM es de 50 nm. Figuras adaptadas de Fitzpatrick *et al.*¹⁵¹, Breydo and Ubersky²¹⁵ y Fusco *et al.*²¹⁰.

1.4.2. Toxicidad de los agregados amiloides

Como se dijo anteriormente, la agregación de proteínas es perjudicial para las células de forma directa e indirecta. Indirecta por el agotamiento de la proteína funcional nativa, cuya ausencia implica la inhibición de su función fisiológica; y de forma directa porque el proceso de mal plegamiento puede llevar a que las proteínas adopten conformaciones patógenas dañinas para el organismo. Además, la agregación de una determinada proteína también puede desencadenar la agregación de otras proteínas propensas a ello, multiplicando así el efecto perjudicial^{216,217}. Ya se dijo que la señal de identidad de muchas enfermedades neurodegenerativas es la presencia de cúmulos de proteína mal plegada en forma de agregados amiloides, como los cuerpos de Lewy (LBs, por sus siglas in inglés) en la enfermedad de Parkinson (PD)²¹⁸, o las placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer (AD)²¹⁹. Esto llevó a que durante mucho tiempo se creyese que los acúmulos de fibras amiloides podían ser los responsables de la toxicidad que daban lugar a la enfermedad²²⁰, ya que las especies monoméricas no poseen ninguna toxicidad celular directa a concentraciones fisiológicas¹⁴⁷. Sin

embargo, cada vez más estudios han demostrado que ciertas especies de oligómeros intermedios y fibras aisladas cortas son las especies más dañinas^{57,221–229}. De hecho, se ha encontrado una fuerte correlación entre los niveles de oligómeros amiloides solubles en el cerebro de pacientes con AD y PD y el grado de deterioro cognitivo^{226,230–233}, lo que concuerda con que los oligómeros amiloides solubles interfieren con la función sináptica contribuyendo a la disfunción cognitiva en las enfermedades neurodegenerativas²³⁴. Por otro lado, se ha llegado a proponer que la formación de fibras amiloides podría ser un proceso fisiológico detoxificante ya que ayudaría a la eliminación de especies intermedias solubles más tóxicas¹⁴⁷. Así, los LBs en la PD o las placas amiloides en la AD serían los sumideros detoxificantes de especies amiloides tóxicas.

Se ha propuesto que muchas de las formas oligoméricas que presentan toxicidad poseerían hebras β dispuestas alrededor de una cavidad central, lo que podría favorecer la rotura de la membrana celular y la inducción de apoptosis por el flujo incontrolado de iones tras su inserción en esta membrana a través de un mecanismo similar a poros^{93,194,198,235–240}. Otros grupos apuntan a la desestabilización de la membrana sin la necesidad de la formación de poros específicos en esta^{241–243}. También hay estudios en donde se observa como la interacción de ciertos oligómeros amiloides, en particular los de $A\beta$, con receptores de membrana específicos, podrían ser el origen de sus efectos tóxicos^{244–246}. De hecho, aunque actualmente no está claro el mecanismo exacto por el cual ciertos oligómeros solubles podrían presentar toxicidad, múltiples estudios apunta a que la perturbación de la membrana celular podría ser un paso inicial generalizado en el proceso de neurodegeneración. Esta perturbación, independientemente del mecanismo específico que siga el oligómero en su interacción con la membrana celular, puede dar lugar a una desregulación de la transducción de señales, cambios en la homeostasis iónica en la célula, aumentos en los niveles de calcio intracelular e inducción de estrés oxidativo, probablemente como resultado de la entrada de calcio extracelular e iones metálicos con actividad redox en las células^{237,247–250}.

Aparte de la toxicidad asociada a la interacción entre determinados oligómeros y las membranas celulares, se han propuesto otros efectos citotóxicos producidos por oligómeros amiloides y que contribuirían al mecanismo de neurodegeneración. Entre otros estaría incluida la inducción de estrés oxidativo^{249,251}, disfunción de las mitocondrias^{252,253}, deterioro del complejo de proteasoma²⁵⁴ y bloqueo del tráfico en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi²⁵⁵. Este bloqueo provoca una acumulación de proteínas (de membrana) desplegadas y

mal plegadas, que ya no pueden modificarse de forma postraduccional y/o transportarse a la membrana celular. Este estrés persistente finalmente resulta en autofagia y apoptosis²⁵⁶.

Pese a que diferentes estudios apuntan a que las fibras amiloides presentan una toxicidad muy baja²⁵⁷⁻²⁶⁰, otros estudios han observado que ciertas fibras amiloides sí que pueden presentar toxicidad^{185,261-264}. En estos estudios, los mecanismos de toxicidad observados para las fibras son en muchos casos idénticos a los que se han asociado con las especies oligoméricas²⁶⁵⁻²⁶⁸. Una observación interesante es que las fibras pueden ser una fuente potencial de oligómeros tóxicos, dado el equilibrio termodinámico existente entre fibras, oligómeros y monómeros^{81,229,269,270}. De hecho, estudios *in vivo* han informado de un halo de oligómeros solubles que rodea las placas amiloides²⁷⁰, y dada su naturaleza soluble y difusiva, éstos podrían alcanzar regiones distantes y dar lugar a daños celulares. En una publicación reciente nuestro grupo ha demostrado que esta propiedad de las fibras de liberar oligómeros tóxicos se ve potenciado en el ambiente celular y es la responsable de inducir disfunción neuronal²²⁹.

Las fibras amiloides, por tanto, parece que no son intrínsecamente tan tóxicas como los oligómeros, pero, dado su elevado número, en comparación con las especies oligoméricas, y su capacidad de elongación, podrían tener un papel importante en procesos de propagación de neurodegeneración¹⁵⁴. En este sentido, cabe destacar que las fibras de ciertas proteínas como α S²⁷¹, tau²⁷², o SOD1²⁷³ pueden fragmentarse y transmitirse entre neuronas, llegando así a neuronas sanas en las que actuarán como semillas para desencadenar nuevos procesos de autoensamblaje. Este proceso constituye un mecanismo del proceso neurodegenerativo y favorece que los procesos de agregación amiloide se diseminen por todo el cerebro^{88,274}.

1.5. Amiloidosis o enfermedades relacionadas con la agregación amiloide de proteínas

En la Naturaleza hay diferentes mecanismos para mantener el proteoma soluble, entre los que caben destacar algunos propios de las IDPs, como la presencia de aminoácidos resistentes a la agregación²². También dentro de la célula existe una serie de mecanismos para evitar procesos de mal plegamiento y agregación de proteínas, entre los que se incluyen la acción de chaperonas como las de la familia de las chaperonas de estrés térmico (Hsp70, Hsp90), así como mecanismos de degradación de proteínas, particularmente la ruta del proteasoma y la de autofagia²⁷⁵. Pero estos mecanismos no siempre son lo suficientemente

efectivos o se encuentran comprometidos en condiciones de estrés o envejecimiento, llevando en ocasiones a la formación de especies citotóxicas, y como consecuencia de esto, al desarrollo de ciertas patologías conocidas globalmente como enfermedades por mal plegamiento de proteínas (PMD, por sus siglas en inglés). Entre estas PMD pueden diferenciarse un grupo particular de desórdenes caracterizados por la presencia de agregados amiloides, denominados enfermedades amiloides o amiloidosis. Hoy en día se conocen alrededor de 50 PMD diferentes relacionadas con la acumulación de agregados amiloides¹⁵⁴, que van desde varias enfermedades neurodegenerativas como la AD, la PD o las encefalopatías espongiiformes transmisibles, hasta amiloidosis sistémicas como la amiloidosis de cadena ligera o amiloidosis localizadas como la diabetes mellitus tipo II (T2D, por sus siglas en inglés)¹⁴⁷. La AD, la PD y la T2D por sí solas representaron alrededor de 3 millones de muertes en 2013, lo que constituye el 5.6% de todas las muertes en el mundo²⁷⁶. Y en los países desarrollados, de altos ingresos, la AD se encuentra entre las cinco causas principales de muerte, lo que se convertirá en un problema socioeconómico aún mayor, a medida que la sociedad envejezca y no haya terapia disponible.

En las enfermedades amiloides, el proceso de mal plegamiento de las proteínas se considera un evento causal central que inicia la patología. Esto está respaldado por estudios genéticos, donde las mutaciones que conducen a un aumento de la producción de la proteína o las mutaciones que aumentan la propensión a la agregación de la proteína causan formas graves y de aparición temprana de la enfermedad. Se han descrito alteraciones genéticas asociadas a patologías amiloides por ejemplo para la AD²⁷⁷, PD²⁷⁸, la ALS²⁷⁹ y la enfermedad de Huntington²⁸⁰. En el caso de la AD, este proceso central de agregación de proteínas se denomina cascada amiloide y ya fue formulado en 1992 por Hardy y Higgins²⁸¹.

1.5.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés) es una neuropatía descrita por primera vez en 1817 por el médico inglés James Parkinson, en su “Ensayo sobre la parálisis temblorosa”²⁸². Está considerada como una enfermedad asociada típicamente al envejecimiento y afecta a entre el 1 y el 2% de la población mayor de 60 años, aunque esta proporción sube al 3-4% a partir de 80 años o para individuos con antecedentes familiares^{283,284}. Se desconoce la etiología concreta de la enfermedad en la mayoría de los pacientes, pero se han identificado diferentes causas genéticas en aproximadamente el 5% al 10% de los casos²⁸⁴. En Europa surgen de 9 a 22 nuevos casos por 100 000 habitantes cada año, y Dorse *et al.* estimaron que el

número de pacientes con PD en Europa occidental y los 10 países más poblados del mundo en 2005 era entre 4.1 y 4.6 millones; postulando que para el año 2030 se alcanzaría más del doble, de 8.7 a 9.3 millones^{285,286}, lo que la convierte en el segundo trastorno neurodegenerativo humano más común después de la AD²⁸⁷. Los factores de riesgo incluyen la edad, el factor más importante, el sexo, siendo la incidencia más acusada en varones, con un riesgo moderado²⁸⁸, y algunos factores ambientales, como la exposición frecuente a ciertos pesticidas²⁸⁹. Por contra, otros factores ambientales, como el consumo de cafeína, anti-oxidantes o la toma de antiinflamatorios no esteroideos podrían ser factores protectores de la PD^{284,290}.

La PD se trata de una enfermedad crónica, caracterizada por síntomas que incluyen temblor en reposo en las extremidades, bradiquinesia o lentitud de movimiento, rigidez muscular e inestabilidad postural, así como alteraciones del estado de ánimo, el habla, la memoria y la cognición²⁹¹. Éstos surgen de una pérdida progresiva de neuronas, principalmente de neuronas dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia nigra (SNpc, por sus siglas en inglés), una región del mesencéfalo (Fig. 1.5 A) que participa en el control motor. Esta pérdida está acompañada por la deposición de agregados amiloides de la proteína α S (Fig. 1.5 D) en los conocidos como cuerpos de Lewy (LBs, por sus siglas en inglés) y neuritas de Lewy (LNs, por sus siglas en inglés), que son inclusiones intracelulares sólidas en las neuronas supervivientes^{203,218,292,293}. Estas inclusiones llevan el nombre de Friederich Heinrich Lewy, quien las identificó por primera vez en el tejido cerebral de pacientes con PD, pero existen otras enfermedades con LBs, como la demencia con cuerpos de Lewy (DLB, por sus siglas en inglés)^{294,295}. Las inclusiones se denominan “cuerpos” o “neuritas” dependiendo de si están ubicadas en los cuerpos de las células neuronales o en axones o dendritas, respectivamente, y también tienden a diferir en forma, pero en todos los casos contienen α S agregada como principal constituyente proteico²⁹⁶, junto con varias otras moléculas como chaperonas moleculares, lípidos y componentes de sistemas de degradación de proteínas^{297,298}. Recientemente se ha descrito una gran abundancia de membranas lipídicas en LBs²⁹⁹.

Se estima que alrededor del 70% de las neuronas mueren antes de que se observen los síntomas claros³⁰⁰. En la actualidad, la única forma de un diagnóstico certero es la confirmación post mortem, mediante un examen histopatológico de la pérdida neuronal y la presencia de LBs y LNs²¹⁸. La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra se puede ver fácilmente en el análisis post-mortem del cerebro de un paciente con PD, ya que la región de la sustancia

nigra, que suele ser de color oscuro, está muy desteñida debido a la pérdida celular³⁰¹ (Fig. 1.5 B y C).

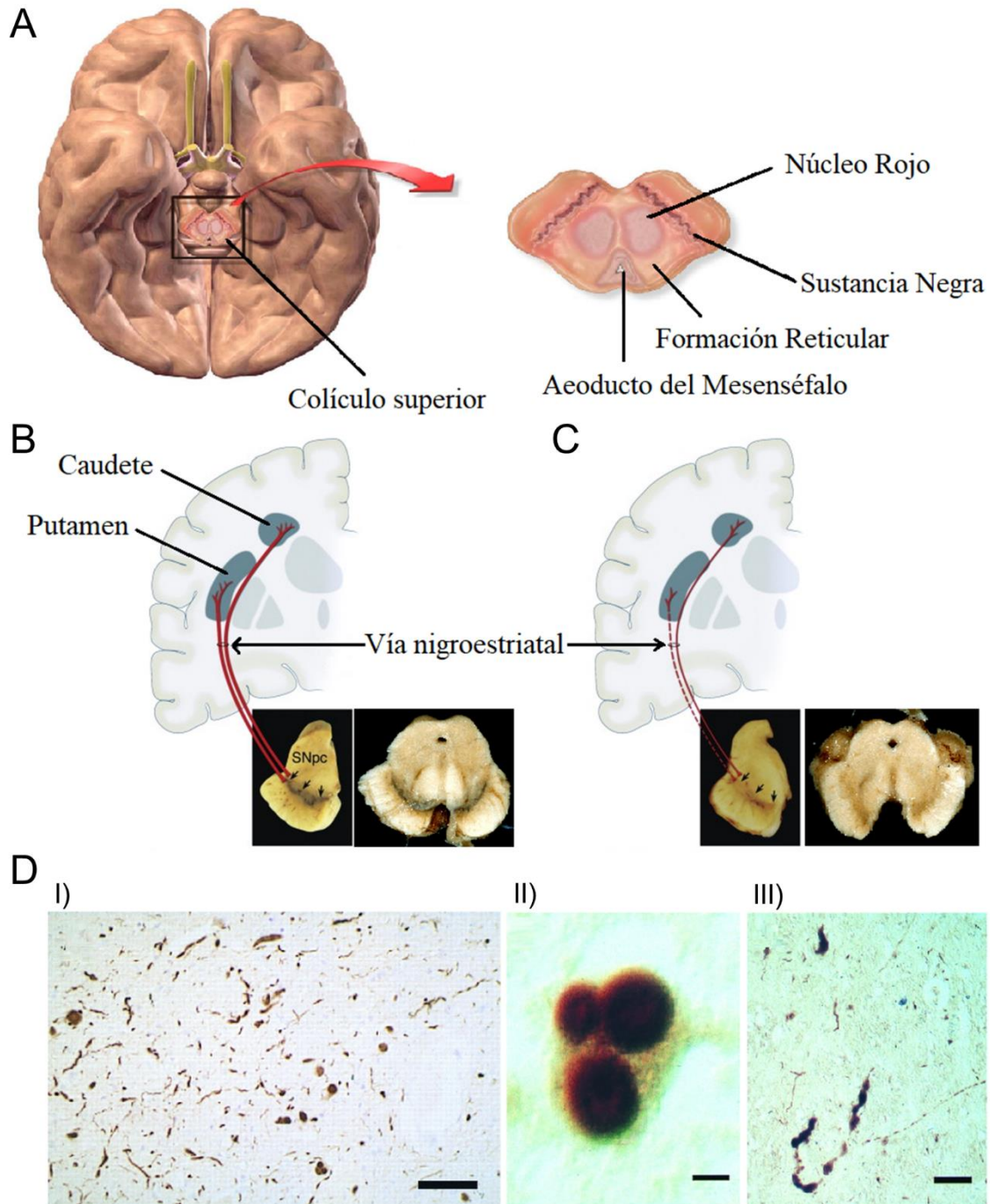


Figura 1.5. Representaciones del cerebro, de una sección de mesencéfalo, representación esquemática de la vía nigrostriatal en estado normal y afectada por enfermedad de Parkinson y corte histológico de la sustancia negra mostrando cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy. (A) Representación del cerebro y de una sección del mesencéfalo en dónde podemos localizar la SNpc. (B) Esquema de la vía nigrostriatal en estado normal (en rojo), compuesta por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares están ubicados en la SNpc (ver flechas). Estas neuronas se proyectan (líneas rojas continuas gruesas) a los ganglios basales y hacen sinapsis en el cuerpo estriado (es decir, el putamen y el núcleo caudado). La fotografía demuestra la pigmentación normal del SNpc, producida por neuromelanina dentro de las neuronas dopaminérgicas. (C) Esquema de la vía nigrostriatal en un paciente de PD (en rojo), en el que se observa la degeneración de la vía nigrostriatal. Hay una marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas que se proyectan al putamen (línea discontinua) y una pérdida mucho más modesta de las que se proyectan al caudado (línea delgada roja sólida). La fotografía demuestra la despigmentación (ver

flechas) del SNpc debido a la pérdida marcada de neuronas dopaminérgicas. (D) Tejido de sustancia negra de paciente con LBD que muestra LBs (I y II) y LNs (I y III) positivos para α S; barras de escala a 100 μ m (I), a 10 μ m (II) y a 90 μ m (III). Figura adaptada de Blausen.com staff (2014). «Medical gallery of Blausen Medical 2014». WikiJournal of Medicine. DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436; de Dauer and Przedborski³⁰²; y de Spillantini *et al.*⁵².

1.6. α -Sinucleína

Como se dijo anteriormente, α S agregada en forma de fibras amiloides es el principal componente de los LBs, lo que ha llevado a la comunidad científica a hipotetizar que los mecanismos moleculares que originan la PD están asociados con la agregación amiloide de α S^{303,304}. Además, en 1997 se descubrió que mutaciones puntuales en el gen SNCA, que codifica α S, están fuertemente asociadas con formas familiares hereditarias, al igual que duplicaciones y triplicaciones del locus de este gen, provocando una aparición temprana de la enfermedad así como una elevada agresividad, lo que aumentó significativamente el interés sobre esta proteína^{278,305}. Además, un estudio de asociación de todo el genoma ha demostrado que individuos con ciertos polimorfismos del gen SNCA, algunos de los cuales se han relacionado con una mayor expresión de α S en neuronas³⁰⁶, tienen un mayor riesgo de desarrollar PD y MSA esporádicos^{307,308}.

α S es una proteína de 140 residuos y 14460 Da que se encuentra intrínsecamente desordenada en su forma nativa, codificada por un único gen que consta de siete exones ubicados en el cromosoma 4³⁰⁹. α S se expresa abundantemente en el cerebro y constituye hasta el 1% de las proteínas del citosol de las neuronas^{310,311}. Fue descrita por primera vez por Maroteaux *et al.* en 1988, tras su estudio con pez *Torpedo californica*, como una proteína neuronal que se localiza en los terminales presinápticos de los axones, así como en el núcleo, lo que llevó a su denominación como sinucleína³¹². Sin embargo, su localización nuclear ha sido debatida a lo largo de los años, e investigaciones en cerebro de rata y humano sugieren su ubicación principalmente en la región citosólica de neuronas³¹³, creyendo que una fracción importante, en torno a un tercio de la misma, se encontraría unida a membranas. En el cerebro humano, α S es abundante en la sustancia negra, el tálamo, la amígdala, el núcleo caudado, el hipocampo y el neocórtex^{310,314} y recientemente también se ha localizado como proteína abundante en el intestino, con una conexión intestino-cerebro, a través del nervio vago, que podría ser relevante para la enfermedad³¹⁵. Se sabe que se localiza específicamente en las terminaciones nerviosas presinápticas, en proximidad con vesículas sinápticas, y por esta razón se la denomina frecuentemente como "proteína presináptica"^{316,317}. Además, se cree que tiene algún papel en la homeostasis de las vesículas sinápticas, aunque su función o funciones

fisiológicas están por concretar^{318,319}. Se ha propuesto que participa en el almacenamiento, transmisión y biosíntesis de dopamina³²⁰, así como en el tráfico³¹¹ y estabilización de vesículas sinápticas³²¹. Además, se le han asociado otras funciones como de ferrireductasa celular³²², de transportador de ácidos grasos entre el citosol y la membrana³²³ o de reguladora del complejo I de la mitocondria³²⁴, aunque el papel de α S en estas otras funciones está por aclararse. Además, se ha propuesto que α S interactúa con al menos 30 proteínas diferentes, lo que se ha relacionado con un papel importante en la señalización celular^{304,325}.

Se ha demostrado la importancia de las sinucleínas en el correcto funcionamiento cerebral. La familia de las sinucleínas en los vertebrados consta de las tres isoformas α -, β - y γ - sinucleínas (Fig. 1.6 A) y de sironetina³²⁶. Se sabe que las funciones de α S pueden ser suplidas, en ausencia de esta, por sus isoformas β -sinucleína (β S) y γ -sinucleína (γ S)³²⁷, habiéndose encontrado que la ausencia de todas las isoformas conduce a una disfunción neuronal dependiente de la edad y muerte prematura, lo que indica que las sinucleínas son contribuyentes importantes para el funcionamiento a largo plazo del sistema nervioso^{328,329}. No obstante, la ausencia de la isoforma α , como consecuencia de su agregación, no es suficiente para explicar los efectos asociados a las alfasinucleopatías (ver apartado siguiente).

1.6.1. Características del monómero de α -sinucleína

La secuencia de aminoácidos de la α S se puede dividir en tres regiones (Fig. 1.6 B) atendiendo a las características que presenta cada una de ellas:

- Región N-terminal

La región N-terminal se encuentra localizada en los residuos 1-60 y posee un gran número de lisinas (Fig. 1.6 A), lo que le confiere carga neta positiva a pH neutro. Además, contiene cuatro repeticiones imperfectas completas de 11 residuos con un motivo hexamérico bastante conservado (KTKEGV), que favorecen que esa sección de la proteína adquiera una conformación de hélice α anfipática (Fig. 1.6 B) en determinadas condiciones³³⁰⁻³³². Las hélices α formadas por estas repeticiones coinciden con precisión con el motivo de hélice de clase A2 de las apolipoproteínas³³³, conocidas por su capacidad de unión de manera reversible a las superficies de las membranas lipídicas³³⁴. De hecho, múltiples estudios confirman que α S se une a las membranas lipídicas³³⁵⁻³³⁸ y lo hace a través de su región N-terminal, que adopta una estructura de hélice α al unirse a estas³³⁹⁻³⁴¹ (Fig. 1.7 A). Cabe destacar también que, en la

región N-terminal podemos encontrar una sección comprendida entre los residuos 45-57, donde se localizan la mayoría de los sitios de mutación patológicos encontrados en pacientes: A30P, E46K, A53T³⁴², H50Q³⁴³ y G51D³⁴⁴, lo que enfatiza la importancia de sus modificaciones en el comportamiento de la α S. Además, en esta región, concretamente en el extremo N-terminal, se encuentra la modificación post-traducciona l más importante de la proteína en su estado fisiológico. De hecho, un 90% de α S se encuentra en células eucariotas acetilado en el extremo N-terminal³⁴⁵.

- Región NAC

La región central de la proteína, del residuo 61 al 95, es conocida como componente β no amiloide (NAC, por sus siglas en inglés), y se caracteriza por su caracter hidrofóbico y su carencia de cargas (Fig. 1.6 A). Esta región tiene predisposición tanto a plegarse en una conformación de hélice α al interactuar con membranas lipídicas altamente cargadas negativamente^{346,347} como consecuencia de la existencia de otras tres repeticiones imperfectas completas de 11 residuos semejantes a las del N-terminal, como a hacerlo en una estructura de lámina β al autoensamblarse³⁴⁸ (Fig. 1.6 B). De hecho, se la considera como la región mínima e indispensable para la agregación de α S y la formación de estructuras en láminas β ^{349,350}. Múltiples estudios estructurales muestran que esta región de la proteína se encuentra formando parte del núcleo de la fibra y que los residuos 1-30 y 110-140 se encuentran móviles y desestructurados^{162,348,351-353}. Esto hace a la región NAC el segmento clave para la agregación de α S, y las alteraciones en su secuencia influyen en su capacidad de autoensamblaje. Ejemplos de la importancia de esta región para la agregación los podemos ver en estudios en que se truncan secciones completas como los 12 residuos que van de los aminoácidos 71 al 82³⁴⁹, o los 9 que van de los aminoácidos 66 al 74³⁵⁴, y que inhiben por completo la agregación; o los aminoácidos 67-71, que llevaron a una reducción significativa en la agregación sin abolirla por completo³⁵⁵. Ciertas mutaciones puntuales en esta región tienen comportamientos similares³⁵⁶, lo que ha llevado a proponer que la región entorno a residuos 68-82 es esencial y suficiente para agregar³⁴⁹.

- Región C-terminal

La región C-terminal de α S se localiza entre los residuos 96 y 140, y posee carga neta negativa como consecuencia de la presencia de 10 residuos de ácido glutámico y 5 de ácido aspártico (Fig. 1.6 A). Debido a la alta densidad de carga y a la presencia de 5 residuos de

prolina, esta región permanece desordenada en todas las conformaciones de la proteína hasta ahora descritas³⁵⁷⁻³⁶⁰, y es responsable de su termosolubilidad³⁶¹. En la estructura de las fibras amiloides, por tanto, esta región permanece desordenada decorando la superficie de las fibras, lo que muy probablemente resulte en una desestabilización de la estructura fibrilar por repulsiones electrostáticas entre estas regiones. De esta manera, la eliminación de esta región favorece el autoensamblaje³⁶² y ha sido relacionada con un estado patológico, ya que se han encontrado fragmentos truncados del C-terminal en LBs de pacientes de PD y DLB³⁶³.

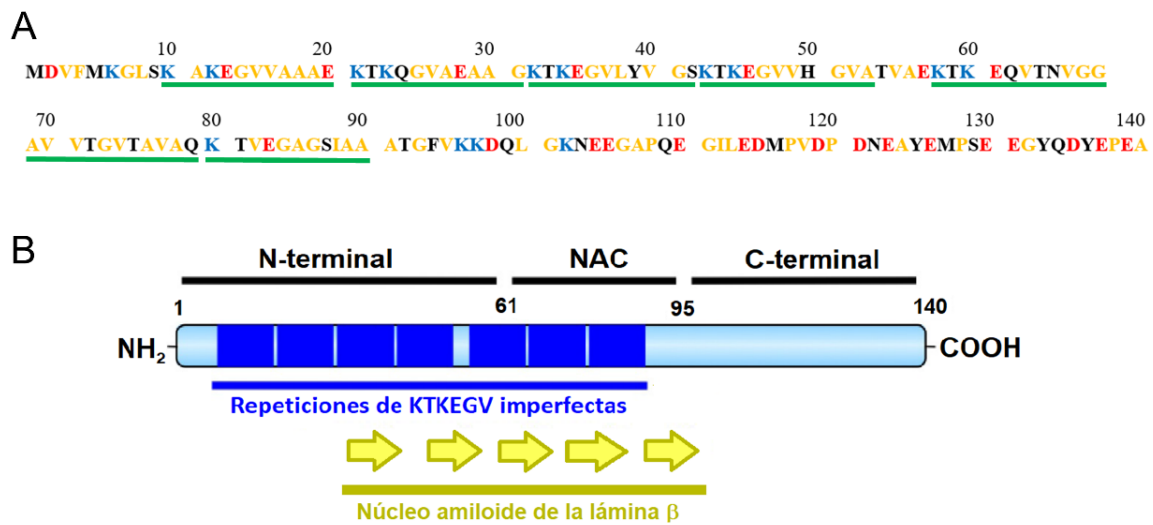


Figura 1.6. Secuencia de α -sinucleína y regiones en las que se divide. (A) Secuencia α S con las 7 repeticiones imperfectas de KTKEGV subrayadas en verde, las lisinas (cargadas positivamente) en azul, los ácidos aspárticos y glutámicos (cargados negativamente) en rojo y los residuos hidrofóbicos en amarillo. (B) Representación esquemática de las regiones de la α S, localización de los siete motivos imperfectos (en azul) de secuencia KTKEGV repetidos entre los primeros 100 residuos N-terminales de esta proteína y las cinco regiones (en amarillo) que se determinaron que adquirirían estructura en hebra β en un polimorfo de fibra amiloide³⁶⁴. Figura adaptada de Cremades *et al.*²⁰³.

Las propiedades específicas de cada una de estas regiones determinan el comportamiento global de la proteína. Por ejemplo, la isoforma β S (Fig. 1.7 A) tiene un elevado grado de identidad de secuencia en la región N-terminal, pero varía en el segmento 73-83 de la región NAC, que se encuentra ausente en esta isoforma, lo que impide su agregación^{317,349,365}. γ S presenta también una alta identidad de secuencia en la región N-terminal, pero varía significativamente en la región NAC y C-terminal, en todo caso, altamente acídica, lo que también resulta en una reducción muy considerable de su agregación^{348,365-368}. De hecho, se ha observado que la introducción de mutaciones en la región NAC de β S, con intención de asemejarla más a la de α S, puede promover que la β S agregue *in vitro* en las mismas condiciones en que lo hace su homólogo α S³⁶⁹. Así mismo, tampoco se han identificado agregados de β S ni de γ S en las inclusiones de proteína de los LBs ni de las LNs en pacientes

de PD o de LBD^{365,370,371}. Además, cabe destacar que en presencia de βS y γS se observa la inhibición de la agregación *in vitro* de αS ^{367,372}.

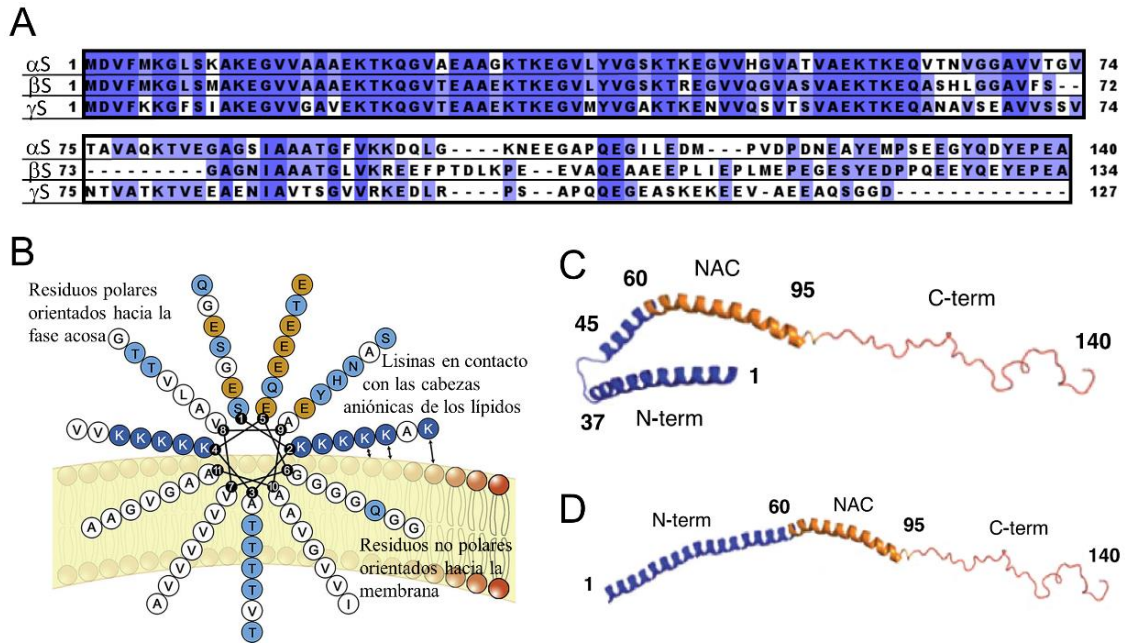


Figura 1.7. Comparativa de las secuencias de las sinucleínas α , β y γ ; proyección de rueda helicoidal de α -sinucleína y estructuras en hélice α de α -sinucleína al unirse a membranas lipídicas. (A) Comparación de las secuencias de aminoácidos de las sinucleínas α , β y γ en las que se muestran los residuos conservados en cada secuencia, siendo el tono más oscuro de azul el que corresponde a posiciones en donde se conserva el aminoácido y el blanco el de posiciones donde no se conserva. (B) Rueda con las 7 repeticiones imperfectas de KTKEGV en donde se muestran las lisinas (cargadas positivamente) en azul y los residuos de glutámico en naranja. αS interactúa principalmente a través de interacciones electrostáticas entre residuos de lisina y grupos de cabeza lipídica cargada negativamente, así como interacciones hidrofóbicas entre residuos no polares y las cadenas de acilo alifáticas. (C) Conformación en herradura de αS con estructura secundaria en hélice α ; se encuentra dividida en dos hélices, N-hélice (3-37) y C-hélice (45-92), separadas por un bucle desordenado (38-44). (D) Conformación de hélice extendida de αS con estructura secundaria en hélice α ; con una hélice continua que abarca los primeros residuos ~ 90 . Figuras adaptadas de Choi *et al.*³⁷³, Ulmer *et al.*³⁷⁴, Robotta *et al.*³⁷⁵ y Georgieva *et al.*³⁴⁰. La estructura C puede encontrarse en el PDB³⁷⁶.

Como se dijo anteriormente, se ha propuesto que la región NAC es el segmento clave en la agregación amiloide de la sinucleína, por lo que el control de las interacciones de regiones NAC de diferentes monómeros entre sí sería fundamental para mantener a la proteína en estado monomérico. En principio, dado el carácter no polar de esta región, cabe esperar que tiendan a interactuar entre sí preferentemente antes que con el solvente acuoso. Sin embargo, se desconocen los residuos concretos y el tipo de interacciones que facilitan los primeros contactos entre moléculas de αS . En este mismo sentido, y a nivel de monómero, se ha observado que la región C-terminal en la conformación desordenada de αS estaría estableciendo interacciones transitorias de largo alcance con las otras dos regiones de la proteína, protegiendo así a la región NAC del solvente acuoso y evitando su autoensamblaje^{377,378}. Este podría ser un mecanismo de protección desarrollado evolutivamente

por la proteína para evitar su agregación en condiciones fisiológicas³⁷⁹. Estas interacciones transitorias de largo alcance se podrían dar en condiciones fisiológicas entre la región 120 a 140 del C-terminal y el segmento 30 a 100 comprendido entre las regiones N-terminal y NAC³⁷⁹⁻³⁸¹. Es por ello que, cuando la interacción entre el C-terminal y las otras dos regiones de la proteína se debilita por un pH bajo, o por la adición de policationes o un aumento de la fuerza iónica de la solución, aumenta la exposición de la región NAC y se observa una aceleración de la agregación^{362,382}.

Se han observado repeticiones de secuencia en diferentes proteínas asociadas con enfermedades neurodegenerativas. La huntingtina, relacionada en su forma expandida con la enfermedad de Huntington, normalmente contiene una repetición de poliglutamina. Existe una fuerte correlación entre la longitud del tracto de poliglutamina expandido, la edad de inicio de la enfermedad y la tasa de formación de fibras *in vitro* por péptidos modelos que contienen poliglutamina^{29,30}. Tau, una proteína asociada con la demencia frontotemporal y la AD, también contiene repeticiones que afectan su tasa de polimerización^{383,384}. Otro ejemplo se da en una forma de enfermedad genética por priones que es causada por la inserción de copias adicionales de una repetición de octapéptidos cerca del extremo N-terminal de PrP³⁸⁵⁻³⁸⁷. No se conocen las funciones biológicas de estas repeticiones en la secuencia de ciertas proteínas, pero se cree que han de tenerlas al haberse conservado evolutivamente. En el caso de α S, a lo largo de las regiones N-terminal y NAC, su secuencia presenta un total de 7 repeticiones imperfectas completas de 11 residuos con un motivo conservado KTKEGV. Como se dijo antes, 4 de estas repeticiones se encuentran en la región N-terminal y las otras 3 se extienden a lo largo de la región NAC³³⁰. Estas 7 repeticiones favorecen que, en contacto con interfases hidrofóbicas/hidrofílicas (interfases H/H), la proteína adquiera una conformación de hélice α en la que los residuos más hidrofóbicos se disponen preferentemente en una cara, limitada por dos bandas laterales de lisinas (cargadas positivamente), y opuesta a una cara en la que se disponen preferiblemente los residuos más hidrofílicos (Fig. 1.7 B), lo que aporta a la hélice un fuerte carácter anfipático³⁸⁸. Estas hélices anfipáticas son fundamentales para permitir la unión de la α S a membranas lipídicas, lo que formaría parte de sus funciones fisiológicas^{325,389}. La hélice puede aparecer como una hélice extendida^{340,390} (Fig. 1.7 C) entre los residuos 3 y 92, generalmente cuando el área de la membrana es lo suficientemente grande y no presenta demasiada curvatura. En presencia de vesículas lipídicas pequeñas, con una gran curvatura, como es el caso de las vesículas sinápticas, la proteína adopta una estructura en hélice de herradura³⁷⁴ (Fig. 1.7 D) con dos hélices que abarcan los residuos 3-37 y 45-92, separadas por un bucle que

abarca los residuos 38-44. Se conoce la estrecha relación que existe entre la α S y las vesículas sinápticas^{318,319}, cuya membrana externa está formada por lípidos entre los que destacan colesterol, fosfolípidos fosfatidilcolina (32%), fosfatidilserina (12%), fosfatidiletanolamina (54%), fosfatidilinositol (2%) y esfingomielina³⁹¹. Dada la elevada afinidad de la proteína por este tipo de vesículas, su unión genera un complejo estable sin que se promueva la agregación de la proteína^{392,393}. Se sabe además que α S se une preferentemente a lípidos aniónicos en comparación a los neutros^{330,394-396}, lo que tiene sentido dadas las características bandas de lisinas alineadas a cada lado de la hélice formada (Fig. 7 B), favoreciendo su interacción con las cabezas cargadas negativamente de los lípidos aniónicos de las membranas con las que interacciona^{373,397}.

1.6.2. Características de los agregados amiloides de α -sinucleína

Una vez se relacionó la agregación amiloide de α S con la PD⁵², se multiplicaron tanto los estudios orientados a caracterizar este proceso, como los que pretendían caracterizar estructuralmente y bioquímicamente los propios agregados.

El proceso de agregación amiloide de α S se ha podido reproducir *in vitro*, en el tubo de ensayo, y las fibras amiloides generadas eran, *a priori*, morfológicamente, tintorialmente y bioquímicamente indistinguibles de las que se habían encontrado en pacientes¹⁹³, aunque como se ha visto muy recientemente por comparación de estructuras tridimensionales obtenidas por cryo-EM, existen diferencias estructurales importantes³⁹⁸. Los estudios *in vitro* permiten controlar los factores que dan origen a la agregación y seguir el proceso de mal plegamiento, lo que aporta gran información de las condiciones en que se generan los agregados y los detalles del mecanismo en sí^{107,184,399}. Con el reciente desarrollo logrado en técnicas de determinación estructural como la resonancia magnética nuclear de estado sólido (ssNMR, por sus siglas en inglés)¹⁶⁶ o la cryo-EM^{400,401}, se han podido resolver varias estructuras a resolución atómica de diferentes polimorfos de fibras de α S generadas *in vitro* con proteína recombinante (Fig. 1.8 D). En la mayor parte de los estudios llevados a cabo se ha comprobado que el núcleo de la fibra se encuentra comprendido aproximadamente entre los residuos 35 y 100^{162,166,351,400}. Sin embargo, se han observado diferencias estructurales significativas entre la variedad de polimorfos de fibras estudiados. El número y la ubicación de las hebras β dentro de esta región varía de unos polimorfos a otros, según las condiciones de la solución en que se han generado. La fuerza iónica, la presencia de polianiones o el pH de la solución son los principales factores

para la variabilidad de la estructura de las fibras, lo que muestra la relevancia de las interacciones electrostáticas en las fuerzas intramoleculares e intermoleculares que definen la estructura general de los diferentes polimorfos amiloides⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Pese a esta variedad de configuraciones de las hebras β en el protofilamento y las diferencias que surgen en el empaquetamiento de estos dentro del filamento, en algunas estructuras, el núcleo del protofilamento es similar, con una estructura de llave griega^{400,404} (Fig. 1.8 D). Entre toda la diversidad de polimorfos cabe destacar que los típicamente obtenidos *in vitro* en PBS con un pH entonto a 7.4 por agitación a 37 °C poseen una morfología alargada formada por dos filamentos que pueden enrollarse entre sí presentando o no una simetría de giro o simetría helicoida levógira (Fig. 1.8 B). Que presente o no esta simetría de giro depende del empaquetamiento de los dos protofilamentos que forman el filamento, que al acoplarse para dar la fibra llevarán a que esta presente una u otra morfología³⁶⁴ (Fig. 1.8 A). Es importante resaltar que diversos estudios han investigado el comportamiento de polimorfos amiloides de α S generados *in vitro* tanto en cultivos celulares como en animales, mostrando la variedad de capacidades de sembrado y propiedades neurotóxicas de los diferentes polimorfos analizados^{88,185,229,262}. Estos y otros estudios apuntan a la idea de que las diferentes conformaciones de los polimorfos de α S contribuyen al tipo de enfermedad neurodegenerativa que presenta el paciente, así como al pronóstico de la enfermedad; lo que ha llevado a establecer una relación entre polimorfo amiloide de α S y tipo de sinucleinopatía específica.

Recientemente se han resuelto las estructuras de fibras amiloides de α S extraídas post mortem de muestras de pacientes⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁹, y, muy recientemente, se ha reportado que las fibras generadas en reacciones de siembra *in vitro* con núcleos de fibras obtenidas de pacientes no mantienen las propiedades estructurales de las fibras parentales, sino que se asemejan más a las estructuras amiloides generadas *in vitro*⁴¹⁰. A partir de estos hallazgos cabe preguntarse si los agregados amiloides generados *in vitro* a partir de α S recombinante son realmente comparables a los que se extraen de pacientes con diferentes sinucleinopatías. En un estudio reciente se comparó mediante cryo-EM la estructura de las fibras de las inclusiones de α S extraídas post mortem del putamen de pacientes con atrofia multisistémica (MSA, por sus siglas en inglés) con las extraídas post mortem de la corteza y la amígdala de pacientes con DLB, sin tratamiento previo de amplificación. Los resultados que arrojaron este estudio son muy interesantes: todos los agregados analizados extraídos de pacientes con MSA tenían estructuras similares entre sí, muy diferentes a los agregados extraídos de pacientes de DLB, y en ambos casos notablemente

diferentes a los polimorfos formados *in vitro* con proteínas recombinantes que han sido reportados hasta la fecha³⁹⁸. A semejantes conclusiones llegaron en un estudio anterior en que también analizaban, aunque con menor resolución mediante resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) y resonancia paramagnética de electrones (EPR, por sus siglas en inglés), agregados amiloides extraídos de muestras de cerebro de pacientes con MSA y con PD⁴⁰⁵. Lo que lleva a destacar la urgente necesidad de encontrar condiciones de agregación de α S *in vitro* que realmente emulen las vías de agregación que se desarrollan *in vivo*, en el interior de la célula, para cada sinucleinopatía. Además, debemos recordar que la diversidad de polimorfos, sobre todo los que son muy divergentes, podría deberse a la existencia de una variedad de rutas de agregación amiloide que podrían tener diferentes mecanismos de nucleación primaria que impongan una estructura significativamente diferente en los primeros núcleos de agregación y que, por tanto, diferentes rutas se encuentren favorecidas en diferentes condiciones patológicas, algunas de las cuales no tienen por qué generar las típicas fibras amiloides largas.

1.6.3. Características de las especies oligoméricas pre-fibrilares de α -sinucleína

Tras la multitud de estudios llevados a cabo para aislar y caracterizar especies intermedias en el proceso de agregación de α S^{81,93,199–202,204,207,411}, caben destacar dos tipos de oligómeros que han podido ser descritos en mayor detalle: un tipo de oligómeros predominantemente desestructurados y benignos¹⁹² (Fig. 1.8 C I) y otros con cierto grado de estructura en lámina β y tóxicos⁹³ (Fig. 1.8 C II). Además, mediante el uso de técnicas de molécula única se ha podido observar la conversión de las especies inicialmente formadas, desestructuradas y no tóxicas, en oligómeros más estables, resistentes a proteinasa K, más compactos y altamente tóxicos, antes de la formación de fibras⁸¹. Estos oligómeros desestructurados pueden ser atrapados cinéticamente bloqueando la fibrillogénesis α S por medio de un compuesto polifenólico llamado epigallocatequina-3-galato, que evita la conversión conformacional de la proteína desde su desestructuración inicial a una estructura amiloidogénica de lámina β ^{192,412}. Estas especies oligoméricas no son tóxicas^{192,412}, a pesar de que son capaces de unirse a membranas lipídicas⁴¹³. Por otro lado, mediante la liofilización de soluciones de proteína, se ha logrado atrapar y enriquecer muestras que contienen un tipo de especies oligoméricas tóxicas^{93,199,202,204,207}, lo que ha permitido su caracterización estructural y biofísica detallada⁹³. Estas especies enriquecidas están formadas por oligómeros con un rango de tamaños promedio de aproximadamente 25-30 moléculas de proteína^{93,199,414}. Con un

contenido de lámina β intermedio entre el de los monómeros intrínsecamente desordenados y el de la estructura fibrilar⁹³. Se ha encontrado que estos oligómeros tienen una estabilidad notable^{93,207} y pueden asociarse con bicapas lipídicas induciendo permeabilidad en la membrana^{93,415} mediante el plegamiento de las regiones N-terminales en hélices α anfipáticas y la inserción del núcleo pequeño y flexible de lámina β en la bicapa lipídica²¹⁰.

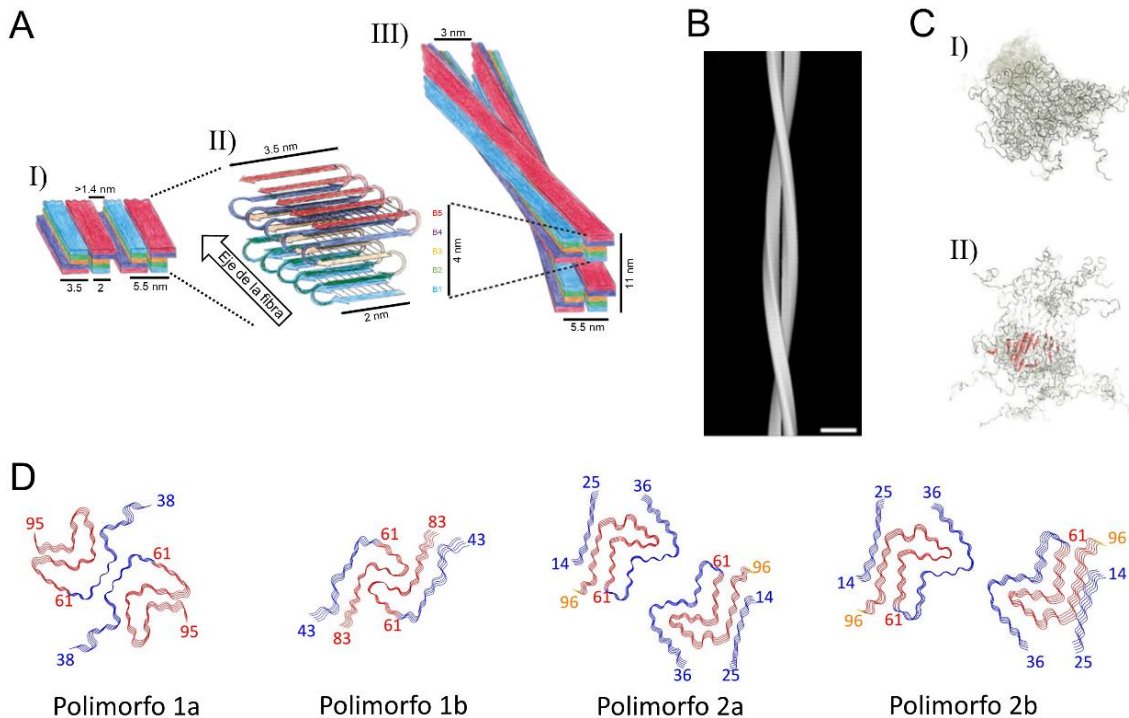


Figura 1.8. Estructuras de diferentes especies autoensambladas de α -sinucleína. (A) Esquema de un posible pliegue propuesto para α S monomérica dentro de un protofilamento (b) y de la incorporación de un protofilamento en una fibra recta (a) y una con simetría de giro (b). (B) Representación en 3D de una fibra de α S medida por cryo-EM, barra de escala: 10 nm. (C) Estructuras de RMN de los oligómeros tipo A (I) y tipo B (II) de α S. (D) Estructuras de los polimorfos de α S resueltas por cryo-EM. Figuras adaptadas de Vilar *et al.*³⁶⁴, Fusco *et al.*²¹⁰ y Guerrero-Ferreira, R. *et al.*⁴⁰¹.

1.7. Mecanismos de nucleación primaria en α -sinucleína

Si la formación de los núcleos amiloides en el proceso de agregación del monómero se da sin la intervención de fibra amiloide previamente formada, estaríamos ante un proceso denominado nucleación primaria. Este, como cualquier proceso de nucleación, podría darse tanto en el seno de la solución, referido como nucleación homogénea, como sobre una superficie o interfase de características específicas capaz de catalizar la interacción entre monómero-monómero, referido como nucleación heterogénea⁶⁷. Para el caso de α S, no se había reportado ningún estudio experimental que asegurase haber logrado la agregación *in vitro* a través de una etapa de nucleación homogénea⁴¹⁶ hasta la presente tesis. De hecho, los ensayos *in vitro* típicamente utilizados en la actualidad para estudiar agregación amiloide favorecen la nucleación heterogénea de las proteínas/péptidos^{120,417,418}.

En particular, las interfases H/H parecen ser fundamentales para acelerar la nucleación primaria en un gran número de proteínas y péptidos amiloidogénicos relacionados con enfermedades, como α S^{120,416}, el péptido A β ⁴¹⁹ o insulina⁴²⁰. La tendencia natural de estas proteínas y péptidos, ya sea desplegadas o en elementos estructurales helicoidales, a presentar anfipaticidad, explica que tiendan a adsorberse en las interfases H/H. De esta manera maximizan simultáneamente las interacciones hidrofílicas con el ambiente acuoso y las hidrofóbicas con la superficie hidrofóbica³³². Es en este tipo de interfases donde estas proteínas iniciarían su autoensamblaje^{120,416,419,421,422}, lo que hace que el inicio de la nucleación primaria heterogénea dependa en gran medida de las afinidades relativas de las diferentes especies de proteínas (monoméricas frente a oligoméricas) por la interfase. Como se ha dicho varias veces, la alta barrera energética que suele presentar el proceso de nucleación homogénea constituye el paso limitante en los procesos de agregación. En la nucleación primaria sobre una interfase, la barrera de energía libre asociada a la nucleación se reduce considerablemente, probablemente, en parte, por un aumento en la concentración local de proteína y a una selección de orientaciones adecuadas y conformaciones propensas a la nucleación de las cadenas polipeptídicas en la interfase¹²⁰. De hecho, se ha demostrado que en condiciones diluidas, a pH, temperatura y fuerza iónica fisiológicas, en el péptido A β y en α S, la nucleación primaria heterogénea domina sobre la nucleación homogénea^{416,419}. La agregación de estos polipéptidos, por ejemplo se veía favorecida por la presencia de barras magnéticas de agitación de la muestra, típicamente recubiertas de material hidrofóbico, o de bolas de politetrafluoroetileno (PTFE), o incluso por las paredes del propio recipiente contenedor de la muestra^{416,419}. Así mismo, la interfase aire/agua (A/W, por sus siglas en inglés) puede actuar también como una interfase H/H y promover la nucleación amiloide *in vitro* en soluciones de proteínas¹²⁰. Otro sistema que *a priori* incluiría otro tipo de interfase H/H serían las vesículas lipídicas, aunque, para el caso de α S, las composiciones lipídicas fisiológicas no favorecen su agregación, sino que ésta sólo es favorecida en presencia de vesículas lipídicas pequeñas o grandes compuestas en su totalidad por lípidos cargados negativamente y con cadenas de hidrocarburos cortas, como son los lípidos 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DMPS, por sus siglas en inglés) o 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DLPS, por sus siglas en inglés)⁴²³, evitando la presencia de sales adicionales al tampón fosfato⁴²². La especificidad de la agregación de α S por este tipo de vesículas y por su composición tan especial se desconoce en la actualidad, así como su posible relevancia fisiológica.

Por otro lado, la elevada dinámica conformacional de α S, y en general de las IDPs, podría ser un factor importante a la hora de determinar la propensión de la proteína a nuclear en agregados amiloides. En condiciones en las que la proteína tenga una velocidad de intercambio conformacional superior a la velocidad de encuentro entre moléculas de proteína, se dificultaría el establecimiento del número adecuado de interacciones intermoleculares necesarias para el proceso de autoensamblaje. Esta elevada dinámica de reconfiguración conformacional está, como ya se dijo, asociada a las propiedades de la capa de hidratación y por ello a las condiciones de la solución, de tal manera que determinados cambios en la solución pueden ralentizar las dinámicas de reconfiguración de los monómeros, y con ello favorecer la asociación entre éstos en el tiempo necesario. Factores que pueden disminuir la movilidad del agua, y con ello la de la capa de hidratación y la de la proteína, serían por ejemplo la presencia de iones⁴²⁴, osmolitos^{425,426}, membranas o por aglomeración celular o un entorno celular con escasa actividad del agua⁴²⁷. Un estudio propuso que éste era un factor clave para la nucleación primaria de α S y que la agregación de la proteína se veía favorecida al disminuir el pH debido a una reducción de la tasa de reconfiguración del monómero en esas condiciones⁴²⁸. De hecho, en ese mismo estudio se sugiere que las tasas relativas entre la reconfiguración de la cadena principal de la proteína monomérica y la asociación bimolecular es lo que dicta la probabilidad y, por lo tanto, la tasa de autoensamblaje amiloide inicial. Estos estudios, sin embargo, no tienen en cuenta que la nucleación en las condiciones experimentales que se estudiaron ocurre en la interfase A/W y que, por tanto, los tiempos de reconfiguración del monómero serán muy diferentes en la interfase a los que se midieron en el seno de la solución, ya que se asumió erróneamente que la agregación tenía lugar mediante nucleación homogénea.

2. Objetivos

El presente trabajo se enmarca en la agregación amiloide de α S y pretende ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares y factores que inician el autoensamblaje, así como determinar las diferentes rutas de agregación amiloide de esta proteína, con el fin último de identificar aquellas que tengan mayor relevancia fisiológica. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Identificar los factores extrínsecos desencadenantes de la agregación, para lo cual pretendíamos hacer un barrido de las condiciones experimentales que llevan a la agregación de la proteína, un estudio estructural y morfológico de los agregados finales, y una búsqueda de condiciones reproducibles *in vitro* que sean fisiológicamente relevantes.
- Caracterizar los diferentes mecanismos de agregación identificados y determinar si la proteína puede agregar mediante una nucleación homogénea y en qué condiciones se vería favorecida.
- Establecer relaciones entre los diferentes mecanismos de nucleación identificados con el fin de establecer las rutas principales de agregación de α S.
- Desentrañar el papel de las diferentes regiones de la proteína en la nucleación heterogénea de formación de agregados amiloides con el fin de proponer un modelo mecanístico de este tipo de nucleación.

3. Materiales y métodos

3.1. Preparación de las muestras de proteína

3.1.1. Expresión y purificación de las diferentes variantes de α -sinucleína

El gen que codifica para la proteína α S humana, tanto el tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés), como el de las deleciones Δ 2-9 y Δ 103-140, así como el de la proteína β S humana WT, se encuentra insertado en el plásmido pT7-7 (pT7-7 asyn; Addgene, Teddington, Reino Unido). Los plásmidos con los genes que codifican para las variantes de α S humana con las deleciones Δ 1-29, Δ 4-64 fueron amablemente cedidas por el profesor Arturo Muga y por la Dra. Begoña Sot⁴²⁹, respectivamente. La expresión de las diferentes variantes se realizó en cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Para ello, primero se transformaron las bacterias mediante choque térmico, incubando 25 μ L células y 1 μ L del plásmido que contenía el gen que codificaba cada una de las variantes de proteína a 42 °C durante 20 segundos e inmediatamente después incubando la mezcla en hielo durante 2 minutos. Tras el choque térmico, las muestras de células se resuspendieron en 500 μ L de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora para que se recuperasen del choque térmico. Finalmente se sembró una placa que contenía LB con agar y 100 μ g/mL de ampicilina (Amp) con 200 μ L de células con el fin de poder seleccionar una única colonia tras la incubación de la placa a 37 °C durante la noche. Se seleccionó una colonia de esta placa y se preparó un precultivo en medio LB con 100 μ g/mL de Amp que se incubó a 37 °C y 220 rpm de agitación durante unas 10 h. Al día siguiente se escaló el cultivo inoculando 30 mL del precultivo por cada a 1 L de medio LB con 100 μ g/mL Amp. Se dejó crecer a 37 °C y 200 rpm hasta una densidad óptica a 600 nm de entre 0.6 y 0.9 y, a continuación, se indujo la expresión de la proteína añadiendo isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido a los cultivos hasta una concentración final de 1 mM. Estos se dejaron incubar durante unas 10 h a 28 °C y 200 rpm. Al día siguiente los cultivos celulares se centrifugaron en tubos de centrifugación de 500 mL durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman Coulter (Beckman; California, EEUU) con un rotor JA-10 (Beckman; California, EEUU) a 9700 rpm (16 650 g) y se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), un tampón con 10 mM de fosfato de sodio y 150 mM de cloruro de sodio (NaCl) con un pH de 7.4, para eliminar los restos del medio. Las células se resuspendieron en 20 mL de tampón de lisis por cada litro de cultivo. El tampón de lisis estaba compuesto por una solución de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a 1 M a un pH de 7.7 con 0.5 M de ácido etilendiaminotetraacético y coctel inhibidor de proteasas cOmplete™ (Merck, Darmstadt, Alemania). A continuación, se indujo la rotura de las membranas celulares por ultrasonicación en baño de hielo, con 7 ciclos de 1 minuto de duración, con 1 minuto de

recuperación entre ciclos, utilizando un ultrasonicador Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processors (SONICS®, Connecticut, EEUU). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13000 rpm (20 442 g) a a 4°C en una centrífuga Beckman Coulter (Beckman; California, EEUU) con un rotor JA-20 (Beckman; California, EEUU). El sobrenadante, con el contenido citoplasmático de las células (extracto crudo), se incubó en un baño a 95 °C durante 20-25 minutos. Al ser una IDP, α S permanece soluble a temperaturas tan elevadas a diferencia de un gran número de proteínas del extracto crudo que, en tales condiciones, precipitan. El resultado de la incubación se volvió a centrifugar con el mismo protocolo que antes y el sobrenadante se trató con sulfato de estreptomicina, añadiendo 10 mg por cada 1 mL de extracto crudo, para precipitar el ADN presente en la solución. Tras incubar durante 15 minutos a 4 °C con una leve agitación, se eliminó el precipitado de ADN por centrifugación en las mismas condiciones que en el paso anterior. Este proceso de precipitación de ADN se repitió una vez más para maximizar la eliminación de ADN de la muestra. Posteriormente, se realizó una precipitación salina añadiendo 361 mg de sulfato amónico por cada 1 mL de solución proteica, y se incubó durante 30 minutos a 4 °C y con agitación suave. Tras centrifugar la muestra en las mismas condiciones que antes, α S se encontraba esta vez en el precipitado, que fue resuspendido en 6-7 mL de Tris a 25 mM, a un pH de 7.7 por cada litro de cultivo ,y posteriormente, dializado frente a 2 L de tampón de diálisis (Tris a 25 mM, pH 7.7) con una membrana de 3500 Da de poro. La diálisis se realizó a 4°C. La solución de 2 L de diálisis se cambió dos veces tras 2-10 h de intercambio por paso de diálisis. A continuación, la muestra de proteína se filtró por una membrana de 0.2 μ m de paso y, dependiendo de la variante de proteína a purificar, se cargó en una columna cromatográfica de intercambio aniónico HiPrep™ Q FF 16/10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). La elución de α S se llevó a cabo en Tris a 25 mM, con un pH de 7.7 con un gradiente de 1.5 M de NaCl. La muestra de proteína eluida se concentró mediante filtros de 15 mL 10 kDa (Merck, Darmstadt, Alemania), posteriormente se filtró por una membrana de 0.2 μ m de paso 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 de la elución asignadas a α S monomérica y se confirmó su identidad y pureza a través de la medición de la masa real de la proteína por medio de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) en el SCT de Proteómica del CIBA (IACS-Universidad de Zaragoza). El proceso de purificación se basa en protocolos previamente descritos^{430,431}.

La variante α S WT Δ 103-140 se purificó con un protocolo similar al anteriormente descrito salvo que en el paso de cromatografía de intercambio iónico se utilizó una columna de intercambio catiónico, concretamente una columna HiTrapTM SP HP de 5 mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

Para la variante N-terminal acetilada de α S WT, se llevó a cabo una transformación doble simultánea con el plásmido pT7-7 asyn y el plásmido pNatB (pACYduet-naa20-naa25; Addgene, Teddington, Reino Unido). La sobreexpresión y purificación de esta variante se realizó tal y como hemos descrito para la WT.

La concentración de las diferentes variantes de proteína generada fue determinada en todos los casos espectrofotométricamente por medida de la absorbancia a 275 nm, usando un coeficiente de extinción molar de $5600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para todas las variantes, excepto α S WT Δ 4-64 y α S WT Δ 103-140, para las que se usaron los coeficientes de extinción molar de $4200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y $1400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente^{93,432}. Las soluciones puras de proteína se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron en alícuotas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Las alícuotas de proteína se descongelaron generalmente una única vez para su utilización y por norma general se filtraron con filtros de 0.5 mL y 100 KDa (Merck, Darmstadt, Alemania) como paso previo a su utilización en experimentos de cinéticas de agregación.

3.1.2. Preparación de núcleos de fibras amiloides para experimentos de siembra

Las muestras de fibras amiloides de α S fueron inicialmente generadas con proteína a $100 \text{ } \mu\text{M}$ en PBS. Soluciones de proteína de $300 \text{ } \mu\text{L}$ en viales de 1.5 mL se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 300 rpm de agitación durante 4-5 días. Posteriormente se eliminaron los restos de monómero de la muestra mediante lavados de las fibras en el tampón deseado. Para ello, las muestras de fibras se ultracentrifugaron durante 90 minutos a $120\,000 \text{ rpm}$ ($627\,000 \text{ g}$) en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima[®] TLX (Beckman; California, EEUU) a temperatura ambiente, usando un rotor TLA 120.2 (Beckman Coulter). Las muestras de fibras lavadas fueron después ultrasónicas durante 40 segundos, con 1 segundo de recuperación por cada segundo de ultrasonicación, a 80% de potencia máxima en un ultrasonicador Vibra-CellTM Ultrasonic Liquid Processors (SONICS[®], Connecticut, EEUU). El tamaño de las fibras en la muestra tras la ultrasonicación fue de alrededor de $300 \pm 140 \text{ nm}$ de longitud, según análisis por microscopía de fuerza atómica. La concentración de fibras en la muestra se calculó por métodos espectrofotométricos (ver apartado 3.1.1) midiendo la concentración de monómero resultante al llevar una alícuota de la solución de fibras a una concentración final de 4 M cloruro

de guanidinio (Gn·HCl). Los experimentos de siembra se prepararon incubando a 37 °C una mezcla de una concentración determinada de proteína monomérica con el porcentaje deseado de semillas de fibra. Las semillas de fibra siempre se generaron inmediatamente antes de su uso.

3.2. Caracterización biofísica

3.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Lauril Sulfato Sódico (SDS-PAGE)

Se realizaron electroforesis con geles desnaturizantes de acrilamida mediante el método de Laemmli⁴³³ para la separación de las proteínas presentes en una muestra de proteína. En este método la migración de las proteínas no viene determinada por su carga eléctrica sino por su peso molecular gracias al efecto del lauril sulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) sobre las proteínas, formando micelas cargadas negativamente alrededor de las cadenas polipeptídicas desnaturizadas. El complejo micela-proteína con carga negativa adquiere una estructura de varilla rígida, de longitud proporcional al peso molecular de la proteína, que migrará dentro de la matriz de poliacrilamida a una velocidad determinada únicamente a su peso molecular. Se usó un gel apilador al 4 % de acrilamida y uno separador al 15 %. Se cargaron en cada muestra unos 10 µg de proteína para la medida. Tras la electroforesis el gel fue teñido con Coomassie para poder identificar las bandas resultantes. Además de la utilización de geles de acrilamida para la comprobación de la identidad y pureza de las diferentes variantes de α S, se utilizaron, también, para la cuantificación del rendimiento de agregación a punto final de las reacciones de agregación.

3.2.2. Espectroscopía de fluorescencia

El fluoróforo tioflavina (ThT, por sus siglas en inglés) se caracteriza por su capacidad de unión a agregados amiloides, dando lugar a un incremento de su rendimiento cuántico de fluorescencia a causa una restricción rotacional del enlace central entre carbonos que une los anillos de benzotiazol y anilina. Este enlace gira libremente cuando el fluoróforo se encuentra libre en solución, lo que provoca un apantallamiento de su fluorescencia. Estas características han convertido a la ThT en una de las sondas más comunes para el estudio de la agregación amiloide⁹².

El sulfato 8-anilinaftaleno (ANS, por sus siglas en inglés) es capaz de unirse de forma no covalente a regiones hidrofóbicas de las proteínas que se encuentran expuestas al solvente y por tanto accesibles al ANS, lo que aumenta significativamente su fluorescencia, al encontrarse en un entorno apolar o rígido, respecto de la que presenta en solución acuosa. Este carácter convierte en ANS en una sonda adecuada y muy usada para el estudio del carácter hidrofóbico de una proteína⁴³⁴.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Cary Elipse Variant (Agilent technologies, California, EEUU) con control de temperatura por efecto Peltier, usando para ello una cubeta de 5x10 mm de paso de luz. Los espectros de emisión de la ThT unida a fibra amiloide se pudieron medir excitando la muestra a 440 nm y recogiendo el espectro de emisión entre 460 y 600 nm, en ambos casos con un ancho de rendija de 5 nm. La concentración de la solución madre de ThT se determinó diluyendo una alícuota de la misma en etanol puro y midiendo su absorbancia a 416 nm, longitud de onda a la que la muestra presenta un coeficiente de extinción molar de $26620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁴³⁵. La unión de la sonda a la fibra se hizo incubando $100 \mu\text{M}$ de muestra con $20 \mu\text{M}$ de ThT durante 30 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. En el caso de los estudios cinéticos de agregación seguidos por ThT el protocolo de medida varía ligeramente (ver siguiente sección). Por otra parte, los espectros de emisión de ANS en muestras de fibras de αS se midieron excitando la muestra a 350 nm y recogiendo el espectro de emisión entre 400 y 650 nm, en ambos casos también con un ancho de rendija de 5 nm. La concentración de la solución madre de ANS se determinó midiendo su absorbancia a 350 nm, en la que presenta un coeficiente de extinción molar de $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁴³⁴. Los espectros de fluorescencia se recogieron en muestras que contenían $50 \mu\text{M}$ de fibras con $250 \mu\text{M}$ de ANS tras incubación de la muestra durante 2 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3. Cinéticas de agregación

En los ensayos de agregación seguidos por ThT se incubaron $100 \mu\text{M}$ de monómero de αS en tampón fosfato sódico 10 mM a un pH de 7.4 o PBS en presencia de las concentraciones indicadas de co-solvente o de sales a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta completar la reacción de agregación. Para seguir la reacción se usó ThT a una concentración de $50 \mu\text{M}$. Para las agregaciones con agitación (700 rpm usando agitación orbital *in situ* en el lector de placas) en ausencia de co-solventes o sales se usó una concentración de $500 \mu\text{M}$ de monómero de αS en PBS a pH 7.4. Para prevenir el crecimiento de bacterias durante los experimentos de agregación se incluyó un

0.01% de acida sódica en las muestras. Para el resto de agregaciones (en reposo) la concentración de monómero fue de 100 μM . En ciertos casos se emplearon esferas de teflón (Polyballs-Teflon, 1/8" Diameter; Polysciences, In.; Pensilvania, EEUU). Los ensayos de agregación fueron realizados en microplacas de baja capacidad de unión de 96 pocillos ($\mu\text{Clear}^{\circledR}$, Black, F-Bottom/Chimney Well; Greiner bio-one North America Inc.; Monroe, EEUU) y estas fueron selladas con una hoja adhesiva AMPLIseal™ 80.0/140 MM (Greiner bio-one North America Inc.; Monroe, EEUU) para evitar la evaporación de los solventes. Las medidas de las cinéticas se realizaron en dos lectores multimodo de microplacas, FLUOstar (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania) y CLARIOstar (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania), indistintamente. Puntualmente también se utilizaron microplacas estándar de 96 pocillos PCR, (white wells, black frame; Brooks Life Sciences; Manchester, Reino Unido) y microplacas de 96 pocillos con recubrimiento de vidrio (Well Glass-Coated Microplates, Flat-Bottom; Thermo Fisher; Massachusetts, EEUU). Los análisis cinéticos de los datos se llevaron a cabo usando ecuaciones sigmoidales estándar (ver sección de análisis de las cinéticas de agregación).

3.2.4. Cinéticas de agregación en placas con tapones hidrofílicos

La interfase A/W se eliminó de las muestras de forma individual en cada pocillo de la microplaca mediante la inserción manual de unos tapones hechos a medida de manera similar a otros estudios¹²⁰. Estos tapones fueron fabricados, mediante fresado, con polimetilmetacrilato (PMMA, por sus siglas en inglés). Se eligió el PMMA como material para la fabricación de los tapones al tratarse de un polímero acrílico transparente, relativamente hidrofílico, y que se ha mostrado ineficiente para promover la agregación de αS^{416} . Se depositó 150 μl de muestra en los pocillos en que se deseaba eliminar la interfase A/W. Los tapones de PMMA, previamente humedecidos con tampón, se colocaron verticalmente en la parte superior de cada pocillo y se dejó que se insertase suavemente por su propio peso. Después, los tapones fueron empujados cuidadosamente hasta lograr su completa inserción en el pocillo. Parte de la muestra se derramó durante la inserción de los tapones, dejando tan solo 110-120 μl en el pocillo una vez este fue sellado con el tapón. Para minimizar la pérdida de muestra por evaporación y evitar la aparición de burbujas en el pocillo a causa de un sellado ineficiente, los tapones fueron sellados con metil cianocrilato.

3.2.5. Cálculo del rendimiento de la agregación al final de la reacción

La fracción de α S agregada se determinó cuantificando la concentración relativa de las fracciones de proteína insoluble y soluble. Tras que la reacción se completara (en la fase conocida como de plateau), las muestras fueron ultracentrifugadas a temperatura ambiente, como se describe en la sección 3.1.2. Se tomó una muestra de la fracción soluble y la concentración de proteína fue determinada espectrofotométricamente (ver apartado 3.1.1) para muestras en ausencia de ThT. Para muestras que contienen ThT, se cargó una alícuota de la fracción soluble en un gel de acrilamida (ver apartado correspondiente), junto con una alícuota de la muestra inicial de proteína, antes de que comenzase la agregación; y la concentración de proteína en la fracción soluble al final de la agregación se estimó comparando las intensidades de las bandas, usando el programa ImageJ (NIH Image; Maryland, EEUU).

3.2.6. Análisis de las cinéticas de agregación

Los datos cinéticos de las agregaciones fueron ajustados a la siguiente ecuación sigmoideal:

$$F = F_i + m_i \cdot t + \frac{(F_f + m_f \cdot t)}{1 + e^{\frac{-(t-t_{50})}{\tau}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

donde F es la intensidad de fluorescencia a cualquier tiempo, F_i es la señal de fluorescencia a tiempo cero, $F_f + m_f \cdot t$ describe la línea base final en la fase de plateau, t_{50} es el tiempo en el cual F alcanza el valor de la mitad de la intensidad máxima y τ es una constante de tiempo característica que representa la inversa de la constante aparente de crecimiento. El tiempo o fase de latencia (t_{lag}) se estima como $t_{50} - 2\tau$ ⁴³⁶. Esta ecuación es comúnmente usada para analizar cinéticas de formación amiloide sin asumir ningún modelo específico, de tal manera que no refleja la complejidad real del proceso de agregación amiloide que se está analizando, pero aporta parámetros empíricos y descriptivos que pueden ser usados en estudios comparativos.

3.2.7. Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) da información sobre el tamaño molecular de las partículas presentes en una solución. Un equipo de DLS proporciona la función de correlación de la intensidad de la luz dispersada durante un período de tiempo. Esta función se obtiene mediante la medición de la variación entre una señal adquirida en un momento dado y la misma señal medida un tiempo después. La función de correlación expresa la tasa de fluctuación de la intensidad de la luz dispersada debido a los movimientos brownianos

de las partículas. El análisis de esta función de fluctuación nos da información del radio hidrodinámico de la partícula o conjunto de partículas presentes en la disolución^{437,438}.

Los radios hidrodinámicos del monómero o de los agregados de α S fueron determinados en un equipo DynaPro NanoStar (Wyatt, Santa Bárbara, EE UU) equipado con control de temperatura por efecto Peltier de la muestra. Las medidas se realizaron a 25 μ M de proteína y a 25 °C usando para ello una cubeta de 2x10 mm de paso de luz. Cada medida constó de 20 adquisiciones y se realizaron una media de 15 medidas por cada muestra. Los tampones fueron previamente filtrados con un filtro de 0.22 μ m de poro para eliminar toda partícula suspendida en el mismo.

3.2.8. Espectroscopía de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés) es una técnica útil para estudiar propiedades conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos en solución⁴³⁹, basándose en las diferencias de absorción de luz polarizada circularmente al incidir sobre los diferentes centros quirales de una muestra dada. Las bandas de CD que podemos observar en las proteínas están situadas en dos regiones del espectro electromagnético: en el ultravioleta (UV) lejano, entre 190 y 250 nm, donde la mayor contribución a las bandas de absorción proviene de los enlaces peptídicos; y en el UV cercano, entre 250 y 320 nm, donde las bandas se derivan de los aminoácidos con grupos aromáticos en sus cadenas laterales. Cada región da una información diferente y complementaria sobre la estructura de las proteínas. En el UV lejano la señal de CD se relaciona con la estructura secundaria de las proteínas: hélices α , láminas β , giros β y regiones desordenadas⁴⁴⁰, mientras que en el UV cercano encontramos información sobre la estructura terciaria de la proteína.

Los espectros de CD fueron adquiridos en un espectropolarímetro Chirascan™ (AppliedPhotophysic, Surrey, Reino Unido) equipado con control de temperatura por efecto Peltier de la muestra. Las medidas se realizaron en el rango que va desde 190 nm a 250 nm (UV lejano), usando una velocidad de barrido de 50 nm/min, una anchura de banda de 1 nm y 10 acumulaciones. La concentración final de la proteína fue de 25 μ M y se usó para la medida una cubeta de 1 mm de paso de luz. Para purgar y refrigerar el sistema se usó un flujo de nitrógeno. Los espectros de CD normalizado se expresan como elipticidad molar $[\theta]$ en grado \cdot cm² \cdot dmol⁻¹. Para ello se emplea la ecuación:

$$[\theta] = \frac{\theta}{C \cdot N \cdot 10 \cdot l} \quad (\text{Eq. 2})$$

Donde θ es el grado de elipticidad, C es la concentración de la muestra (en molar), N es el número de residuos de la proteína, l es el paso de luz de la cubeta (cm) y 10 es un factor que convierte el paso de luz, l , a milímetros.

3.2.9. Espectroscopía de infrarrojo

La espectroscopía de infrarrojo (IR) de proteínas aporta información sobre los diferentes tipos complejos de vibración del grupo amida del enlace peptídico. Las proteínas presentan diferentes bandas amida, siendo las más utilizadas para el estudio de la conformación de proteínas, las denominadas amida I y amida II. La banda amida I (comprendida en la región entre 1600 y 1700 cm^{-1}) presenta una mayor intensidad, es más sensible a la conformación y tiene una menor contribución de cadenas laterales, lo que la hace la más útil e interesante para nuestro estudio. La banda amida II (comprendida en la región entre 1500 y 1600 cm^{-1}) suele ser de interés para estudiar el grado de accesibilidad de la proteína al disolvente. La sensibilidad de la banda amida I a la conformación de la proteína lleva a que varíe su posición, dentro del rango anteriormente indicado, según se encuentre el grupo amida en cuestión formando parte de una u otra estructura secundaria. Esto hace que a su vez la banda amida I de una proteína esté constituida por la banda amida I de todos los grupos amida de sus residuos, generando una envolvente en la que contribuirán las diferentes estructuras secundarias (tales como hélice α , lámina β , giros β , desordenada, etc.) dando una banda con una posición característica para cada una de ellas y con una intensidad que será proporcional a la cantidad de esa estructura en la muestra⁴⁴¹.

La composición en estructura secundaria de los agregados de α S al final de las diferentes reacciones de agregación se analizaron por espectroscopía de IR. Para ello, la muestra fue sometida a ultracentrifugación a temperatura ambiente, como se describió en el apartado 3.1.2, y los agregados fueron resuspendidos en el correspondiente tampón deuterado (grado de deuteración ≥ 99.90 ; Merck, Darmstadt, Alemania) en dos ciclos de centrifugación-resuspensión, con el objetivo de eliminar de la muestra tanto todo el monómero que no hubiese agregado, como la mayor parte de las moléculas de H_2O de la solución original. Se resuspendieron las muestras con un volumen adecuado para que quedase una concentración final de agregados de al menos 4 mg/mL. Las muestras fueron depositadas entre dos ventanas

pulidas de CaF₂ (Harrick Scientific Products Inc.; Nueva York, EEUU) separadas por un espaciador de PTFE (Harrick Scientific Products Inc.; Nueva York, EEUU). Los espectros se midieron en modo transmisión a temperatura ambiente usando un equipo VERTEX 70 FTIR Spectrometer (Bruker; Massachusetts, EEUU) equipado con un detector criogénico de telururo de mercurio y cadmio enfriado mediante nitrógeno líquido. El sistema fue continuamente purgado con nitrógeno seco para evitar la señal atmosférica del vapor de agua. Los espectros de IR se procesaron y analizaron mediante rutinas estándar en los programas OPUS (Bruker; Massachusetts, EEUU), RAMOPN (NRC, National Research Council of Canada;) y Spectra-Calc-Arithmetic© (Galactic Inc.; Alabama, EEUU)⁴⁴¹. La deconvolución de los espectros fue realizada usando las rutinas de ajuste en los programas de análisis de IR anteriormente mencionados y fijando las posiciones de las diferentes bandas de absorción que se han obtenido previamente realizando la segunda derivada del espectro de IR.

3.2.10. Estimación de la fracción de lámina β paralela y antiparalela en los agregados al final de las reacciones de agregación a diferentes concentraciones de MeOH por análisis global de espectros de infrarrojo

Se realizó un análisis de ajuste global de los espectros de IR de los agregados generados a diferentes concentraciones de MeOH en el rango que va de 5-40 % MeOH (ver apartado 4.1.7 en resultados). Esto permitió la estimación de la fracción de lámina beta paralela y antiparalela presente en los agregados al final de las reacciones de agregación en las diferentes condiciones. Para esto se usó la ecuación:

$$X_i = X_{\parallel} \cdot a_i \cdot (A + B \cdot [\text{MeOH}]) + X_{\perp} \cdot (1 - a_i) \cdot (C + D \cdot [\text{MeOH}]) \quad (\text{Eq. 3})$$

donde se asume que el valor de absorbancia observado para cada frecuencia, X_i , es una combinación lineal de los valores de cada uno de los dos tipos estructurales de agregados puros a esa frecuencia (paralelo, X_{\parallel} , o antiparalelo, X_{\perp}) y su población (a_i , y $1 - a_i$, respectivamente). Además, sólo se obtuvieron buenos ajustes cuando se asumió que la señal de las estructuras paralela y antiparalela variaban linealmente con la concentración de MeOH, una asunción que coincidía con los datos experimentales obtenidos.

3.2.11. Estudios de estabilidad de agregados de α-sinucleína

La estabilidad de la estructura amiloide de un agregado va a venir caracterizada por las condiciones ambientales en las que se encuentre este. Para estudiar la estabilidad de un determinado polimorfo de αS al cambio de medio se tomó una muestra del polimorfo en

cuestión y se dividió en dos o tres alícuotas, según el número de medios en los que se desease estudiar la estabilidad de la muestra. Una de las alícuotas se dejó en el medio original en el que se formó y las demás fueron ultracentrifugadas y los agregados resuspendidos en los medios en los que se deseaba estudiar su estabilidad. Para una correcta resuspensión de los agregados en el nuevo medio se procedió a una primera resuspensión por agitación con la micropipeta y un posterior baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Los agregados se incubaron 20 h a 37 °C en el medio a estudiar, tras lo cual se trataron, al igual que la alícuota que se dejó en el medio original, de igual modo que se describió anteriormente para muestras que iba a ser estudiadas por espectroscopía de IR.

3.2.12. Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X permite identificar la estructura en lámina β cruzada, propia de los agregados amiloides, generando un patrón de difracción característico para esta estructura. Este patrón se distingue por una señal de difracción en la zona meridional con una distancia muy constante de 4.7 Å, independientemente del tipo de polimorfo y proteína que compone la fibra, ya que corresponde a la distancia entre los protómeros dentro de la misma lámina β (por tanto, característica de las interacciones entre las cadenas principales de las proteínas). Además, aparece otra señal de difracción en la zona ecuatorial del patrón de difracción, correspondiente a la distancia promedio entre las láminas β que forman la fibra (característica esta de las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos) y, por tanto, más variable, en torno a 9-12 Å. La calidad de este patrón de difracción dependerá de la correcta alineación de las fibras en la muestra a difractar^{266,442}.

Los agregados de α S se ultracentrifugaron a temperatura ambiente, como se describe arriba, y a continuación se resuspendieron a una concentración final de unos 800 μ M. Se depositó un volumen de 10 μ l de la solución deseada entre dos capilares de vidrio, depositados en una placa de Petri, cuyos extremos opuestos fueron sellados con cera, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 o 3 días, como se describe en la bibliografía⁴⁴². Los patrones de rayos X fueron recogidos a temperatura ambiente en la línea BL13-XALOC del Sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España) a una longitud de onda de 0.97 Å. La distancia al detector fue de 61.5 cm y la resolución fue de 3 Å. Los datos se analizaron usando el programa iMOSFLM (CCP4; Reino Unido).

3.2.13. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una técnica topográfica tridimensional que da una alta resolución de la rugosidad de una superficie gracias a la interacción entre una punta afilada (de apenas unos átomos de grosor en su extremo inferior) y los átomos de la muestra en estudio. El barrido de la superficie de la muestra permite la caracterización topográfica de proteínas individuales, fibras o células adheridas a la superficie. La interacción de la punta con la muestra también permite la caracterización de sus propiedades mecánicas⁴⁴³.

Las muestras de agregados de α S fueron diluidas hasta una concentración de proteína entre 0.1-0.5 μ M (equivalente de monómero). Un volumen de 10 μ L de cada muestra se depositó sobre láminas limpias de Muscovite Mica V-5 (Electron Microscopy Sciences; Pensilvania, EEUU) de aproximadamente 1 cm² de superficie cada una y se dejó adherir durante un periodo de 30 minutos. A continuación, las láminas de mica fueron lavadas con agua doblemente destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche. Las imágenes de AFM se tomaron con un equipo NanoWizard II AFM (Bruker; Massachusetts, EEUU) usando puntas FMG01 gold probe (NT-MDT Spectrum Instruments Ltd.; Moscow, Rusia) en modo de contacto intermitente en aire. Fueron procesadas usando el programa Gwyddion (<https://www.gwyddion.net>). El grosor de la punta usada para la medida era de 10 nm, así que para compensar el error que introduce la medición en el plano horizontal, se restaron 10 nm a los valores de las medidas de longitud de las fibras obtenidas directamente de las imágenes del AFM para así hacer el estudio estadístico para el análisis de la morfología de los polimorfos.

3.2.14. Medida de tensiones superficiales

Para la medida de la tensión superficial se recurrió al método de Wilhelmy^{444,445}, que determina la tensión superficial utilizando una sonda en la que uno de los extremos se encuentra en contacto con la interfase, mientras que el otro está unido a una electrobalanza. Así se puede medir directamente la fuerza que la superficie ejerce sobre la sonda y determinar la tensión superficial de la interfase mediante el análisis correspondiente.

La tensión superficial de las soluciones de PBS en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de MeOH y α S se midió usando un tensiómetro DeltaPi 4-channel Langmuir (Kibron Inc., Helsinki, Finlandia). No fue posible el desarrollo de experimentos similares a alta

concentración de sales por las características del sistema de medida. Antes de los experimentos, los pocillos del equipo fueron limpiados con etanol y agua doblemente destilada y secados mediante el uso de un sistema de vacío. Previamente al experimento y tras su finalización se quemaron las sondas empleadas en la medida, con un mechero de tipo soplete, para limpiar por pirolisis la superficie de las mismas. El tensiómetro fue calibrado con PBS a 25 °C bajo agitación constante a 400 rpm y posteriormente al calibrado del equipo se adicionó el MeOH a la concentración deseada en aquellos experimentos en los que era necesario. Se agregó la proteína en las concentraciones adecuadas después del equilibrado del equipo con el tampón. La tensión superficial de las diferentes soluciones se recogió hasta que el sistema alcanzó el valor de equilibrio (entre 30 minutos y 2 horas dependiendo de las condiciones de la solución) dentro de la precisión de la medida (± 0.01 mN/m). Las medidas del instrumento pueden expresarse como valores de tensión superficial (γ), o como valores de presión superficial (π); donde π (mN/m) = 72.8 mN/m - γ (mN/m), siendo 72.8 mN/m el valor de la tensión superficial de la interfase A/W de una muestra de agua pura.

3.2.15. Sistema de microfluídica

El sistema de microfluídica que se utilizó para comprobar la naturaleza de la nucleación en agregados amiloides de α S en determinadas condiciones estaba fabricado de un material hidrofílico, polietereetercetona (PEEK, por sus siglas en inglés), y se encontraba formado por los siguientes componentes:

- 1) Tubos capilares para la entrada de los aditivos, con diámetros externo e interno de 0.06 y 0.04 pulgadas, respectivamente.
- 2) Micromezclador con forma de T (IDEX Health and Science; Massachusetts, EEUU) con un volumen muerto de 0.95 μ L para permitir una mezcla de los componentes eficiente y rápida.
- 3) Tubo capilar para la incubación de proteína, con diámetros externo e interno de 0.06 y 0.04 pulgadas, respectivamente, y una longitud de 280 mm.
- 4) Una válvula de dos pasos para garantizar un cierre correcto y evitar la entrada de aire al sistema.

Los reactivos se inyectaron en el sistema a un flujo de 300 μ L/min usando una bomba para jeringas Harvard PHD Ultra[®] Syringe Pump (Harvard Apparatus; Massachusetts, EEUU). La relación superficie volumen (S/V) para el tubo de PEEK, en el que se realizaron las

incubaciones, fue de 3.93 mm^{-1} ; mientras que, en los pocillos de las microplacas, en que se realizaron el resto de experimentos de agregación, la relación S/V fue de 0.77 mm^{-1} .

3.3. Experimentos bioquímicos

3.3.1. Preparación de vesículas unilaminares pequeñas

Se prepararon soluciones de vesículas unilaminares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés) a partir de DMPS (Avanti Polar Lipids, Alabama, EEUU) por ultrasonicación en el tampón deseado, ultrasonicando 40 minutos con una alternancia de 1 segundo de recuperación por cada segundo de ultrasonicación, al 40 % de la potencia máxima en un ultrasonicador Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processors (SONICS®, Connecticut, EEUU), en oscuridad y con el vial de muestra en un baño de hielo. La concentración de las soluciones madre de lípido y de la solución final de SUV en tampón a base de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico (HEPES) a un pH de 6.5 se estimó a partir de un ensayo de Fiske⁴⁴⁶. En este se hace un análisis colorimétrico incubando con una mezcla de soluciones de heptamolibdato amónico y de ácido ascórbico tanto con el fosfato inorgánico procedente de la digestión del lípido durante 45 minutos a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ en ácido perclórico al 60%, como con las alícuotas correspondientes a una resta patrón hecha con diferentes concentraciones conocidas de fosfato inorgánico durante 7 minutos a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente se miden las absorbancias a 812 nm de las muestras finales tanto de la resta patrón como de las muestras de lípido, y de la comparación se extrapola la concentración inicial de lípido en la solución. De esta manera se validó el protocolo para la generación de SUV, que tenía una eficacia del 100%. Una vez validado el protocolo de generación de SUV en HEPES, se utilizó el mismo protocolo para la generación de SUV en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6.5, condiciones en las que se realizaron los experimentos de agregación⁴²².

3.3.2. Medida de la concentración de los agentes de aglomeración macromolecular

La medida de la concentración de los agentes de aglomeración macromoleculares utilizados se realizó midiendo el incremento del índice de refracción de las soluciones de agentes de aglomeración con un refractómetro digital automático AR200 (Reichert Technologies, Nueva York, EEUU). Los citados incrementos son de 0.152 mL/g, 0.141 mL/g y 0.136 mL/g para dextrano 70, ficol 70 y polietilén glicol (PEG) 8, respectivamente⁴⁴⁷. El

número que acompaña a cada uno de estos tres polímeros sintéticos indica su peso molecular en kDa.

3.3.3. Estimación de la concentración efectiva de proteína o de la fuerza iónica en soluciones con agentes de aglomeración macromolecular

La concentración efectiva o corregida de α S y de fuerza iónica de la solución de proteína es consecuencia de la reducción de la fracción de volumen disponible al solvente por la presencia de 150 mg/mL de dextrano 70 o ficol 70. Esta se estimó, como se describe en la bibliografía⁴⁴⁸, y resultó ser de 110.8 μ M y de 166.2 mM, respectivamente, para una solución de α S a 100 μ M con 150 mM de NaCl; estas diferencias pueden ser obviadas en los análisis cinéticos de las agregaciones de α S en nuestras condiciones de estudio ya que esos cambios son inapreciables en las cinéticas de agregación resultantes.

4. Resultados

4.1. Bloque I: Caracterización de las diferentes rutas de nucleación primaria de α -sinucleína: En la búsqueda de condiciones que favorezcan la nucleación homogénea de la proteína

La formación de agregados amiloides es un proceso de autoensamblaje, generalmente a partir de proteínas monoméricas, durante el cual la cadena polipeptídica sufre una reordenación estructural compleja. Existen diferentes procesos microscópicos que tienen lugar durante la agregación macroscópica de la proteína, siendo el proceso de nucleación primaria el paso limitante de la reacción, así como el proceso del que menos información se tiene^{67,449}.

Tradicionalmente, las reacciones de agregación de α S *in vitro* han requerido concentraciones de proteína entre 50-100 μ M a temperatura, pH y fuerza iónica fisiológicas, así como la acción de una fuerte agitación^{416,450}, aunque no se entendía en profundidad las bases de este requerimiento. Inicialmente se atribuyó a un efecto importante de la agitación en la fragmentación de fibras y generación de nuevos extremos de elongación. Sin embargo, desde un estudio publicado en 2014¹²⁰, aunque ya se había sugerido en el 2010⁴¹⁶, se puso de manifiesto el papel de las interfaces H/H, tales como la interfase A/W o los recubrimientos hidrófobos de las barras agitadoras o de los recipientes que contienen a la muestra, en el desencadenamiento del autoensamblaje de α S, a través de un mecanismo de nucleación heterogénea. Lo que hizo replantearse el efecto de estas superficies y de la agitación en las primeras etapas de la agregación, así como el uso de determinados materiales para contener a la muestra de proteína^{120,332}.

En las condiciones de agregación de α S que más se han utilizado, con diferencia, hasta la fecha, la nucleación primaria tiene lugar en la interfase A/W. Otras condiciones frecuentes también incorporan otras superficies hidrófobas para acelerar la nucleación primaria, concretamente esferas de PTFE, vesículas lipídicas sintéticas u otros materiales/agentes tensioactivos^{335,423,451,452}. El empleo de vesículas lipídicas quizás podría representar, *a priori*, la condición fisiológicamente más relevante en este contexto, aunque, a pH neutro, se ha observado que las vesículas sintéticas compuestas por lípidos fisiológicamente relevantes no inducen agregación de α S⁴²³. Las condiciones que se han publicado hasta la fecha para que vesículas lipídicas promuevan, de forma reproducible, la agregación amiloide de α S requieren contenidos muy altos, normalmente del 100%, de lípidos de cadena corta y cargados negativamente^{422,423}, lo que cuestiona la relevancia fisiológica de esta superficie como posible inductor de la agregación de α S en la célula. Hasta el presente trabajo, por tanto, sólo se han

explorado rutas de agregación de α S iniciadas por nucleación heterogénea que, además, no encontrarían, aparentemente, una analogía en el interior celular.

Si todavía queda bastante por descifrar sobre los mecanismos que inician la agregación *in vitro* de α S, nuestro desconocimiento es incluso mayor sobre los procesos que la desencadenan dentro de las células. La sobreexpresión de la proteína por sí sola parece ser insuficiente para desencadenar la nucleación *de novo* de agregados amiloides de α S⁴⁵³, lo que sugiere que la proteína requiera de microambientes celulares particulares, todavía desconocidos, para la acumulación de agregados amiloide de α S dentro de las células. Además, evidencias experimentales recientes muestran que las estructuras amiloides de α S que se han resuelto a alta resolución, generalmente por RMN o cryo-EM^{166,364,401,454}, en todos los casos generadas *in vitro* mediante nucleación heterogénea en la interfase A/W, difieren notablemente de las estructuras amiloides obtenidas de extractos de cerebro de pacientes^{405,398}. Estos resultados, por tanto, sugieren que las rutas de agregación amiloide *in vivo* difieren notablemente de las exploradas hasta ahora *in vitro*.

En este contexto, nos propusimos comprender en mayor profundidad el papel de los efectos de interfases H/H en la nucleación primaria de la proteína con el fin de identificar los factores clave para la iniciación de los procesos de autoensamblaje, así como explorar nuevas rutas de nucleación de la proteína.

4.1.1. Las condiciones comúnmente utilizadas para la agregación de α -sinucleína *in vitro* requieren de interfases hidrofóbicas/hidrofílicas

Para poder hacer comparables entre sí todos los datos de las cinéticas de agregación realizadas a lo largo de todo este estudio, y evitar los posibles efectos que pudiese introducir el material que compusiese la superficie de los diferentes recipientes⁴⁵², todas las agregaciones mostradas en este estudio se realizaron con el mismo tipo de placas, tratadas con un recubrimiento de PEG, que las hacía presentar una superficie hidrofílica. Este tipo de placas ha sido ampliamente utilizada por otros grupos para estudiar las cinéticas de agregación de α S^{184,455}. No obstante, se realizó un estudio de la influencia del material contenedor de la muestra en las cinéticas de agregación como se explicará más adelante.

Empezamos este estudio reproduciendo la agregación de α S en las condiciones *in vitro* comúnmente más empleadas en la bibliografía (PBS con una fuerza iónica de 150 mM a un pH

de 7.4 y 37 °C de temperatura). En estas condiciones, pudimos observar la formación de fibras amiloides, con la típica curva cinética sigmoidea (Fig. 4.1 A), cuando la placa fue sometida a agitación fuerte (agitación orbital de 700 rpm). Además, debido al tipo de agitación en placa, se requirieron también altas concentraciones de proteína (típicamente 500 μ M).

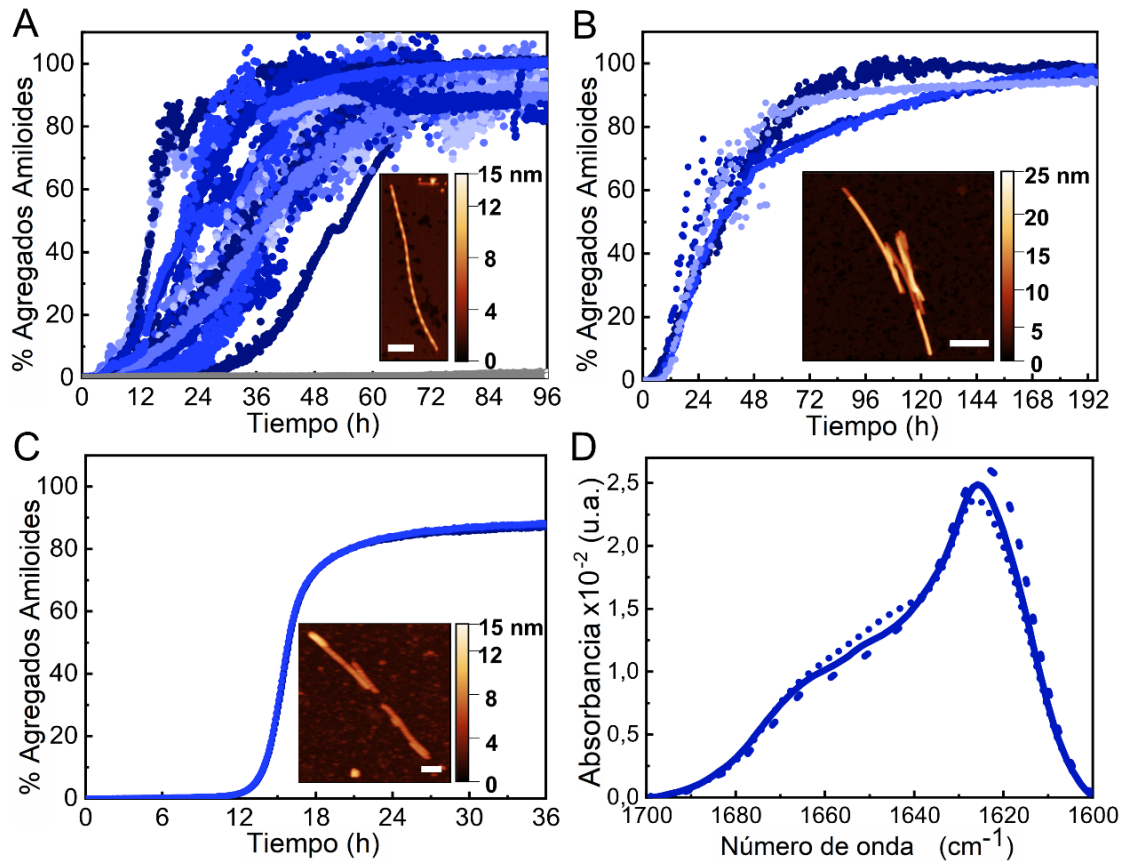


Figura 4.1. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en interfases hidrofóbicas/hidrofílicas típicas. (A) Cinética de agregación de α S a 500 μ M en condiciones de agitación (700 rpm). (B) Cinética de agregación de α S a 100 μ M en condiciones de reposo en presencia de una esfera de PTFE o (C) SUV de DMPS. El recuadro muestra una imagen de AFM representativa de cada tipo de agregado. Barra de escala: 200 nm. (D) Espectros de IR de los agregados formados con agitación (línea continua), o en presencia de una esfera de PTFE (línea discontinua) o SUV (línea punteada). Se muestran los espectros normalizados para una mejor comparación.

En estas condiciones, las cinéticas de agregación obtenidas presentaban una gran variabilidad, como ya se había reportado en estudios anteriores^{450,456,457}. Este comportamiento sería una consecuencia directa de la naturaleza estocástica y mutable del área de la interfase A/W que presenta la solución de la muestra durante la agitación a alta velocidad. De hecho, nosotros hemos podido observar que la naturaleza y curvatura de la interfase A/W es determinante para la inducción de la agregación de α S en estas condiciones. En experimentos que realizamos utilizando tapones hidrofílicos para eliminar la interfase A/W, se observó que en aquellos pocillos donde existían pequeñas burbujas de aire en contacto con la solución de proteínas había una aceleración de la agregación incluso en condiciones de reposo (Fig. 4.2 B);

condiciones (100 μ M α S en PBS) en las que no se pudo observar agregación tras más de 10 días de incubación cuando la solución de proteína estaba en contacto con una interfase A/W plana (Fig. 4.10 A, línea verde claro), en línea con resultados publicados por otros grupos⁴⁵⁷. Lo que nos llevó a pensar que realmente lo determinante para promover la nucleación podría ser la curvatura de esta interfase, y que la agitación, al deformar la superficie, introduce curvaturas en la interfase que promoverían la agregación de la proteína.

Los agregados amiloides formados en la interfase A/W en condiciones de agitación fuerte y elevada concentración de proteína mostraron la típica morfología de fibras no ramificadas, largas y con simetría de giro o simetría helicoidal. Según un análisis de las dimensiones de estas fibras medidas por AFM, mostraban una altura de 10 ± 1 nm, una longitud de 600 ± 400 nm ($n = 50$) y mostraban una periodicidad de giro de 66 ± 3 nm ($n = 25$).

Para analizar el efecto que tiene de la interfase A/W en el proceso de agregación, tanto en esta como en otras condiciones experimentales, procedimos a repetir los experimentos eliminando la interfase. Para ello utilizamos unos tapones fabricados con un material hidrofílico, PMMA, que encajaban en los pocillos de la placa y que eliminaban, por tanto, la capa de aire que hay sobre la solución de proteína¹²⁰. Cuando se eliminó la interfase A/W utilizando los tapones hidrofílicos, no se observó agregación durante 10 días (Fig. 4.1 A línea gris y Fig. 4.2 A), pero cuando finalmente se quitaron los tapones, se observó agregación de esas mismas soluciones de proteína con las cinéticas esperables (Fig. 2 A). Esto corroboraba, como había sido reportado previamente¹²⁰, que en estas condiciones la inducción de la agregación ocurría por una nucleación heterogénea en la interfase A/W accesible a la proteína. Sin embargo, como ya se ha comentado, en algunos casos se formaron pequeñas burbujas de aire con el tiempo, como consecuencia del sellado imperfecto de los tapones, lo que producía una aceleración considerable de la nucleación: se observó la agregación de la proteína en menos de 2 días de incubación en condiciones de reposo, mientras que en las mismas condiciones en presencia de una interfase A/W plana no se observó agregación por más de 10 días de incubación (Fig. 4.2 B). Por tanto, la agitación es importante para generar curvatura en la interfase A/W y ésta es importante para la nucleación de α S en condiciones diluidas y de pH y fuerza iónica fisiológicas.

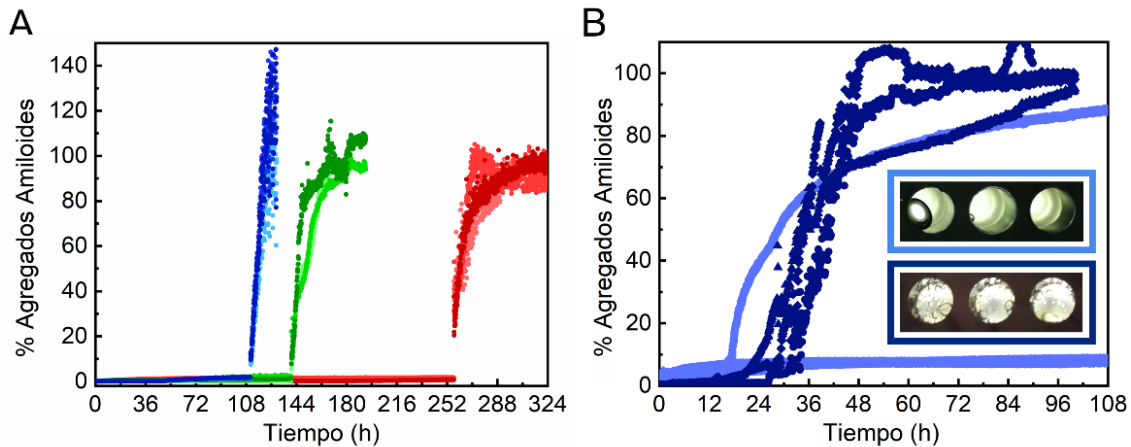


Figura 4.2. Impacto de la interfase aire/agua en la cinética de agregación de α -sinucleína. (A) Cinéticas de agregación representativas de α S a 500 μ M en PBS a pH 7.4 (37 $^{\circ}$ C) en presencia de 50 μ M ThT, incubadas en condiciones de agitación (700 rpm) y en presencia de tapones de PMMA. Tras diferentes tiempos de incubación, los tapones fueron quitados, lo que inició la agregación de α S. (B) Cinéticas de agregación representativas de dos triplicados de α S a 100 μ M en PBS, pH 7.4 (37 $^{\circ}$ C), en presencia de 50 μ M de ThT, en condiciones de reposo y con tapones de PMMA. Se muestra también una foto de los pocillos correspondientes para los dos triplicados. La entrada de aire durante la incubación de la muestra, debido al sellado imperfecto los pocillos, provocó que se activase la agregación de la proteína (las tres réplicas del triplicado que muestra burbujas se corresponde con las cinéticas mostradas en azul oscuro y las tres réplicas en azul claro corresponden al triplicado en que sólo un pocillo presentaba burbujas de aire, que fue en el que se vio agregación de la proteína).

Un método alternativo utilizado para lograr la agregación de α S *in vitro*, que mejora la gran variabilidad que presentan las cinéticas de agregación iniciadas en la interfase A/W en condiciones de agitación, implica introducir otro tipo de interfases donde existe inherentemente cierta curvatura. Un ejemplo es la adición de esferas de PTFE a la solución, aunque este método se ha combinado generalmente con sistemas de agitación^{458,459}. Nosotros hemos estudiado el efecto de introducir en la solución de proteína (100 μ M de α S en PBS pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C) una esfera de PTFE (material hidrofóbico) de un área superficial similar a la que presenta la interfase A/W en el pocillo de las placas en que realizamos nuestros experimentos (aproximadamente 32 y 38 mm², respectivamente) en condiciones de reposo. En estas condiciones, en ausencia de la esfera de PTFE, no se observa agregación durante 10 días. En presencia de la esfera de PTFE, sin embargo, se observó agregación en los dos primeros días de incubación (Fig. 4.1 B). Las fibras formadas en estas condiciones, según el análisis de las imágenes de AFM, tienen 8.8 ± 0.8 nm de altura y 360 ± 90 nm de longitud (n = 15), sin presentar aparentemente simetría helicoidal.

Otra alternativa para inducir la agregación de α S que se ha utilizado recientemente es la incorporación de vesículas lipídicas sintéticas, aunque sólo se ha podido observar utilizando SUV compuestos por un contenido artificialmente alto de lípidos de fosfatidilserina saturados, típicamente compuestas por un 100% de DMPS, a un pH ligeramente ácido y a muy baja fuerza

iónica^{422,423}. Sin embargo, a fuerza iónica fisiológica no se observa agregación⁴²², y ésta se ve ralentizada a pH neutro³⁹³. Reprodujimos la agregación de α S a 100 μ M en presencia de 800 μ M de SUV compuestos por un 100% de DMPS en tampón fosfato a un pH de 6.5, a 37 °C, y en condiciones de reposo (Fig. 4.1 C). Las especies fibrilares obtenidas mediante estas condiciones de agregación, tras el estudio morfológico de las imágenes obtenidas por AFM, presentaban una altura de 6.3 ± 0.6 nm, una longitud de 800 ± 400 nm ($n = 15$) y no presentaban simetría de giro. Los agregados amiloides generados en los tres tipos de interfases presentaron una morfología fibrilar, (Fig. 4.1 A-C), aunque con diferencias en el ensamblaje de las protofibrillas, ya que unas fibras presentaban simetría helicoidal pero no otras. En todo caso, la estructura de las protofibrillas era muy similar para las fibras generadas en los tres tipos de interfases, mostrando espectros de IR esencialmente idénticos (Fig. 4.1 D), con la banda de absorción típica asociada con la lámina β intermolecular de los agregados amiloides a aproximadamente $1625\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ ^{441,460,461}.

4.1.2. La adición de concentraciones moderadas de alcohol acelera la nucleación amiloide de α -sinucleína

Es común encontrar en la bibliografía estudios que emplean co-solventes para desencadenar cambios en la conformación o el entorno de las proteínas que ayuden a comprender los mecanismos de plegamiento o agregación^{331,462,463}. Los alcoholes, particularmente el alcohol fluorado TFE, posiblemente sean el tipo de co-solventes más empleados para investigar la agregación de proteínas. Para el caso de la agregación de α S, el efecto de ciertos alcoholes ha sido previamente analizado, aunque siempre en condiciones de agitación^{331,464}. Nosotros hemos realizado experimentos sin agitación para poder estudiar mejor el efecto de los co-solventes en la nucleación primaria de la proteína. Al añadir concentraciones incluso moderadamente bajas (5%) de alcoholes como MeOH o TFE pudimos observar la agregación de α S durante los primeros días de incubación (a 100 μ M en PBS pH 7.4 , 37 °C; salvo que se diga lo contrario, éstas fueron la concentración de proteína y condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura que se han utilizado para todos los experimentos de agregación). A concentraciones crecientes de alcoholes la agregación se daba con fases de latencia cada vez más cortas (Fig. 4.3 A y B).

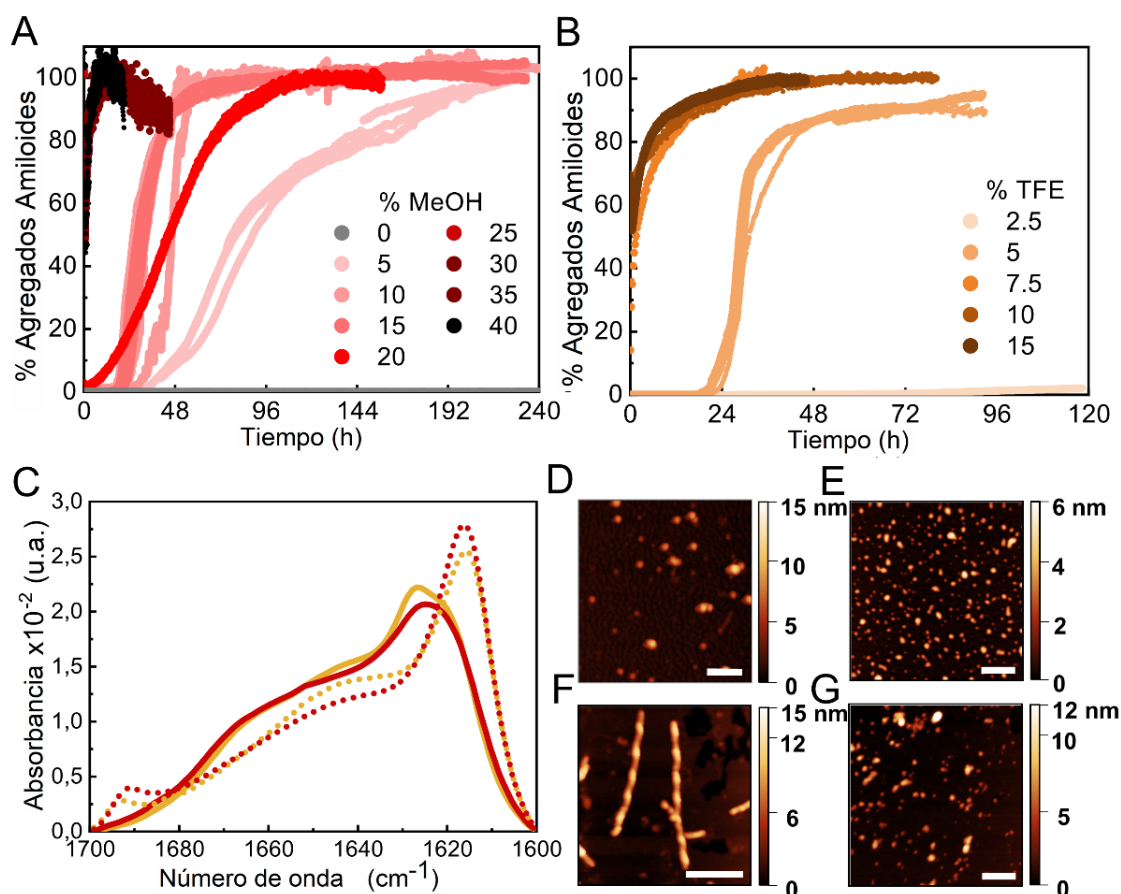


Figura 4.3. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en presencia de concentraciones crecientes de MeOH y TFE. (A-B) Cinéticas de agregación de α S a 100 μ M en presencia de diferentes concentraciones de MeOH (A) o TFE (B). Se muestran tres réplicas representativas de más de 10 experimentos con tres lotes de proteínas diferentes. (C) Espectros de IR de agregados formados en 10% MeOH (línea continua roja), 35% MeOH (línea punteada roja), 5% TFE (línea continua naranja) o 15% TFE (línea punteada naranja). (D-G) Imágenes de AFM de agregados formados en presencia de 10% MeOH (D), 35% MeOH (E), 5% TFE (F) y 15% TFE (G). Barra de escala: 200 nm.

El estudio estructural mediante espectroscopía de IR de los agregados generados en presencia o ausencia de bajas concentraciones de alcoholes muestra espectros de IR notablemente similares, independientemente de la condición en que se generaron. Todos ellos presentan la típica banda intensa a aproximadamente 1625 cm^{-1} , característica de estructura en lámina β amiloide⁴⁴¹ (Fig. 4.1 D, 4.3 C y 4.4 C-D). Pese a lo cual, tras los estudios morfológicos realizados mediante AFM, sí que se observaron variaciones en la morfología de los diferentes tipos de agregados según las condiciones en que habían sido generados (Fig. 4.1 A-C, 4.3 D-G y 4.4 E-H). Por ejemplo, en el caso de los agregados generados en presencia de un 5% de TFE, muestran una morfología fibrilar con un promedio de $10 \pm 1\text{ nm}$ de altura y $600 \pm 300\text{ nm}$ de longitud ($n = 20$) y con una periodicidad de giro de $61 \pm 2\text{ nm}$ de longitud (Fig. 4.3 F). En cambio, los agregados generados en 10% de MeOH muestran una morfología preferentemente globular, con alturas medias de $6 \pm 2\text{ nm}$ y diámetros de $47 \pm 8\text{ nm}$ ($n = 50$) (Fig. 4.3 D).

Este mismo comportamiento se observó con otros alcoholes como isopropanol (i-PropOH) (Fig. 4.4 A), 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) (Fig. 4.4 B) o etanol (los datos para éste último alcohol no son mostrados).

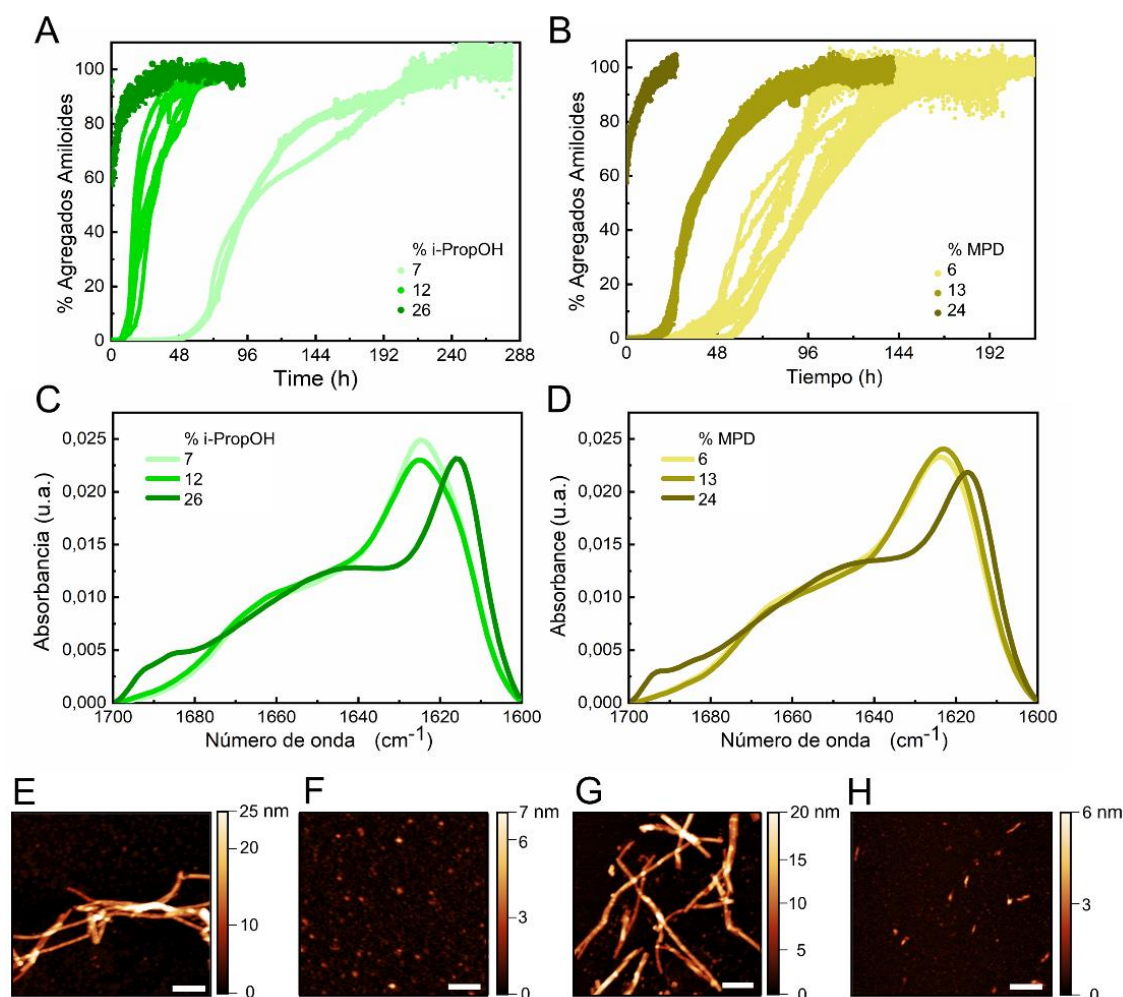


Figura 4.4. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en presencia de i-PropOH o MPD. (A-B) Cinéticas de agregación de α S a 100 μ M en PBS a pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C en presencia de 50 μ M ThT y diferentes concentraciones de i-PropOH (A) o MPD (B). Se muestran tres réplicas representativas de más de 10 experimentos con tres lotes de proteínas diferentes. (C-D) Espectros de IR de agregados formados en presencia de i-PropOH (C) o MPD (D) (concentraciones indicadas en las figuras). (E-H) Imágenes de AFM representativas de los agregados amiloides de α S generados en presencia de 7% (E) o 26% (F) de i-PropOH o en presencia de 6% (G) o 24% (H) de MPD. Barra de escala: 200 nm.

A partir de ciertas concentraciones de alcohol, que variaba según el tipo de alcohol utilizado, la fase de latencia de las cinéticas de agregación disminuía abruptamente desde un tiempo de latencia relativamente largo (típicamente mayor a 20 h) a uno mucho más corto (menor a 5-10 min) (Fig. 4.3 A y B y 4.4 A y B). Este fenómeno se observó, por ejemplo, al pasar del 5% al 7.5% de TFE o del 15% al 25% de MeOH. Al analizar los espectros de IR de los agregados generados en estas condiciones que presentan fases de latencia tan cortas, pudimos comprobar que los espectros de IR de estos agregados exhiben peculiaridades importantes que son comunes entre sí (Fig. 4.3 C, líneas de puntos, Fig. 4.4 C, línea verde oscuro y Fig. 4.4 D, línea marrón oscuro), pero diferentes a los espectros observados para los agregados a concentraciones de alcohol menores y, por tanto, con fases de latencia largas (Fig.

4.1 D, 4.3 C, líneas continuas y 4.4 C, líneas verde y verde claro y D, líneas marrón y marrón claro). En particular, la típica banda intensa característica de estructura en lámina β amiloide, que hasta ahora aparecía a aproximadamente 1625 cm^{-1} para todos los agregados analizados (todos ellos con fases de latencia largas), se desplaza a aproximadamente 1615 cm^{-1} . Además, aparece una nueva señal de baja frecuencia a aproximadamente 1690 cm^{-1} (Fig. 4.3 C y 4.4 C y D). Respecto al estudio morfológico realizado por AFM de estos agregados generados en condiciones que presentan fases de latencia cortas, los agregados formados eran preferentemente globulares (Fig. 4.3 E y G y 4.4 F y H). Como ejemplos, las dimensiones de los agregados formados en presencia de 15% de TFE eran de $5 \pm 1\text{ nm}$ de altura y $49 \pm 17\text{ nm}$ de diámetro ($n = 50$), valores similares a los formados en presencia de 35% MeOH ($6 \pm 2\text{ nm}$ de altura y $44 \pm 12\text{ nm}$ de diámetro ($n = 50$)) (Fig. 4.3 E y G). En todos los casos, independientemente del alcohol empleado y de si el agregado se ha obtenido en un régimen con fase de latencia corta o larga, los agregados exhibieron características amiloides. 1) Capacidad de unir la sonda ThT, aumentando ésta su rendimiento cuántico de fluorescencia en el complejo, aunque la intensidad de fluorescencia fue significativamente menor en los agregados generados en regímenes con fases de latencia cortas en comparación con los agregados generados con fases de latencia más largas. 2) Espectro característico de IR, que en todos los casos demostraba la presencia de estructura en lámina β intermolecular⁴⁴¹ (Tabla 4.1, donde puede observarse el porcentaje de lámina β que presentaban los diferentes agregados caracterizados en este trabajo). 3) Patrón de difracción de rayos X indicativo de estructura en lámina- β cruzada (Fig. 4.5). Esta estructura tan particular presenta típicamente una difracción a 4.7 \AA y otra entre 9 y 11 \AA (Fig. 4.5 A). Tanto los agregados generados a bajas concentraciones de alcohol con fase de latencia de horas, como los generados a concentraciones de alcohol superiores con fase de latencia de segundos-minutos mostraron un patrón de difracción con estas características (Fig. 4.5 B-C).

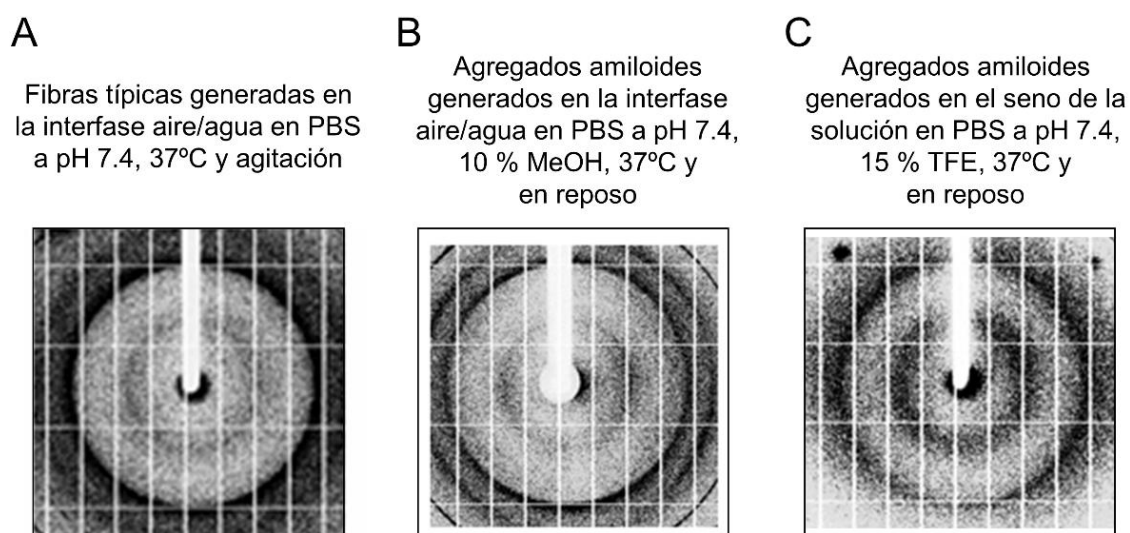


Figura 4.5. Patrón de difracción de rayos X de los agregados amiloides de α -sinucleína. Patrón de difracción de rayos X de los agregados típicos formados en PBS a pH 7.4 ($37\text{ }^\circ\text{C}$) en la interfase A/W en condiciones de agitación (A) y los agregados generados con 10% de MeOH (B) o con 15% de TFE (C) en condiciones de reposo. En todos los casos, los patrones de difracción de rayos X muestran el sello de difracción típico de la estructura β cruzada con las dos distancias características que corresponden a un espaciado entre hebras en los agregados de $4.68 \pm 0.01\text{ \AA}$ (A), $4.68 \pm 0.01\text{ \AA}$ (B) y $4.58 \pm 0.01\text{ \AA}$ (C) y una distancia entre láminas de $9.0 \pm 0.1\text{ \AA}$ (A), $9.0 \pm 0.2\text{ \AA}$ (B) y $9.3 \pm 0.3\text{ \AA}$ (C).

Y 4) capacidad de inducir la agregación de nuevos monómeros actuando como semillas. Tanto los agregados generados en condiciones con un 10% de MeOH como los generados en condiciones con un 35% de MeOH, muestran capacidades de siembra en su condición de origen (Fig. 6 A-B), un rasgo característico de los agregados fibrilares de naturaleza amiloide. Es importante señalar aquí que los agregados generados a 35% MeOH no tienen morfología fibrilar, pero sí que son capaces de actuar como semillas y cumplen el resto de propiedades características de los agregados amiloides. Cuando se repitieron estas reacciones de siembra en condiciones en las que el otro polimorfo al usado como semilla es más estable, no se observó aceleración de las cinéticas de agregación con respecto a las cinéticas en ausencia de semillas (Fig. 4.7 C y D), lo que sugiere que los agregados amiloides dejan de ser estables en esas otras condiciones, como posteriormente se demostró (ver apartado 4.1.7). Estos resultados, por tanto, sugieren que existen dos rangos de condiciones diferenciados en los que se producen diferentes tipos de agregados, con diferentes estructuras y estabilidades.

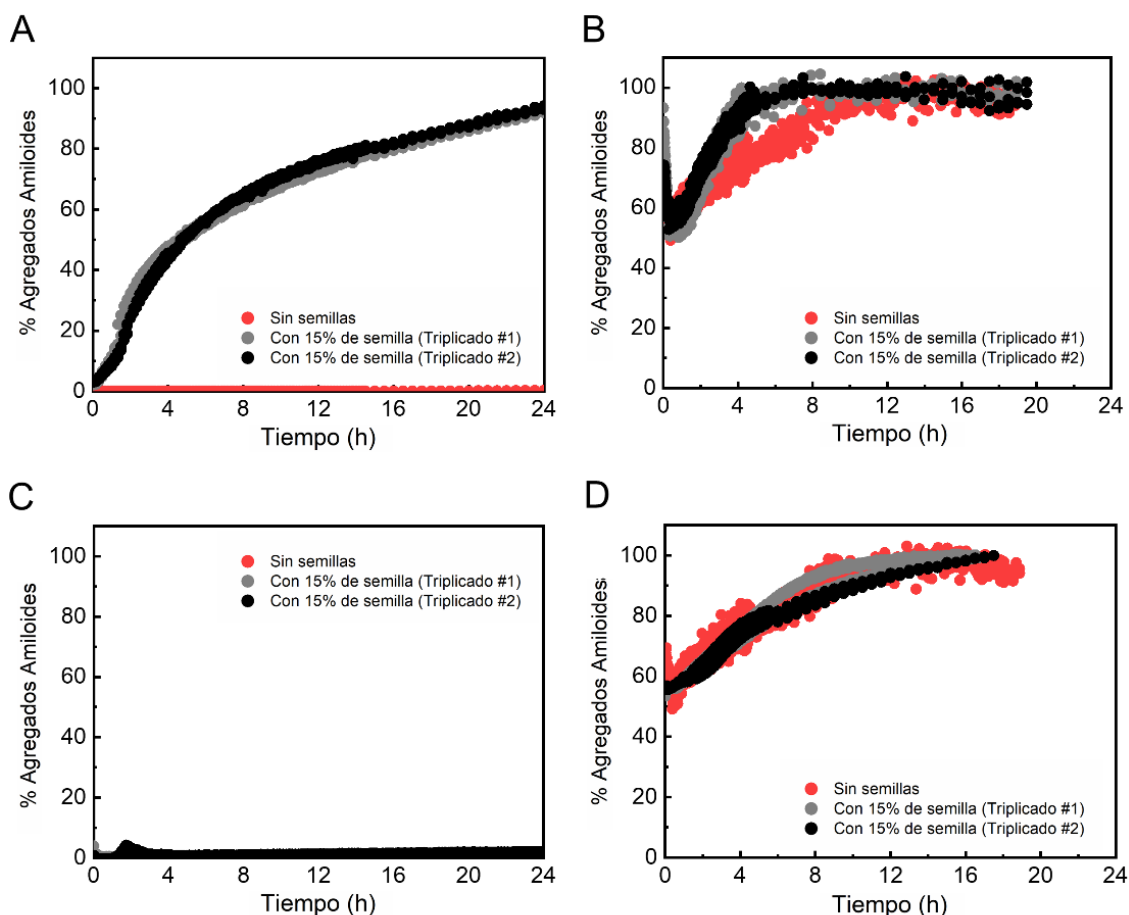


Figura 4.6. Capacidades de siembra de los pequeños agregados amiloides generados en PBS con 10% de MeOH o con 35% de MeOH. Cinéticas de agregación de α S a 25 μ M con semillas a 3.75 μ M (15% de semilla) en experimentos de: (A) sembrado del agregado generado en condiciones con 10% de MeOH sobre monómero en condiciones con 10% de MeOH; (B) sembrado del agregado generado en condiciones con 35% de MeOH sobre monómero en condiciones con 35% de MeOH; (C) sembrado del agregado generado en condiciones con 35% de MeOH sobre monómero en condiciones con 10% de MeOH; (D) sembrado del agregado generado en condiciones con 10% de MeOH sobre monómero en condiciones con

15% de MeOH; (E) sembrado del agregado generado en condiciones con 10% de MeOH sobre monómero en condiciones con 35% de MeOH.

Para aclarar el papel que juega las variaciones en la polaridad de la solución al añadir los alcoholes con el aumento de la velocidad de nucleación de α S, realizamos experimentos de agregación de α S con diferentes alcoholes a diferentes concentraciones de manera que la constante dieléctrica de la solución fuera siempre la misma, concretamente en torno a 73. Las concentraciones de los diferentes alcoholes que se utilizaron fueron: 10% de TFE, 12% de i-PropOH, 13% de MPD y 15% de MeOH. Los resultados que arrojan las cinéticas de estas agregaciones muestran que diferentes alcoholes, para una misma constante dieléctrica de la muestra, presentan diferencias muy notables en las fases de latencia (Fig. 4.7A). Además, los agregados formados, según su caracterización por espectroscopía de IR, no comparten una misma estructura (Fig. 4.7 B). Puede apreciarse como el agregado generado al 10% de TFE, y que cinéticamente mostró una fase de latencia corta, muestra una estructura muy diferente, con un pico a aproximadamente 1615 cm^{-1} y otro de baja frecuencia a aproximadamente 1690 cm^{-1} , a la que muestran los agregados generados con los otros alcoholes a las concentraciones indicadas, todos ellos con fases de latencia largas en sus cinéticas, y con un espectro de IR con un solo pico a aproximadamente 1625 cm^{-1} .

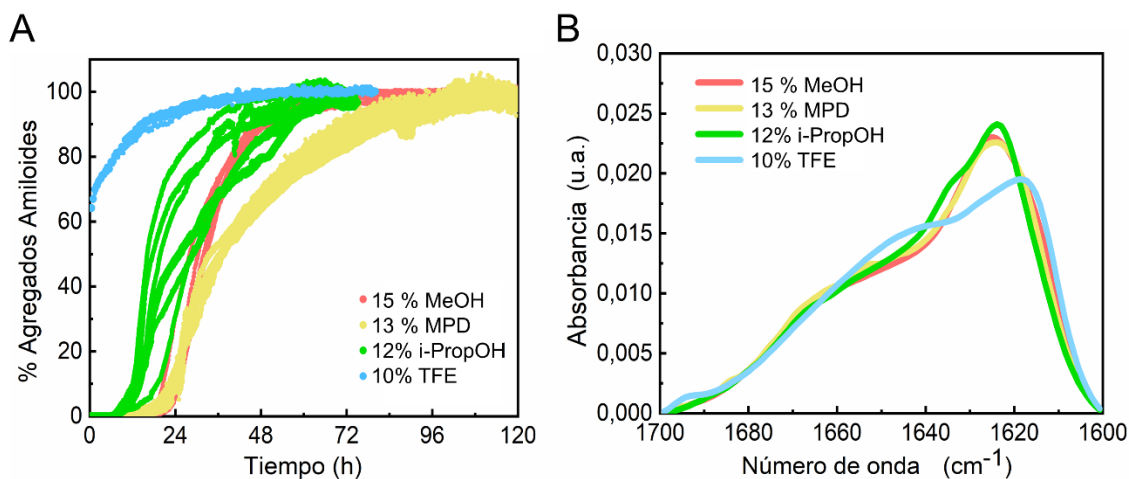


Figura 4.7. Caracterización cinética y estructural de los agregados de α -sinucleína formados en presencia de diferentes alcoholes, pero con la misma constante dieléctrica en solución. Cinética de agregación (A) y espectros de IR (B) de los agregados generados con α S a $100\ \mu\text{M}$ en PBS a pH 7.4 ($37\ ^\circ\text{C}$) en presencia de 15% de MeOH (rojo claro), 13% de MPD (amarillo), 12% de i-PropOH (verde) o 10% de TFE (cian). Las concentraciones de los diferentes alcoholes se eligieron para dar como resultado una solución con una constante dieléctrica igual o muy próxima a 73.

En este punto se quiso estudiar si la forma N-terminal acetilada de α S, la forma fisiológica más relevante de la proteína, tenía este comportamiento a nivel de agregación en función de la concentración de alcohol. Para ello, se realizaron experimentos análogos con esta

variante de la proteína y no se vieron diferencias significativas con respecto a la variante sin acetilar (Fig. 4.8).

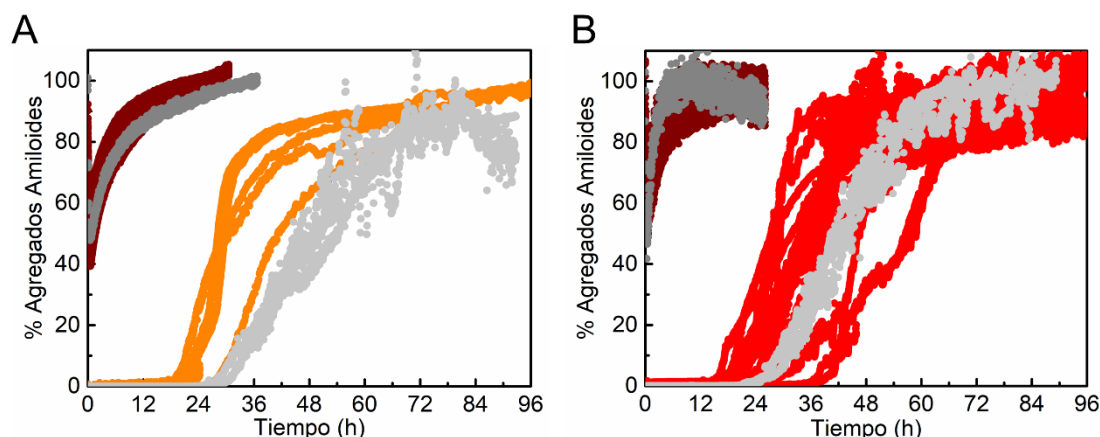


Figura 4.8. Comparación del comportamiento de agregación de la variante de α -sinucleína acetilada en el extremo N-terminal con la variante sin la modificación. Cinética de agregación de α S a 100 μ M en PBS a pH 7.4 (37 $^{\circ}$ C) en presencia de de ThT a 50 μ M y (A) 5% o 15% de TFE o (B) 10% o 35% de MeOH. La proteína WT se muestra en naranja (5% de TFE) o marrón oscuro (15% de TFE) en (A) y en rojo (10% de MeOH) o rojo oscuro (35% de MeOH) en (B), mientras que la variante de la proteína acetilada en el extremo N-terminal se muestra en gris claro (concentraciones más bajas de alcoholes) y oscuro (concentraciones más altas de alcoholes).

Por último, se analizó el efecto que pudiese tener el material del contenedor de las soluciones de proteína en la distinción de estos dos regímenes de agregación observados, con fase de latencia larga o corta. Para ello, se compararon los resultados obtenidos con las placas utilizadas hasta ahora, que están tratadas con un recubrimiento de PEG para hacer su superficie hidrofílica, con otros dos tipos de placas con diferentes superficies de contacto con la muestra: placas de poliestireno (superficie hidrofóbica) y placas con recubrimiento de vidrio (superficie hidrofílica) (Fig. 4.9). A nivel de las cinéticas de agregación hay que remarcar que, aunque se observaron variaciones en las cinéticas al utilizar recipientes con diferentes superficies de contacto con la solución de muestra en las condiciones en las que domina la agregación con fase de latencia larga (Fig. 4.9 A-B), la aceleración de la nucleación en el régimen de fases de latencia cortas (en el rango de minutos) es independiente del material de recubrimiento de la placa (Fig. 4.9 C-D).

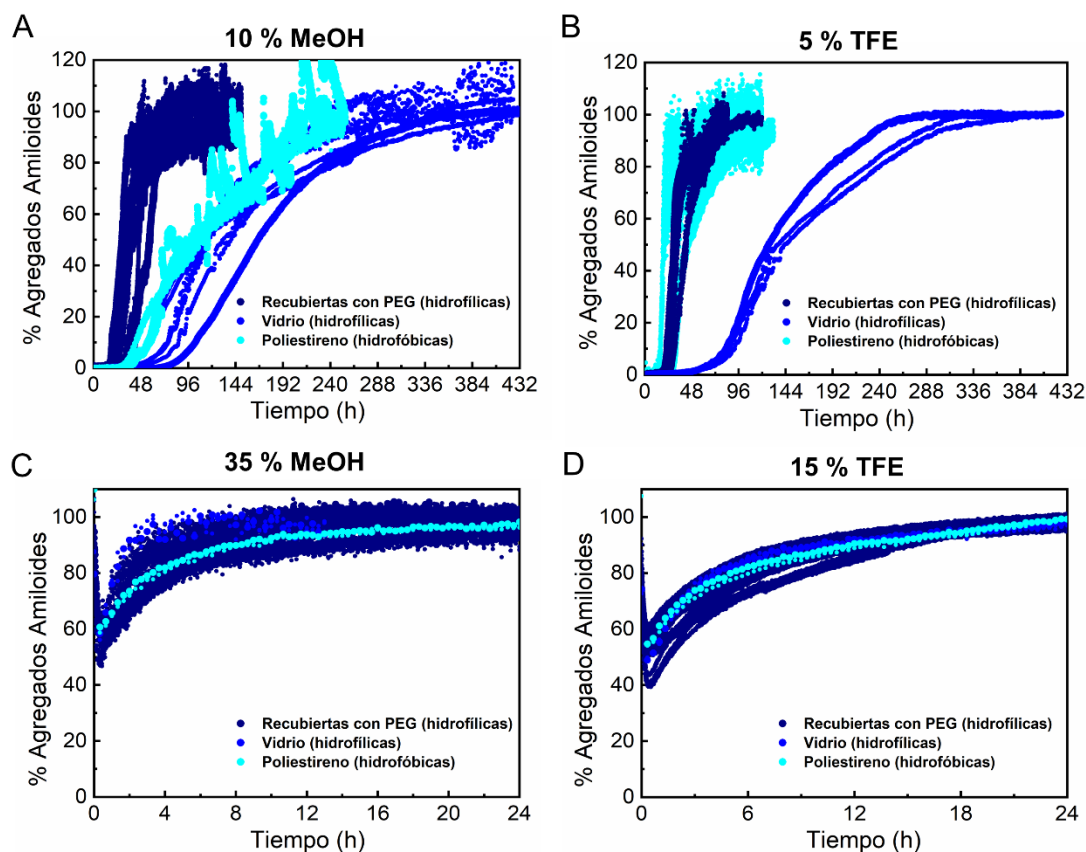


Figura 4.9. Impacto del material del recipiente en la cinética de agregación de α -sinucleína. (A-D) Cinéticas de agregación de α S a $100 \mu\text{M}$ en PB, pH 7.4, 37°C , en presencia de $50 \mu\text{M}$ ThT y 10% MeOH (A) o 5% TFE (B) o 35% MeOH (C) o 15% TFE (D). Cada condición se evaluó en placas revestidas con un tratamiento de PEG (azul oscuro), placas revestidas con vidrio (azul estándar) o placas de poliestireno sin revestimiento (cian).

4.1.3. La adición de altas concentraciones de sales, particularmente sales cosmotrópicas, conducen a la aceleración de la nucleación de α -sinucleína

El estudio del efecto de la presencia de alcoholes sobre la nucleación primaria de α S demostró que los cambios que éstos producen en la polaridad de las soluciones de proteína no eran el origen último de la aceleración de la nucleación. Otra propiedad que tienen los alcoholes en soluciones acuosas de proteínas es su efecto pronunciado en la reducción de la tensión superficial de las proteínas y, por lo tanto, en la reducción de su capa de hidratación. Con el fin de investigar si una disminución en la hidratación de las proteínas es un factor relevante para acelerar la nucleación de α S, analizamos el efecto de la adición de diferentes concentraciones de sales, particularmente sales cosmotrópicas, en el proceso de agregación de α S. Estas sales se caracterizan por favorecer la red de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua de la solución, aumentando su estructuración y dando lugar usualmente a un aumento en la estabilidad de las formas plegadas de las proteínas y a una reducción de la capa de hidratación. En oposición a este tipo de sales existen las conocidas como sales caotrópicas, que son

conocidas como agentes inductores de desorden en la estructura tridimensional del agua de la solución y tienden a disolver o solvatar solutos y desnaturalizar proteínas (ya que la forma desnaturalizada tiene más área expuesta al solvente)⁴⁶⁵. Para hacer este estudio trabajamos con tres sales: NaCl, con propiedades cosmotrópicas moderadas, sulfato de sodio (Na₂SO₄), con propiedades muy cosmotrópicas, y tiocianato de sodio (NaSCN), con propiedades caotrópicas según la serie de Hofmeister⁴⁶⁶.

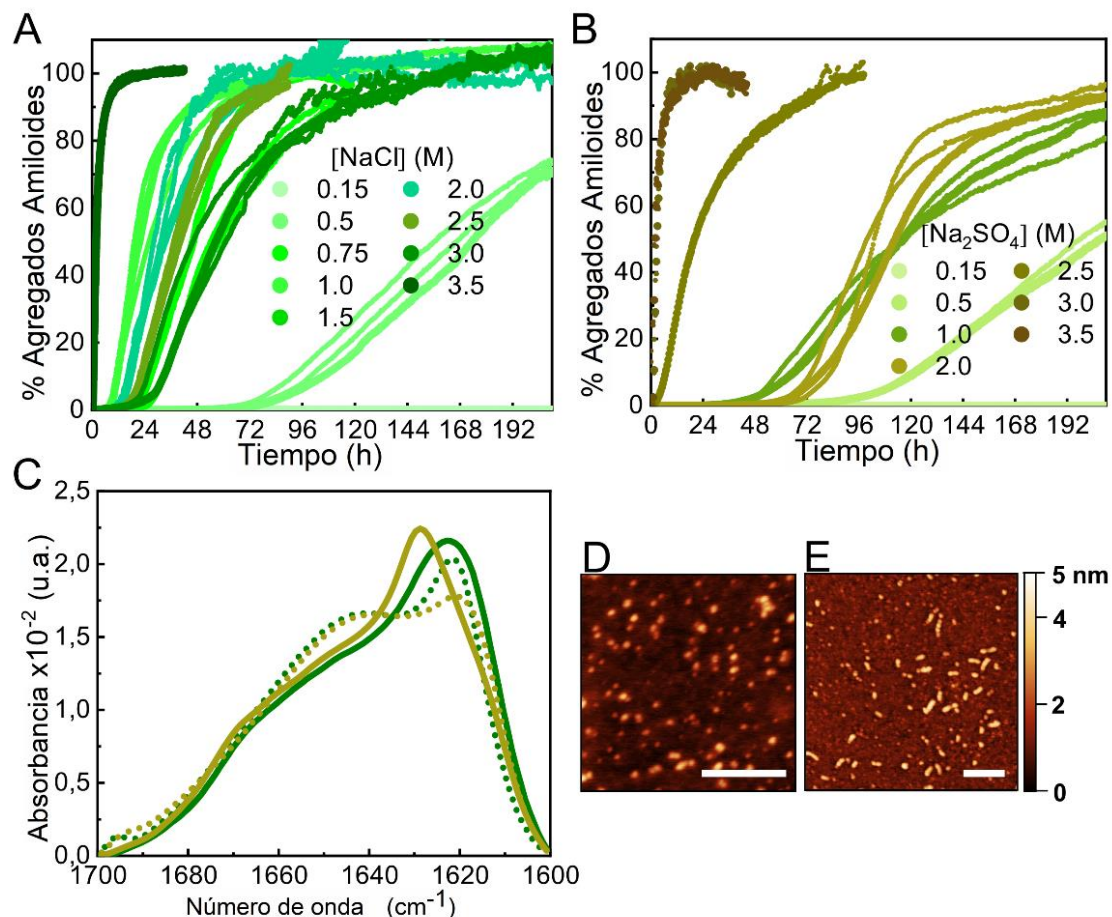


Figura 4.10. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en presencia de sales cosmotrópicas. (A-B) Cinética de agregación de α S a 100 μ M incubado en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (A) o Na₂SO₄ (B) (concentraciones expresadas en fuerza iónica). Se muestran tres réplicas representativas de más de 10 mediciones con tres lotes de proteínas diferentes. (C) Espectros de IR de agregados formados en 2 M de NaCl (línea continua verde), 3.5 M de NaCl (línea punteada verde), 2 M de Na₂SO₄ (línea sólida marrón) y 3 M de Na₂SO₄ (línea punteada marrón) (concentraciones expresadas en fuerza iónica). Imágenes de AFM representativas de agregados formados en 2 M de NaCl (D) y 3.5 M de NaCl (E). Barra de escala: 200 nm.

Los experimentos de agregación se realizaron con 100 μ M α S en tampón fosfato a 10 mM, pH 7.4, con la concentración de la sal deseada, a 37 °C de temperatura y en condiciones de reposo (sin agitación). La proteína en presencia de una fuerza iónica de 0.15 M por la adición de NaCl (condiciones estándar usadas anteriormente) no agrega de forma perceptible transcurridas 200 horas de incubación (Fig. 4.10 A), y tampoco lo hace si se encuentra a esa

fuerza iónica por la acción de Na_2SO_4 (Fig. 4.10 B) o NaSCN (Fig. 4.11) en condiciones de reposo. Al aumentar la concentración de las diferentes sales en el rango de fuerza iónica entre 0.5-1 M se observó una aceleración significativa de la agregación de αS tanto en los experimentos realizados con sales cosmotrópicas (NaCl , Na_2SO_4 ; Fig. 4.10 A y B, respectivamente), como en con sales caotrópicas (NaSCN ; Fig. 4.11). En las cinéticas de agregación se aprecia una fase de latencia en el rango de horas a días. Al incrementar más la fuerza iónica de la solución, en el rango de 1-3 M para NaCl y 1-2 M para Na_2SO_4 o NaSCN , las tres sales utilizadas en este estudio se comportaron de manera similar, con una cinética de agregación que varió levemente con la concentración de sal y con fases de latencia características mayores a 10 h. Sin embargo, al aumentar aún más la fuerza iónica de la solución, se observaron comportamientos diferentes entre las sales cosmotrópicas y caotrópicas. Para las sales cosmotrópicas empleadas, NaCl y Na_2SO_4 , la cinética de agregación cambió drásticamente a concentraciones altas de sal, dando fases de latencia cortas (menores a 5-10 min). En el caso de NaCl , este cambio drástico en las cinéticas se apreció a partir de fuerzas iónicas de 3.5 M (Fig. 4.10 A); mientras que para Na_2SO_4 , la transición a un régimen de fases de latencia cortas ya se pudo apreciar a partir de fuerzas iónicas iguales a 2.5 M (Fig. 4.10 B). Por otro lado, para el caso de la sal altamente caotrópica NaSCN , se observó una fuerte desaceleración del proceso general de agregación, con un fuerte incremento en los tiempos de las fases de latencia a partir de fuerzas iónicas iguales o superiores a 3 M (Fig. 4.11 A).

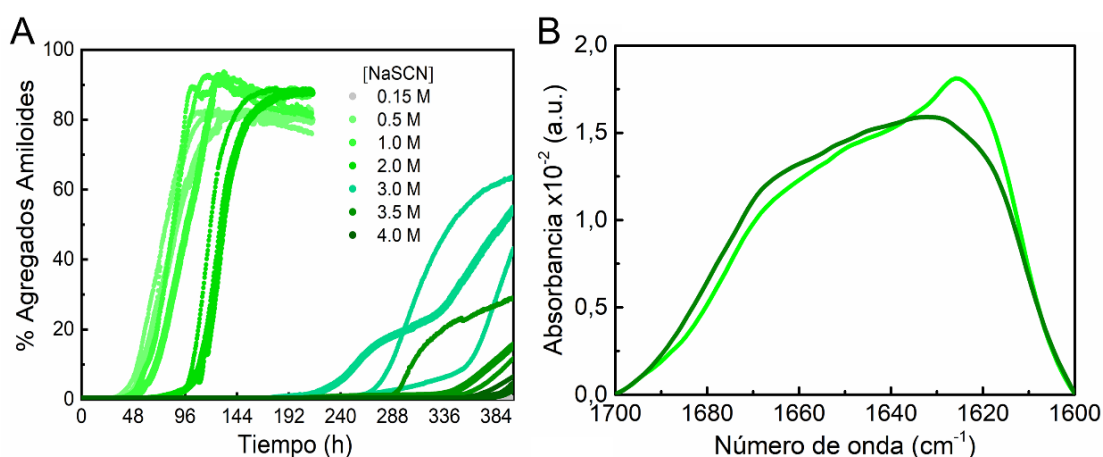


Figura 4.11. Caracterización cinética de la agregación de α -sinucleína formada en presencia de NaSCN , como ejemplo de sal caotrópica. (A) Cinética de agregación de αS a $100 \mu\text{M}$ en tampón fosfato a 10 mM , a $\text{pH } 7.4$ ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) en presencia de ThT a $50 \mu\text{M}$ y diferentes concentraciones de NaSCN . Tras un aumento moderado en la concentración de NaSCN hasta 2 M , hay un aumento significativo en la tasa aparente de agregación de αS , en línea con los efectos observados para NaCl y Na_2SO_4 . Por encima de 2 M de NaSCN , sin embargo, se observa una drástica desaceleración de la agregación, en marcado contraste con el comportamiento encontrado para las sales cosmotrópicas (Fig. 4.10). (B) Espectros de IR de agregados formados en 2 M de NaSCN (línea verde claro), 4 M de NaSCN (línea verde oscuro)

Tras analizar los espectros de IR de los agregados de α S generados en las diferentes condiciones de sal, tal y como se observó para las agregaciones promovidas por alcoholes, pudo distinguirse claramente diferencias en la estructura secundaria que presentaban los agregados que fueron generados en regímenes cinéticos de agregación con fases de latencia largas frente a los generados con fases de latencia cortas. Independientemente de la sal empleada y de la fuerza iónica a la que se hubiese producido la agregación, los agregados originados con cinéticas con fase de latencia larga volvieron a presentar espectros de IR con un solo pico a aproximadamente 1625 cm^{-1} ; mientras aquellos otros que se formaron en procesos que mostraban cinéticas con fases de latencia cortas nuevamente presentaron espectros de IR con un pico a aproximadamente 1615 cm^{-1} y otro de baja frecuencia a aproximadamente 1690 cm^{-1} (Fig. 4.10 C y 4.11 B). También pudo observarse, mediante análisis morfológico de los agregados por AFM, que los formados en altas concentraciones de sal parecían poseer preferentemente una morfología globular pequeña para todas las sales. En el caso de agregados generados en presencia de 2 M de NaCl, como ejemplo de agregados generados por una cinética de nucleación lenta, las dimensiones de los agregados eran $3.2 \pm 0.2\text{ nm}$ de altura y de $20 \pm 2\text{ nm}$ de diámetro ($n = 50$) (Fig. 4.10 D). Mientras que, para los agregados generados por cinéticas de nucleación rápida, como por ejemplo a 3.5 M de NaCl, los valores de tamaño observados fueron muy similares: $3.3 \pm 0.2\text{ nm}$ de altura y $23 \pm 3\text{ nm}$ de diámetro ($n = 50$) (Fig. 4.10 E).

4.1.4. La adición de agentes de aglomeración macromolecular también acelera la nucleación primaria de α -sinucleína

El tercer tipo de co-solvente o aditivo más utilizado para sondear cambios de hidratación de proteínas se trata de agentes de aglomeración macromolecular, típicamente polímeros sintéticos inertes. Nosotros utilizamos tres polímeros diferentes usados comúnmente como agentes de aglomeración en el estudio de agregación amiloide de proteínas. Estos son: dextrano 70, ficol 70 y PEG 8. La agregación de α S en presencia de concentraciones moderadas (150 g/L) de estos tres tipos de agentes de aglomeración dio lugar a una aceleración de la nucleación de α S, dando fases de latencia en los tres casos de aproximadamente 10 h (Fig. 4.12 A).

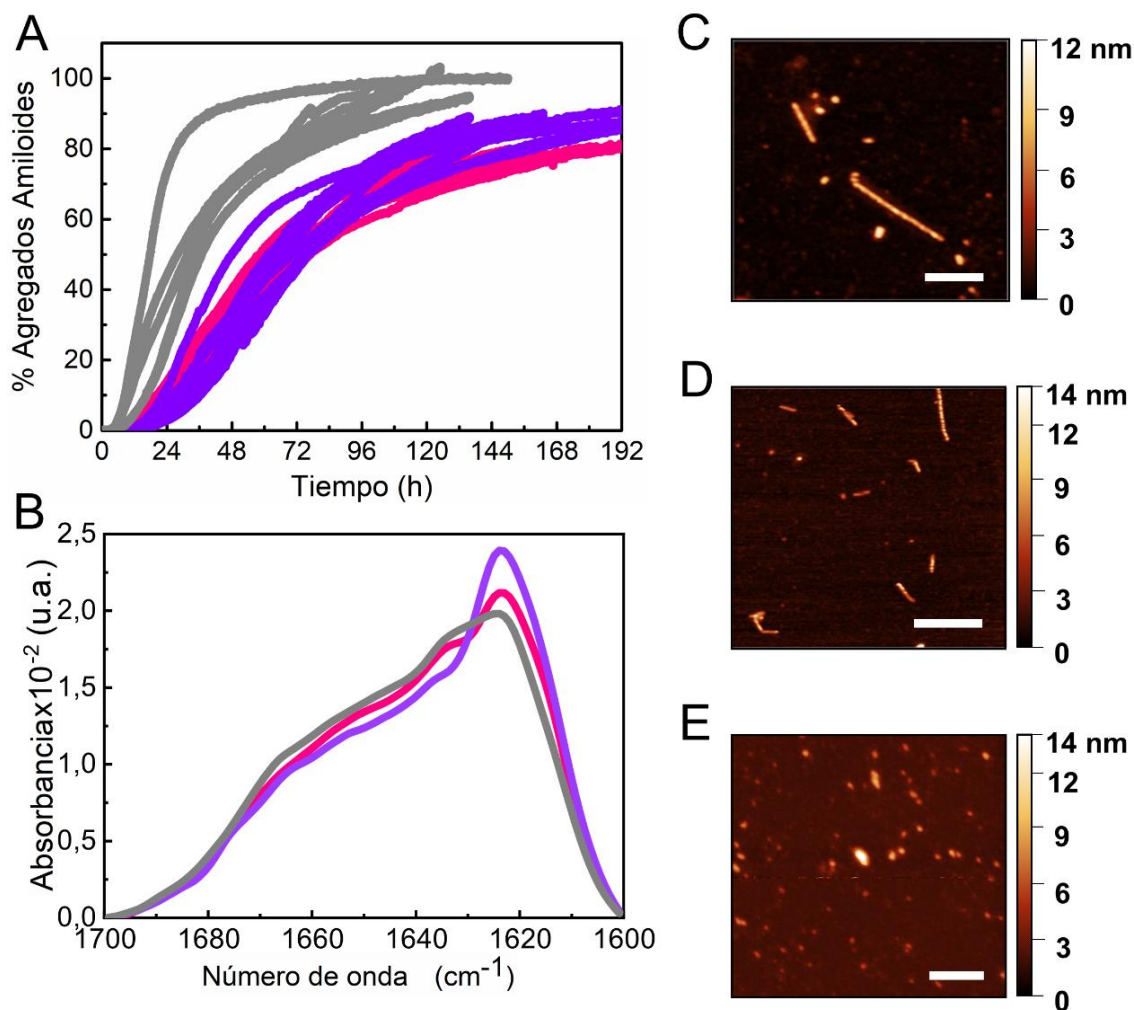


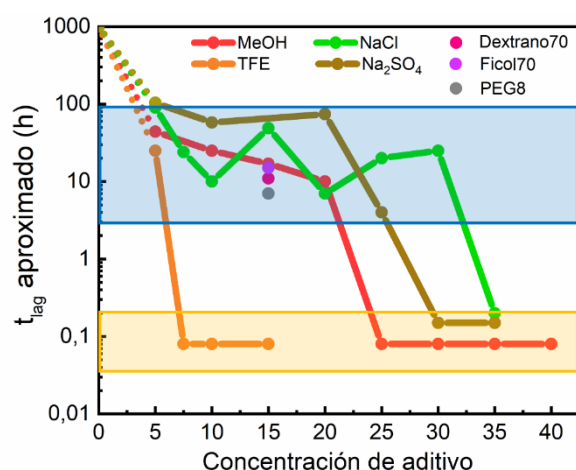
Figura 4.12. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en presencia de agentes de aglomeración macromolecular. (A) Cinéticas de agregación de 100 μ M α S incubada en presencia de 150 g/L de dextrano 70 (rosa), ficol 70 (violeta) y PEG 8 (gris). Se muestran tres triplicados representativos de más de 10 mediciones de tres lotes de proteínas diferentes. (B) Espectros de IR de agregados formados en presencia de dextrano 70 (rosa), ficol 70 (violeta) y PEG 8 (gris). (C-E) Imágenes de AFM representativas de los agregados formados en dextrano 70 (C), ficol 70 (D) y PEG 8 (E). Barra de escala: 200 nm.

En el caso de los agregados formados en las soluciones con dextrano 70 y ficol 70, tras el análisis morfológico por AFM, pudo comprobarse que presentaban una morfología preferentemente fibrilar, con dimensiones similares: 6.0 ± 0.8 nm de altura y 380 ± 170 nm de longitud ($n = 30$) en el caso del dextrano 70, y 6.3 ± 0.5 nm de altura, 340 ± 170 nm de longitud ($n = 15$) para ficol 70 (Fig. 4.12 C y D). En el caso de PEG 8, sin embargo, se observaron agregados de tipo más globular (Fig. 4.12 E). En cualquier caso, los tres tipos de agregados mostraron un aumento en la señal de fluorescencia de ThT, característica propia de los agregados amiloides, y un solo pico a aproximadamente 1625 cm^{-1} en sus espectros de IR (Fig. 4.12 B), como el resto de los agregados amiloides generados a través de procesos con cinéticas que muestran fases de latencia largas (Fig. 4.1 D, 4.3 C, 4.4 C y D, 4.10 C, 4.11 B y 4.12 B). Aunque, sin embargo, no se pudo lograr la difracción de rayos X de estas muestras

para poder comprobar que mostraban un patrón de difracción característico de conformación amiloide. Cabe destacar que, al aumentar la concentración del agente de aglomeración hasta 300-400 g/L, no se observaron cambios en los mecanismos de agregación para ninguno de los agentes de aglomeración utilizados, dándose siempre fases de latencia largas (datos no mostrados).

4.1.5. α -sinucleína forma agregados amiloides sin la presencia de una superficie de nucleación activa en condiciones de hidratación limitadas

Se ha observado que, a partir de determinadas concentraciones de alcohol o de ciertas fuerzas iónicas generadas por sales cosmotrópicas, las cinéticas de agregación de α S presentan una reducción drástica en las fases de latencia (Fig. 4.13 y Tabla 4.1). Un análisis general de la duración de las fases o tiempos de latencia (t_{lag}) en función de las concentraciones de aditivos que promueven la nucleación de la proteína (Fig. 4.13) refleja claramente la existencia de dos regímenes principales que sugieren mecanismos diferenciados de nucleación: un régimen en el que la fase de latencia de las reacciones de agregación abarca típicamente más de 10 h (Fig. 4.13, condiciones dentro del recuadro azul) y otro régimen cuya fase de latencia es al menos dos órdenes de magnitud inferior que la fase de latencia típica del régimen anterior (Fig. 4.13, condiciones dentro del recuadro amarillo). Llegados a este punto, nos propusimos caracterizar el tipo de nucleación primaria que se favorece en cada uno de los dos regímenes observados en este trabajo.



(% de alcoholes y agentes de aglomeración / $10^{-1} \times M$ para sales)

Figura 4.13. Análisis de la duración aproximada de la fase de latencia de agregación de α -sinucleína con respecto a la concentración de los diferentes tipos de aditivos. En ausencia de aditivos, no se observó agregación en las condiciones utilizadas en este estudio (α S a 100 μ M en PBS a pH 7.4, a 37 °C, en reposo), tras varios meses de incubación de la proteína, como se había publicado anteriormente⁴⁵⁷. Se eligió un valor arbitrario de 1000 h (aproximadamente 40 días) para la representación gráfica con el fin de visualizar la aceleración de la nucleación primaria en presencia de los aditivos seleccionados. Los valores de fase de latencia aproximados para todas las condiciones, excepto el valor 0 de concentración, se estimaron a partir del análisis (Materiales y Métodos) de las curvas cinéticas que se muestran en las Fig. 4.3, 4.10 y 4.12. La concentración de sales viene dada en forma de concentración de fuerza iónica.

En primer lugar analizamos el efecto que ejercen diferentes condiciones de deshidratación leve sobre el monómero de α S. Para ello estudiamos la estructura secundaria del monómero en las condiciones de interés mediante espectroscopía de CD. De los resultados arrojados por esta técnica podemos concluir que no hay apenas variación estructural apreciable al someter al monómero a las condiciones de deshidratación leve probadas (Fig. 4.14 A). Además, estudiamos por DLS el radio hidrodinámico (R_h) de los monómeros en estas condiciones; observando que no hay una diferencia significativa en los R_h de los monómeros sometidos a las distintas condiciones de deshidratación leve testadas, estando todas en el rango de 2.9-3.4 nm (Fig. 4.14 B).

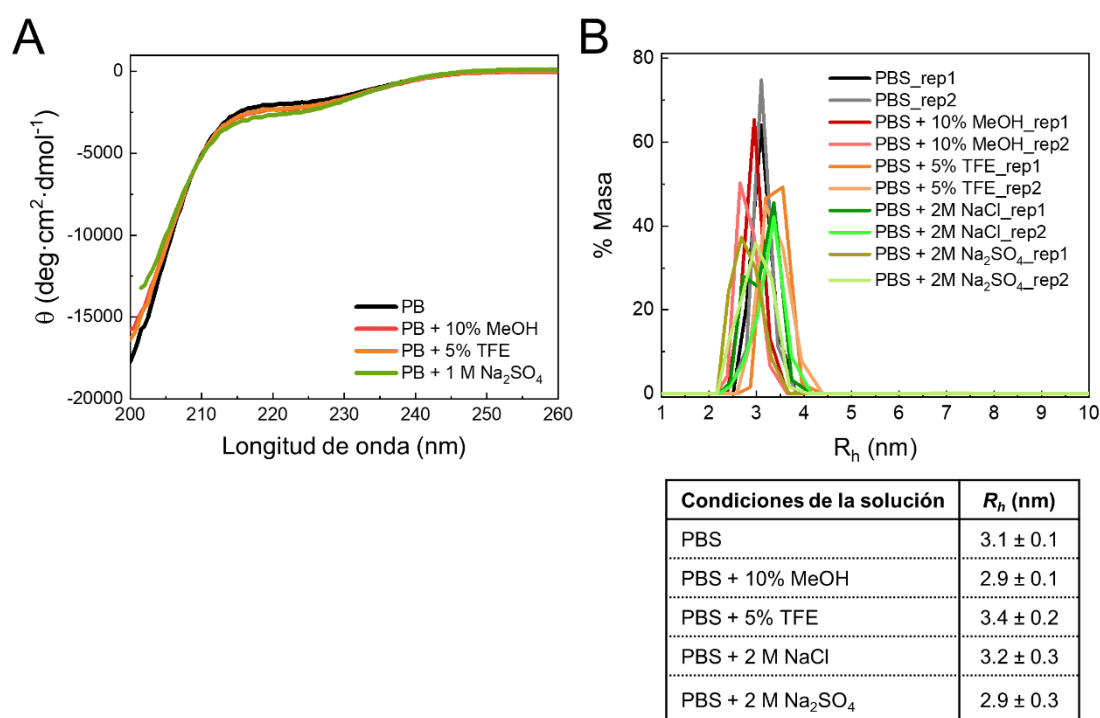


Figura 4.14. Evaluación de las características generales del conjunto estructural de la proteína monomérica en presencia de co-solventes y sales a concentraciones que aceleran la agregación de amiloide de α -sinucleína. (A) Espectros de CD de UV lejano de α S en diferentes condiciones. (B) Análisis del R_h de α S por DLS de α S en diferentes condiciones y valores medios aportados.

Con el fin de analizar el papel de las interfases en los dos tipos de nucleación primaria en presencia de aditivos, primero eliminamos cualquier interfase que pudiese promover la nucleación. En nuestras condiciones experimentales, la única interfase H/H accesible a la proteína era la interfase A/W, por lo repetimos los ensayos de agregación de α S en condiciones características para cada uno de los dos regímenes de nucleación en presencia de una interfase H/H sustituyendo a la interfase A/W incorporando unos tapones hidrofílico, tal y como se hizo en el apartado 4.1.1. Estos experimentos fueron bastante complejos ya que, debido al tiempo que requerían las reacciones de agregación en estas condiciones (aproximadamente 5-7 días) y

a que el ajuste de los tapones a los pocillos presentaba en muchas ocasiones un sellado imperfecto, era inevitable la aparición estocástica de burbujas de aire en un número elevado de muestras (Fig. 4.2 B), lo que aceleraba la nucleación de forma significativa. No obstante, en aquellas muestras donde no se formaron burbujas dentro de las primeras 100 h de incubación, no se observó agregación de α S en condiciones de reposo para las condiciones de agregaciones con fases de latencia largas en presencia tanto de alcoholes como de sales (Fig. 4.15), lo que demostraba el papel de la interfase A/W en el mecanismo de nucleación en estas condiciones. En condiciones que favorecen una reducción moderada de la capa de hidratación de la proteína, por tanto, se acelera la nucleación heterogénea de α S, sin signos de nucleación homogénea significativa durante los tiempos de medida (aproximadamente 1 semana).

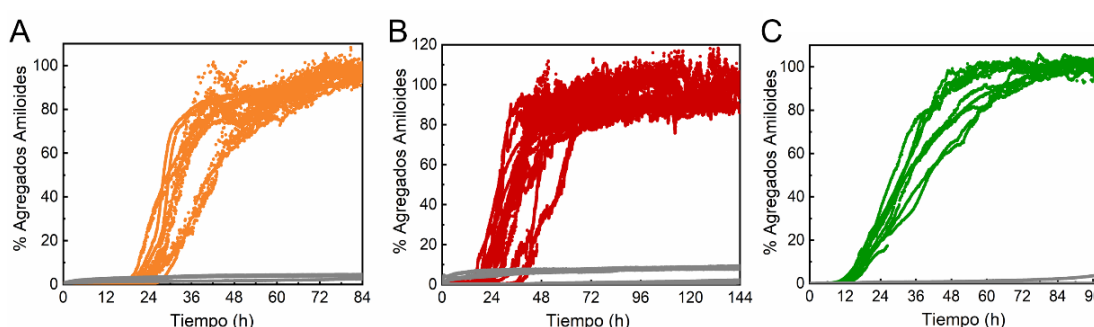


Figura 4.15. La eliminación de las superficies hidrofóbica/hidrofílica accesibles a α -sinucleína inhibe la agregación de la proteína en condiciones de alta hidratación de la proteína. Cinéticas de agregación de α S a 100 μ M en PBS a pH 7.4 (37 $^{\circ}$ C) en presencia de ThT a 50 μ M y 10% de MeOH (A), 5% de TFE (B) y 2 M de NaCl (C) en presencia de la interfase de A/W, sin tapones de PMMA (curvas de colores); y sin la interfase, con tapones de PMMA (curvas grises).

Para analizar el papel de la interfase A/W en las agregaciones con fases de latencia cortas, a causa de la elevada velocidad del proceso de nucleación, se tuvieron que buscar otras alternativas experimentales. Primero, analizamos la capacidad de α S para adsorberse y acumularse en la interfase A/W en estas condiciones en comparación con las condiciones de nucleación heterogénea previamente analizadas. Para ello recurrimos al empleo de un tensiómetro de Langmuir, con el que realizamos experimentos de tensión superficial de la interfase A/W en las condiciones más significativas y con diferentes concentraciones de proteína.

En ausencia de MeOH, la adición de α S a la solución condujo a la partición de la proteína entre el seno de la solución y la interfase A/W. La adsorción de la proteína a la interfase resultó en una reducción de la tensión superficial, que podía medirse directamente en el tensiómetro de Langmuir. En ausencia de α S en la solución, la interfase A/W presentó una tensión superficial de 72.8 ± 2 mN/m (Fig. 4.16 A). Incrementos en la concentración de proteína

en la solución conducían a una disminución en la tensión superficial de la interfase A/W, hasta alcanzar la concentración de saturación, en donde se llegaba a un mínimo de tensión superficial en la interfase, que no disminuía con el aumento de la concentración de proteína en la solución. En este punto de saturación, que en nuestros experimentos fue de aproximadamente 60 nM de α S para una interfase A/W estimada de 254.5 mm², α S generaba una monocapa de proteína en la interfase A/W, lo que disminuía la tensión superficial a un valor de 52 ± 2 mN/m (Fig. 4.16 A).

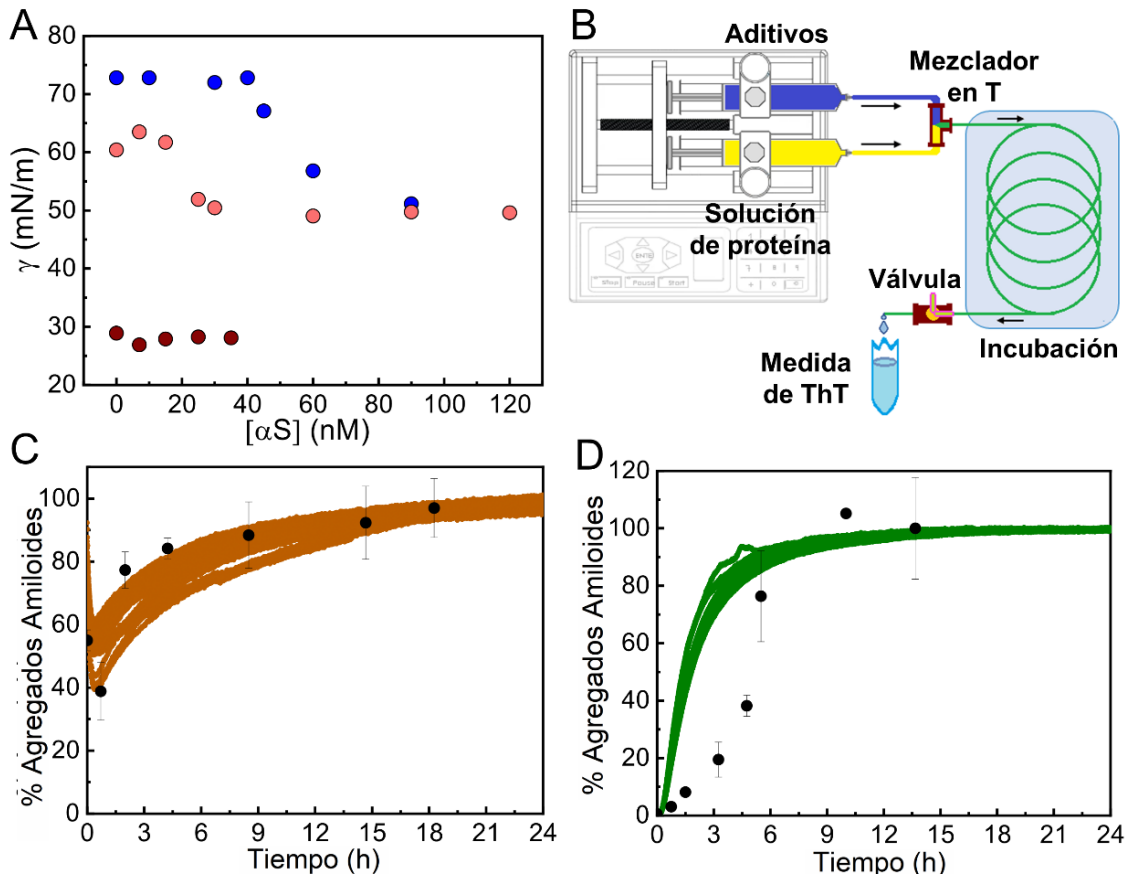


Figura 4.16. Propensión de la α -sinucleína a agregar en ausencia de una interfase hidrófoba/hidrófila activa. (A) Medidas de la tensión superficial en la interfase A/W de soluciones de α S en PBS solo (azul), con 10% de MeOH (rosa) o con 35% de MeOH (marrón); error de medición promedio 0.82, 1.15 y 2.07 mN/m para cada condición de solución, respectivamente. (B) Esquema del sistema de microfluídica utilizado para los experimentos que se muestran en los paneles C-D. (C-D) Cinética de agregación de α S a 100 μ M en presencia de 15% de TFE (C) o 3.5 M de NaCl (D) incubados en el sistema de microfluídica (puntos negros). Las barras representan errores estándar para $n = 3-4$ mediciones por punto de tiempo de agregación. Las líneas sólidas de colores muestran datos de agregaciones estándar en la placa.

Al repetir los experimentos en presencia de 10% de MeOH pudo verse como este co-solvente inducía una disminución en la tensión superficial de la interfase A/W (59.5 ± 0.8 mN/m; Fig. 4.16 A). Al hacer el barrido de concentraciones de proteína en la solución se vio que la concentración de saturación de α S (aproximadamente 25 nM) disminuyó significativamente con respecto al valor en ausencia de co-solvente, indicando que la proteína

tiene más preferencia por adsorberse a la interfase A/W en presencia de 10% de MeOH, a pesar de la disminución de la polaridad de la solución por la presencia del MeOH. Esto se puede deber, por tanto, a un aumento en la helipticidad de la región N-terminal de la proteína en presencia de MeOH³³¹. La monocapa de proteína en la interfase A/W en contacto con la solución al 10% de MeOH generaba una tensión superficial constante de 52 ± 2 mN/m, lo que mostraba que las propiedades de la monocapa eran similares en presencia o ausencia de 10% de MeOH. Sin embargo, al aumentar la concentración al 35% de MeOH en la solución, ya en ausencia de proteína, la tensión superficial de la interfase A/W disminuyó a aproximadamente 28 ± 2 mN/m, por lo que la proteína ya no se adsorbía a la interfase (Fig. 4.16 A).

Los datos proporcionados por los experimentos de tensión superficial indicaban que α S no se adsorbía a la interfase A/W cuando había una concentración de 35% de MeOH, que es representativa de las condiciones que generan agregaciones con fases de latencia cortas, lo que sugería que la nucleación primaria de la proteína en estas circunstancias se estaba dando en el seno de la solución y, por tanto, mediante una nucleación homogénea. Para demostrar de forma más directa que la proteína agregaba mediante una nucleación homogénea en estas condiciones, utilizamos un dispositivo de microfluídica (ver esquema del sistema en la Fig. 4.16 B) en el que la solución de proteína es mezclada e incubada con la concentración apropiada de aditivos en contacto únicamente con material hidrofílico (PEEK). Usando este dispositivo, logramos reproducir las cinéticas de agregación que habíamos observado previamente en los pocillos de las placas en presencia de una interfase A/W tanto en presencia de alcohol como de sal como co-solventes (Fig. 4.16 C y D). Es importante mencionar aquí que los dos tipos de experimentos (en los pocillos de la placa y en el sistema de microfluídica), que dieron cinéticas casi superponibles, presentan materiales en contacto con la solución muy diferentes, así como relaciones de superficie/volumen considerablemente distintas (en el caso de la tubería de PEEK, la relación de superficie/volumen es 5 veces mayor que en los pocillos de la placa), lo que está a favor de una nucleación homogénea. Las pequeñas desviaciones observadas entre la cinética de agregación de α S en presencia de 3.5 M de NaCl en la placa y en el sistema de microfluídica (Fig. 4.16 D) probablemente estén relacionadas con una aceleración de la nucleación heterogénea de la proteína en la interfase A/W en la placa bajo estas condiciones, ya que, a 3.5 M de NaCl, y a diferencia de 35% de MeOH, se espera que la proteína se divida entre el seno de la solución y la interfase A/W donde la nucleación heterogénea probablemente se vea también acelerada en estas condiciones.

Para asegurarnos de que las agregaciones realizadas en este dispositivo realmente estaban dándose lugar a través de un proceso de nucleación homogénea, y que no pudiéramos haber introducido en el sistema núcleos de agregación previamente formados antes de la mezcla con los co-solventes, realizamos una serie de comprobaciones en los lotes de α S que estaban siendo empleados para estos experimentos (Fig. 4.17). La mayoría de los experimentos presentados en este trabajo se realizaron con alícuotas de lotes de proteínas que se almacenaron a -80 °C justo después de la purificación por cromatografía de exclusión molecular y se descongelaron sólo una vez inmediatamente antes de su uso. Para comprobar la ausencia de trazas de núcleos preformados en estas alícuotas tras su descongelación, re-purificamos por SEC parte de uno de los lotes de α S congelada a -80 °C y comparamos el perfil de DLS que presenta una alícuota inmediatamente después de la re-purificación con una que acababa de ser descongelada de uno de los lotes almacenado a -80 °C. El resultado fue que ambas muestras contenían una única población de partículas con un R_h de 3.1 ± 0.2 nm y 3.1 ± 0.1 nm, respectivamente, que corresponde a la presencia únicamente de especies monoméricas de proteína (Fig. 4.17 A). Simultáneamente, también se realizaron una serie de experimentos de control, empleando diferentes concentraciones de NaCl como co-solvente, con las muestras re-purificadas mediante SEC y muestras recién descongeladas de uno de los lotes almacenado a -80 °C. Se hicieron tanto en tampón fosfato 10 mM a pH 7.4 con 2.5 M de NaCl, como una condición representativa de las agregaciones que dan lugar a cinéticas con una fase de latencia larga, como en el mismo tampón, pero con 3.5 M de NaCl, como una representativa de las agregaciones que dan lugar a cinéticas con una fase de latencia corta. En ambos casos no hay diferencia en el tipo de alícuota empleada, mostrando ambas soluciones de proteína cinéticas completamente superponibles (Fig. 4.17 B).

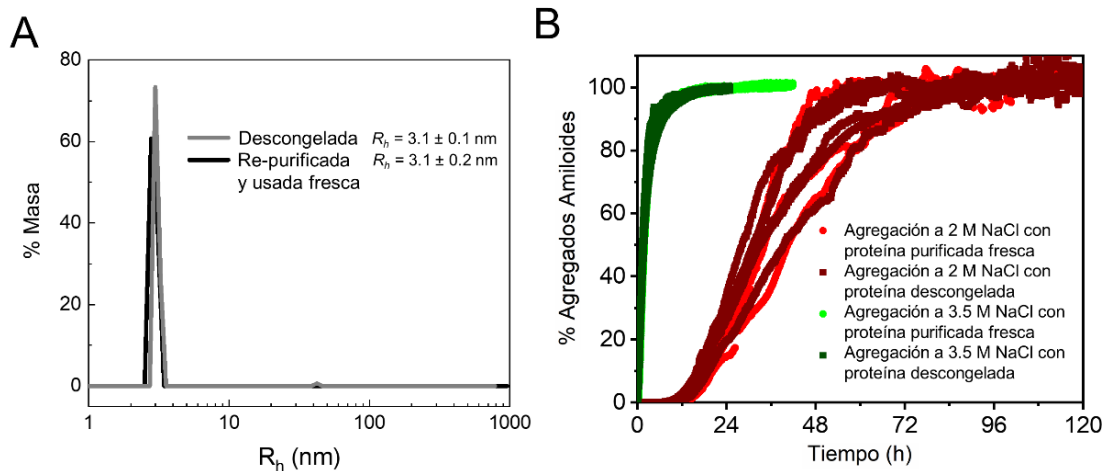


Figura 4.17. Evaluación de la presencia/ausencia de núcleos preformados en las muestras de lotes de proteínas. (A) Perfiles de DLS representativos de las soluciones de lotes de proteínas antes y después de la re-purificación por SEC y analizados/utilizados inmediatamente después de la elución de la columna;

líneas grises y negras, respectivamente. (B) Comparación de los perfiles cinéticos de agregación de la proteína de un lote purificada por SEC y almacenada a -80 °C (las alícuotas se descongelan inmediatamente antes de su uso) frente a una re-purificada por SEC y usada inmediatamente después de su elución de la columna; colores oscuros y claros, respectivamente; la comparación se hizo tanto en una condición del régimen con fase de latencia larga (PBS con 2.5 M de NaCl) en color rojo, como en una del régimen con fase de latencia corta (PBS con 3.5 M de NaCl) en color verde.

4.1.6. α -Sinucleína forma preferentemente agregados amiloides con lámina β paralela por nucleación heterogénea y agregados amiloides con lámina β antiparalela por nucleación homogénea

Cuando comparamos los espectros de IR de los agregados generados a través de nucleación primaria heterogénea u homogénea, hemos podido observar al menos dos diferencias notables (Fig. 4.3 C, 4.4 C y D y 4.10 C). La primera variación observada fue la aparición de una banda adicional en la región de amida I, a aproximadamente 1690 cm^{-1} , en los agregados generados a través de nucleación homogénea. Esta banda es indicativa de la presencia de una estructura de lámina β antiparalela^{441,467}. Además, notamos un desplazamiento general en el pico de la banda característica de amida I que se corresponde con la estructura en lámina β intermolecular, que aparece a aproximadamente 1625 cm^{-1} para los agregados amiloides generados por nucleación heterogénea, con lámina β intermolecular paralela, mientras que para los generados por nucleación homogénea aparece a números de onda más bajos, aproximadamente a 1615 cm^{-1} .

Con el fin de corroborar la disposición paralela o antiparalela de la arquitectura en lámina β de cada una de las dos clases estructurales de agregados amiloides de α S que hemos podido distinguir en este trabajo, analizamos la formación de excímero de fluorescencia intermolecular de moléculas de pireno unidas a diferentes posiciones de la cadena polipeptídica, particularmente en las posiciones 6, 24, 56, 69, 85, 90 y 140 en ambos tipos de agregados amiloides. Estos experimentos fueron llevados a cabo por el doctorando Pablo José Gracia González, que realizó un análisis estructural detallado previo en fibras con lámina β paralela de α S^{166,364,401}. Las posiciones 56, 69, 85 y 90 se encuentran ubicadas en el núcleo amiloide en lámina β de las fibras, la posición 24 está ubicada cerca de la parte N-terminal del núcleo amiloide y las posiciones 6 y 140 están ubicadas en los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia de la proteína, respectivamente. Cuando se analizaron los espectros de pireno de agregados de disposición paralela y antiparalela, respectivamente, según los espectros de IR cuando se utilizaron las variantes de pireno en las posiciones 56, 69, 85 y 90, en el primer caso se observó la formación de excímero de pireno (banda de emisión alrededor de 470 nm), además de las bandas de emisión de pireno monomérico (375-395 nm) (Fig. 4.19 A, azul),

mientras que para el segundo caso sólo se observó emisión de fluorescencia del monómero de pireno. Este comportamiento se visualizó mejor cuando se usó la relación de intensidades excímero/monómero (E/M), que de hecho se puede usar como un indicador de proximidad pireno-pireno⁴⁶⁸ (Fig. 4.18 B). Incluso en posiciones alejadas del núcleo amiloide se observó formación de excímero de pireno en los agregados generados con fase de latencia larga, lo que implica una disposición de lámina β intermolecular paralela. En el caso de los agregados amiloides generados en condiciones con regímenes cinéticos con fases de latencia cortas, y que mostraban una estructura en lámina β antiparalela por espectroscopía de IR, no se observó formación significativa de excímero de pireno para ninguna de las posiciones de α S analizadas (Fig. 4.18 A, roja punteada y verde punteada) (Fig. 4.18 C y D, sombreados rojos y verdes). Estos resultados, por tanto, están de acuerdo con una orientación relativa antiparalela de los monómeros de α S dentro de este tipo de agregado amiloide.

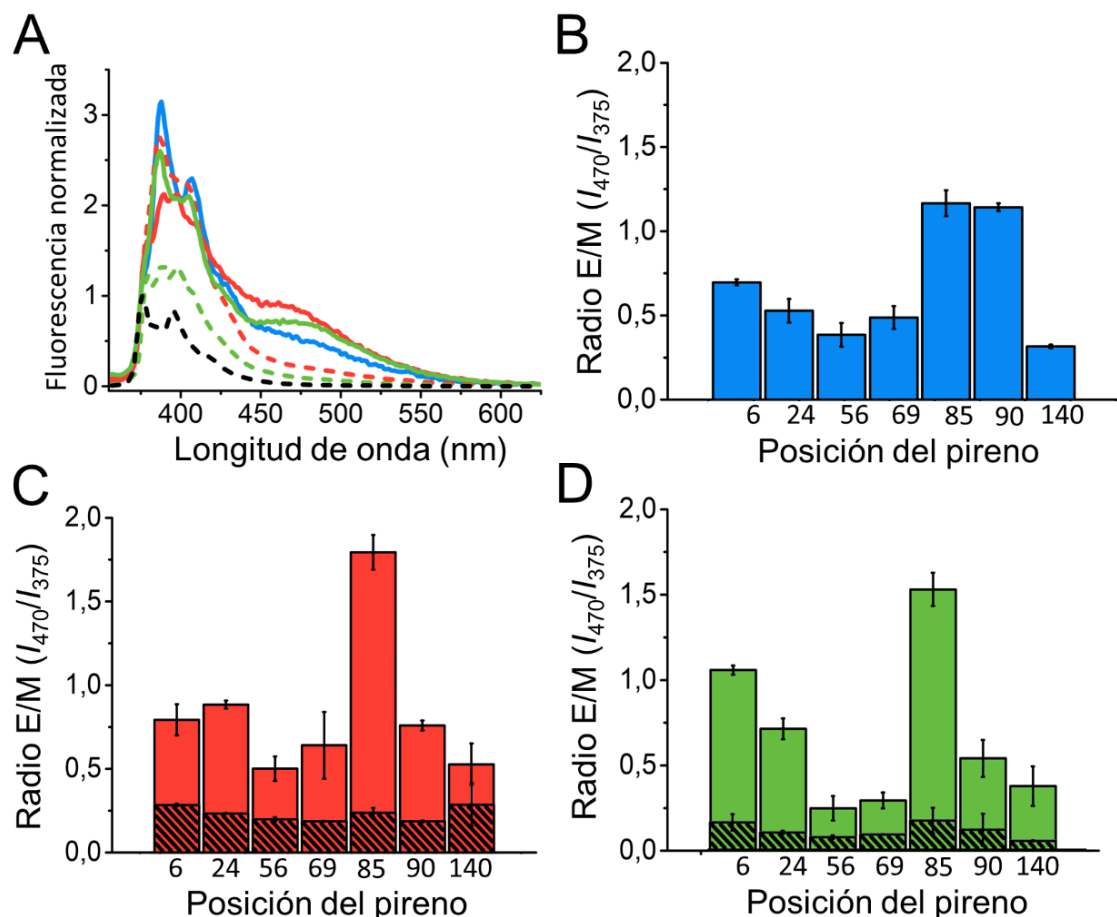


Figura 4.18. Análisis de formación de excímeros de pireno intermolecular de los agregados amiloides de α -sinucleína con diferentes láminas β . (A) Espectros de fluorescencia de pireno de agregados de α S, marcados en la posición 85 de la secuencia primaria de la proteína, formados en la interfase A/W en PBS con agitación (azul), o en reposo en PBS con 10% MeOH (línea roja continua), o 2 M NaCl (línea verde continua), así como los agregados formados en la mayor parte de las soluciones en PBS con 35% MeOH (línea roja punteada) o 3.5 M NaCl (línea verde punteada). (B-D) Valores de la relación de intensidad de E/M de pireno obtenidos para los agregados de α S etiquetados con una relación de α S-pireno/ α S-no-etiquetada de 1:10 en diferentes posiciones de la secuencia primaria (6, 24, 56, 69, 85, 90 y 140) formadas

en la interfase A/W en PBS con agitación fuerte, en PBS con 10% MeOH (C, rojo), PBS con 35% MeOH (C, sombreado en rojo), PBS con 2 M NaCl (D, verde) o PBS con 3.5 M NaCl (D, sombreado en verde), a pH 7.4.

Para ahondar más en la razón por la que la agregación a través de nucleación primaria homogénea produce siempre agregados con una estructura en lámina β antiparalela intermolecular, intentamos comprobar si la electrostática de α S juega algún papel en la orientación de los monómeros en el seno de la solución durante el proceso de nucleación. Para ello, además de la información que nos aportan las agregaciones mediante nucleación homogénea realizadas a altas fuerzas iónicas, que ya sugieren un papel poco relevante de las interacciones electrostáticas, recurrimos al empleo de una variante de α S en la que se eliminaron los últimos 36 residuos de la proteína, donde se concentran la gran mayoría de las cargas negativas (presentando esta variante una carga neta de -9 a pH fisiológico que contrasta a los -15 que presenta la WT). Esta variante, Δ 104-140 α S, en presencia de alcoholes (TFE y MeOH) en condiciones de nucleación primaria homogénea (15% TFE y 35% MeOH) agrega con cinéticas similares a las cinéticas de la proteína completa en las mismas condiciones (Fig. 4.19). Además, los agregados de la variante truncada generados en condiciones de nucleación homogénea presentaban una estructura en lámina β antiparalela similar a los formados por la proteína completa (Fig. 4.19 C y D). Estos resultados descartan que las interacciones electrostáticas sean relevantes para la disposición paralela o antiparalela de las moléculas de α S en los agregados amiloides. Sin embargo, cabe destacar que sí que juegan un papel en la elongación de los agregados amiloides con arquitectura paralela, ya que la variante truncada elonga más lentamente que la proteína completa según las cinéticas de agregación obtenidas.

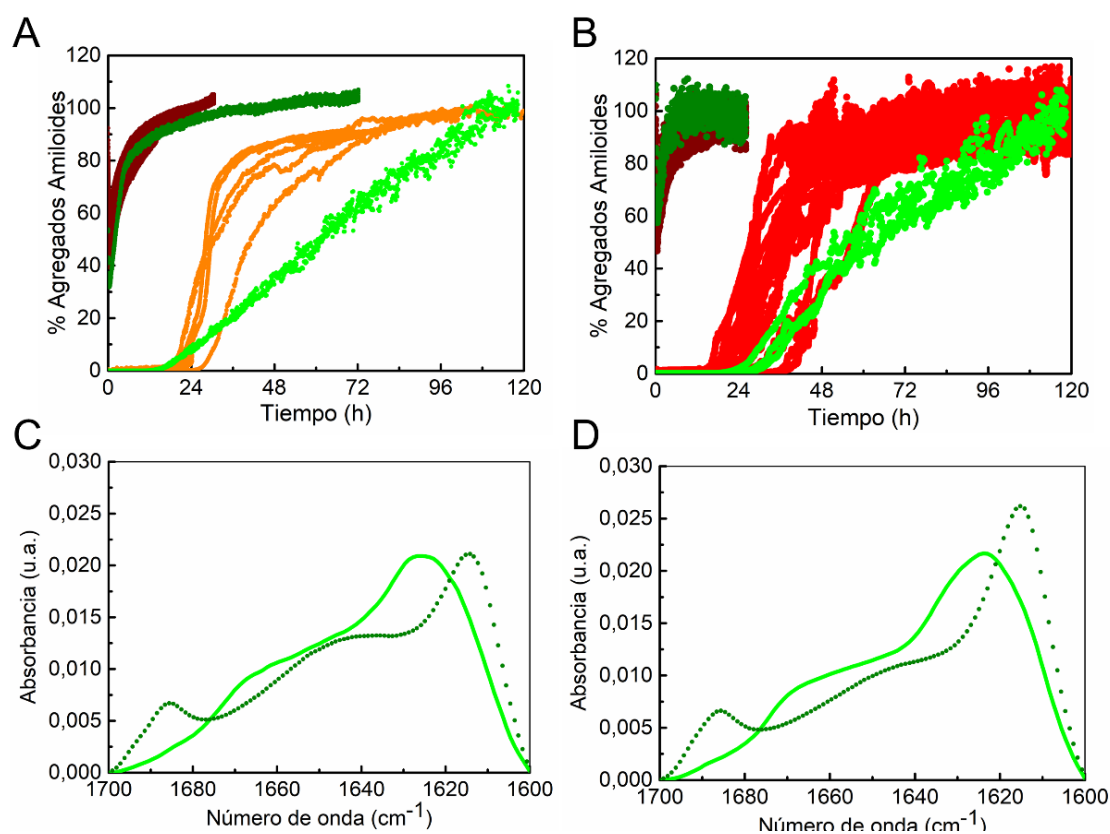


Figura 4.19. Comparación entre el comportamiento de agregación de WT y Δ 104-140 α -sinucleína. (A-B) Cinética de agregación de α S a 100 μ M en PBS a pH 7.4, 37 °C en presencia de 50 μ M ThT y (A) 5% o 15% de TFE o (B) 10% o 35% de MeOH. La proteína WT se muestra en naranja (5% de TFE) o marrón oscuro (15% de TFE) en (A) y en rojo (10% de MeOH) o rojo oscuro (35% de MeOH) en (B), mientras que la variante de la proteína Δ 104-140 se muestra en verde claro para las agregaciones con menor contenido de co-solvente y verde oscuro para las que tienen mayor contenido de co-solvente en cada panel. (C-D) Espectros de IR de los agregados de Δ 104-140 α S formados en presencia de 5% o 15% de TFE (C, verde claro y verde oscuro respectivamente) y 10% o 35% de MeOH (D, verde claro y verde oscuro respectivamente).

Por otro lado, dada la relación constante entre cinéticas de agregación con fases de latencia cortas y agregados resultantes con una arquitectura en lámina β antiparalela, decidimos comprobar el tipo estructural de agregados que se forman en condiciones de nucleación aparentemente homogénea (rango de 25-30% de MeOH) a una concentración de proteína 20 veces menor a la utilizada anteriormente (5 μ M). Las cinéticas de agregación obtenidas a esa concentración de α S presentaban una fase de latencia más larga, en el rango de horas (Fig. 4.20 A), consecuencia de la menor probabilidad de contactos favorables entre monómeros de α S para poder dar lugar a la formación de un núcleo activo, aunque la organización estructural de los agregados obtenidos se correspondía con una organización en lámina β antiparalela (Fig. 4.20 B, datos aportados por Pablo José Gracia Gonzalez). En este rango de concentraciones de proteína, no se pudo observar agregación en condiciones donde se favorece la nucleación heterogénea (datos no mostrados), indicando que cuando la nucleación homogénea es favorable

(condiciones de baja hidratación de la proteína) esta se puede dar de manera muy eficaz en el seno de la solución sin la necesidad de una superficie activa, lo que lleva a que la concentración crítica para la agregación de la proteína sea significativamente menor que la que se necesita en condiciones de nucleación heterogénea.

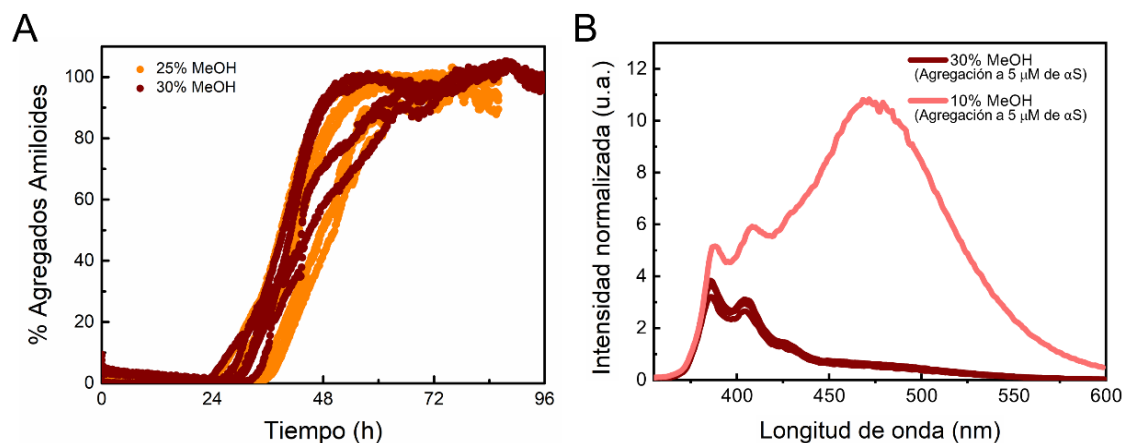


Figura 4.20. Agregación de α -sinucleína a una concentración de proteína 5 μ M en PBS a pH 7.4, 30% de MeOH. (A) Cinética de agregación de α S a 5 μ M en PBS a pH 7.4 (37 ° C) en presencia de 25% y 30% de MeOH con ThT a 50 μ M. (B) Espectros de fluorescencia de agregados de α S marcados con pireno a 5 μ M formados en presencia de 10% y 30% de MeOH. Sólo se utilizó α S marcado, que llevaba el pireno en la posición 85. Los espectros se normalizaron a I_{375} .

4.1.7. La agregación a través de una nucleación homogénea da lugar a agregados amiloides con diferente estabilidad termodinámica con respecto a los agregados generados por nucleación heterogénea

Nuestros resultados indican que la agregación de α S puede desencadenarse por mecanismos de nucleación alternativos, dependiendo del grado de hidratación de la proteína, y que conducen a distintos polimorfos amiloides con diferente estructura interna de los protofilamentos. Estos mismos resultados parecen indicar que en medios en que la proteína posee una hidratación alta, si se desencadena la agregación, se prefiere la formación de agregados con lámina β paralela, mientras que en condiciones en que la proteína tiene una hidratación limitada los agregados formados tienden a presentar una configuración antiparalela. Dado que esta divergencia en los mecanismos de mal plegamiento de los agregados parece estar vinculada al estado de hidratación del monómero de proteína, nos pareció interesante analizar la influencia del grado de hidratación de la proteína sobre la estabilidad de los agregados de α S resultantes. Para ello, empleamos el alcohol MeOH como agente modificador de la capa de hidratación de α S y comparamos el porcentaje de agregados paralelos y antiparalelos formados al final de las reacciones de agregación a diferentes concentraciones de MeOH (Fig. 4.21 y 4.22). Este porcentaje se estimó tanto por análisis de los espectros de IR, como por análisis de

los espectros de pireno (estos últimos experimentos y su análisis fueron realizados por el doctorando Pablo José Gracia González).

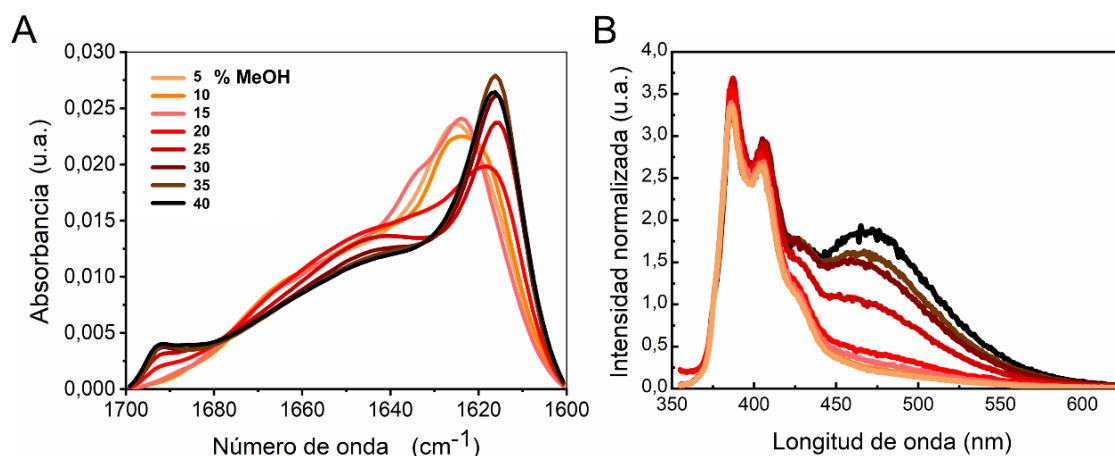


Figura 4.21. Análisis estructural de los agregados de α -sinucleína formados en presencia de diferentes porcentajes de MeOH. (A-B) Espectros de IR (A) y de fluorescencia de pireno normalizados por I_{375} (B) de agregados formados con 100 μ M α S en PBS, pH 7.4, 37 °C, en presencia de diferentes concentraciones de MeOH.

Al aumentar la concentración de MeOH en la solución de proteína en el rango 5-40%, puede observarse una variación en los espectros que se corresponde con la aparición de estructura en lámina β antiparalela. Para determinar más exactamente los límites entre los rangos de concentraciones de MeOH donde coexisten agregados con estructura paralela y antiparalela, realizamos un ajuste global de los espectros de IR mediante Python y un análisis análogo de los espectros de pireno. Los resultados del análisis aparecen recogidos en la Fig. 4.22 A, donde se puede distinguir que la disposición de lámina β paralela se forma preferentemente a concentraciones de MeOH menores a 15%, mientras que se prefiere la orientación antiparalela a concentraciones mayores a 25% de MeOH. Sin embargo, entre 15 y 25% de MeOH, se observa una mezcla de ambos tipos de agregados, lo que indica que en este régimen notablemente estrecho de concentraciones de MeOH y, por lo tanto, de condiciones de hidratación de proteínas, ambos tipos de mecanismos de nucleación primaria compiten entre sí.

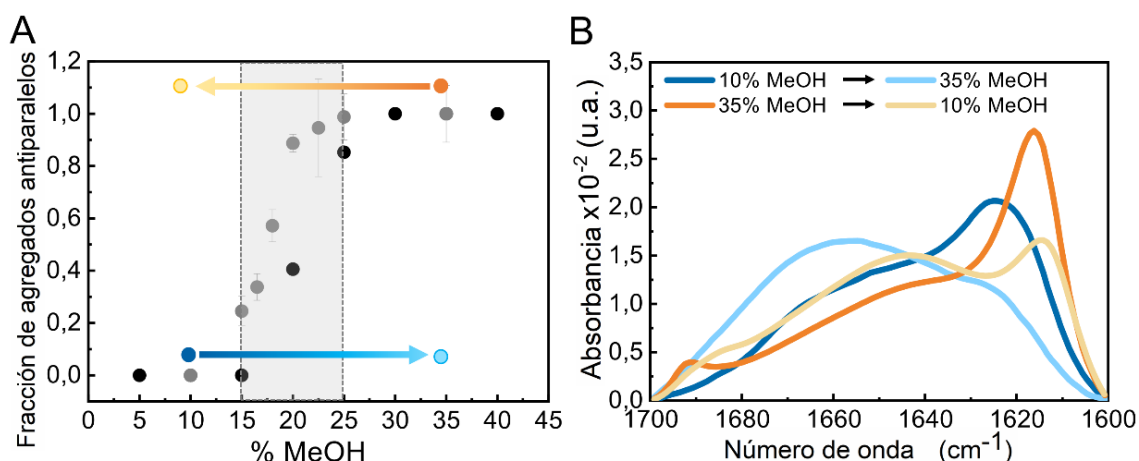


Figura 4.22. Impacto de la concentración de alcohol en el comportamiento de agregación de α -sinucleína. (A) Fracción de agregados antiparalelos encontrados al final de las reacciones de agregación de α S a 100 μ M en PBS, pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, en presencia de diferentes concentraciones de MeOH obtenidas del análisis de la deconvolución de los espectros de IR (puntos negros) o de la relación E/M de las bandas de pireno (puntos grises). Para los datos de pireno, las barras de error muestran la desviación estándar de experimentos por triplicado, mientras que para los datos del análisis de los espectros de IR la incertidumbre obtenida del ajuste de espectros globales fue 0.02 (ver capítulo de Materiales y Métodos). Se analizó la estabilidad de los agregados con lámina β paralela (generados al 10% MeOH) y antiparalela (generados al 35% MeOH) en condiciones en las que el otro tipo de agregado se forma preferentemente (marcados como puntos y flechas azules y naranjas, respectivamente). (B) Estabilidad de los agregados indicados en el panel A para espectros de IR.

Cuando los agregados con lámina β paralela, generados por nucleación heterogénea a bajas concentraciones de alcohol, se transfirieron a condiciones en las que domina la nucleación homogénea formando agregados con lámina β antiparalela y viceversa (Fig. 4.22 A), se observó que los agregados no se disociaban por completo en monómeros de forma rápida (15 h de incubación a temperatura ambiente), siempre y cuando la concentración de MeOH en la solución final fuera superior al 5%. En el caso de que los agregados se transfieren a PBS en ausencia de alcohol, sólo los agregados formados con lámina β paralela se mantuvieron estables, mientras que los que presentaban estructura en lámina β antiparalela se desagregaron instantáneamente. Esto pudo comprobarse a través de un análisis SDS-PAGE (no se muestra). Por otro lado, cuando la disolución contenía al menos un 5% de MeOH, se comprobó que todos los agregados transferidos mantenían su disposición original de lámina β , aunque sus estructuras sufrían una severa desestabilización (Fig. 4.22 B y Fig. 4.23) dando un aumento significativo en el contenido de estructura desordenada en ambos casos (Fig. 4.22 B), lo que afectó fuertemente a sus capacidades de siembra en experimentos de elongación (Fig. 4.6).

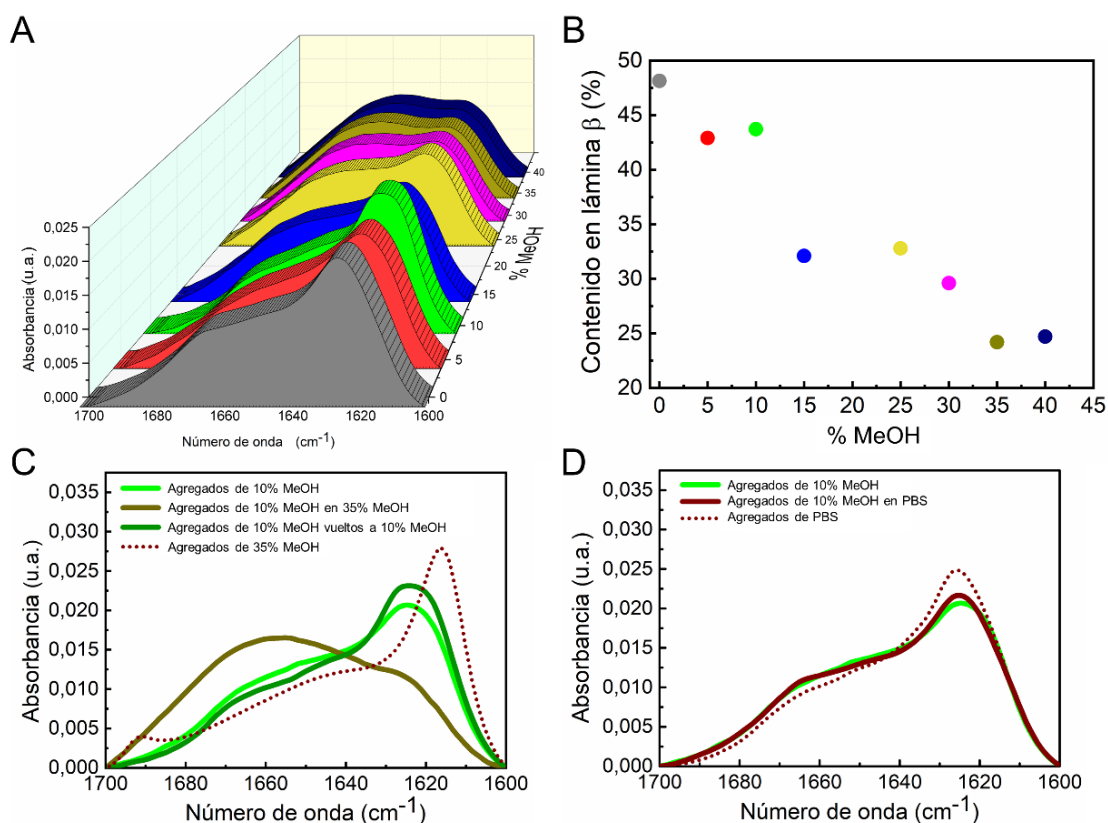


Figura 4.23. Análisis de la estabilidad estructural de los agregados amiloides de α -sinucleína generados al 10% de MeOH cuando se transfieren a soluciones con diferentes concentraciones de MeOH. (A) Espectros de IR de agregados generados al 10% de MeOH y trasferidos a diferentes concentraciones de MeOH en el rango entre 0-40%, en condiciones por lo demás idénticas (PBS a pH 7.4, 25 °C), tras 15 h de incubación a temperatura ambiente en las nuevas condiciones. (B) El contenido de lámina β en los agregados generados al 10% de MeOH y trasferidos a las diferentes condiciones dichas anteriormente, se obtuvo a partir del análisis cuantitativo de los espectros de IR (panel A). (C) Comparación de los espectros de IR de los agregados generados al 10% MeOH cuando permanecen en el 10% MeOH (verde), cuando se transfieren al 35% MeOH (marrón), cuando se transfieren de nuevo al 10% MeOH (verde oscuro) y espectro de los agregados generados al 35% MeOH. (línea de puntos de color marrón oscuro). (D) Comparación de los espectros de IR de los agregados generados al 10% MeOH cuando permanecen en el 10% MeOH (verde), cuando se transfieren a PBS solo (marrón oscuro) y el espectro de los agregados generados en la interfase A/W con agitación y sólo PBS (línea de puntos de color marrón oscuro).

Posteriormente, realizamos un estudio del contenido en lámina β en función del contenido de MeOH de los agregados con estructura en lámina β paralela. Para ello, se generaron agregados en presencia de 10% MeOH y se transfirieron a soluciones con diferente contenido de MeOH. Al transferir los agregados a condiciones de completa hidratación de la proteína (sólo PBS), estos permanecieron estables y alcanzaron un contenido máximo de lámina β (Fig. 4.23 A y B), además de mostrar un espectro de IR idéntico al de los agregados que fueron generados en PBS, sin alcohol, con agitación (Fig. 4.23 D). Al aumentar el contenido en MeOH, se aprecia una disminución progresiva en el contenido de la lámina β , concomitante con un aumento en la estructura desordenada (Fig. 4.23 A y B), llegando a un máximo de la desestabilización estructural al transferirlos a un porcentaje igual o mayor al 35%

de MeOH (Fig. 4.23 A y B). Sorprendentemente, cuando a estos agregados desestructurados en 35% de MeOH se les vuelve a transferir a sus condiciones originales, en presencia de 10% de MeOH, los agregados recuperan su estructura inicial (Fig. 4.23 C). Para ampliar la información sobre la estabilidad de los diferentes agregados obtenidos, al ser transferidos a PBS, consultar la Tabla 4.1.

4.1.8. Los agregados formados dentro de los condensados biomoleculares de α -sinucleína generados por separación de fase líquido-líquido se asemejan a los generados por nucleación homogénea

Con el objetivo de dilucidar si la nucleación primaria homogénea y, por lo tanto, la formación de agregados con lámina β antiparalela puede desencadenarse dentro de los condensados biomoleculares de α S generados por LLPS, entorno que se presupone con una actividad de agua reducida en comparación a condiciones diluidas, hemos reproducido las condiciones de formación de condensados biomoleculares de α S *in vitro* que han sido publicadas muy recientemente¹⁴⁴ (Fig. 4.24 B).

Los experimentos fueron realizados por el doctorando Pablo José Gracia González, que empleó α S a 200 μ M, en 25 mM de Tris, pH 7.4, 50 mM NaCl y en presencia de 10% de PEG 8 en una configuración de gota sobre un portaobjetos. Los resultados fueron primeramente visualizados por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) y por microscopía de fluorescencia de campo amplio. Tras añadir la proteína en estas condiciones, la solución muestra una distribución homogénea de la proteína (Fig. 4.24 A). Después de 20 minutos de incubación, sin embargo, ya se aprecian condensados biomoleculares de proteína (Fig. 24 B) los cuales con el tiempo llevan a la agregación de α S (dentro de las 2 h de incubación), con una elevada fracción de proteína agregada en menos de 20 h (Fig. 4.24 C). Estos agregados unen ThT. En condiciones similares, pero sin la formación de condensados biomoleculares, no se observó agregación en la misma escala de tiempo (Fig. 4.25). La tasa de formación de agregados, en los condensados biomoleculares es, por lo tanto, notablemente rápida, lo que ya sugiere cinéticas con fases de latencia cortas, lo que *a priori* sugeriría un mecanismo de nucleación homogénea, según nuestros resultados en condiciones diluidas. Cuando investigamos la naturaleza de los agregados amiloides formados en los condensados biomoleculares de α S por una transición de fase líquido a sólido, observamos que éstos exhibían una unión de ThT relativamente baja (no se muestra) y tenían tamaños relativamente pequeños (se requirieron 2 h de ultracentrifugación a 627 000 g para obtener un sedimento),

características compatibles con los agregados amiloides con lámina β intermolecular antiparalela. Es importante destacar que cuando caracterizamos el ensamblaje intermolecular de las hebras β en los agregados utilizando la estrategia de formación de excímero de pireno, no se observó formación de excímero cuando la sonda de pireno se ubicó en la posición 85 (Fig. 4.24 D), la posición que muestra la relación E/M más alta entre todas las disposiciones paralelas caracterizadas. De hecho, el espectro de fluorescencia del pireno (Fig. 4.24 D) es idéntico al de los agregados amiloides con lámina β antiparalela previamente caracterizados (Fig. 4.19 A). En la Tabla 4.1 pueden compararse las orientaciones intermoleculares de los diferentes agregados caracterizados en este trabajo.

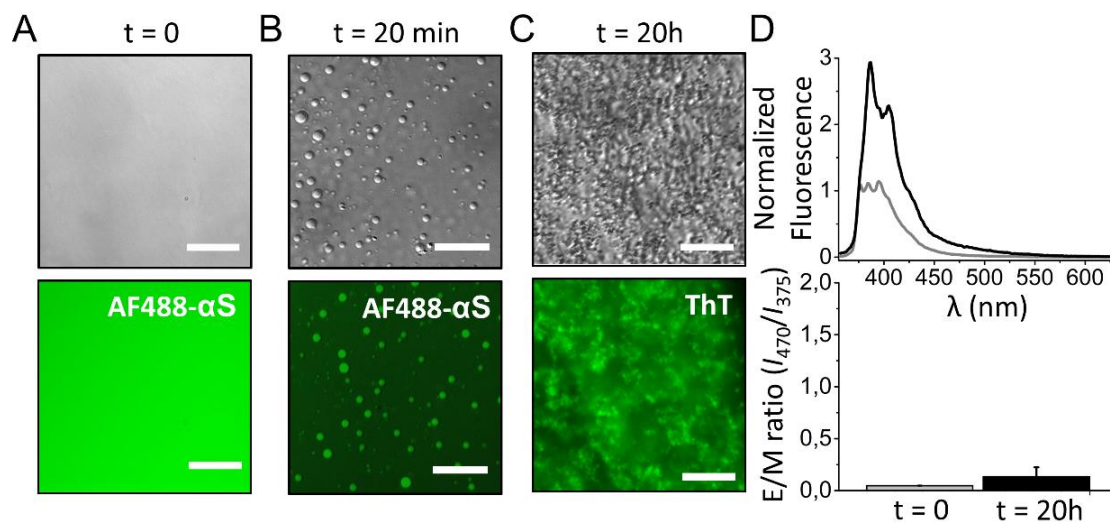


Figura 4.24. Análisis de los agregados amiloides formados por la transición de líquido a sólido de los condensados biomoleculares de α -sinucleína generados por separación de fase líquido-líquido. La formación de condensados biomoleculares α S se desencadenó incubando proteína a 200 μ M en 25 mM de Tris, 50 mM de NaCl, a pH 7.4 en presencia de 10% de PEG 8 en un montaje de gota (Fig. 25). (A) Imágenes representativas adquiridas, por DIC (paneles superiores) y microscopía de fluorescencia de campo amplio (paneles inferiores), inmediatamente después de la preparación de la muestra. (B) Imágenes adquiridas después de 20 min de incubación. (C) Imágenes adquiridas después de 20 h de incubación. Para las imágenes de fluorescencia en los paneles A y B, se añadió 1 μ M de α S-AF488 a las soluciones de proteína y se registró la señal de fluorescencia de AF488. En la imagen de fluorescencia del panel C, toda la proteína era no etiquetada y se añadió ThT a 100 μ M en el tiempo igual a 0. Se utilizó un conjunto de filtros de excitación/emisión de GFP para las adquisiciones de microscopía de fluorescencia en todos los casos. Barra de escala: 25 μ m. (D) Espectros de pireno representativos (arriba) y análisis de la relación E/M (abajo) en el tiempo 0 h (gris) y 20 h (negro) de incubación de una muestra de proteína tratada como en los paneles superiores (A-C), que también contenía α S-pireno a 20 μ M marcado en la posición 85. Las barras de error representan los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Tabla 4.1. Resumen de las principales características de la agregación α -sinucleína en las diferentes condiciones utilizadas en este estudio

| Condición ¹ | Cinéticas de agregación | | Agregados | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | Duración de la fase de latencia | Tipo aparente de nucleación | Arquitectura de la lámina β | % lámina β (N) ² | Estabilidad en PBS |
| PBS interfase A/W ³ | Muy lenta (> 200 h) | Heterogénea | Paralela | 54 \pm 4 (9) | Si |
| +Esferas de PTFE | Lenta (\approx 10 h) | Heterogénea | Paralela | 51 \pm 4 (2) | Si |
| +SUV ⁴ | Lenta (\approx 10 h) | Heterogénea | Paralela | 46 \pm 3 (5) | Si |
| +5% TFE | Lenta (\approx 20 h) | Heterogénea | Paralela | 49 \pm 3 (3) | Si |
| +6.4% MPD | Lenta (\approx 30-40 h) | Heterogénea | Paralela | 42 \pm 3 (4) | Si |
| +7.5% i-PropOH | Lenta (\approx 50 h) | Heterogénea | Paralela | 50 \pm 8 (3) | Si |
| +10% MeOH | Lenta (\approx 30-40 h) | Heterogénea | Paralela | 41 \pm 9 (7) | Si |
| +15% TFE | Rápida (<5-10 min) | Homogénea | Antiparalela | 60.2 \pm 0.6 (8) | No |
| +24.6% MPD | Rápida (<5-10 min) | Homogénea | Antiparalela | 59 \pm 2 (2) | No |
| +26.2% i-PropOH | Rápida (<5-10 min) | Homogénea | Antiparalela | 58 (1) | No |
| +35% MeOH | Rápida (<5-10 min) | Homogénea | Antiparalela | 57 \pm 6 (2) | No |
| +2M NaCl | Lenta (\approx 20 h) | Heterogénea | Paralela | 43 (1) | Si |
| +2M Na ₂ SO ₄ | Lenta (\approx 5 h) | Heterogénea | Paralela | 51.4 (1) | Si |
| +3.5M NaCl | Rápida (<5-10 min) | Homogénea | Antiparalela | 27.95 \pm 0.08 (2) | No |
| +3M Na ₂ SO ₄ | Rápida (<5-10 min) | Homogénea | Antiparalela | 19.5 (1) | No |
| +150 g/l Dext 70 | Lenta (\approx 10 h) | Heterogénea | Paralela | 42 \pm 4 (3) | Si |
| +150 g/l Ficoll 70 | Lenta (\approx 10 h) | Heterogénea | Paralela | 45 \pm 1 (2) | Si |
| +150 g/l PEG 8 | Lenta (\approx 5-10 h) | Heterogénea | Paralela | 40 \pm 9 (2) | Si |
| +10 g/l PEG 8 (LLPS) | Rápida | Homogénea ⁵ | Antiparalela | --- | --- |
| Oligómero-B ⁶ | --- | --- | Antiparalela | 35 \pm 5 | Si |

[1] Todas las condiciones contenían α S a 100 μ M en PBS a pH 7.4 y las agregaciones se realizaron a 37 °C en reposo, excepto por las condiciones referidas a "interfase PBS A/W" y "+ SUV". La concentración de sales se expresa en fuerza iónica. [2] N se refiere al número de réplicas utilizadas en el análisis; los números representan la desviación estándar y promedio. [3] interfase A/W significa interfase A/W. En esta condición no se observa agregación para α S a 100 μ M y en condiciones de reposo (fase de latencia superior a 250 h), por lo que los agregados se generaron con 500 μ M de α S y agitación. [4] La condición de la solución en este caso fue tampón fosfato a pH 6.5, 37 °C en reposo. [e] Los datos sobre el oligómero tóxico de α S se obtuvieron previamente^{93,202,210,469} y se incluyen aquí para comparación. [5] El tipo aparente de nucleación primaria no fue directamente determinado por las diferentes evidencias experimentales que apuntan a una nucleación homogénea (ver texto principal del artículo). [6] Este tipo de oligómero tiene una estructura intermedia entre los monómeros y las fibrillas completamente formadas y es altamente tóxico para las células. Recientemente demostramos que se forman durante el proceso de liofilización de proteínas⁹³.

4.2. Bloque II: Estudio del mecanismo de nucleación primaria de α -sinucleína mediada por interfases

Tras haber explorado diferentes rutas de nucleación primaria en el bloque anterior, y encontrar condiciones adecuadas (en reposo, con un mayor control del proceso y de su reproducibilidad) para estudiar la nucleación primaria heterogénea en la interfase A/W, nos propusimos estudiar el mecanismo de nucleación heterogénea con mayor detalle, identificando las regiones de la proteína que son relevantes para las diferentes etapas del proceso.

Los estudios hasta ahora realizados en este sentido no han logrado aportar mucha información sobre los mecanismos de nucleación heterogénea de α S debido a las dificultades técnicas inherentes del estudio de proteínas en interfases. Trabajos precedentes han mostrado el importante papel que desempeñan las interfases H/H en el desencadenamiento de la agregación amiloide de α S⁴¹⁶. En particular la interfase A/W, presente en la mayoría de los experimentos realizados *in vitro*, juega un papel crucial para la formación de núcleos amiloides en condiciones de alta hidratación, capaces de transferirse al seno de la solución y actuar como semillas en procesos de elongación¹²⁰. Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual la agregación está catalizada en este tipo de interfases. Se ha propuesto que la nucleación de α S en la interfase se debe a un aumento local de la concentración de proteína, lo que favorecería los contactos intermoleculares, además de posibles efectos, aún desconocidos, en el paisaje conformacional de la proteína que podrían favorecer su agregación⁴⁷⁰⁻⁴⁷⁵. Nosotros hemos identificado el papel clave que juega el agua en la inducción de la nucleación de la proteína, tanto en la nucleación heterogénea como homogénea. En las inmediaciones de la superficie hidrofóbica, la actividad del agua es menor que en el seno de la solución, por lo que la presencia de una superficie hidrofóbica ayudará a disminuir la barrera de solvatación de las moléculas de proteína para iniciar su autoensamblaje.

Con el fin de elucidar con detalle el mecanismo por el cual α S inicia la agregación por medio de interfases, nos planteamos estudiar cuáles son los factores intrínsecos de la proteína necesarios para cada uno de los pasos relevantes. Como modelo de interfase H/H hemos trabajado principalmente con la interfase A/W, ya que nos permite obtener más información a través de técnicas de análisis de superficies. Además, como modelo de interfase lipídica que induce agregación, hemos trabajado con muestras de SUV de 100% de DMPS⁴²³. En el estudio hemos utilizado una serie de variantes de α S, así como la isoforma β S con el fin de analizar el

efecto de diferentes regiones de sinucleína que son fundamentales para la nucleación heterogénea y diseccionar su papel en las diferentes etapas del mecanismo de nucleación.

4.2.1. Diseño de las variantes de sinucleína empleadas en este trabajo

Con el fin de comprender mejor el papel de las diferentes regiones de α S en el mecanismo de la nucleación heterogénea, nos centramos en primer lugar en la región N-terminal de la proteína, ya que esta región es la responsable de la interacción de la proteína con las interfases, tanto H/H^{332,416} como con las superficies lipídicas^{339,341}. En contacto con estas interfases, la región N-terminal de α S adquiere una estructura en hélice α anfipática, con una disposición regular de las lisinas que se colocan en dos bandas laterales a cada lado de la cara hidrofóbica de la hélice, favoreciendo su interacción con interfases H/H y con vesículas lipídicas aniónicas. Se ha reportado que α S adquiere una estructura en hélice α continua desde el residuo 3 al 92, en caso de unirse a vesículas con composición lipídica fisiológica y una superficie no demasiado curva. Si las vesículas son pequeñas y la curvatura de la superficie de la vesícula es elevada, sin embargo, se ha visto que la conformación más estable de la proteína presenta dos hélices α que abarcan los residuos 3-37 y 45-92, separadas por una vuelta que abarca los residuos 38-44³⁷⁴ en una conformación tipo herradura (Fig. 4.25 B I). En el caso de la interfase A/W, se ha demostrado que la proteína en la interfase adopta una estructura en hélice α , aunque no se ha caracterizado hasta la fecha los residuos involucrados en esta interacción³³².

Para definir con mayor detalle las secciones de la secuencia primaria que presentan una tendencia más elevada a formar hélice α en las condiciones en las que estudiaremos la nucleación heterogénea de la proteína, recurrimos al empleo de la espectroscopía de NMR. Las técnicas de NMR seleccionadas fueron la de efecto nuclear Overhauser heteronuclear (hetNOEs, por sus siglas en inglés)⁴⁷⁶ y experimentos HNC α y C β C α (co)NH. Los hetNOEs son experimentos de NMR 2D en los que se obtiene una intensidad de las señales por transferencia dipolar de la magnetización y parámetros de relajación del isótopo ¹⁵N. Esta técnica permite obtener una medida de la dinámica de cada uno de los residuos en el rango del ps, ya que existe una correlación entre la atenuación con el tiempo de la señal de hetNOEs de un residuo y su dinámica. Así es que al hacer una representación de las medidas de hetNOEs en base a la secuencia de la proteína, puede observarse que los residuos que dan señales de hetNOEs bajas tendrán una mayor dinámica o flexibilidad, y los que dan hetNOEs más altas indican que esos

residuos forman parte de una estructura más rígida. Simultáneamente, esta dinámica de los residuos dentro de la proteína puede correlacionarse con la estructura en la que se encuentra cada residuo^{477,478}. Primero, se obtuvieron los desplazamientos químicos de los grupos carbono α ($C\alpha$) y carbono β ($C\beta$) mediante experimentos 3D en los que se transfiere la magnetización a través de acoplamiento J desde el NH de cada residuo al $C\alpha$ y $C\beta$ del residuo anterior (empleando experimentos $HNC\alpha$ y $C\beta C\alpha(co)NH$). Así, se pudo calcular los desplazamientos químicos secundarios por residuo, es decir, la diferencia entre los valores experimentales de desplazamientos químicos de $C\alpha$ y $C\beta$ por residuo respecto a los valores nominales tabulados para cada residuo en conformación desordenada^{477,479,480}, lo que proporcionaba una estimación del porcentaje de estructura secundaria. Las diferencias positivas se relacionan con una adquisición de estructura tipo hélice α por residuo (cuando el 100% de la población está en conformación de hélice α se espera un desplazamiento proporcional de 3.09 ppm), mientras que diferencias negativas indican la adquisición de hebra β . Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Javier Oroz, en colaboración con el Prof. Douglas V. Laurents, en el Instituto de Física Química Rocasolano (CSIC). Los espectros hetNOEs fueron realizados a 15 °C con una solución de αS a 200 μM en concentraciones de 0, 10 y 16% de MeOH, condiciones en las que se vio un aumento de la proporción en hélice α de la proteína, sin que ésta comience a agregar en los tiempos de medida. Los datos indicaban que la proteína se encuentra monomérica, principalmente en un estado desordenado, pero con una población baja en otros estados conformacionales con hélice α en determinadas secciones de la proteína, de manera que en ausencia de MeOH, un 7 % de la población de monómero se encuentra en un estado con estructura parcial en hélice α en la región más N-terminal de la proteína (Fig. 4.25 A). Al aumentar la concentración de MeOH al 10%, la población en este estado conformacional con hélice α en la región N-terminal se incrementaba al 9.5% (Fig. 4.25 B) y cuando se aumentaba la concentración de MeOH al 16% la población aumentaba a un 14% (Fig. 4.25 C). En esta última condición, por tanto, tenemos resolución para determinar las dos secciones de la región N-terminal de la proteína que tienen más tendencia a adquirir hélice α : una entre los residuos 3 y 30 y otra entre los residuos 54 y 66.

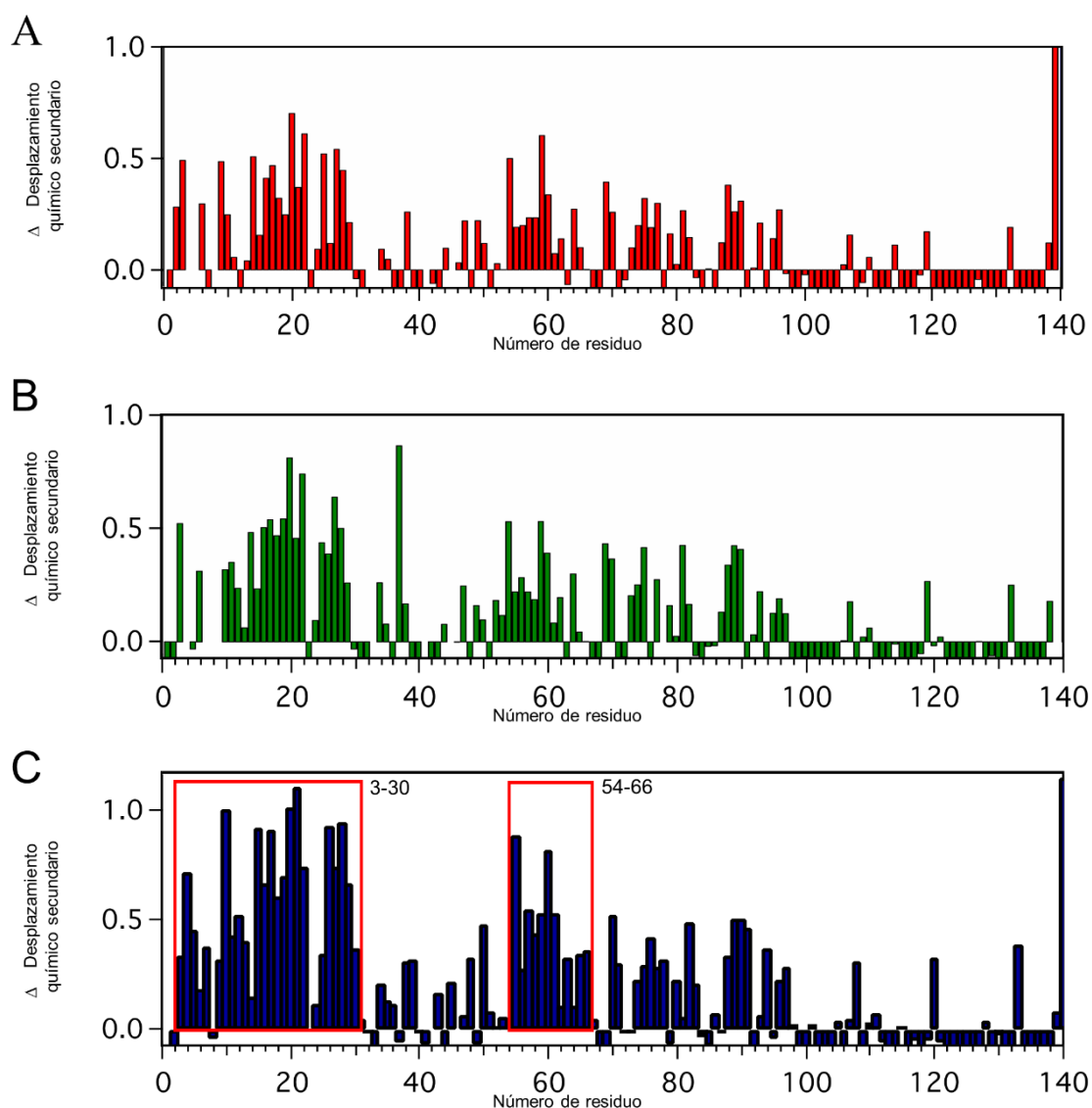


Figura 4.25. Determinación de la tendencia a formar hélice α de las diferentes regiones de α -sinucleína. Representaciones de las diferencias entre los desplazamientos químicos de C α y C β por residuo de los espectros HNC α y C β C α (co)NH de NMR tomados a 15 °C con α S a 200 μ M en presencia de 0% MeOH (A), 10% MeOH (B), 16% MeOH (C) con respecto a los valores tabulados para cada residuo en una estructura desordenada⁴⁸⁰.

Además de la localización y la longitud de las hélices α que pueden formarse en α S, es fundamental considerar la anfipaticidad de las mismas ya que ésta determina la afinidad de la proteína por las interfases H/H. Para conocer la anfipaticidad de las posibles hélices α , recurrimos al servidor on-line HELIQUEST⁴⁸¹ que permite predecir esta magnitud para la hélice α formada por una secuencia dada de proteína. El análisis de la predicción de la anfipaticidad de una teórica hélice α en conformación 11/3, conformación más favorable para la región N-terminal de sinucleína de acuerdo a publicaciones anteriores⁴⁸², señala tres regiones cuya estructura en hélice sería altamente anfipática: una entre los residuos 1-10, que sería la que presenta mayor anfipaticidad, otra entre los residuos 45-65 y otra entre los residuos 70-80

que presentaría una anfipaticidad menor a las otras dos regiones (Fig. 4.26 B, recuadros en rojo). La primera región estaría comprendida en la primera hélice descrita con mayor afinidad por membranas lipídicas^{360,374}, mientras que las dos últimas regiones abarcarían la segunda hélice de la estructura en herradura descrita con menor afinidad por vesículas lipídicas. Las dos primeras regiones, con una mayor anfipaticidad, además, coinciden con las dos regiones con mayor tendencia a adquirir estructura en hélice según los datos que obtuvimos por NMR (Fig. 4.25). Si estudiamos en mayor detalle la anfipaticidad de la primera de las hélices α observadas por espectroscopía de NMR, podremos darnos cuenta de que la eliminación de los primeros 10 residuos da lugar a una reducción muy significativa de la anfipaticidad, quedando por detrás de las otras dos regiones, lo que invertiría la afinidad de las dos hélices por las interfases H/H (Fig. 4.26 C).

El conjunto de resultados presentado nos llevó a diseñar una delección de los 29 primeros residuos de α S, eliminando así la región entera que comprende la primera hélice más N-terminal con mayor afinidad por las interfases (Δ 1-29 α S, donde la metionina inicial se elimina postraducionalmente^{483,484}). Dada la relevancia predicha de los primeros 10 residuos en la anfipaticidad de esta primera hélice, se diseñó otra variante en la que se eliminaron los primeros 9 residuos (Δ 2-9 α S). Por otro lado, vimos por RMN que la segunda región de la proteína con mayor tendencia a formar hélice se encuentra entre los residuos 54-66, que coincide con la sección que presenta un alto valor de momento hidrofóbico según el predictor de anfipaticidad. Con el fin de elucidar el papel de esta región, se propuso el uso de una variante donde los primeros 64 residuos fueron eliminados (Δ 4-64 α S). Por otro lado, incorporamos al análisis la isoforma β S, dado que esta variante de sinucleína tiene una elevada identidad de secuencia en toda la región N-terminal con respecto a α S, pero presenta una delección en la región que se ha propuesto como la más amiloidogénica, residuos 71-82³⁴⁹, además de presentar otras variaciones de secuencia principalmente en la región NAC. Finalmente también incluimos a la variante de α S sin la región C-terminal (Δ 104-140 α S), con el fin de estudiar el comportamiento de α S en ausencia de esta región caracterizada por su carga neta negativa y su desorden intrínseco.

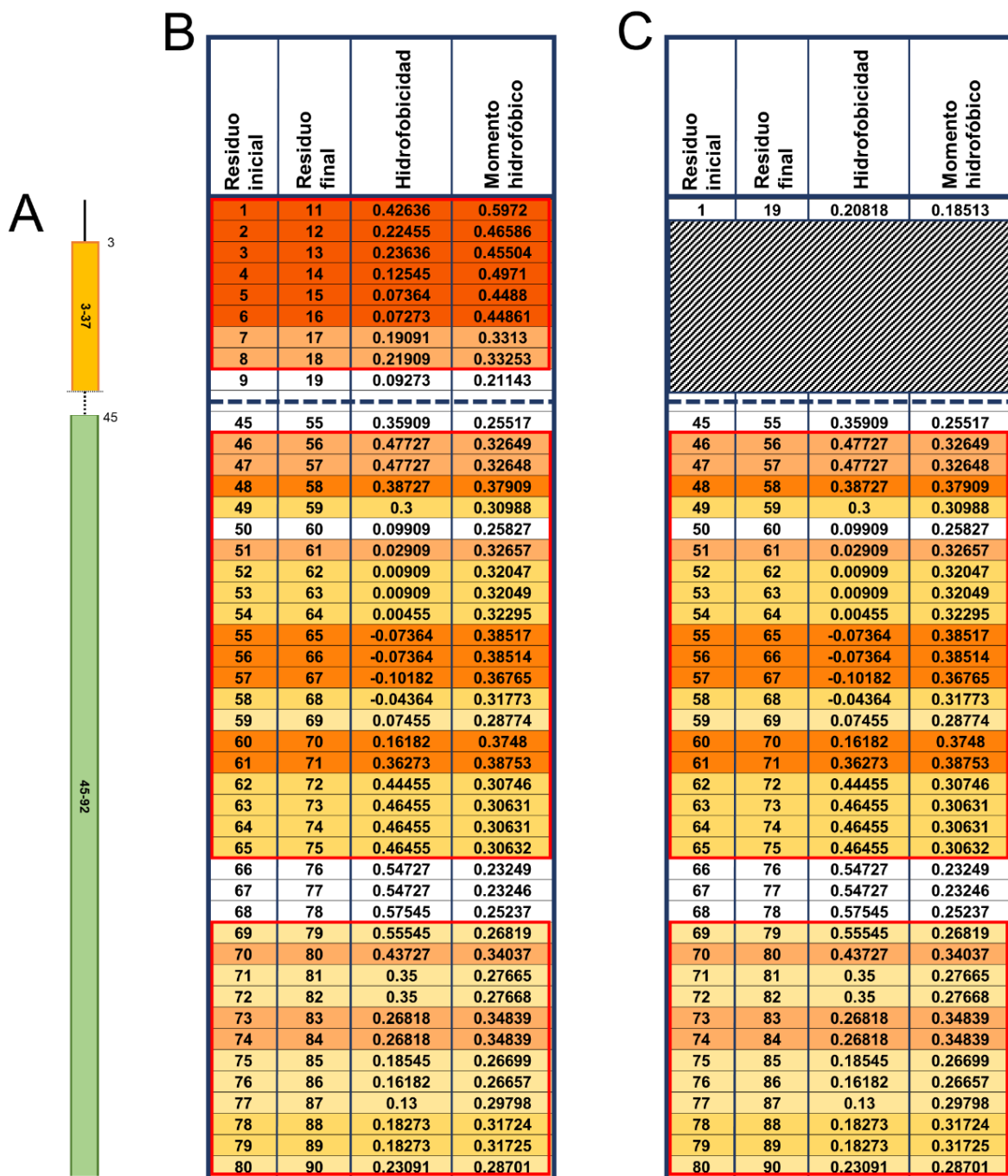


Figura 4.26. Predicción de la anfipaticidad de las hélices α de WT α S y Δ 2-9 α -sinucleína. Predicción de anfipaticidad de las hélices α que pueden darse en las diferentes regiones de la proteína según el programa HELIQUEST, para WT α S (B) y Δ 2-9 α S (C). Se han coloreado las potenciales secuencias que adquirirían estructura en hélice anfipática según el valor predicho de momento hidrofóbico: en naranja oscuro valores >0.4 , en naranja valores >0.35 y <0.4 , en naranja claro valores >0.32 y <0.35 , en amarillo fuerte valores >0.3 y <0.32 y en amarillo claro valores >0.26 y <0.3 . Valores menores a 0.26 no fueron coloreados. Se han enmarcado en rojo las regiones que muestran más anfipaticidad según el predictor. En (A) se muestran las dos regiones de la proteína que adquieren estructura en hélice α al unirse a vesículas lipídicas según Ulmer *et al.*³⁷⁴

4.2.2. Capacidad de nucleación de las diferentes variantes de sinucleína en la interfase aire/agua

Primero realizamos ensayos de agregación de las diferentes variantes de sinucleína (WT α S, Δ 2-9 α S, Δ 1-29 α S, Δ 4-64 α S, Δ 104-140 α S y WT β S) a una concentración de 100 μ M en PBS a 37 $^{\circ}$ C y con agitación (300 rpm). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en viales de 1.5 mL, tratados con un recubrimiento de PEG que les hacía presentar una superficie hidrofílica, en los que se depositaron 300 μ L de muestra. En estas condiciones experimentales, con agitación, sólo WT α S y Δ 104-140 α S mostraron agregación tras 7 días de incubación (Fig. 4.27 A).

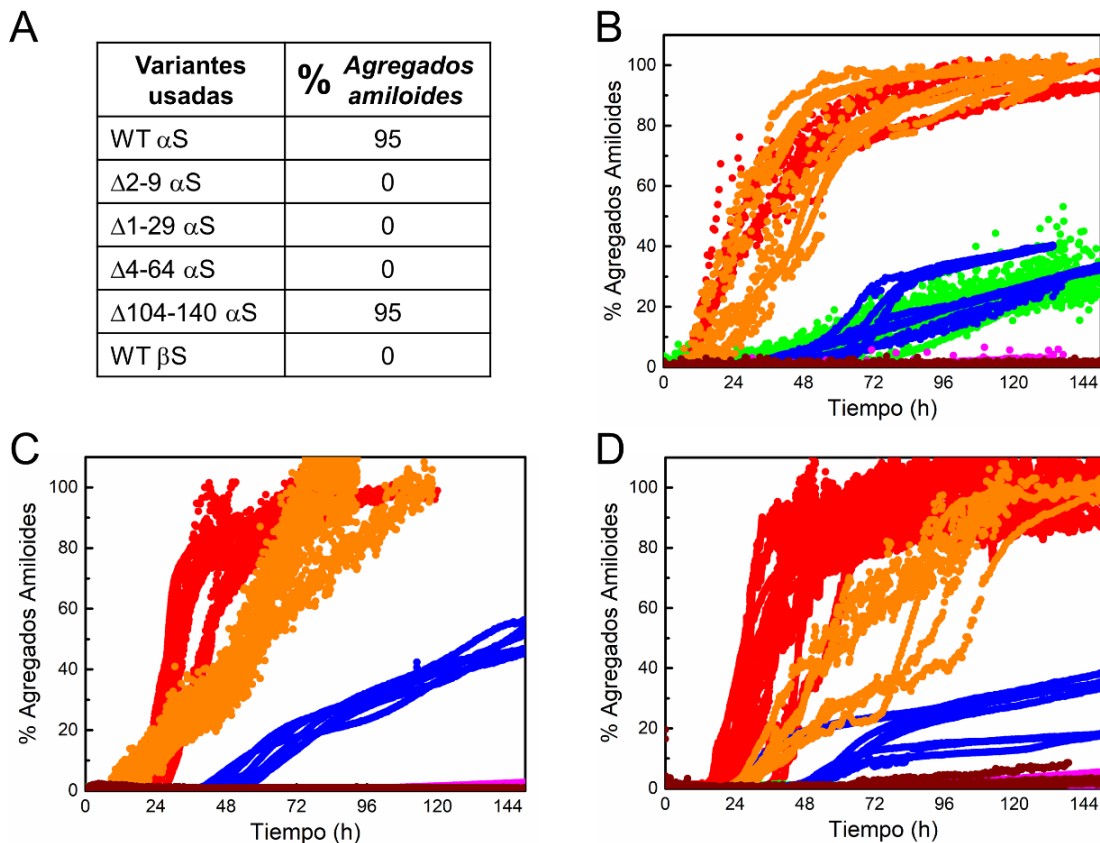


Figura 4.27. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en presencia de una interfase hidrofóbica/hidrofílica. (A) Rendimiento de agregación tras 7 días de incubación de muestras de 100 μ M de proteína en PBS pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C con 300 rpm de agitación en orbital en un incubador. (B-D) Cinéticas de agregación de diferentes variantes de sinucleína a 100 μ M en PBS pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C, con 50 μ M ThT y en presencia de una interfase teflón/agua (B), A/W con 5% de TFE (C) y A/W con 10% de MeOH (D). En todos los casos las variantes de proteína fueron: WT α S (rojo), Δ 2-9 α S (verde), Δ 1-29 α S (azul), Δ 4-64 α S (magenta), Δ 104-140 α S (naranja) y WT β S (marrón).

A continuación, decidimos estudiar la capacidad de nucleación de las diferentes variantes de sinucleína en una interfase H/H alternativa a la interfase A/W. Para ello recogimos las cinéticas de agregación de las diferentes variantes, en equipos multimodo de placas (empleando placas tratadas con un recubrimiento de PEG), con soluciones de 100 μ M de proteína en PBS, a 37 $^{\circ}$ C, en reposo e introduciendo una esfera de PTFE en cada pocillo de la placa. En tales condiciones, la única variante que mostró un comportamiento similar a la WT α S fue la variante

$\Delta 104-140$ αS (Fig. 4.27 B). Para la variante WT βS y $\Delta 4-64$ αS no se detectó agregación en los 6 días de incubación, mientras que para las variantes $\Delta 2-9$ αS y $\Delta 1-29$ αS la agregación fue mucho menor (con un 30-40 % de rendimiento, en comparación con un rendimiento del 95% para la WT αS) y con unas cinéticas mucho más lentas, en especial con una fase de latencia mucho más larga (en torno a e veces más larga). Resultados parecidos se obtuvieron cuando la nucleación se originó en la interfase A/W en presencia de co-solventes, en concreto 5 % de TFE o un 10% de MeOH, y en reposo.

4.2.3. La afinidad de α -sinucleína por la interfase aire/agua y su capacidad para saturarla depende de la región de la proteína que adquiera hélice anfipática e interaccione con la interfase

Dado que varias de las variantes de αS truncadas en el extremo N-terminal veían impedida el proceso de nucleación, pese a que, *a priori*, las deleciones no afectarían a la región más amiloidogénica^{349,350}, nos planteamos estudiar su capacidad de interacción con la interfase A/W. Para ello, realizamos medidas de tensión superficial en dicha interfase mediante un tensiómetro de Langmuir. Los experimentos fueron realizados por el Dr. Jesús Sot Sanz en el grupo del Prof. Félix M. Goñi, de la Universidad del País Vasco. Los resultados obtenidos (Fig. 4.28) indican que las tres variantes truncadas en el extremo N-terminal de αS son capaces de interaccionar con la interfase, formando una monocapa en condiciones de saturación y provocando un aumento en la presión superficial de la interfase A/W. Al observar en mayor detalle los datos obtenidos pudimos comprobar que la proteína silvestre (WT) es la que da lugar a una mayor presión superficial de saturación en esta interfase, 20.9 ± 0.3 mN/m, seguida de las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$, con valores de presión superficial de saturación muy semejantes entre sí (17.5 ± 0.2 mN/m y 17.2 ± 0.4 mN/m, respectivamente) y, con una presión superficial de saturación considerablemente inferior (10.0 ± 0.1 mN/m), la variante $\Delta 4-64$. De estos resultados podía considerarse que las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ exponían la misma región de la proteína a la superficie, presumiblemente, según las predicciones de anfipaticidad de las regiones de la hélice α , expondrían una sección en torno a la región 45-64. Esta debería de diferente a la expuesta por la variante WT, que introducía mayores tensiones superficiales en la interfase al generar la monocapa, lo que implicaría que expusiese a la interfase una sección de la proteína que, según las predicciones de anfipaticidad, involucraría la región más N-terminal, compuesta por los residuos 1-30. En estas tres variantes de αS , en cualquier caso, la región amiloidogénica se encontraría libre, en el seno de la solución, con la posibilidad de interaccionar con otras regiones de moléculas de proteína adyacentes. Por lo que estos datos

según sin explicar por qué las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ mostraban una nucleación muy impedida en las condiciones hasta ahora estudiadas. Por otro lado, la región de la variante $\Delta 4-64$ que se encuentra en contacto con la interfase al formar una monocapa ha de ser diferente a la que presentan las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ αS , dado que da lugar a una presión superficial de saturación diferente; de hecho es bastante menor, lo que sugiere una menor afinidad por la interfase. Dado que esta región implica al menos parte de la región del NAC involucrada en la nucleación³⁴⁹, explicaría que esta variante no fuese capaz de nuclear y que, por tanto, la nucleación ocurra sólo si la región amiloideogénica se encuentra en la solución.

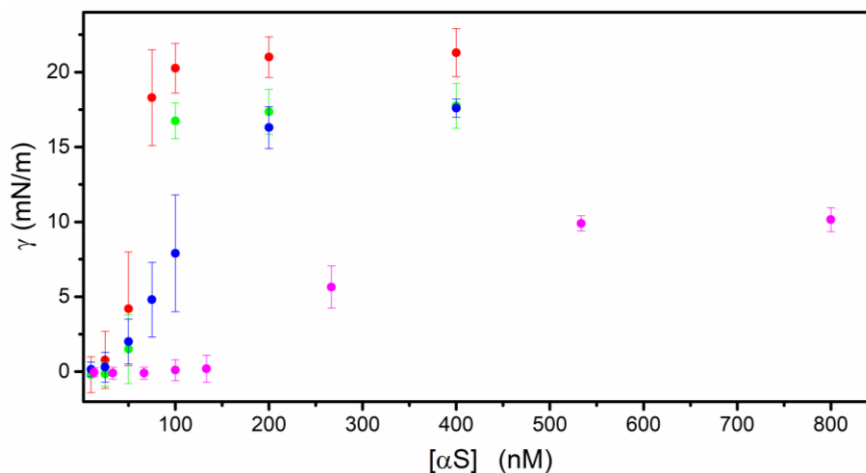


Figura 4.28. Caracterización de la tensión superficial en la interfase aire/agua al adicionar diferentes variantes de α -sinucleína a la solución. Medidas de tensión superficial, expresadas como presión superficial (γ), de la interfase A/W a lo largo de un barrido de concentraciones de las variantes de sinucleína: WT αS (rojo), $\Delta 2-9$ αS (verde), $\Delta 1-29$ αS (azul), $\Delta 4-64$ αS (magenta).

También pudimos comprobar cómo variaban las concentraciones de proteína a las que se saturaba la interfase (concentraciones de saturación). Mientras que con la variante WT la concentración requerida fue en torno a 100 nM, para las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ se requirió una concentración ligeramente superior, mientras que para la variante $\Delta 4-64$ fue necesaria una concentración 4-5 veces superior. En cualquier caso, estos resultados indican que, en las condiciones de agregación, para todas las variantes, la interfase se encuentra saturada con una monocapa de moléculas de proteína.

4.2.4. Papel de la orientación de las moléculas de proteína en la interfase en el mecanismo de nucleación primaria heterogénea

Con el fin de comprender el mecanismo por el cual las variantes truncadas en el extremo N-terminal $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ presentaban una nucleación muy desfavorable con respecto a la variante WT en las mismas condiciones, aun siendo capaces de adsorberse en la interfase A/W y mantener la región amiloidogénica en solución, estudiamos el papel de las interacciones entre

los extremos N- y C-terminal de la proteína como posibles moduladores en el proceso de nucleación. Una posible explicación para la diferencia en las velocidades de nucleación entre la variante WT y las variantes truncadas en el N-terminal sería que la disposición de las moléculas de las variantes truncadas en la interfase no sea la óptima para establecer interacciones intermoleculares persistentes entre las regiones amiloidogénicas de proteínas contiguas. Se sabe que en la proteína monomérica en solución, el extremo C-terminal, cargado negativamente, establece interacciones electrostáticas con el extremo N-terminal, cargado positivamente, haciendo que la región NAC esté menos expuesta a interacciones intermoleculares^{377,378}. Estas interacciones electrostáticas se verán favorecidas al adquirir la región N-terminal una conformación en hélice α , ya que los residuos de lisina de esta región se colocan en línea formando dos bandas a cada lado de la hélice que flanquean a la cara hidrofóbica de la hélice, la cual se encuentra expuesta hacia el aire en la interfase A/W, quedando las bandas de las lisinas en la solución en una posición ideal para interactuar con las cargas negativas del extremo C-terminal³⁷³. Para estudiar esta posibilidad, realizamos ensayos de agregación en las mismas condiciones que antes, pero en presencia de 2 M de NaCl. A esta fuerza iónica, las cargas de las proteínas se ven apantalladas, por lo que las interacciones N-/C-terminal de la proteína se ven desfavorecidas.

Los resultados de las cinéticas de agregación de las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ en presencia y ausente de 2 M de sal, en comparación con la proteína silvestre, mostraron un comportamiento muy diferente. Mientras la nucleación de la proteína se ve muy desfavorecida en condiciones de baja fuerza iónica, al aumentar considerablemente la fuerza iónica, las variantes recuperaban la capacidad de nuclear, siendo, en el caso de la variante $\Delta 1-29$, similar a la proteína silvestre. Este comportamiento debería de encontrarse asociado a una configuración del monómero de las variantes $\Delta 2-9$ y $\Delta 1-29$ más propensa a la nucleación. Estos resultados también indican que únicamente la primera de las dos posibles regiones anfífilicas de la variante WT es la que interactúa con la interfase, como se explicará más detalladamente en la Discusión. Por el contrario, la variante βS seguía sin poder iniciar la nucleación en presencia de altas concentraciones de sal, indicando que la región ausente en esta isoforma es esencial para la nucleación heterogénea de sinucleína, como ya se había establecido anteriormente^{317,349,365}.

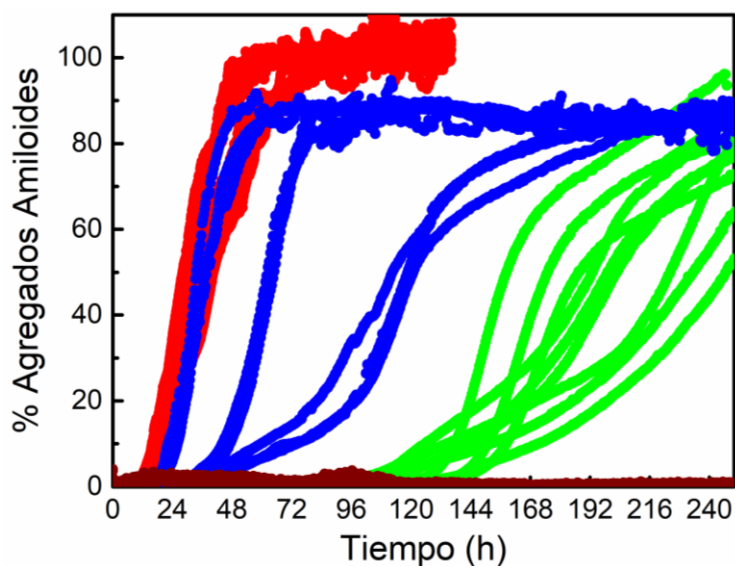


Figura 4.29. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en la interfase aire/agua en presencia de 2M de NaCl. Cinéticas de agregación de diferentes variantes de sinucleína a 100 μ M en tampón fosfato a 10 mM, a pH 7.4 (37 $^{\circ}$ C) con ThT a 50 μ M y con 2M de NaCl. Las variantes usadas son: WT α S (rojo), Δ 2-9 α S (verde), Δ 1-29 α S (azul) y β S WT (marón).

4.2.5. Nucleación heterogénea en vesículas lipídicas: Efecto de la carga iónica del lípido con respecto a su hidrofobicidad en la agregación de α -sinucleína

Otro tipo de superficies que recientemente se han utilizado para promover la agregación amiloide, como se ha dicho, son vesículas lipídicas sintéticas, aunque la composición lipídica a la que α S inicia la agregación no es fisiológicamente relevante, ya que típicamente está compuesta por 100% de lípidos cargados negativamente y de cadena corta ⁴²³. Por tanto, el elevado contenido en lípidos cargados negativamente pone en duda que este tipo de interfases se le pueda considerar como una interfases H/H, como es normalmente asumido. Para comprender mejor el mecanismo de agregación realizamos ensayos cinéticos de agregación en soluciones con 100 μ M de proteína y SUV de DMPS a 800 μ M en tampón fosfato a 20 mM, pH 6.5 a 37 $^{\circ}$ C y sin agitación (condiciones usadas en estudios anteriores^{422,423}), estudiando el comportamiento de las diferentes variantes de α S truncadas en la región N-terminal, la cual es relevante para la interacción de la proteína a las vesículas^{339,341} (Fig. 4.30).

Las variantes Δ 2-9 y Δ 1-29, que aún conservan lisinas (cargadas positivamente al pH de estudio) en su extremo N-terminal, mostraron agregación en estas condiciones, de forma similar a la variante WT, aunque con una cinética ligeramente más lenta (Fig. 4.30 A). La variante Δ 4-64, al carecer de la región rica en lisinas, mostraba una completa inhibición de la nucleación (Fig. 4.30, puntos en magenta).

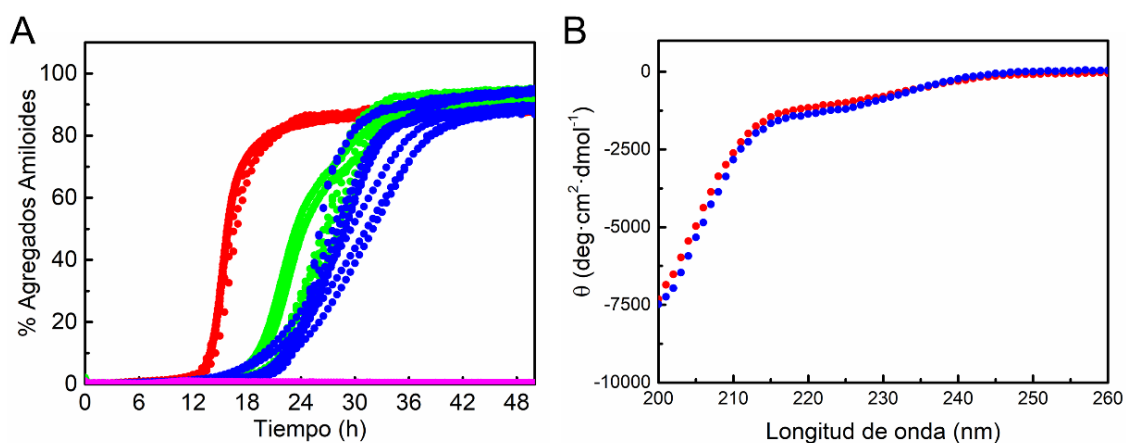


Figura 4.30. Caracterización de la agregación de α -sinucleína en presencia de vesículas lipídicas aniónicas. (A) Cinéticas de agregación de diferentes variantes de sinucleína a 100 μ M en tampón fosfato 20mM a pH 6.5 (37 °C) con ThT a 50 μ M y en presencia de SUV de 100% DMPS a 800 μ M. Las variantes usadas fueron: WT α S (rojo), Δ 2-9 α S (verde), Δ 1-29 α S (azul) y Δ 4-64 α S (magenta). (B) Espectros de CD de UV lejano de 25 μ M de la variante Δ 4-64 α S en tampón fosfato 20 mM a pH 6.5 (rojo) y en presencia de SUV de 100% DMPS a 200 μ M (azul).

Se ha demostrado que α S, al adsorberse en SUV de composición semejante a la de las vesículas sinápticas³⁹¹ (DOPE:DOPS:DOPC, 5:3:2), interacciona con la membrana lipídica uniéndose los residuos del 1 al 97. Los 25 primeros residuos quedan anclados de manera permanente a la superficie de la membrana lipídica, mientras que los restantes hasta el residuo 97 se adsorben de forma transitoria⁴⁸⁵. Para comprender mejor el papel que juega la región NAC en el proceso de adsorción de la proteína en una membrana lipídica formada completamente por lípidos aniónicos, estudiamos, mediante espectroscopía de CD de UV lejano, la unión de la variante Δ 4-64 a SUV compuestos únicamente por DPMS a través del cambio en estructura secundaria (ganancia de estructura en hélice) de la proteína, de forma análoga a los estudios realizados en la proteína WT⁴²². Los espectros de CD mostraban que no había variación en la estructura secundaria de la variante al añadir SUV de DPMS (Fig. 4.30 B), indicando que esta variante no es capaz de unirse a este tipo de SUV. Tanto en ausencia como en presencia de SUV de DPMS esta variante permanece desordenada, mientras que si fuese capaz de unirse a las vesículas deberíamos observar un aumento de estructura en hélice según se ha descrito para la proteína WT tanto en presencia de SUV de DPMS⁴²² como de SUV de composición similar a la de las vesículas sinápticas⁴⁸⁵ (donde adquiere estructura en hélice desde el residuo 1 al residuo 97).

5. Discusión

5.1. Bloque I: Caracterización de las diferentes rutas de nucleación primaria de α -sinucleína: En la búsqueda de condiciones que favorezcan la nucleación homogénea de la proteína

En este trabajo hemos estudiado en profundidad los procesos de nucleación primaria de α S, descubriendo que el grado de hidratación de la proteína es un determinante clave no sólo para iniciar el autoensamblaje de α S, sino también para dictar la preferencia por el tipo de nucleación primaria y el tipo de polimorfo amiloide resultante. Así pues, el papel de la hidratación de las proteínas se muestra fundamental para poder comprender su proceso de agregación, aunque a menudo se ha pasado por alto el papel del agua en la agregación amiloide. Unos pocos estudios ya habían resaltado que la velocidad de autoensamblaje inicial de algunos péptidos amiloidogénicos dependía en gran medida de su grado de hidratación; y nuestro trabajo lo demuestra para la proteína α S, donde vemos que una disminución de la capa de hidratación de la proteína resulta en una considerable reducción de la barrera de desolvatación que favorece la nucleación primaria de la proteína y la consiguiente formación de agregados amiloides⁴⁸⁶. Además de la disminución de la barrera de desolvatación, que acelerará los procesos de nucleación, no debemos de olvidar el papel favorable que juega la entropía de solvatación en la termodinámica de formación de agregados amiloides, debido a la liberación al seno de la solución de moléculas agua de la capa de hidratación de la proteína⁹⁷⁻¹⁰¹. Así pues, el grado de hidratación de la molécula puede jugar un doble efecto sobre la nucleación primaria en la agregación amiloide. Por un lado, una alta hidratación de la proteína favorecería termodinámicamente su autoensamblaje, debido a la gran contribución de la entropía de solvatación. Pero, por otro lado, brindaría una protección frente a la agregación amiloide, originando altas barreras de desolvatación que reducirían la velocidad de autoensamblaje inicial.

En este sentido, nosotros hemos utilizado diferentes co-solventes y moléculas cuya única característica compartida es que se excluyen preferentemente de la superficie de la proteína, lo que resulta en el colapso de la capa de hidratación de la proteína y, por lo tanto, en una disminución de la hidratación de ésta. En tales condiciones pudimos observar que la reducción de la hidratación de la proteína favorecía la nucleación reduciendo la barrera de activación. Estudios previos habían sugerido que en condiciones de hidratación limitadas se favorecerían ciertas conformaciones monoméricas o interacciones intramoleculares particulares de α S que propiciarían su autoensamblaje^{107,331,487,488}. Mediante simulaciones por MD, se ha propuesto que las propiedades de la red de agua de la capa de hidratación de α S son

importantes para la aparición de una estructura de hebra α entre los residuos 72-74 que sería relevante para el autoensamblaje inicial de la proteína⁴⁸⁸. Experimentalmente, además, para la misma proteína se ha observado que en condiciones de desolvatación parcial (presencia de alcoholes o aumento de la temperatura) se producen cambios estructurales relevantes en el conjunto estructural monomérico, lo que a su vez promueve su agregación^{107,331,487}. En este sentido, nosotros no encontramos cambios drásticos aparentes en la estructura o compactación del conjunto estructural monomérico de la proteína en dichas condiciones (Fig. 4.14), aunque éstos podrían ser sutiles. Sin embargo, nuestros resultados indican que el agua juega un papel fundamental en el proceso de iniciación de la nucleación que dictamina la velocidad a la que ésta se produce, mediante la modulación de la barrera de solvatación de la proteína.

Las interacciones de las moléculas de agua de hidratación con la proteína no son homogéneas a lo largo de la secuencia de α S, sino que varía de una región a otra de la misma como consecuencia de las características intrínsecas de los residuos que las forman. Las moléculas de agua interfaciales en la región amiloidogénica central de α S (el dominio NAC) presentan mayor interacción con la proteína que las que solvatan a las regiones N-terminal y C-terminal, debido al carácter altamente hidrofóbico de este segmento proteico⁴⁸⁹. De hecho, se han observado un número importante de moléculas de agua cuasi-unidas a la proteína en su región amiloidogénica, mostrando una dinámica significativamente restringida y, por ello, con tiempos de residencia mucho más largos⁴⁹⁰. Teniendo en cuenta que la región NAC es clave para la iniciación de la agregación amiloide en α S³⁴⁹, puede entenderse que la reducción de la capa de hidratación de las moléculas de proteína en esta región resulte en una aceleración de la nucleación primaria, promoviendo y estabilizando puentes de hidrógeno proteicos intermoleculares⁹⁵.

Al analizar sistemáticamente el efecto de diferentes concentraciones de los distintos tipos de aditivos que hemos empleado para estudiar la cinética de agregación de α S en condiciones en las que, de otra manera, ésta no puede nuclear de manera eficiente, hemos podido observar una disminución significativa en la fase de latencia de la cinética de agregación de α S en condiciones de hidratación reducidas. Se observó que las cinéticas de agregación podían ser clasificadas en dos regímenes cinéticos de agregación según el grado de hidratación de la proteína, uno correspondiente a la cinética con fases de latencia del orden de 20 h, es decir, al menos un orden de magnitud más rápidas que en ausencia de aditivos, y otro régimen con fases de latencia inferiores a 5 min, es decir, al menos tres órdenes de magnitud más rápidas

que en ausencia de aditivos (Fig. 4.13). Estos regímenes se correspondían claramente a dos mecanismos de nucleación primaria diferentes, en el primer régimen se estaba propiciando una nucleación heterogénea, mientras que en el segundo régimen era la nucleación homogénea la fuerza impulsora de la agregación. Esto indica que el grado de hidratación de la proteína, y con ello la barrera de energía de desolvatación que debe de superarse para el autoensamblaje inicial, no sólo es importante para promover la nucleación primaria, sino que determina el tipo de nucleación que se da (Fig. 5.1).

En condiciones de alta hidratación, hemos demostrado que la nucleación de α S en agregados amiloides sólo puede tener lugar de manera efectiva, debido a las elevadas barreras de activación, en presencia de interfases H/H (hidrofóbicas/hidrofílicas), como ya había sido observado anteriormente^{120,416}. α S tiende a adsorberse en las interfases H/H como consecuencia de la anfipaticidad de la estructura en hélice de su región N-terminal. De esa manera se maximizan simultáneamente las interacciones hidrofílicas con la parte polar de la estructura de la proteína en el ambiente acuoso, así como las interacciones hidrofóbicas con la parte apolar en contacto con la superficie hidrofóbica de la interfase³³². La adsorción de la proteína en este tipo de interfases provoca un aumento local de la concentración de esta en la interfase, así como una selección de conformaciones/orientaciones. En una interfase A/W plana (condiciones de reposo de la muestra), no obstante, la barrera de energía libre de desolvatación de la proteína es muy elevada, por lo que los efectos de adsorción no son suficientes para promover la nucleación primaria, como hemos visto en este estudio y ya se había reportado⁴¹⁶ (Fig. 5.1 A). En estas condiciones sólo se han visto tradicionalmente fenómenos de nucleación primaria en la interfase A/W al introducir agitación. Nosotros hemos visto que, en condiciones de reposo, pero en presencia de pequeñas burbujas de aire, se acelera la nucleación considerablemente en la interfase A/W de la burbuja, con cinéticas similares a las obtenidas cuando la muestra se agita. Estos resultados indican que la agitación es esencial para el proceso de nucleación mediante la inducción de deformaciones en la interfase, además de un posible efecto en la fragmentación de fibras. Por tanto, para promover la nucleación en una interfase tipo A/W parece que es necesario una superficie curva que podría tener relación con una mayor reducción de la capa de hidratación de la región NAC de moléculas de proteína contiguas adsorbidas en la parte curva de la interfase en contacto con la solución que se encontrarían en mayor contacto con la superficie hidrofóbica. Esto podría explicar también por qué las esferas de PTFE⁴¹⁶, que crean una interfase H/H con una curvatura semejante a la de las burbujas de aire en los experimentos con la interfase A/W, promueven la nucleación primaria pese a tratarse de una

interfase rígida. Las interfases H/H también son críticas para la agregación de muchas otras proteínas y péptidos amiloidogénicos que también comparten el carácter anfifílico con la α S, incluidos péptidos desordenados como el péptido A β ⁴¹⁹ y proteínas plegadas como insulina⁴²⁰ o β -lactoglobulina⁴⁹¹. Para las proteínas plegadas, esto puede explicarse porque las superficies hidrófobas proporcionan condiciones desnaturalizantes capaces de interactuar con conformaciones parcialmente desplegadas de proteínas, a través de regiones hidrófobas expuestas al disolvente. Al mismo tiempo, una reducción local de la actividad del agua en la interfase de la disolución con la superficie hidrófoba facilitaría la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares y, por tanto, la agregación inducida por la superficie.

En condiciones de hidratación ligeramente reducidas, la nucleación de la α S requiere igualmente de interfases H/H (Fig. 5.1 B), aunque en este caso ya no es necesario introducir deformaciones en la interfase. En tales condiciones, los efectos de la interfase, junto con un entorno más favorable a la formación de puentes de hidrógeno proteicos intermoleculares debido a las condiciones de hidratación reducidas, permiten la formación de un número suficiente de interacciones intermoleculares simultáneas entre moléculas de proteína contiguas que logren compensar la pérdida de entropía de las cadenas polipeptídicas, que ya de por sí es baja al encontrarse las moléculas de proteína ancladas en la interfase. Estos resultados complementan los estudios realizados previamente por los grupos de Uversky³⁹⁹ y Eliezer y Webb^{107,464}, que sugirieron el importante papel de la desolvatación de las proteínas en el desencadenamiento de la agregación de α S en condiciones en las que ahora sabemos que la nucleación se produce en una interfase H/H. En estas condiciones, aunque la deshidratación del medio sea suficiente para reducir la barrera de energía libre de desolvatación de α S a niveles tales que la presencia de una interfase activa permitan la nucleación de la proteína, no es lo suficientemente elevada para promover la nucleación en el seno de la solución (Fig. 5.1 C). Sin embargo, en condiciones de hidratación más limitadas, hemos observado que el proceso de nucleación se ve favorecido y, por lo tanto, puede tener lugar de manera muy eficaz en el seno de la solución sin la necesidad de una superficie activa para concentrar las moléculas de proteína o disminuir sus entropías translacional y configuracional. En condiciones de hidratación intermedias, ambos tipos de nucleación coexisten, resultando en mezclas de diferentes tipos de polimorfos amiloides.

Curiosamente, hemos identificado una clara correlación entre el tipo de nucleación (heterogénea u homogénea) y la estructura de los agregados de α S generados. Por un lado,

hemos podido observar que los agregados generados en todas las condiciones de hidratación limitada mostraban con una morfología globular, que contrasta con la morfología alargada no ramificada que tradicionalmente se ha venido reportando en fibras amiloides³⁶⁴. Una explicación sería que, en medios con limitación de agua, los residuos cargados o polares tenderían a interactuar entre ellos, favoreciendo conformaciones más compactas que en medios donde la proteína estuviese altamente hidratada. Por otro lado, los agregados resultantes de un proceso de agregación iniciado a través de una nucleación heterogénea de forma general presentan una estructura en lámina β intermolecular paralela, mientras que los agregados generados a través de una nucleación homogénea mostraban la presencia de una estructura en lámina β intermolecular antiparalela^{441,467,492} (Tabla 1).

La adsorción de la proteína en interfases H/H por su región N-terminal fuerza a que la disposición de las moléculas de proteína en los núcleos amiloides sea paralela. Sin embargo, en condiciones de nucleación homogénea, los monómeros no sufren restricción en su posible orientación, pudiendo autoensamblarse en la disposición que les sea más favorable para formar el agregado amiloide, siendo la estructura en lámina β antiparalela la que, *a priori*, mayor estabilidad de los puentes de hidrógeno presentaría^{493,494}. Otros ejemplos de fibras amiloides con una estructura en lámina β antiparalela han sido reportados para lisozima, mucina, el mutante D23N de A β 40 y γ -globulina^{495-497,177} cuando la agregación se inició en interfases que no promovían orientaciones proteicas preferidas. Los autores informaron de la desnaturalización de proteínas como un paso preliminar para la agregación inducida por la superficie, que al mismo tiempo se vio favorecida en presencia de hidrogeles más hidrófobos⁴⁹⁷. Esta estructura también se ha reportado para fibras amiloides de los péptidos A β ₁₆₋₂₂ o A β ₂₄₋₃₆ que han sido formadas mediante nucleación homogénea en condiciones de elevada hidratación⁴⁹⁸. A su vez, se han observado configuraciones tanto paralelas⁴⁹⁹⁻⁵⁰² como antiparalelas^{503,504,425} al seguir el proceso de nucleación homogénea por simulaciones de MD en diferentes péptidos.

A pesar de estos casos en los que la configuración en lámina β intermolecular antiparalela predominaba en fibras amiloides de diferentes proteínas y péptidos, la presencia de esta estructura se propuso como distintiva de los oligómeros estables, particularmente tóxicos, tanto de α S y A β , como de otros sistemas amiloidogénicos^{93,202,205,206}, dejando la estructura en lámina β paralela como distintiva de las fibras amiloides. En todos los casos, este tipo de oligómeros fueron generados en condiciones de baja hidratación, típicamente mediante la liofilización de la proteína^{93,202,204,207}, aunque en pocos casos se asoció este proceso con el

de su formación y acumulación. Debido a la estabilidad de estos oligómeros y a la diferente configuración de la estructura en lámina β con respecto a la mayoría de las fibras amiloides reportadas hasta la fecha, varios investigadores propusieron que estos oligómeros representan especies fuera de la ruta de agregación amiloide (“off-pathway species”). Nuestros resultados, sin embargo, apuntan a que estos oligómeros en realidad sí que se encuentran dentro del paisaje conformacional amiloide, representando intermedios de una ruta de agregación amiloide desencadenada por nucleación homogénea que presenta preferencia una estructura en lámina β intermolecular antiparalela. El hecho de que hayan sido “atrapadas” significa que son especies meta-estables en esa ruta ya que estarían separadas por grandes barreras energéticas con las especies fibrilares y las monoméricas⁹³.

Revisando la literatura hemos encontrado un gran número de proteínas que, en condiciones de hidratación limitada, por ejemplo a temperaturas elevadas, sufren procesos de agregación que dan lugar a la formación de agregados ricos en lámina β intermolecular antiparalela. Estas proteínas no comparten ni homología de secuencia ni topología estructural de su conformación nativa⁵⁰⁵, como por ejemplo la albúmina sérica bovina⁵⁰⁶, la azurina⁵⁰⁷, la β -lactoglobulina⁵⁰⁸, toxina del cólera⁵⁰⁹, adenilato ciclasa⁵¹⁰, citocromo *c*⁵¹¹, quimotripsinógeno⁵¹², acetilcolinesterasa⁵¹³ y ribonucleasa A⁵¹⁴. Además, multitud de proteínas *a priori* no amiloidogénicas que pertenecen a diferentes clases estructurales, incluidas proteínas globulares, como la lactato deshidrogenasa, fosfofructoquinasa, γ -interferón, inhibidor de tripsina pancreática bovina o quimotripsina; y péptidos desordenados, incluida la poli(L-lisina), han mostrado la formación de agregados con una estructura de lámina β intermolecular antiparalela durante el proceso de liofilización⁵¹⁵⁻⁵¹⁷. Para las proteínas plegadas, se ha propuesto que existe una relación entre el grado de agregación de sufre una proteína globular al verse sometida a un proceso de liofilización y el grado en que la proteína se despliega en condiciones de deshidratación. De esta manera, la adición de compuestos estabilizadores de la conformación nativa durante el proceso de liofilización minimizan la agregación de este tipo de proteínas^{517,518}.

Un ambiente fisiológico con una actividad de agua particularmente baja sería el interior de condensados biomoleculares. Recientemente, se ha informado que ciertas IDPs amiloidogénicas, como tau^{519,520}, TDP-43^{142,521} y α S^{144,145}, son capaces de dar procesos de LLPS y generar condensados biomoleculares de proteína tanto *in vitro* como *in vivo*, y que, en tal ambiente, la agregación amiloide es un proceso particularmente favorable. Además, se ha

sugerido que los procesos de agregación amiloide dentro de condensados biomoleculares de proteína, comúnmente referidos como transición líquido-a-sólido, desempeñan un papel relevante en la agregación *in vivo* de las IDPs amiloidogénicas asociadas a enfermedades neurodegenerativas⁵²². En el interior de estos condensados biomoleculares hay una concentración local muy significativa de proteína y un bajo contenido en agua, como consecuencia de la preferencia por interacciones proteína-proteína sobre las interacciones proteína-agua. Además, se ha visto que la formación de estas estructuras involucra un efecto de desolvatación de las macromoléculas involucradas, con la consiguiente expulsión de un gran número de moléculas de agua de la parte condensada a la parte diluida^{124,523}. Según nuestros resultados, para el caso de α S estas condiciones podrían ser idóneas para que se favorezcan procesos de agregación de proteínas a través de una nucleación homogénea y los agregados formados podrían tener una configuración en lámina β intermolecular antiparalela (Fig. 5.1 D). Dada la capacidad intrínseca de ciertas IDPs amiloidogénicas para inducir procesos de LLPS en el citoplasma/nucleoplasma y que la agregación amiloide de las proteínas a través de una nucleación homogénea en condiciones de hidratación limitadas parece ser un proceso general, creemos que la formación de agregados amiloides por nucleación homogénea podría ser una ruta amiloide *in vivo* relevante para α S y otras IDPs amiloidogénicas. Futuros estudios en este sentido son necesarios para identificar la participación de la nucleación homogénea y heterogénea en la formación de patología de cuerpos de Lewy y la inducción de enfermedad en modelos *in vivo*.

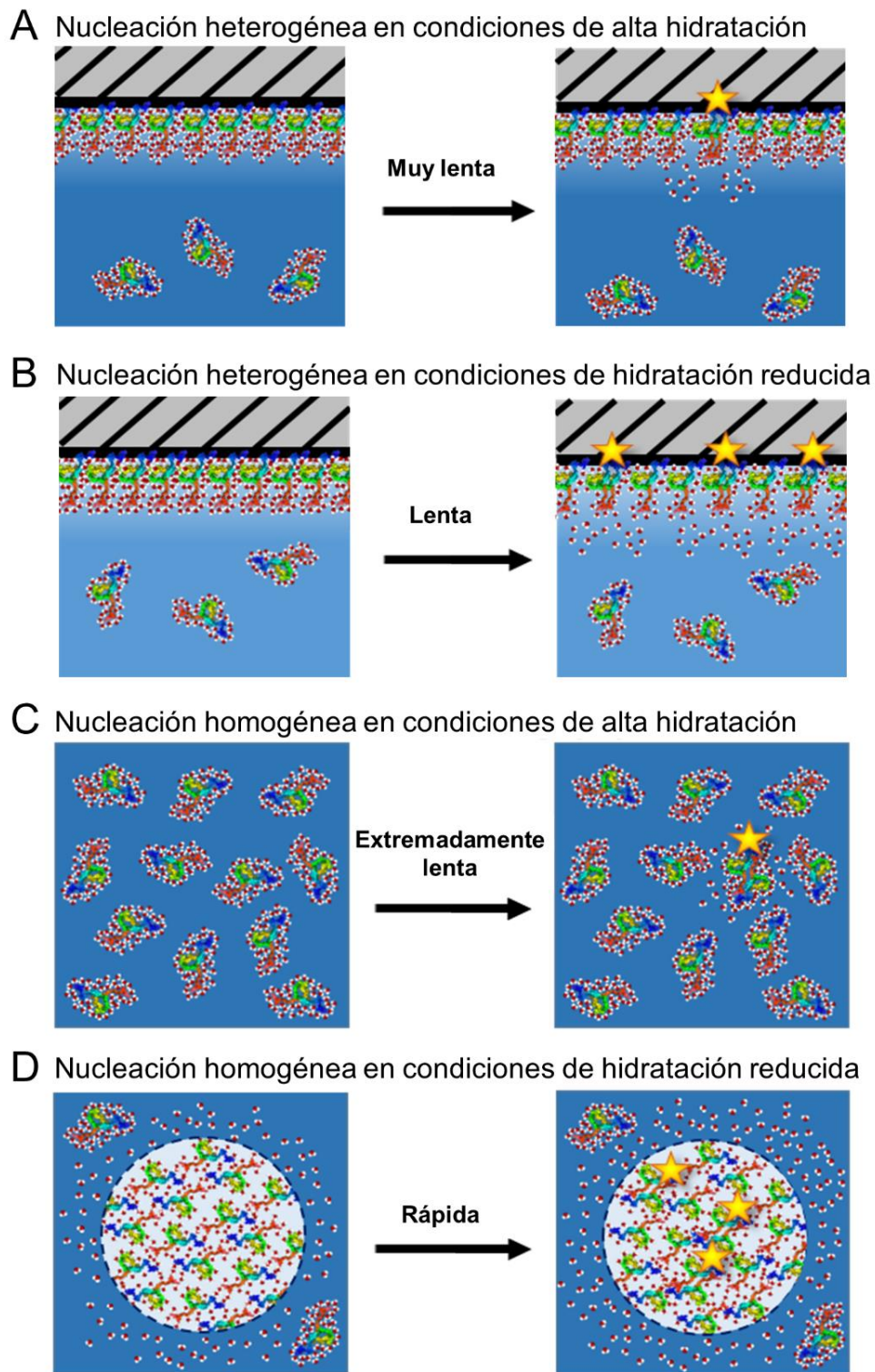


Figura 5.1. Esquema del posible papel del agua en la nucleación amiloide heterogénea y homogénea. Las superficies hidrófobas pueden actuar como catalizadoras de la nucleación amiloide de α S en soluciones acuosas, aunque en condiciones de alta hidratación (A) el proceso es enormemente lento como consecuencia de las altas barreras energéticas de solvatación. En condiciones de hidratación proteica reducida (B) la nucleación primaria heterogénea de α S puede verse favorecida, dando lugar a agregación amiloide. En ausencia de superficies activas, la nucleación homogénea es un proceso extremadamente lento en condiciones de alta hidratación (C), pero se acelera drásticamente en condiciones de hidratación limitada, como las que se encuentran en el interior de los condensados biomoleculares de α S generados por un proceso de LLPS (D). En todos los casos el entorno que confiere a las proteínas una alta hidratación se muestra en azul oscuro, mientras que el que les confiere una hidratación reducida se representa en azul claro.

5.2. Bloque II: Estudio del mecanismo de nucleación primaria de α -sinucleína mediada por interfases

Desde hace tiempo se conoce la importancia de la región NAC^{349,350}, especialmente de la sección entre los residuos 71-82³⁴⁹, en el autoensamblaje de α S mediada por interfases. Está ampliamente demostrado que alteraciones en esta región afectan el proceso de agregación de la proteína^{349,369,381} y que su ausencia lo inhibe³⁴⁹. Sin embargo, la presencia de esta región por sí sola no es suficiente para garantizar la agregación⁴¹⁶. Por otro lado, es ampliamente conocido el papel determinante del extremo N-terminal de α S en la unión de la proteína a la interfase A/W³³² o a las membranas lipídicas^{485,524}. En su unión a ambas superficies, α S adquiere una conformación en hélice α en la región N-terminal involucrada en la unión. De igual modo, esta región de la proteína ha mostrado adquirir estructura en hélice α en presencia de determinados co-solventes, como ciertos alcoholes³³¹. Se ha propuesto que el truncamiento de esta región promueve la formación de fibras amiloides, presumiblemente por aumentar la hidrofobicidad general de la proteína, y que, por tanto, la presencia de la región N-terminal ralentizaría la agregación⁵²⁵. En el mismo estudio se vio que el aumento de la longitud del extremo N-terminal con la adición extra de las dos primeras repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos que caracterizan la secuencia de esta proteína, hacen que aumente su tendencia a adquirir estructura en hélice y se reduzca la tendencia de la proteína a agregar⁵²⁵. Nuestros resultados, por el contrario, apuntan a que la delección de secciones de la región N-terminal conlleva una disminución en la eficacia de agregación. Estos resultados vendrían respaldados por estudios preedentes que muestran como la reducción de la región N-terminal conduce a una reducción de la agregación de la proteína, hasta llegar a inhibirla al eliminar los 70 primeros residuos³⁸¹. Por otro lado, se ha visto que el aumento del número de cargas negativas en esta región también ralentizaba la fibrilación de α S, mientras que el aumento de la carga positiva daba como resultado la aceleración del proceso, lo que demuestra la importancia de la carga neta en esta región³⁵⁶. Por otro lado, el extremo C-terminal de α S, que normalmente no es proclive a interactuar con interfases ni se encuentra formando interacciones relevantes en las fibras amiloides^{357-359,485}, juega un papel clave en la estabilidad del monómero en solución al interactuar con las regiones N-terminal y NAC de la proteína y proteger, así, a la región NAC de interacciones intermoleculares con otras moléculas de proteína³⁷⁹⁻³⁸¹. Estudios previos han demostrado que la ausencia del extremo C-terminal o la anulación de su carga acelera la agregación de α S⁵²⁶, probablemente debido a la exposición de la región NAC a nivel de

monómero y a la estabilización de las fibras amiloides al eliminar las repulsiones electrostáticas entre regiones C-terminal adyacentes.

Nosotros hemos podido distinguir dos regiones clave para la nucleación primaria heterogénea, una entorno a los residuos 1-20 y otra en torno a 70-90 (Fig. 5.2 A). La primera es la región responsable de interactuar con interfases, particularmente interfases H/H, mientras que la segunda, perteneciente a la región NAC, es la responsable de establecer las interacciones intermoleculares que darán lugar a la formación del núcleo amiloide. En el caso en que los primeros residuos de la proteína fuesen eliminados, entonces, la región en hélice más anfipática pasaría a ser la región 54-66 de la proteína, que es la que establecería interacciones con la interfase H/H en este caso. El resto de la proteína se mantiene en solución.

En condiciones de alta hidratación, donde la nucleación homogénea no está favorecida, y en presencia de una interfase H/H, como la interfase A/W, las moléculas de α S (WT) interactúan con la interfase por su región más N-terminal (residuos 1-20 aproximadamente) quedando el resto de la proteína “colgando” desde la interfase hacia la solución. En esta configuración, el extremo C-terminal cargado negativamente de cada molécula de proteína podría estar interactuando con la hilera de lisinas de la hélice formada en la interfase, bien de la misma molécula de proteína o de una molécula de proteína contigua. En esta configuración, la interacción N-/C-terminal no dificultaría la interacción intermolecular de la región NAC de moléculas de proteína próximas (Fig. 5.2 B I), que comenzarían el proceso de autoensamblaje en el caso de que exista un ambiente favorable para su previa desolvatación. El hecho de que la región 54-66 no se adsorba a la interfase en la proteína WT facilita que la región NAC se encuentre en solución con una configuración favorable para establecer interacciones intermoleculares entre diferentes regiones NAC de moléculas de α S próximas a nivel de la interfase.

Esto queda claro al observar el comportamiento de las variantes Δ 2-9 y Δ 1-29, que poseen esta región (54-66) en configuración de hélice y adsorbida en la interfase. En estas variantes y en condiciones de baja fuerza iónica (condiciones en las que los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína se encuentran interactuando), la orientación de las regiones NAC amiloidogénicas es inadecuada para la nucleación. Probablemente esto sea debido a una restricción del movimiento de esta región, que forzosamente queda en una orientación alejada de otras regiones NAC de moléculas vecinas debido a la interacción de los

extremos de la proteína (Fig. 5.2 C I). Al aumentar la fuerza iónica, las cargas de ambos extremos de α S se ven apantalladas y no tiene lugar la interacción electrostática entre ellos, lo que conlleva a que la región NAC ahora tenga más libertad para adoptar diferentes orientaciones, posibilitando las primeras interacciones intermoleculares (Fig. 5.2 B II y C II). Sin embargo, si la región NAC se adsorbe en la interfase, como ocurre en la variante Δ 4-64, estos primeros contactos entre moléculas de α S, imprescindibles para la formación de los primeros núcleos amiloides, estarán impedidos (Fig. 5.2 D y F I).

Esta misma situación tiene lugar cuando la proteína se une a vesículas con un contenido lipídico fisiológico³⁹¹. En estas condiciones se ha demostrado que α S interacciona con las vesículas a través de los primeros 97 residuos, que adquieren estructura en hélice en el complejo, quedando los 25 residuos del extremo N-terminal unidos de forma más estable a la membrana y los restantes estableciendo interacciones más débiles y dinámicas⁴⁸⁵. La interacción de la región entre los residuos 26-97 con las vesículas se ve modulada por la composición lipídica de éstas. Estudios realizados con membranas de alto contenido en lípidos neutros han demostrado que esta región se encuentra fundamentalmente interaccionando con la membrana y enterrada en ella⁵²⁷. Esta adsorción se produce a través de interacciones hidrofóbicas, dado el carácter anfipático de la hélice formada³⁷³. De hecho, la unión de α S a membranas lipídicas se ve favorecida por la existencia de defectos de empaquetamiento en la membrana⁵²⁸, debido a la baja anfipaticidad de la hélice formada en esta región (residuos 26-97)⁵²⁹, lo que facilitará la interacción de la cara más hidrofóbica con las cadenas acílicas de la bicapa lipídica^{373,529}. Por el contrario, la unión de α S a SUV compuestos totalmente por lípidos de cabeza aniónica se produce principalmente a través de interacciones electrostáticas, adsorbiéndose preferencialmente la región N-terminal de la proteína, que es la que dispone de lisinas (con carga positiva) en su eventual hélice (Fig. 5.2 F II). Esto dejará a la región más amiloidogénica del NAC libre en la solución y dispuesta a interaccionar con monómeros cercanos en una configuración propensa. Por tanto, dependiendo de la fracción de lípidos cargados negativamente y lípidos neutros en las vesículas, la región amiloidogénica del NAC se encontrará libre en solución en el caso de un contenido alto en lípidos cargados negativamente, o interaccionando con las vesículas, en el caso de un contenido alto en lípidos neutros, lo que facilitará o impedirá su agregación en las vesículas, respectivamente (Fig. 5.2 F I-II).

La importancia de la electrostática en el mecanismo de adsorción de proteínas a membranas lipídicas ha sido considerada clave en estudios sobre interacciones proteína/lípido^{530,531} y se había considerado relevante en la interacción de α S a membranas lipídicas, ya que, junto con la hidrofobicidad, favorecería la interacción de la región N-terminal con la membrana^{373,423,529}. Pero no se había considerado su papel en los mecanismos que dan lugar a la nucleación primaria de α S.

En resumen, nuestros resultados han proporcionado información relevante para la comprensión del mecanismo de nucleación heterogénea en α S. Concretamente, evidencian tres requisitos para la iniciación de la nucleación heterogénea en condiciones de fuerza iónica y pH fisiológicos que son clave: 1) la interacción de la región más N-terminal de la proteína (residuos 1-20/30) con la interfase, lo que favorece una concentración y disposición de las regiones amiloidogénicas adecuada para la nucleación, 2) la localización de la región amiloidogénica de la región NAC en la solución para que pueda establecer los primeros contactos intermoleculares (estas interacciones no son posibles si esta región se encuentra adsorbida en la interfase) y 3) la orientación adecuada de las regiones amiloidogénicas de las proteínas adsorbidas en la interfase que se ve desfavorecida por las interacciones electrostáticas entre el los extremos N- y C-terminal. En condiciones de pH bajos, estas interacciones electrostáticas no se darían y, por tanto, se facilitaría la nucleación heterogénea. Además, como ya se vio en la discusión del bloque I, la nucleación se vería favorecida en condiciones con una reducción de la actividad de agua, que resultase en una disminución de la barrera energética para su desolvatación. Estas condiciones son más accesibles en las proximidades de superficies hidrofóbicas, donde el agua tiende a excluirse, por lo que las interfases H/H son idóneas para la agregación de α S, no sólo por concentrar a la proteína localmente y orientarla de manera que las regiones amiloidogénicas se encuentren en la disposición más favorable para establecer interacciones, sino que también por la generación de las condiciones de hidratación favorables para la desolvatación de la proteína, requisito esencial para la formación de los primeros núcleos amiloides.

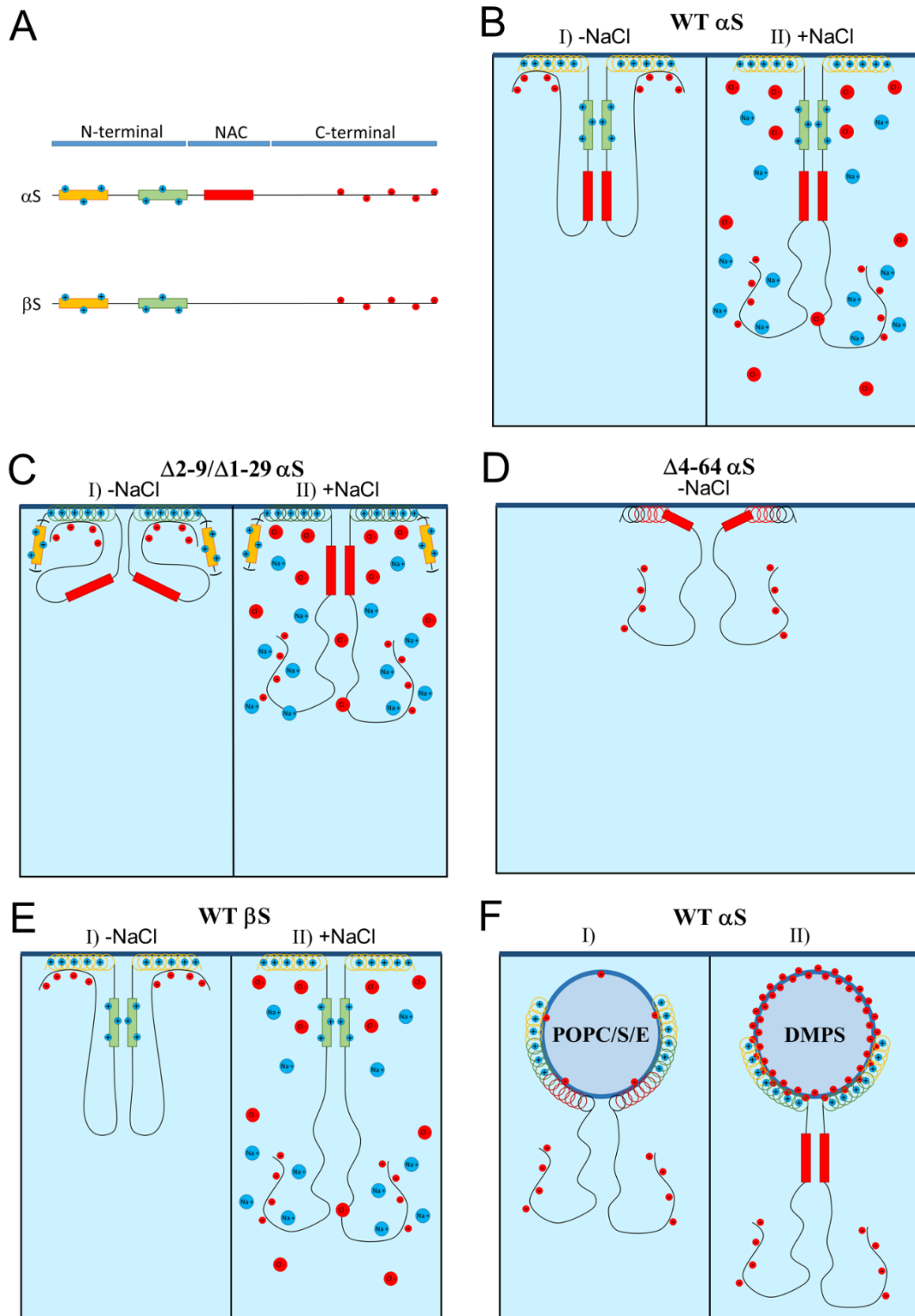


Figura 5.2. Esquema de las posibles conformaciones que adoptaría sinucleína al adsorberse en diferentes interfaces hidrofóbicas/hidrofílicas en las diferentes variantes de proteína utilizadas en este estudio según los resultados obtenidos. (A) Representación esquemática de αS y de βS , donde se muestran las secciones del extremo N-terminal en las que se favorecería la primera (recuadro amarillo) y la segunda (recuadro verde) hélices α , la sección de la región NAC que es fundamental para la agregación de αS^{349} (recuadro rojo) y la distribución neta de cargas en las diferentes regiones de la proteína. (B-E) Posibles conformaciones de WT αS (B), $\Delta 2-9$ o $\Delta 1-29 \alpha S$ (C), $\Delta 4-64 \alpha S$ (D) y WT βS (E) en la interfase A/W en condiciones de fuerza iónica fisiológicas (I) o de elevada fuerza iónica (II). (F) Conformaciones de WT αS adsorbida en la interfase de SUV de composición fisiológica (I), según estudios anteriores⁴⁸⁵ o en SUV de 100% DMPS (II) en condiciones de muy baja fuerza iónica.

6. Conclusiones

6.1. Bloque I: Caracterización de las diferentes rutas de nucleación primaria de α -sinucleína: En la búsqueda de condiciones que favorezcan la nucleación homogénea de la proteína

- α S es capaz de autoensamblarse en agregados amiloides mediante nucleación primaria homogénea.
- La nucleación homogénea de α S supone una ruta amiloide adicional a las previamente exploradas, que es altamente favorecida en condiciones de hidratación limitada y presenta cinéticas órdenes de magnitud más rápidas que las observadas anteriormente. En base a una extensa documentación publicada, proponemos que puede ser una ruta amiloide general para las cadenas polipeptídicas.
- En condiciones de elevada hidratación, la nucleación homogénea de α S es muy poco favorecida mientras que la nucleación heterogénea, en presencia de interfases H/H, tiene un papel relevante.
- El grado de hidratación de las proteínas es un determinante clave no solo para iniciar el autoensamblaje de α S, sino también para dictar la preferencia por el tipo de nucleación primaria y, por tanto, el tipo de polimorfo amiloide estructural generado.
- Existe una preferencia por una estructura en lámina β intermolecular antiparalela cuando α S agrega a través de nucleación homogénea, mientras que en la agregación iniciada por un proceso de nucleación heterogénea las moléculas de proteína son forzadas a adquirir una estructura en lámina β intermolecular paralela.
- En la nucleación primaria homogénea no existen limitaciones en la orientación de los monómeros durante el proceso de nucleación, lo que explica que los polimorfos adquieran una estructura en lámina β intermolecular antiparalela, que es la más estable al presentar puentes de hidrógenos más fuertes.
- La nucleación homogénea podría estar favorecida dentro de condensados biomoleculares de α S generados por un proceso de separación de fases líquido-líquido, por lo que podría ser un proceso relevante *in vivo*.

6.2. Bloque II: Estudio del mecanismo de nucleación primaria de α -sinucleína mediada por interfases

- Hemos distinguido dos regiones clave para la nucleación primaria heterogénea: la primera (en torno a los residuos 1-20) involucrada en la interacción de la proteína con interfases, particularmente interfases H/H, y la segunda (en torno a los residuos 70-90) involucrada en el establecimiento de los puentes de hidrógeno intermoleculares que darán lugar a la formación del núcleo amiloide.
- La región N-terminal de α S, al adsorberse en la interfase y adquirir estructura en hélice, incrementa sus propiedades electrostáticas al generarse una fila de lisinas, resultando en un aumento de la afinidad por la interacción con el extremo C-terminal de la proteína. Esta interacción influye en la orientación del segmento más amiloidogénico de la región NAC en las moléculas de proteína adheridas a la interfase y, por tanto, en la efectividad de la nucleación primaria heterogénea.
- La adsorción de α S a SUV compuestos por lípidos aniónicos sigue un mecanismo a través de interacciones electrostáticas, involucrando únicamente a la región N-terminal rica en lisinas (primeros 50 residuos) y dejando a la región NAC libre en el seno de la solución y con posibilidad de interactuar con otras proteínas adsorbidas en la vesícula. Por el contrario, la interacción de la proteína con SUV de composición fisiológica similar a la de las vesículas sinápticas sigue un mecanismo fundamentalmente a través de interacciones hidrofóbicas, involucrando en la adsorción tanto a la región N-terminal como a la región NAC, lo que impide que esta última establezca interacciones intermoleculares competentes para la formación de núcleos amiloides.

7. Bibliografía

1. Dobson, C. M. Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. *Angew Chem Int Ed* **26** (1998).
2. Sali, A., Shakhnovich, E. & Karplus, M. How does a protein fold? *Nature* **369**, 248–251 (1994).
3. Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230 (1973).
4. Dill, K. A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133–7155 (1990).
5. Lins, L. & Brasseur, R. The hydrophobic effect in protein folding. *FASEB J.* **9**, 535–540 (1995).
6. Burger, V., Gurry, T. & Stultz, C. Intrinsically disordered proteins: Where computation meets experiment. *Polymers* **6**, 2684–2719 (2014).
7. Levinthal, C. How to fold graciously. *Mossbauer Spectrosc. Biol. Syst.* **67**, 22–24 (1969).
8. Karplus, M. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Fold. Des.* **2**, S69–S75 (1997).
9. Leopold, P. E., Montal, M. & Onuchic, J. N. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8721–8725 (1992).
10. Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. & Thirumalai, D. Navigating the folding routes. *Science* **267**, 1619–1620 (1995).
11. Onuchic, J. N., Wolynes, P. G., Luthey-Schulten, Z. & Socci, N. D. Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3626–3630 (1995).
12. Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. **426**, 7 (2003).
13. Laage, D., Elsaesser, T. & Hynes, J. T. Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules. *Chem. Rev.* **117**, 10694–10725 (2017).
14. Bellissent-Funel, M.-C. *et al.* Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins. *Chem. Rev.* **116**, 7673–7697 (2016).
15. Zhou, R. Hydrophobic Collapse in Multidomain Protein Folding. *Science* **305**, 1605–1609 (2004).
16. Baldwin, R. L. Dynamic hydration shell restores Kauzmann’s 1959 explanation of how the hydrophobic factor drives protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13052–13056 (2014).

17. Hillyer, M. B. & Gibb, B. C. Molecular Shape and the Hydrophobic Effect. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **67**, 307–329 (2016).
18. Tsai, C.-J., Maizel, J. V. & Nussinov, R. The Hydrophobic Effect: A New Insight from Cold Denaturation and a Two-State Water Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 55–69 (2002).
19. Kinoshita, M. Importance of Translational Entropy of Water in Biological Self-Assembly Processes like Protein Folding. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1064–1080 (2009).
20. Levy, Y. & Onuchic, J. N. Water and proteins: A love-hate relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 3325–3326 (2004).
21. Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* **293**, 321–331 (1999).
22. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *7* (2002).
23. Babu, M. M., van der Lee, R., de Groot, N. S. & Gsponer, J. Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 432–440 (2011).
24. Iakoucheva, L. M., Brown, C. J., Lawson, J. D., Obradović, Z. & Dunker, A. K. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* **323**, 573–584 (2002).
25. Wootton, J. C. Sequences with ‘unusual’ amino acid compositions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 413–421 (1994).
26. Romero, P., Obradovic, Z. & Dunker, A. K. Folding minimal sequences: the lower bound for sequence complexity of globular proteins. *FEBS Lett.* **462**, 363–367 (1999).
27. Lavoie, H. *et al.* Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2967–2979 (2003).
28. Mier, P. & Andrade-Navarro, M. A. Assessing the low complexity of protein sequences via the low complexity triangle. *PLOS ONE* **15**, e0239154 (2020).
29. Scherzinger, E. *et al.* Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates In vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549–558 (1997).
30. Li, S. Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 777–782 (1998).
31. Karlin, S., Brocchieri, L., Bergman, A., Mrazek, J. & Gentles, A. J. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 333–338 (2002).

32. Receveur-Bréchet, V., Bourhis, J.-M., Uversky, V. N., Canard, B. & Longhi, S. Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **62**, 24–45 (2005).
33. Dunker, A. K. & Obradovic, Z. The protein trinity—linking function and disorder. *Nat. Biotechnol.* **19**, 805–806 (2001).
34. Uversky, V. N. Chapter One - Protein intrinsic disorder and structure-function continuum. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Uversky, V. N.) vol. 166 1–17 (Academic Press, 2019).
35. Zambelli, B. *et al.* Insights in the (un)structural organization of *Bacillus pasteurii* UreG, an intrinsically disordered GTPase enzyme. *Mol BioSyst* **8**, 220–228 (2012).
36. Ak, D., Cj, B., Jd, L., Lm, I. & Z, O. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* **41**, 6573–6582 (2002).
37. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208 (2005).
38. Uversky, V. N. & Dunker, A. K. Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1804**, 1231–1264 (2010).
39. Dunker, A. K., Cortese, M. S., Romero, P., Iakoucheva, L. M. & Uversky, V. N. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* **272**, 5129–5148 (2005).
40. Haynes, C. *et al.* Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLOS Comput. Biol.* **2**, e100 (2006).
41. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 527–533 (2002).
42. Borgia, A. *et al.* Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex. *Nature* **555**, 61–66 (2018).
43. Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 3–16 (2004).
44. Frieden, C. Protein aggregation processes: In search of the mechanism. *Protein Sci.* **16**, 2334–2344.
45. Liebman, S. W. & Chernoff, Y. O. Prions in Yeast. *Genetics* **191**, 1041–1072 (2012).
46. Kato, M. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).

47. Zhang, H. *et al.* RNA controls PolyQ protein phase transitions. *Mol. Cell* **60**, 220–230 (2015).
48. Patel, A. *et al.* A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell* **162**, 1066–1077 (2015).
49. Chiti, F. & Dobson, C. M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 15–22 (2009).
50. Durham, H. D., Roy, J., Dong, L. & Figlewicz, D. A. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 523–530 (1997).
51. Esteban-Martín, S., Silvestre-Ryan, J., Bertoncini, C. W. & Salvatella, X. Identification of fibril-like tertiary contacts in soluble monomeric α -synuclein. *Biophys. J.* **105**, 1192–1198 (2013).
52. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 6469–6473 (1998).
53. Sipe, J. D. & Cohen, A. S. Review: History of the Amyloid Fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000).
54. Salahuddin, P. & Distributed Information Sub-Centre (DISC), Interdisciplinary Biotechnology Unit, Aligarh Muslim University (A.M.U.), Aligarh, 202002, India. Protein folding, misfolding, aggregation and amyloid formation: Mechanisms of A β oligomer mediated toxicities. *J. Biochem. Mol. Biol. Res.* **1**, 36–45 (2015).
55. Dobson, C. M. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329–332 (1999).
56. Gazit, E. The “Correctly Folded” State of Proteins: Is It a Metastable State? - Gazit - 2002 - - Wiley Online Library. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 257–259 (2002).
57. Baldwin, A. J. *et al.* Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14160–14163 (2011).
58. Perczel, A., Hudáky, P. & Pálfi, V. K. Dead-end street of protein folding: Thermodynamic rationale of amyloid fibril formation. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14959–14965 (2007).
59. Williams, A. D. *et al.* Mapping A β amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **335**, 833–842 (2004).
60. Tzotzos, S. & Doig, A. J. Amyloidogenic sequences in native protein structures. *Protein Sci.* **19**, 327–348 (2010).

61. King, O. D., Gitler, A. D. & Shorter, J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res.* **1462**, 61–80 (2012).
62. Goux, W. J. *et al.* The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides. *J. Biol. Chem.* **279**, 26868–26875 (2004).
63. Adler-Abramovich, L. *et al.* Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 701–706 (2012).
64. Gour, N. *et al.* Amyloid-like Structures Formed by Single Amino Acid Self-Assemblies of Cysteine and Methionine. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 1230–1239 (2019).
65. Ciryam, P., Tartaglia, G. G., Morimoto, R. I., Dobson, C. M. & Vendruscolo, M. Widespread aggregation and neurodegenerative diseases are associated with supersaturated proteins. *Cell Rep.* **5**, 781–790 (2013).
66. Cremades, N. & Dobson, C. M. The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiol. Dis.* **109**, 178–190 (2018).
67. Arosio, P., Knowles, T. P. J. & Linse, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 7606–7618 (2015).
68. Buell, A. K. *et al.* Detailed Analysis of the Energy Barriers for Amyloid Fibril Growth. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5247–5251 (2012).
69. Auer, S., Dobson, C. M. & Vendruscolo, M. Characterization of the nucleation barriers for protein aggregation and amyloid formation. *HFSP J.* **1**, 137–146 (2007).
70. Jarrett, J. T. & Lansbury, J. Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* **31**, 12345–12352 (2002).
71. Chatani, E. & Yamamoto, N. Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophys. Rev.* **10**, 527–534 (2018).
72. Xue, W.-F., Homans, S. W. & Radford, S. E. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8926–8931 (2008).
73. Knowles, T. P. J. *et al.* An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science* **326**, 1533–1537 (2009).
74. Linse, S. Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation. *Biophys. Rev.* **9**, 329–338 (2017).

75. Törnquist, M. *et al.* Secondary nucleation in amyloid formation. *Chem. Commun.* **54**, 8667–8684 (2018).
76. Serio, T. R. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* **289**, 1317–1321 (2000).
77. Lee, J., Culyba, E. K., Powers, E. T. & Kelly, J. W. Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 602–609 (2011).
78. Almstedt, K., Nyström, S., Nilsson, K. P. R. & Hammarström, P. Amyloid fibrils of human prion protein are spun and woven from morphologically disordered aggregates. *Prion* **3**, 224–235 (2009).
79. Thakur, A. K. *et al.* Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 380–389 (2009).
80. Wei, L. *et al.* The Molecular Basis of Distinct Aggregation Pathways of Islet Amyloid Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **286**, 6291–6300 (2011).
81. Cremades, N. *et al.* Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* **149**, 1048–1059 (2012).
82. Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M. & Robinson, C. V. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* **9**, 1960–1967 (2000).
83. Olofsson, A., Ippel, J. H., Wijmenga, S. S., Lundgren, E. & Öhman, A. Probing Solvent Accessibility of Transthyretin Amyloid by Solution NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **279**, 5699–5707 (2004).
84. Plakoutsi, G. *et al.* Evidence for a mechanism of amyloid formation involving molecular reorganisation within native-like precursor aggregates. *J. Mol. Biol.* **351**, 910–922 (2005).
85. Pagano, K. *et al.* Structural and dynamics characteristics of acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* in the monomeric state and in the initial native-like aggregates. *J. Biol. Chem.* **285**, 14689–14700 (2010).
86. Marvian, A. T. *et al.* The status of the terminal regions of α -synuclein in different forms of aggregates during fibrillization. *Int. J. Biol. Macromol.* **155**, 543–550 (2020).
87. Collins, S. R., Douglass, A., Vale, R. D. & Weissman, J. S. Mechanism of prion propagation: Amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol.* **2**, (2004).
88. Froula, J. M. *et al.* Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J. Biol. Chem.* **294**, 10392–10406 (2019).

89. Kyle, R. A. Amyloidosis: a convoluted story. *Br. J. Haematol.* **114**, 529–538 (2001).
90. Vassar, P. S. & Culling, C. F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch. Pathol.* **68**, 487–498 (1959).
91. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1804**, 1405–1412 (2010).
92. Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D. & Guo, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R. Soc. Open Sci.* **4**, 160696 (2017).
93. Chen, S. W. *et al.* Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E1994–E2003 (2015).
94. Thirumalai, D., Reddy, G. & Straub, J. E. Role of Water in Protein Aggregation and Amyloid Polymorphism. *Acc. Chem. Res.* **45**, 83–92 (2012).
95. Vajda, T. & Perczel, A. Role of water in protein folding, oligomerization, amyloidosis and miniprotein: ROLE OF WATER IN BEHAVIOR OF PROTEIN AND MINIPROTEIN. *J. Pept. Sci.* **20**, 747–759 (2014).
96. Stephens, A. D. & Kaminski Schierle, G. S. The role of water in amyloid aggregation kinetics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **58**, 115–123 (2019).
97. Reddy, G., Straub, J. E. & Thirumalai, D. Dynamics of locking of peptides onto growing amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11948–11953 (2009).
98. Reddy, G., Straub, J. E. & Thirumalai, D. Dry amyloid fibril assembly in a yeast prion peptide is mediated by long-lived structures containing water wires. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21459–21464 (2010).
99. Fichou, Y. *et al.* Hydration water mobility is enhanced around tau amyloid fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 6365–6370 (2015).
100. Pavlova, A. *et al.* Protein structural and surface water rearrangement constitute major events in the earliest aggregation stages of tau. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E127–E136 (2016).
101. Arya, S. *et al.* Water Rearrangements upon Disorder-to-Order Amyloid Transition. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 4105–4110 (2016).
102. Schwierz, N., Frost, C. V., Geissler, P. L. & Zacharias, M. Dynamics of seeded A β 40-fibril growth from atomistic molecular dynamics simulations: Kinetic trapping and Reduced water mobility in the locking step. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 527–539 (2016).

103. Zheng, J., Ma, B., Tsai, C.-J. & Nussinov, R. Structural Stability and Dynamics of an Amyloid-Forming Peptide GNNQQNY from the Yeast Prion Sup-35. *Biophys. J.* **91**, 824–833 (2006).
104. Balbirnie, M., Grothe, R. & Eisenberg, D. S. An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β -sheet structure for amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 2375–2380 (2001).
105. Chong, S.-H. & Ham, S. Distinct Role of Hydration Water in Protein Misfolding and Aggregation Revealed by Fluctuating Thermodynamics Analysis. *Acc. Chem. Res.* **48**, 956–965 (2015).
106. Mukherjee, S., Chowdhury, P. & Gai, F. Effect of Dehydration on the Aggregation Kinetics of Two Amyloid Peptides. *J. Phys. Chem. B* **113**, 531–535 (2009).
107. Anderson, V. L., Webb, W. W. & Eliezer, D. Interplay between desolvation and secondary structure in mediating cosolvent and temperature induced alpha-synuclein aggregation. *Phys. Biol.* **9**, 056005 (2012).
108. Bokor, M., Tantos, Á., Tompa, P., Han, K.-H. & Tompa, K. WT and A53T α -Synuclein Systems: Melting Diagram and Its New Interpretation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3997 (2020).
109. Dalal, V., Arya, S. & Mukhopadhyay, S. Confined Water in Amyloid-Competent Oligomers of the Prion Protein. *ChemPhysChem* **17**, 2804–2807 (2016).
110. Chatani, E., Tsuchisaka, Y., Masuda, Y. & Tsenkova, R. Water Molecular System Dynamics Associated with Amyloidogenic Nucleation as Revealed by Real Time Near Infrared Spectroscopy and Aquaphotomics. *PLoS ONE* **9**, e101997 (2014).
111. Walters, R. H. & Murphy, R. M. Examining polyglutamine peptide length: A connection between collapsed conformations and increased aggregation. *J. Mol. Biol.* **393**, 978–992 (2009).
112. Krishnan, R. *et al.* Conserved features of intermediates in amyloid assembly determine their benign or toxic states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11172–11177 (2012).
113. Basak, S., Prasad, G. V. R. K., Varkey, J. & Chattopadhyay, K. Early sodium dodecyl sulfate induced collapse of α -synuclein correlates with Its amyloid formation. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 239–246 (2015).
114. Fernández-Ramírez, M. del C., Hervás, R., Menéndez, M., Laurents, D. V. & Carrión-Vázquez, M. Tau amyloidogenesis begins with a loss of its conformational polymorphism. *bioRxiv* 2020.06.18.158923 (2020) doi:10.1101/2020.06.18.158923.
115. Eschmann, N. A. *et al.* Signature of an aggregation-prone conformation of tau. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

116. Chen, D. *et al.* Tau local structure shields an amyloid-forming motif and controls aggregation propensity. *Nat. Commun.* **10**, 2493 (2019).
117. Gallat, F.-X. *et al.* Dynamical Coupling of Intrinsically Disordered Proteins and Their Hydration Water: Comparison with Folded Soluble and Membrane Proteins. *Biophys. J.* **103**, 129–136 (2012).
118. Schirò, G. *et al.* Translational diffusion of hydration water correlates with functional motions in folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Commun.* **6**, 6490 (2015).
119. Rani, P. & Biswas, P. Local structure and dynamics of hydration water in intrinsically disordered proteins. *J. Phys. Chem. B* **119**, 10858–10867 (2015).
120. Campioni, S. *et al.* The Presence of an Air–Water Interface Affects Formation and Elongation of α -Synuclein Fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2866–2875 (2014).
121. Straube, E. Scaling concepts in polymer physics. Von P. G. DE GENNES. Ithaca/London: Cornell University Press 1980. Geb., £ 23,-, \$ 48.-. *Acta Polym.* **32**, 290–290 (1981).
122. Wolf, N., Priess, J. & Hirsh, D. Segregation of germline granules in early embryos of *Caenorhabditis elegans*: an electron microscopic analysis. 10.
123. Strome, S. & Wood, W. B. Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos. *Cell* **35**, 15–25 (1983).
124. Hyman, A. A., Weber, C. A. & Jülicher, F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 39–58 (2014).
125. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 285–298 (2017).
126. Shin, Y. & Brangwynne, C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* **357**, eaaf4382 (2017).
127. Gucht, J. van der, Spruijt, E., Lemmers, M. & Cohen Stuart, M. A. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. *J. Colloid Interface Sci.* **361**, 407–422 (2011).
128. Aumiller, W. M. & Keating, C. D. Experimental models for dynamic compartmentalization of biomolecules in liquid organelles: Reversible formation and partitioning in aqueous biphasic systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **239**, 75–87 (2017).
129. Chiu, Y.-P. *et al.* Liquid-liquid phase separation and extracellular multivalent interactions in the tale of galectin-3. *Nat. Commun.* **11**, 1229 (2020).

130. Huggins, M. L. Thermodynamic properties of solutions of long-chain compounds. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **4**, 107–107 (1942).
131. Flory, P. J. Thermodynamics of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.* **10**, 51–61 (1942).
132. Ribeiro, S. S., Samanta, N., Ebbinghaus, S. & Marcos, J. C. The synergic effect of water and biomolecules in intracellular phase separation. *Nat. Rev. Chem.* **3**, 552–561 (2019).
133. Zaslavsky, B. Y. & Uversky, V. N. In aqua veritas: The indispensable yet mostly ignored role of water in phase separation and membrane-less organelles. *Biochemistry* **57**, 2437–2451 (2018).
134. Cinar, H. *et al.* Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid–Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications. *Chemistry* **25**, 13049–13069 (2019).
135. Forman-Kay, J. D. & Mittag, T. From Sequence and Forces to Structure, Function, and Evolution of Intrinsically Disordered Proteins: Structure. *Structure* **21**, 1492–1499 (2013).
136. Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **44**, 18–30 (2017).
137. Aguzzi, A. & Altmeyer, M. Phase separation: Linking cellular compartmentalization to disease. *Trends Cell Biol.* **26**, 547–558 (2016).
138. Boeynaems, S. *et al.* Protein phase separation: A new phase in cell biology. *Trends Cell Biol.* **28**, 420–435 (2018).
139. Nedelsky, N. B. & Taylor, J. P. Bridging biophysics and neurology: aberrant phase transitions in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 272–286 (2019).
140. Alberti, S. & Dormann, D. Liquid–liquid phase separation in disease. *Annu. Rev. Genet.* **53**, 171–194 (2019).
141. Lin, Y., Fichou, Y., Zeng, Z., Hu, N. Y. & Han, S. Electrostatically driven complex coacervation and amyloid aggregation of tau are Independent processes with overlapping conditions. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 615–627 (2020).
142. Babinchak, W. M. *et al.* The role of liquid–liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain. *J. Biol. Chem.* **294**, 6306–6317 (2019).
143. Babinchak, W. M. & Surewicz, W. K. Liquid–liquid phase separation and its mechanistic role in pathological protein aggregation. *J. Mol. Biol.* **432**, 1910–1925 (2020).

144. Ray, S. *et al.* α -Synuclein aggregation nucleates through liquid–liquid phase separation. *Nat. Chem.* **12**, 705–716 (2020).
145. Hardenberg, M. C. *et al.* Observation of an α -synuclein liquid droplet state and its maturation into Lewy body-like assemblies. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.06.08.140798> (2020)
doi:10.1101/2020.06.08.140798.
146. Fändrich, M. & Dobson, C. M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* **21**, 5682–5690 (2002).
147. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–396 (2014).
148. Sunde, M. *et al.* Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. Edited by F. E. Cohen. *J. Mol. Biol.* **273**, 729–739 (1997).
149. Sawaya, M. R. *et al.* Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453–457 (2007).
150. Eisenberg, D. & Jucker, M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **148**, 1188–1203 (2012).
151. Fitzpatrick, A. W. P. *et al.* Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5468–5473 (2013).
152. Knowles, T. P. *et al.* Role of Intermolecular Forces in Defining Material Properties of Protein Nanofibrils. *Science* **318**, 1900–1903 (2007).
153. Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366 (2006).
154. Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 27–68 (2017).
155. Török, M. *et al.* Structural and dynamic features of Alzheimer’s A β peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* **277**, 40810–40815 (2002).
156. Lührs, T. *et al.* 3D structure of Alzheimer’s amyloid- β (1–42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17342–17347 (2005).
157. Petkova, A. T., Yau, W.-M. & Tycko, R. Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer’s β -amyloid fibrils. *Biochemistry* **45**, 498–512 (2006).

158. Paravastu, A. K., Leapman, R. D., Yau, W.-M. & Tycko, R. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18349–18354 (2008).
159. Bertini, I., Gonnelli, L., Luchinat, C., Mao, J. & Nesi, A. A new structural model of A β ₄₀ fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16013–16022 (2011).
160. Lu, J.-X. *et al.* Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* **154**, (2013).
161. Colvin, M. T. *et al.* Atomic resolution structure of monomorphic A β ₄₂ amyloid fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9663–9674 (2016).
162. Der-Sarkissian, A., Jao, C. C., Chen, J. & Langen, R. Structural Organization of α -Synuclein Fibrils Studied by Site-directed Spin Labeling. *J. Biol. Chem.* **278**, 37530–37535 (2003).
163. Chen, M., Margittai, M., Chen, J. & Langen, R. Investigation of α -synuclein fibril structure by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* **282**, 24970–24979 (2007).
164. Gath, J. *et al.* Unlike Twins: An NMR Comparison of Two α -Synuclein Polymorphs Featuring Different Toxicity. *PLoS ONE* **9**, (2014).
165. Gath, J. *et al.* Yet another polymorph of α -synuclein: solid-state sequential assignments. *Biomol. NMR Assign.* **8**, 395–404 (2014).
166. Tuttle, M. D. *et al.* Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 409–415 (2016).
167. Margittai, M. & Langen, R. Template-assisted filament growth by parallel stacking of tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10278–10283 (2004).
168. Daebel, V. *et al.* β -Sheet Core of Tau Paired Helical Filaments Revealed by Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13982–13989 (2012).
169. Luca, S., Yau, W.-M., Leapman, R. & Tycko, R. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: Constraints from solid state NMR. *Biochemistry* **46**, 13505–13522 (2007).
170. Bedrood, S. *et al.* Fibril Structure of Human Islet Amyloid Polypeptide \diamond . *J. Biol. Chem.* **287**, 5235–5241 (2012).
171. Ladner, C. L. *et al.* Stacked sets of parallel, in-register β -strands of β 2-microglobulin in amyloid fibrils revealed by site-directed spin labeling and chemical labeling. *J. Biol. Chem.* **285**, 17137–17147 (2010).

172. Tycko, R., Savtchenko, R., Ostapchenko, V. G., Makarava, N. & Baskakov, I. V. The α -helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel β -sheet structure in PrP fibrils: Evidence from solid state NMR. *Biochemistry* **49**, 9488–9497 (2010).
173. Helmus, J. J., Surewicz, K., Apostol, M. I., Surewicz, W. K. & Jaroniec, C. P. Intermolecular alignment in Y145Stop Human prion protein amyloid fibrils probed by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 13934–13937 (2011).
174. Müller, H. *et al.* Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion* **8**, 344–358 (2014).
175. Itoh-Watanabe, H. *et al.* Role of aromatic residues in amyloid fibril formation of human calcitonin by solid-state ^{13}C NMR and molecular dynamics simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 8890 (2013).
176. Bateman, D. A., Tycko, R. & Wickner, R. B. Experimentally derived structural constraints for amyloid fibrils of wild-type transthyretin. *Biophys. J.* **101**, 2485–2492 (2011).
177. Qiang, W., Yau, W.-M. & Tycko, R. Structural evolution of Iowa mutant β -amyloid fibrils from polymorphic to homogeneous states under repeated seeded growth. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4018–4029 (2011).
178. Gorski, S. A., Capaldi, A. P., Kleanthous, C. & Radford, S. E. Acidic conditions stabilise intermediates populated during the folding of Im7 and Im9 1 Edited by C. R. Matthews. *J. Mol. Biol.* **312**, 849–863 (2001).
179. Petkova, A. T. Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's - Amyloid Fibrils. *Science* **307**, 262–265 (2005).
180. Hess, S., Lindquist, S. L. & Scheibel, T. Alternative assembly pathways of the amyloidogenic yeast prion determinant Sup35–NM. *EMBO Rep.* **8**, 1196–1201 (2007).
181. Bolognesi, B. *et al.* Single Point Mutations Induce a Switch in the Molecular Mechanism of the Aggregation of the Alzheimer's Disease Associated A β ₄₂ Peptide. *ACS Chem. Biol.* **9**, 378–382 (2014).
182. Kad, N. M. *et al.* Hierarchical assembly of β 2-microglobulin amyloid In Vitro revealed by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **330**, 785–797 (2003).
183. Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U. & Müller, S. A. Multiple assembly Ppathways underlie amyloid- β Fibril polymorphisms. *J. Mol. Biol.* **352**, 282–298 (2005).
184. Buell, A. K. *et al.* Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7671–7676 (2014).

185. Woerman, A. L. *et al.* Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4949–E4958 (2015).
186. Bitan, G. *et al.* Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 330–335 (2003).
187. Gosal, W. S. *et al.* Competing Pathways Determine Fibril Morphology in the Self-assembly of β 2-Microglobulin into Amyloid. *J. Mol. Biol.* **351**, 850–864 (2005).
188. Bader, R., Bamford, R., Zurdo, J., Luisi, B. F. & Dobson, C. M. Probing the Mechanism of Amyloidogenesis through a Tandem Repeat of the PI3-SH3 Domain Suggests a Generic Model for Protein Aggregation and Fibril Formation. *J. Mol. Biol.* **356**, 189–208 (2006).
189. Kumar, S. & Udgaonkar, J. B. Conformational conversion may precede or follow aggregate elongation on alternative pathways of amyloid protofibril formation. *J. Mol. Biol.* **385**, 1266–1276 (2009).
190. Jiménez, J. L. *et al.* The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9196–9201 (2002).
191. Bemporad, F. & Chiti, F. Protein Misfolded Oligomers: Experimental Approaches, Mechanism of Formation, and Structure-Toxicity Relationships. *Chem. Biol.* **19**, 315–327 (2012).
192. Ehrnhoefer, D. E. *et al.* EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 558–566 (2008).
193. Conway, K. A., Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Fibrils formed in vitro from α -synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **39**, 2552–2563 (2000).
194. Lashuel, H. A. *et al.* α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *J. Mol. Biol.* **322**, 1089–1102 (2002).
195. Shafir, Y., Durell, S. R., Anishkin, A. & Guy, H. R. Beta-barrel models of soluble amyloid beta oligomers and annular protofibrils: Models of A β Oligomers and Protofibrils. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **78**, 3458–3472 (2010).
196. Lasagna-Reeves, C. A., Glabe, C. G. & Kaye, R. Amyloid- β Annular Protofibrils Evade Fibrillar Fate in Alzheimer Disease Brain. *J. Biol. Chem.* **286**, 22122–22130 (2011).
197. Laganowsky, A. *et al.* Atomic view of a toxic amyloid small oligomer. *Science* **335**, 1228–1231 (2012).

198. Serra-Batiste, M. *et al.* A β 42 assembles into specific β -barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 10866–10871 (2016).
199. Lorenzen, N. *et al.* The Role of Stable α -Synuclein Oligomers in the Molecular Events Underlying Amyloid Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 3859–3868 (2014).
200. Volles, M. J. *et al.* Vesicle Permeabilization by Protofibrillar α -Synuclein: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Parkinson's Disease \dagger . *Biochemistry* **40**, 7812–7819 (2001).
201. Campioni, S. *et al.* A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 140–147 (2010).
202. Celej, M. S. *et al.* Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem. J.* **443**, 719–726 (2012).
203. Cremades, N., Chen, S. W. & Dobson, C. M. Chapter Three - Structural characteristics of α -synuclein oligomers. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Sandal, M.) vol. 329 79–143 (Academic Press, 2017).
204. van Rooijen, B. D., van Leijenhorst-Groener, K. A., Claessens, M. M. A. E. & Subramaniam, V. Tryptophan Fluorescence Reveals Structural Features of α -Synuclein Oligomers. *J. Mol. Biol.* **394**, 826–833 (2009).
205. Cerf, E. *et al.* Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochem. J.* **421**, 415–423 (2009).
206. Zou, Y., Li, Y., Hao, W., Hu, X. & Ma, G. Parallel β -sheet fibril and antiparallel β -sheet oligomer: New insights into amyloid formation of hen egg white lysozyme under heat and acidic condition from FTIR spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **117**, 4003–4013 (2013).
207. Paslawski, W., Mysling, S., Thomsen, K., Jørgensen, T. J. D. & Otzen, D. E. Co-existence of Two Different α -Synuclein Oligomers with Different Core Structures Determined by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 7560–7563 (2014).
208. Bolognesi, B. *et al.* ANS Binding Reveals Common Features of Cytotoxic Amyloid Species. *ACS Chem. Biol.* **5**, 735–740 (2010).
209. Ladiwala, A. R. A. *et al.* Conformational differences between two amyloid β oligomers of similar size and dissimilar toxicity. *J. Biol. Chem.* **287**, 24765–24773 (2012).
210. Fusco, G. *et al.* Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* **358**, 1440–1443 (2017).
211. Tay, W. M., Huang, D., Rosenberry, T. L. & Paravastu, A. K. The Alzheimer's Amyloid- β (1–42) Peptide Forms Off-Pathway Oligomers and Fibrils That Are

- Distinguished Structurally by Intermolecular Organization. *J. Mol. Biol.* **425**, 2494–2508 (2013).
212. Huang, D. *et al.* Antiparallel β -Sheet Structure within the C-Terminal Region of 42-Residue Alzheimer's Amyloid- β Peptides When They Form 150-kDa Oligomers. *J. Mol. Biol.* **427**, 2319–2328 (2015).
213. Beta-barrel models of soluble amyloid beta oligomers and annular protofibrils - Shafrir - 2010 - Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.22832>.
214. Stroud, J. C., Liu, C., Teng, P. K. & Eisenberg, D. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7717–7722 (2012).
215. Breydo, L. & Uversky, V. N. Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers. *FEBS Lett.* **589**, 2640–2648 (2015).
216. Dubey, K., Anand, B. G., Temgire, M. K. & Kar, K. Evidence of rapid coaggregation of globular proteins during amyloid formation. *Biochemistry* **53**, 8001–8004 (2014).
217. Oskarsson, M. E. *et al.* In vivo seeding and cross-seeding of localized amyloidosis. *Am. J. Pathol.* **185**, 834–846 (2015).
218. Forno, L. S. Neuropathology of Parkinson's Disease: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 259–272 (1996).
219. Alzheimer, A. über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z. Für Gesamte Neurol. Psychiatr.* **4**, 356 (1911).
220. Ross, C. A. & Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **10**, S10–S17 (2004).
221. Conway, K. A. *et al.* Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 571–576 (2000).
222. Mendes Sousa, M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimarães, A. & Saraiva, M. J. Deposition of Transthyretin in Early Stages of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Am. J. Pathol.* **159**, 1993–2000 (2001).
223. Bucciantini, M. *et al.* Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507–511 (2002).
224. Hoshi, M. *et al.* Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6370–6375 (2003).

225. Zraika, S. *et al.* Toxic oligomers and islet beta cell death: guilty by association or convicted by circumstantial evidence? *Diabetologia* **53**, 1046–1056 (2010).
226. Winner, B. *et al.* In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4194–4199 (2011).
227. Almeida, M. R. & Saraiva, M. J. Clearance of extracellular misfolded proteins in systemic amyloidosis: Experience with transthyretin. *FEBS Lett.* **586**, 2891–2896 (2012).
228. Kastritis, E. & Dimopoulos, M. A. Recent advances in the management of AL Amyloidosis. *Br. J. Haematol.* **172**, 170–186 (2016).
229. Cascella, R. *et al.* The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells. *Nat. Commun.* **12**, 1814 (2021).
230. Savage, M. J. *et al.* A sensitive A β Oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J. Neurosci.* **34**, 2884–2897 (2014).
231. Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R. & De Felice, F. G. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **10**, S76–S83 (2014).
232. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842 (2008).
233. Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M. & Lang, A. E. α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **73**, 155–169 (2013).
234. Cremades, N. & Dobson, C. M. The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiol. Dis.* **109**, 178–190 (2018).
235. Arispe, N., Pollard, H. B. & Rojas, E. Beta-amyloid Ca²⁺-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer Disease. *Mol. Cell. Biochem.* **140**, 119–125 (1994).
236. Mirzabekov, T. A., Lin, M. & Kagan, B. L. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J. Biol. Chem.* **271**, 1988–1992 (1996).
237. Quist, A. *et al.* Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10427–10432 (2005).
238. Yoshiike, Y., Kaye, R., Milton, S. C., Takashima, A. & Glabe, C. G. Pore-Forming Proteins Share Structural and Functional Homology with Amyloid Oligomers. *NeuroMolecular Med.* **9**, 270–275 (2007).

239. Ahmed, M. *et al.* Structural conversion of neurotoxic amyloid- β (1–42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 561–567 (2010).
240. Kaye, R. & Lasagna-Reeves, C. A. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J. Alzheimers Dis.* **33**, S67–S78 (2012).
241. Brender, J. R., Salamekh, S. & Ramamoorthy, A. Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular prospective. *Acc. Chem. Res.* **45**, 454–462 (2012).
242. Stöckl, M. T., Zijlstra, N. & Subramaniam, V. α -Synuclein Oligomers: an Amyloid Pore?: Insights into Mechanisms of α -Synuclein Oligomer–Lipid Interactions. *Mol. Neurobiol.* **47**, 613–621 (2013).
243. Walsh, P. *et al.* The mechanism of membrane disruption by cytotoxic amyloid oligomers formed by prion protein(106–126) is dependent on bilayer composition. *J. Biol. Chem.* **289**, 10419–10430 (2014).
244. Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W. & Strittmatter, S. M. Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid- β Oligomers. *Nature* **457**, 1128–1132 (2009).
245. Li, S. *et al.* Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.* **31**, 6627–6638 (2011).
246. Morkuniene, R. *et al.* Small A β 1–42 oligomer-induced membrane depolarization of neuronal and microglial cells: Role of N-methyl-D-aspartate receptors: A β 1–42 Oligomers Depolarize Cells. *J. Neurosci. Res.* **93**, 475–486 (2015).
247. Arispe, N., Rojas, E. & Pollard, H. B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 567–571 (1993).
248. Stefani, M. & Dobson, C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **81**, 678–699 (2003).
249. Deas, E. *et al.* α -Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson’s Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 376–391 (2016).
250. Pedersen, J. T. *et al.* Amyloid- β and α -Synuclein Decrease the Level of Metal-Catalyzed Reactive Oxygen Species by Radical Scavenging and Redox Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3966–3969 (2016).

251. De Felice, F. G. *et al.* A β Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress through an N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Mechanism That Is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine. *J. Biol. Chem.* **282**, 11590–11601 (2007).
252. Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G. & Anandatheerthavarada, H. K. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* **283**, 9089–9100 (2008).
253. Nakamura, K. α -Synuclein and Mitochondria: Partners in Crime? *Neurotherapeutics* **10**, 391–399 (2013).
254. α -synuclein and Protein Degradation Systems: a Reciprocal Relationship | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-012-8341-2>.
255. α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models | Science. <https://science.sciencemag.org/content/313/5785/324.long>.
256. Ogen-Shtern, N., Ben David, T. & Lederkremer, G. Z. Protein aggregation and ER stress. *Brain Res.* **1648**, 658–666 (2016).
257. Morgan, D. *et al.* A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 982–985 (2000).
258. Slow, E. J. *et al.* Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11402–11407 (2005).
259. Bowman, A. B., Yoo, S.-Y., Dantuma, N. P. & Zoghbi, H. Y. Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin–proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 679–691 (2005).
260. Chen, L. & Feany, M. B. α -Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* **8**, 657–663 (2005).
261. Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L. & Melki, R. Fibrillar α -Synuclein and Huntingtin Exon 1 Assemblies Are Toxic to the Cells. *Biophys. J.* **102**, 2894–2905 (2012).
262. Peelaerts, W. *et al.* α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* **522**, 340–344 (2015).
263. Prusiner, S. B. *et al.* Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5308–E5317 (2015).

264. Tipping, K. W. *et al.* pH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5691–5696 (2015).
265. Lindersson, E. *et al.* Proteasomal inhibition by α -synuclein filaments and oligomers. *J. Biol. Chem.* **279**, 12924–34 (2004).
266. Bousset, L. *et al.* Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **4**, 2575 (2013).
267. Flavin, W. P. *et al.* Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **134**, 629–653 (2017).
268. Wang, X. *et al.* Pathogenic alpha-synuclein aggregates preferentially bind to mitochondria and affect cellular respiration. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**, (2019).
269. Lesné, S. *et al.* A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352–357 (2006).
270. Koffie, R. M. *et al.* Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4012–4017 (2009).
271. Luk, K. C. *et al.* Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949–953 (2012).
272. Kfoury, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M. & Diamond, M. I. Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species *. *J. Biol. Chem.* **287**, 19440–19451 (2012).
273. Münch, C., O’Brien, J. & Bertolotti, A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3548–3553 (2011).
274. Melki, R. How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol. Dis.* **109**, 201–208 (2018).
275. Vendruscolo, M. Proteome folding and aggregation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 138–143 (2012).
276. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **385**, 117–171 (2015).
277. Mullan, M. *et al.* A pathogenic mutation for probable Alzheimer’s disease in the APP gene at the N–terminus of β -amyloid. *Nat. Genet.* **1**, 345–347 (1992).

278. Polymeropoulos, M. H. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045–2047 (1997).
279. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62 (1993).
280. Gusella, J. F. *et al.* A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234–238 (1983).
281. Hardy, J. & Higgins, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184–185 (1992).
282. Lees, A. J. Unresolved issues relating to the Shaking Palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Mov. Disord.* **22**, S327–S334 (2007).
283. Principles and Practice of Movement Disorders - 2nd Edition.
<https://www.elsevier.com/books/principles-and-practice-of-movement-disorders/9781437723694>.
284. Balestrino, R. & Schapira, A. H. V. Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* **27**, 27–42 (2020).
285. Dorsey, E. R. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* **68**, 384–386 (2007).
286. García-Ramos, R., López Valdés, E., Ballesteros, L., Jesús, S. & Mir, P. The social impact of Parkinson's disease in Spain: Report by the Spanish Foundation for the Brain. *Neurol. Engl. Ed.* **31**, 401–413 (2016).
287. Hoehn, M. M. & Yahr, M. D. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* **17**, 427–427 (1967).
288. Gillies, G. E., Pienaar, I. S., Vohra, S. & Qamhawi, Z. Sex differences in Parkinson's disease. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 370–384 (2014).
289. Breckenridge, C. B., Berry, C., Chang, E. T., Sielken, R. L. & Mandel, J. S. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **11**, e0151841 (2016).
290. Noyce, A. J. *et al.* Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **72**, 893–901 (2012).
291. Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 368–376 (2008).
292. Kim, T. D., Paik, S. R. & Yang, C.-H. Structural and functional implications of C-terminal regions of α -synuclein. *Biochemistry* **41**, 13782–13790 (2002).

293. Schulz-Schaeffer, W. J. The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **120**, 131–143 (2010).
294. Lewy, F. H. Handbuch de Neurologie (ed Lewandowsky M):920–933. (Springer, Berlin, 1912).
295. Holdorff, B. Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J. Hist. Neurosci.* **11**, 19–28 (2002).
296. Spillantini, M. G. *et al.* α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
297. Uryu, K. *et al.* Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous α -synuclein inclusions of α -synucleinopathies. *Am. J. Pathol.* **168**, 947–961 (2006).
298. Halliday, G. M., Del Tredici, K. & Braak, H. Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. in *Parkinson's Disease and Related Disorders* (eds. Riederer, P., Reichmann, H., Youdim, M. B. H. & Gerlach, M.) 99–103 (Springer, 2006). doi:10.1007/978-3-211-45295-0_16.
299. Shahmoradian, S. H. *et al.* Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* **22**, 1099–1109 (2019).
300. Dunnett, S. B. & Björklund, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* **399**, A32–A39 (1999).
301. Fedorow, H. *et al.* Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **75**, 109–124 (2005).
302. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
303. Uversky, V. α -Synuclein Misfolding and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 507–540 (2008).
304. Breydo, L., Wu, J. W. & Uversky, V. N. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 261–285 (2012).
305. Singleton, A. B. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* **302**, 841–841 (2003).
306. Maraganore, D. M. *et al.* High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 685–693 (2005).
307. Satake, W. *et al.* Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1303–1307 (2009).

308. Soldner, F. *et al.* Parkinson-associated risk variant in enhancer element produces subtle effect on target gene expression. *Nature* **533**, 95–99 (2016).
309. Chen, X. *et al.* The human NACP/ α -synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3–q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics* **26**, 425–427 (1995).
310. Iwai, A. *et al.* The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* **14**, 467–475 (1995).
311. Bonini, N. M. & Giasson, B. I. Snaring the Function of α -Synuclein. *Cell* **123**, 359–361 (2005).
312. Maroteaux, L., Campanelli, J. & Scheller, R. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* **8**, 2804–2815 (1988).
313. Irizarry, M. C. *et al.* Characterization of the Precursor Protein of the Non-A β Component of Senile Plaques (NACP) in the Human Central Nervous System: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 889–895 (1996).
314. Lavedan, C. The Synuclein Family. *Genome Res.* **8**, 871–880 (1998).
315. Kim, S. *et al.* Transneuronal propagation of pathologic α -synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease. *Neuron* **103**, 627–641.e7 (2019).
316. Shibayama-Imazu, T. *et al.* Cell and tissue distribution and developmental change of neuron specific 14 kDa protein (phosphoneuroprotein 14). *Brain Res.* **622**, 17–25 (1993).
317. Jakes, R., Spillantini, M. G. & Goedert, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* **345**, 27–32 (1994).
318. Clayton, D. F. & George, J. M. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* **58**, 120–129 (1999).
319. Deleersnijder, A., Gerard, M., Debyser, Z. & Baekelandt, V. The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends Mol. Med.* **19**, 368–377 (2013).
320. Bellani, S. *et al.* The regulation of synaptic function by α -synuclein. *Commun. Integr. Biol.* **3**, 106–109 (2010).
321. Perlmutter, J. D., Braun, A. R. & Sachs, J. N. Curvature dynamics of α -synuclein familial Parkinson disease mutants. *J. Biol. Chem.* **284**, 7177–7189 (2009).

322. Davies, P., Moualla, D. & Brown, D. R. α -Synuclein Is a Cellular Ferrireductase. *PLoS ONE* **6**, (2011).
323. Sharon, R. *et al.* α -Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9110–9115 (2001).
324. Liu, G. *et al.* α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* **454**, 187–192 (2009).
325. Burré, J. The Synaptic Function of α -Synuclein. *J. Park. Dis.* **5**, 699–713 (2015).
326. Clayton, D. F. & George, J. M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* **21**, 249–254 (1998).
327. Abeliovich, A. *et al.* Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron* **25**, 239–252 (2000).
328. Greten-Harrison, B. *et al.* $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19573–19578 (2010).
329. Burré, J. *et al.* α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro. *Science* **329**, 1663–1667 (2010).
330. Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F. & George, J. M. Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **273**, 9443–9449 (1998).
331. Munishkina, L. A., Phelan, C., Uversky, V. N. & Fink, A. L. Conformational Behavior and Aggregation of α -Synuclein in Organic Solvents: Modeling the Effects of Membranes [†]. *Biochemistry* **42**, 2720–2730 (2003).
332. Wang, C., Shah, N., Thakur, G., Zhou, F. & Leblanc, R. M. α -Synuclein in α -helical conformation at air–water interface: implication of conformation and orientation changes during its accumulation/aggregation. *Chem. Commun.* **46**, 6702 (2010).
333. Segrest, J. *et al.* The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* **33**, 141–166 (1992).
334. Segrest, J. P., Jackson, R. L., Morrisett, J. D. & Gotto, A. M. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* **38**, 247–253 (1974).
335. Necula, M., Chirita, C. N. & Kuret, J. Rapid anionic micelle-mediated α -synuclein fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.* **278**, 46674–46680 (2003).

336. Varkey, J. *et al.* Membrane Curvature Induction and Tubulation Are Common Features of Synucleins and Apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 32486–32493 (2010).
337. Middleton, E. R. & Rhoades, E. Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys. J.* **99**, 2279–2288 (2010).
338. Westphal, C. H. & Chandra, S. S. Monomeric synucleins generate membrane curvature. *J. Biol. Chem.* **288**, 1829–1840 (2013).
339. Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R. & Browne, G. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states 1 Edited by P. E. Wright. *J. Mol. Biol.* **307**, 1061–1073 (2001).
340. Georgieva, E. R., Ramlall, T. F., Borbat, P. P., Freed, J. H. & Eliezer, D. Membrane-bound α -synuclein forms an extended helix: Long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12856–12857 (2008).
341. Bartels, T. *et al.* The N-Terminus of the Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein Triggers Membrane Binding and Helix Folding. *Biophys. J.* **99**, 2116–2124 (2010).
342. Venda, L. L., Cragg, S. J., Buchman, V. L. & Wade-Martins, R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **33**, 559–568 (2010).
343. Appel-Cresswell, S. *et al.* Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease: α -Synuclein p.H50q, A Novel Mutation For Pd. *Mov. Disord.* **28**, 811–813 (2013).
344. Kiely, A. *et al.* Synucleinopathy with a G51D α -synuclein mutation: a neuropathological and genetic study. in 39–40 (2013).
345. Arnesen, T. *et al.* Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8157–8162 (2009).
346. Viennet, T. *et al.* Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α -Synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. *Commun. Biol.* **1**, 44 (2018).
347. Braun, A. R., Lacy, M. M., Ducas, V. C., Rhoades, E. & Sachs, J. N. α -Synuclein's uniquely long amphipathic helix enhances its membrane binding and remodeling capacity. *J. Membr. Biol.* **250**, 183–193 (2017).
348. Serpell, L. C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M. & Crowther, R. A. Fiber diffraction of synthetic α -synuclein filaments shows amyloid-like cross- β conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4897–4902 (2000).

349. Giasson, B. I., Murray, I. V. J., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 2380–2386 (2001).
350. Bodles, A. M., Guthrie, D. J. S., Greer, B. & Irvine, G. B. Identification of the region of non-A β component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity: Bioactive region of NAC. *J. Neurochem.* **78**, 384–395 (2001).
351. Miake, H., Mizusawa, H., Iwatsubo, T. & Hasegawa, M. Biochemical characterization of the core structure of α -synuclein filaments. *J. Biol. Chem.* **277**, 19213–19219 (2002).
352. Del Mar, C., Greenbaum, E. A., Mayne, L., Englander, S. W. & Woods, V. L. Structure and properties of α -synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15477–15482 (2005).
353. Heise, H. *et al.* Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length α -synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15871–15876 (2005).
354. Hai-Ning Du, ‡ *et al.* A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human α -synuclein. *Biochemistry* **42**, 8870–8878 (2003).
355. Waxman, E. A., Mazzulli, J. R. & Giasson, B. I. Characterization of Hydrophobic Residue Requirements for α -Synuclein Fibrillization. *Biochemistry* **48**, 9427–9436 (2009).
356. Koo, H.-J., Lee, H.-J. & Im, H. Sequence determinants regulating fibrillation of human α -synuclein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 772–778 (2008).
357. Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A. & Lansbury, Jr, P. T. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709–13715 (1996).
358. Uversky, V. N., Li, J. & Fink, A. L. Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 10737–10744 (2001).
359. Meuvlis, J., Gerard, M., Desender, L., Baekelandt, V. & Engelborghs, Y. The Conformation and the Aggregation Kinetics of α -Synuclein Depend on the Proline Residues in Its C-Terminal Region. *Biochemistry* **49**, 9345–9352 (2010).
360. Fusco, G. *et al.* Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
361. Park, S. M. *et al.* Stress-Induced Aggregation Profiles of GST- α -Synuclein Fusion Proteins: Role of the C-Terminal Acidic Tail of α -Synuclein in Protein Thermosolubility and Stability †. *Biochemistry* **41**, 4137–4146 (2002).

362. Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V. & Jovin, T. M. Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109–140 on α -synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry* **43**, 16233–16242 (2004).
363. Baba, M. *et al.* Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* **152**, 879–884 (1998).
364. Vilar, M. *et al.* The fold of α -synuclein fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 8637–8642 (2008).
365. Biere, A. L. *et al.* Parkinson's disease-associated α -synuclein is more fibrillogenic than β - and γ -synuclein and cannot cross-seed its homologs. *J. Biol. Chem.* **275**, 34574–34579 (2000).
366. Dedmon, M. M., Patel, C. N., Young, G. B. & Pielak, G. J. FlgM gains structure in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12681–12684 (2002).
367. Uversky, V. N. *et al.* Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate. *J. Biol. Chem.* **277**, 11970–11978 (2002).
368. Yamin, G. *et al.* Forcing nonamyloidogenic β -synuclein to fibrillate. *Biochemistry* **44**, 9096–9107 (2005).
369. Zibae, S. *et al.* Human β -synuclein rendered fibrillogenic by designed mutations. *J. Biol. Chem.* **285**, 38555–38567 (2010).
370. Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* **20**, 3214–3220 (2000).
371. Mori, F., Tanji, K., Yoshimoto, M., Takahashi, H. & Wakabayashi, K. Demonstration of α -Synuclein Immunoreactivity in Neuronal and Glial Cytoplasm in Normal Human Brain Tissue Using Proteinase K and Formic Acid Pretreatment. *Exp. Neurol.* **176**, 98–104 (2002).
372. Kelly, J. W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 101–106 (1998).
373. Choi, T. S., Han, J. Y., Heo, C. E., Lee, S. W. & Kim, H. I. Electrostatic and hydrophobic interactions of lipid-associated α -synuclein: The role of a water-limited interfaces in amyloid fibrillation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1860**, 1854–1862 (2018).
374. Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B. & Nussbaum, R. L. Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* **280**, 9595–9603 (2005).

375. Robotta, M. *et al.* Direct evidence of coexisting horseshoe and extended helix conformations of membrane-bound alpha-synuclein. *ChemPhysChem* **12**, 267–269 (2011).
376. Bank, R. P. D. RCSB PDB - 1XQ8: Human micelle-bound alpha-synuclein. <https://www.rcsb.org/structure/1XQ8>.
377. Bertocini, C. W. *et al.* Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1430–1435 (2005).
378. Hong, D.-P., Xiong, W., Chang, J.-Y. & Jiang, C. The role of the C-terminus of human α -synuclein: Intra-disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers. *FEBS Lett.* **585**, 561–566 (2011).
379. Dedmon, M. M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. Mapping long-range interactions in α -synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 476–477 (2005).
380. Lee, H.-J. & Lee, S.-J. Characterization of Cytoplasmic α -Synuclein Aggregates. *J. Biol. Chem.* **277**, 48976–48983 (2002).
381. Zibae, S. *et al.* Sequence Determinants for Amyloid Fibrillogenesis of Human α -Synuclein. *J. Mol. Biol.* **374**, 454–464 (2007).
382. Fernández, C. O. *et al.* NMR of α -synuclein–polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation. *EMBO J.* **23**, 2039–2046 (2004).
383. Hutton, M. Missense and splice site mutations in tau associated with FTDP-17: Multiple pathogenic mechanisms. *Neurology* **56**, S21–S25 (2001).
384. Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W. & Martin, D. W. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1381–1388 (1989).
385. Owen, F. *et al.* A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Mol. Brain Res.* **13**, 155–157 (1992).
386. Poulter, M. *et al.* Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies. *Brain* **115**, 675–685 (1992).
387. Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. & Harris, D. A. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an Insertional mutation. *Neuron* **21**, 1339–1351 (1998).

388. George, J. M., Jin, H., Woods, W. S. & Clayton, D. F. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* **15**, 361–372 (1995).
389. Snead, D. & Eliezer, D. α -Synuclein Function and Dysfunction on Cellular Membranes. *Exp. Neurobiol.* **23**, 292–313 (2014).
390. Trexler, A. J. & Rhoades, E. α -Synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. *Biochemistry* **48**, 2304–2306 (2009).
391. Takamori, S. *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831–846 (2006).
392. Bodner, C. R., Dobson, C. M. & Bax, A. Multiple tight phospholipid-binding modes of α -synuclein revealed by solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **390**, 775–790 (2009).
393. Galvagnion, C. The role of lipids interacting with α -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* **7**, 433–450 (2017).
394. Jo, E., McLaurin, J., Yip, C. M., St. George-Hyslop, P. & Fraser, P. E. α -Synuclein Membrane Interactions and Lipid Specificity. *J. Biol. Chem.* **275**, 34328–34334 (2000).
395. McLean, P. J., Kawamata, H., Ribich, S. & Hyman, B. T. Membrane association and protein conformation of α -synuclein in intact neurons. *J. Biol. Chem.* **275**, 8812–8816 (2000).
396. Rhoades, E., Ramlall, T. F., Webb, W. W. & Eliezer, D. Quantification of α -synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **90**, 4692–4700 (2006).
397. Pfefferkorn, C. M., Jiang, Z. & Lee, J. C. Biophysics of α -Synuclein Membrane Interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 162–171 (2012).
398. Schweighauser, M. *et al.* Structures of α -Synuclein Filaments from Multiple System Atrophy. *Nature* **585**, 464–469 (2020).
399. Munishkina, L. A., Henriques, J., Uversky, V. N. & Fink, A. L. Role of Protein–Water Interactions and Electrostatics in α -Synuclein Fibril Formation [†]. *Biochemistry* **43**, 3289–3300 (2004).
400. Li, B. *et al.* Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat. Commun.* **9**, 3609 (2018).
401. Guerrero-Ferreira, R. *et al.* Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cryo-electron microscopy. *eLife* **8**, e48907 (2019).

402. Boyer, D. R. *et al.* The α -synuclein hereditary mutation E46K unlocks a more stable, pathogenic fibril structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 3592–3602 (2020).
403. Zhao, K. *et al.* Parkinson's disease associated mutation E46K of α -synuclein triggers the formation of a distinct fibril structure. *Nat. Commun.* **11**, 2643 (2020).
404. Guerrero-Ferreira, R. *et al.* Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *eLife* **7**, e36402 (2018).
405. Strohäker, T. *et al.* Structural heterogeneity of α -synuclein fibrils amplified from patient brain extracts. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
406. Fenyi, A. Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification. *Neurobiol. Dis.* **6** (2019).
407. van Rumund, A. *et al.* α -Synuclein real-time quaking-induced conversion in the cerebrospinal fluid of uncertain cases of parkinsonism. *Ann. Neurol.* **85**, 777–781 (2019).
408. Van der Perren, A. *et al.* The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **139**, 977–1000 (2020).
409. Shahnawaz, M. *et al.* Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature* **578**, 273–277 (2020).
410. Lövestam, S. *et al.* Seeded assembly in vitro does not replicate the structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy. *FEBS Open Bio* **11**, 999–1013 (2021).
411. Gallea, J. I. & Celej, M. S. Structural Insights into Amyloid Oligomers of the Parkinson Disease-related Protein α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* **289**, 26733–26742 (2014).
412. Sternke-Hoffmann, R., Peduzzo, A., Bolakhrif, N., Haas, R. & Buell, A. K. The Aggregation Conditions Define Whether EGCG is an Inhibitor or Enhancer of α -Synuclein Amyloid Fibril Formation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1995 (2020).
413. Lorenzen, N. *et al.* How Epigallocatechin Gallate Can Inhibit α -Synuclein Oligomer Toxicity in Vitro. *J. Biol. Chem.* **289**, 21299–21310 (2014).
414. Zijlstra, N., Blum, C., Segers-Nolten, I. M. J., Claessens, M. M. A. E. & Subramaniam, V. Molecular composition of sub-stoichiometrically labeled α -synuclein oligomers determined by single-molecule photobleaching. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 8821–8824 (2012).

415. Giehm, L., Svergun, D. I., Otzen, D. E. & Vestergaard, B. Low-resolution structure of a vesicle disrupting α -synuclein oligomer that accumulates during fibrillation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3246–3251 (2011).
416. Pronchik, J., He, X., Giurleo, J. T. & Talaga, D. S. In vitro formation of amyloid from α -synuclein is dominated by reactions at hydrophobic interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9797–9803 (2010).
417. Librizzi, F. & Rischel, C. The kinetic behavior of insulin fibrillation is determined by heterogeneous nucleation pathways. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **14**, 3129–3134 (2005).
418. Habchi, J. *et al.* Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes. *Nat. Chem.* **10**, 673–683 (2018).
419. Srivastava, A. K. *et al.* β -Amyloid aggregation and heterogeneous nucleation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **28**, 1567–1581 (2019).
420. Grigolato, F., Colombo, C., Ferrari, R., Rezabkova, L. & Arosio, P. Mechanistic origin of the combined effect of surfaces and mechanical agitation on amyloid formation. *ACS Nano* **11**, 11358–11367 (2017).
421. Gaspar, R., Pallbo, J., Weininger, U., Linse, S. & Sparr, E. Ganglioside lipids accelerate α -synuclein amyloid formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1866**, 1062–1072 (2018).
422. Galvagnion, C. *et al.* Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 229–234 (2015).
423. Galvagnion, C. *et al.* Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7065–7070 (2016).
424. K., T. Amyloid β Conformation in Aqueous Environment. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 540–547 (2008).
425. Jahan, I. & Nayeem, S. M. Effect of osmolytes on conformational behavior of intrinsically disordered protein α -Synuclein. *Biophys. J.* **117**, 1922–1934 (2019).
426. Ferreira, L. A., Uversky, V. N. & Zaslavsky, B. Y. Role of solvent properties of water in crowding effects induced by macromolecular agents and osmolytes. *Mol. Biosyst.* **13**, 2551–2563 (2017).
427. Fragniere, A. M. C. *et al.* Hyperosmotic stress induces cell-dependent aggregation of α -synuclein. *Sci. Rep.* **9**, 2288 (2019).

428. Ahmad, B., Chen, Y. & Lapidus, L. J. Aggregation of α -synuclein is kinetically controlled by intramolecular diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2336–2341 (2012).
429. Gallardo, J., Escalona-Noguero, C. & Sot, B. Role of α -Synuclein Regions in Nucleation and Elongation of Amyloid Fiber Assembly. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 872–879 (2020).
430. Hoyer, W. *et al.* Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* **322**, 383–393 (2002).
431. van der Wateren, I. M., Knowles, T. P. J., Buell, A. K., Dobson, C. M. & Galvagnion, C. C-terminal truncation of α -synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological pH. *Chem. Sci.* **9**, 5506–5516 (2018).
432. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326 (1989).
433. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
434. Cardamone, M. & Puri, N. K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* **282**, 589–593 (1992).
435. Wall, J., Murphy, C. L. & Solomon, A. In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Methods Enzymol.* **309**, 204–217 (1999).
436. Nielsen, L. *et al.* Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism [†]. *Biochemistry* **40**, 6036–6046 (2001).
437. Santos, N. C. & Castanho, M. A. Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophys. J.* **71**, 1641–1650 (1996).
438. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **8**, 409–427 (2016).
439. Johnson, W. C. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **7**, 205–214 (1990).
440. Compton, L. A. & Johnson, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* **155**, 155–167 (1986).
441. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J. & Goñi, F. M. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23–56 (1993).

442. Morris, K. L. & Serpell, L. C. X-Ray Fibre Diffraction Studies of Amyloid Fibrils. in *Amyloid Proteins* (eds. Sigurdsson, E. M., Calero, M. & Gasset, M.) vol. 849 121–135 (Humana Press, 2012).
443. Adamcik, J. & Mezzenga, R. Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **17**, 369–376 (2012).
444. Davies, J. T. *Interfacial phenomena - 2nd Ed.* (Elsevier, 1963).
445. Casper, J. M. Physical chemistry of surfaces (3rd Ed.), Arthur W. Adamson, Wiley-Interscience, New York, 1976, 698 pp. \$24.95. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **15**, 632–633 (1977).
446. Fiske, C. H. & Subbarow, Y. J. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375–400 (1925).
447. Monterroso, B., Zorrilla, S., Sobrinos-Sanguino, M., Keating, C. D. & Rivas, G. Microenvironments created by liquid-liquid phase transition control the dynamic distribution of bacterial division FtsZ protein. *Sci. Rep.* **6**, 35140 (2016).
448. Christiansen, A., Wang, Q., Samiotakis, A., Cheung, M. S. & Wittung-Stafshede, P. Factors Defining Effects of Macromolecular Crowding on Protein Stability: An in Vitro/in Silico Case Study Using Cytochrome *c*. *Biochemistry* **49**, 6519–6530 (2010).
449. Cohen, S. I. A., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. & Knowles, T. P. J. From Macroscopic Measurements to Microscopic Mechanisms of Protein Aggregation. *J. Mol. Biol.* **421**, 160–171 (2012).
450. Conway, K. A., Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* **4**, 1318–1320 (1998).
451. Giehm, L., Oliveira, C. L. P., Christiansen, G., Pedersen, J. S. & Otzen, D. E. SDS-induced fibrillation of α -synuclein: An alternative Fibrillation pathway. *J. Mol. Biol.* **401**, 115–133 (2010).
452. Gaspar, R. *et al.* Secondary nucleation of monomers on fibril surface dominates α -synuclein aggregation and provides autocatalytic amyloid amplification. *Q. Rev. Biophys.* **50**, e6 (2017).
453. Delenclos, M. *et al.* Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *J. Neurochem.* **150**, 566–576 (2019).
454. Li, Y. *et al.* Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res.* **28**, 897–903 (2018).

455. Corbett, G. T. *et al.* PrP is a central player in toxicity mediated by soluble aggregates of neurodegeneration-causing proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **139**, 503–526 (2020).
456. Giehm, L. & Otzen, D. E. Strategies to increase the reproducibility of protein fibrillization in plate reader assays. *Anal. Biochem.* **400**, 270–281 (2010).
457. Giehm, L., Lorenzen, N. & Otzen, D. E. Assays for α -synuclein aggregation. *Methods* **53**, 295–305 (2011).
458. Janowska, M. K., Wu, K.-P. & Baum, J. Unveiling transient protein-protein interactions that modulate inhibition of alpha-synuclein aggregation by beta-synuclein, a pre-synaptic protein that co-localizes with alpha-synuclein. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
459. Pujols, J. *et al.* High-throughput screening methodology to identify alpha-synuclein aggregation inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
460. Zandomenighi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G. & Fändrich, M. FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **13**, 3314–3321 (2004).
461. Natalello, A. & Doglia, S. M. Insoluble protein assemblies characterized by fourier transform infrared spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* **1258**, 347–369 (2015).
462. Gao, M. *et al.* Crowders and Cosolvents-Major Contributors to the Cellular Milieu and Efficient Means to Counteract Environmental Stresses. *ChemPhysChem* **18**, 2951–2972 (2017).
463. Nayar, D. & van der Vegt, N. F. A. Cosolvent effects on polymer hydration drive hydrophobic collapse. *J. Phys. Chem. B* **122**, 3587–3595 (2018).
464. Anderson, V. L. & Webb, W. W. A Desolvation Model for Trifluoroethanol-Induced Aggregation of Enhanced Green Fluorescent Protein. *Biophys. J.* **102**, 897–906 (2012).
465. Collins, K. D. & Washabaugh, M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.* **18**, 323–422 (1985).
466. Baldwin, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.* **71**, 2056–2063 (1996).
467. Dzwolak, W., Ravindra, R., Nicolini, C., Jansen, R. & Winter, R. The Diastereomeric Assembly of Polylysine Is the Low-Volume Pathway for Preferential Formation of β -Sheet Aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3762–3768 (2004).
468. Thirunavukkuarasu, S., Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. Multiparametric Fluorescence Detection of Early Stages in the Amyloid Protein Aggregation of Pyrene-labeled α -Synuclein. *J. Mol. Biol.* **378**, 1064–1073 (2008).

469. van Diggelen, F. *et al.* Two conformationally distinct α -synuclein oligomers share common epitopes and the ability to impair long-term potentiation. *PLoS ONE* **14**, (2019).
470. Soreghan, B., Kosmoski, J. & Glabe, C. Surfactant properties of Alzheimer's alpha beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *J. Biol. Chem.* **269**, 28551–28554 (1994).
471. West, M. W. *et al.* De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11211–11216 (1999).
472. Schladitz, C., Vieira, E. P., Hermel, H. & Möhwald, H. Amyloid- β -sheet formation at the air-water interface. *Biophys. J.* **77**, 3305–3310 (1999).
473. Lopes, D. H. J. *et al.* Mechanism of islet amyloid polypeptide fibrillation at lipid interfaces studied by Infrared Reflection absorption spectroscopy. *Biophys. J.* **93**, 3132–3141 (2007).
474. Hoernke, M., Falenski, J. A., Schwieger, C., Kokschi, B. & Brezesinski, G. Triggers for β -Sheet Formation at the Hydrophobic–Hydrophilic Interface: High Concentration, In-Plane Orientational Order, and Metal Ion Complexation. *Langmuir* **27**, 14218–14231 (2011).
475. Morris, V. K. *et al.* Recruitment of Class I Hydrophobins to the Air:Water Interface Initiates a Multi-step Process of Functional Amyloid Formation. *J. Biol. Chem.* **286**, 15955–15963 (2011).
476. Konrat, R. NMR contributions to structural dynamics studies of intrinsically disordered proteins. *J. Magn. Reson.* **241**, 74–85 (2014).
477. Schwarzinger, S. *et al.* Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2970–2978 (2001).
478. Kragelj, J., Ozenne, V., Blackledge, M. & Jensen, M. R. Conformational propensities of intrinsically disordered proteins from NMR chemical shifts. *ChemPhysChem* **14**, 3034–3045 (2013).
479. Kjaergaard, M. & Poulsen, F. M. Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J. Biomol. NMR* **50**, 157–165 (2011).
480. Poulsen IDP/IUP random coil chemical shifts.
https://spin.niddk.nih.gov/bax/nmrserver/Poulsen_rc_CS/.
481. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B. & Drin, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics* **24**, 2101–2102 (2008).

482. Jao, C. C., Hegde, B. G., Chen, J., Haworth, I. S. & Langen, R. Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 19666–19671 (2008).
483. Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8247–8251 (1989).
484. Dalbøge, H., Bayne, S. & Pedersen, J. In vivo processing of N-terminal methionine in *E. coli*. *FEBS Lett.* **266**, 1–3 (1990).
485. Fusco, G. *et al.* Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **5**, 3827 (2014).
486. Mukherjee, S., Chowdhury, P. & Gai, F. Effect of Dehydration on the Aggregation Kinetics of Two Amyloid Peptides. *J. Phys. Chem. B* **113**, 531–535 (2009).
487. Anderson, V. L., Ramlall, T. F., Rospigliosi, C. C., Webb, W. W. & Eliezer, D. Identification of a helical intermediate in trifluoroethanol-induced α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18850–18855 (2010).
488. Balupuri, A., Choi, K.-E. & Kang, N. S. Computational insights into the role of α -strand/sheet in aggregation of α -synuclein. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
489. Barnes, R. *et al.* Spatially Heterogeneous Surface Water Diffusivity around Structured Protein Surfaces at Equilibrium. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 17890–17901 (2017).
490. Arya, S. *et al.* Femtosecond hydration map of intrinsically disordered α -synuclein. *Biophys. J.* **114**, 2540–2551 (2018).
491. Lefèvre, T. & Subirade, M. Formation of intermolecular β -sheet structures: a phenomenon relevant to protein film structure at oil–water interfaces of emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **263**, 59–67 (2003).
492. Barth, A. & Zscherp, C. What vibrations tell about proteins. *Q. Rev. Biophys.* **35**, 369–430 (2002).
493. Kobayashi, K., Granja, J. R. & Ghadiri, M. R. β -Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel β -Sheets. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 95–98 (1995).
494. Chou, K.-C., Pottle, M., Némethy, G., Ueda, yuzo & Scheraga, H. A. Structure of β -sheets. Origin of the right-handed twist and of the increased stability of antiparallel over parallel sheets. *J. Mol. Biol.* **162**, 89–112 (1982).

495. Castillo, E. J., Koenig, J. L., Anderson, J. M. & Lo, J. Protein adsorption on hydrogels. II. Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces. *Biomaterials* **6**, 338–345 (1985).
496. Castillo, E. J., Koenig, J. L., Anderson, J. M. & Jentoft, N. Protein adsorption on soft contact lenses : III. Mucin. *Biomaterials* **7**, 9–16 (1986).
497. Castillo, E. J., Koenig, J. L. & Anderson, J. M. Characterization of protein adsorption on soft contact lenses. IV. Comparison of in vivo spoilage with the in vitro adsorption of tear proteins. *Biomaterials* **7**, 89–96 (1986).
498. Klimov, D. K. & Thirumalai, D. Dissecting the assembly of A β 16–22 amyloid peptides into antiparallel β sheets. *Structure* **11**, 295–307 (2003).
499. Qu, L., Fudo, S., Matsuzaki, K. & Hoshino, T. Computational study on the assembly of amyloid β -peptides in the hydrophobic environment. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **67**, 959–965 (2019).
500. Ma, B. & Nussinov, R. Stabilities and conformations of Alzheimer's β -amyloid peptide oligomers (A β 16–22, A β 16–35, and A β 10–35): Sequence effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14126–14131 (2002).
501. López de la Paz, M., de Mori, G. M. S., Serrano, L. & Colombo, G. Sequence Dependence of Amyloid Fibril Formation: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Biol.* **349**, 583–596 (2005).
502. Lee, C. & Ham, S. Characterizing amyloid-beta protein misfolding from molecular dynamics simulations with explicit water. *J. Comput. Chem.* **32**, 349–355 (2011).
503. Chebaro, Y., Mousseau, N. & Derreumaux, P. Structures and Thermodynamics of Alzheimer's Amyloid- β A β (16–35) Monomer and Dimer by Replica Exchange Molecular Dynamics Simulations: Implication for Full-Length A β Fibrillation. *J. Phys. Chem. B* **113**, 7668–7675 (2009).
504. Zhang, T. *et al.* Molecular dynamics study to investigate the dimeric structure of the full-length α -synuclein in aqueous solution. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, 2281–2293 (2017).
505. Dong, A., Prestrelski, S. J., Dean Allison, S. & Carpenter, J. F. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *J. Pharm. Sci.* **84**, 415–424 (1995).
506. Clark, A. H. & Tuffnell, C. D. Small-angle x-ray scattering studies of thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.* **16**, 339–351 (2009).
507. Surewicz, W. K., Szabo, Art. G. & Mantsch, H. H. Conformational properties of azurin in solution as determined from resolution-enhanced Fourier-transform infrared spectra. *Eur. J. Biochem.* **167**, 519–523 (1987).

508. Casal, H. L., Köhler, U. & Mantsch, H. H. Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **957**, 11–20 (1988).
509. Surewicz, W. K., Leddy, J. J. & Mantsch, H. H. Structure, stability, and receptor interaction of cholera toxin as studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 8106–8111 (1990).
510. Labruyere, E. *et al.* Structural and ligand-binding properties of a truncated form of Bacillus anthracis adenylate cyclase and of a catalytically inactive variant in which glutamine substitutes for lysine-346. *Biochemistry* **30**, 2619–2624 (1991).
511. Muga, A., Mantsch, H. H. & Surewicz, W. K. Membrane binding induces destabilization of cytochrome c structure. *Biochemistry* **30**, 7219–7224 (1991).
512. Ismail, A. A., Mantsch, H. H. & Wong, P. T. T. Aggregation of chymotrypsinogen: portrait by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1121**, 183–188 (1992).
513. Gorne-Tschelnokow, U., Naumann, D., Weise, C. & Hucho, F. Secondary structure and temperature behaviour of acetylcholinesterase. Studies by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1235–1242 (1993).
514. Seshadri, S., Oberg, K. A. & Fink, A. L. Thermally Denatured Ribonuclease A Retains Secondary Structure As Shown by FTIR. *Biochemistry* **33**, 1351–1355 (1994).
515. Prestrelski, S. J., Tedeschi, N., Arakawa, T. & Carpenter, J. F. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* **65**, 661–671 (1993).
516. Griebenow, K. & Klibanov, A. M. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10969–10976 (1995).
517. Carrasquillo, K. G., Sanchez, C. & Griebenow, K. Relationship between conformational stability and lyophilization-induced structural changes in chymotrypsin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 41 (2000).
518. Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J. & Arakawa, T. Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 456–464 (1993).
519. Ambadipudi, S., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E. & Zweckstetter, M. Liquid–liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
520. Zhang, X. *et al.* RNA stores tau reversibly in complex coacervates. *PLoS Biol.* **15**, e2002183 (2017).

521. Schmidt, H. B. & Rohatgi, R. In vivo formation of vacuolated multi-phase compartments lacking membranes. *Cell Rep.* **16**, 1228–1236 (2016).
522. Alberti, S. & Dormann, D. Liquid–liquid phase separation in disease. *Annu. Rev. Genet.* **53**, 171–194 (2019).
523. Nakamura, H., DeRose, R. & Inoue, T. Harnessing biomolecular condensates in living cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **166**, 13–27 (2019).
524. Vamvaca, K., Volles, M. J. & Lansbury, P. T. The first N-terminal amino acids of α -Synuclein are essential for α -helical structure formation In vitro and membrane binding in yeast. *J. Mol. Biol.* **389**, 413–424 (2009).
525. Kessler, J. C., Rochet, J.-C. & Lansbury, P. T. The N-Terminal Repeat Domain of α -Synuclein Inhibits β -Sheet and Amyloid Fibril Formation [†]. *Biochemistry* **42**, 672–678 (2003).
526. Crowther, R. A., Jakes, R., Spillantini, M. G. & Goedert, M. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. *FEBS Lett.* **436**, 309–312 (1998).
527. Wietek, J., Haralampiev, I., Amoussouvi, A., Herrmann, A. & Stöckl, M. Membrane bound α -synuclein is fully embedded in the lipid bilayer while segments with higher flexibility remain. *FEBS Lett.* **587**, 2572–2577 (2013).
528. Nuscher, B. *et al.* α -Synuclein Has a High Affinity for Packing Defects in a Bilayer Membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 21966–21975 (2004).
529. Antonny, B. Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 101–123 (2011).
530. Papayannopoulos, V. *et al.* A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP2 density. *Mol. Cell* **17**, 181–191 (2005).
531. Yeung, T. Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science* **313**, 347–351 (2006).

8. Anexos

Anexo I: The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates.



Cite this: DOI: 10.1039/d0sc05297c

All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates†

José D. Camino,^a Pablo Gracia,^{ib} ^a Serene W. Chen,^b Jesús Sot,^{ib} ^c Igor de la Arada,^{ib} ^c Víctor Sebastián,^{ib} ^{def} José L. R. Arrondo,^{cg} Félix M. Goñi,^{ib} ^{cg} Christopher M. Dobson[‡] ^b and Nunilo Cremades^{*a}

α -Synuclein amyloid self-assembly is the hallmark of a number of neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease, although there is still very limited understanding about the factors and mechanisms that trigger this process. Primary nucleation has been observed to be initiated *in vitro* at hydrophobic/hydrophilic interfaces by heterogeneous nucleation generating parallel β -sheet aggregates, although no such interfaces have yet been identified *in vivo*. In this work, we have discovered that α -synuclein can self-assemble into amyloid aggregates by homogeneous nucleation, without the need of an active surface, and with a preference for an antiparallel β -sheet arrangement. This particular structure has been previously proposed to be distinctive of stable toxic oligomers and we here demonstrate that it indeed represents the most stable structure of the preferred amyloid pathway triggered by homogeneous nucleation under limited hydration conditions, including those encountered inside α -synuclein droplets generated by liquid–liquid phase separation. In addition, our results highlight the key role that water plays not only in modulating the transition free energy of amyloid nucleation, and thus governing the initiation of the process, but also in dictating the type of preferred primary nucleation and the type of amyloid polymorph generated depending on the extent of protein hydration. These findings are particularly relevant in the context of *in vivo* α -synuclein aggregation where the protein can encounter a variety of hydration conditions in different cellular microenvironments, including the vicinity of lipid membranes or the interior of membraneless compartments, which could lead to the formation of remarkably different amyloid polymorphs by either heterogeneous or homogeneous nucleation.

Received 24th September 2020
Accepted 9th October 2020

DOI: 10.1039/d0sc05297c

rsc.li/chemical-science

^aBioComputation and Complex Systems Physics Institute (BIFI)-Joint Unit BIFI-IQFR (CSIC), University of Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain. E-mail: ncc@unizar.es

^bCentre for Misfolding Diseases, Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1EW, UK

^cBiofisika Institute (CSIC, UPV/EHU), University of the Basque Country, Campus Universitario, B. Sarriena, 48940 Leioa, Spain

^dInstituto de Nanociencia y Materiales de Aragon (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

^eDepartment of Chemical and Environmental Engineering, Aragon Health Research Institute (IIS Aragon), University of Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain

^fNetworking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, 28029 Madrid, Spain

^gDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, Campus Universitario, B. Sarriena, 48940 Leioa, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0sc05297c

‡ Deceased 8 September 2019. *In memoriam*.

Introduction

One of the key hallmarks of a variety of neurodegenerative disorders, collectively referred to as synucleinopathies, including Parkinson's disease, is the aberrant aggregation of α -synuclein (α S),¹ an intrinsically disordered protein highly abundant in neuronal synapses. α S aggregation can be reproduced *in vitro* and its kinetics are typically followed by means of thioflavin T (ThT) binding measurements, given the ability of this dye to bind specifically the cross- β structure of amyloid aggregates.² Using this type of assays, it has been established that amyloid aggregates are generally formed through nucleated self-assembly reactions, that follow typically a sigmoidal kinetics with a lag-phase (typically associated with a t_{lag}) that in part reflects the energetically unfavorable primary nucleation step,^{3,4} followed by a rapid-growth phase as a consequence of the more favorable processes of aggregate elongation, fragmentation, or secondary nucleation that take over once the early aggregates are formed, and a final stationary phase that reflects



the consumption of monomers in the reaction and the equilibrium between monomers and aggregates.⁴ While significant progress has been made towards understanding some of the microscopic processes that take place during amyloid self-assembly,⁴ the processes that occur during primary nucleation, and the factors and mechanisms by which the process is initiated remain largely unknown. However, a detailed understanding of this process and its complex conformational landscape is a prerequisite for elucidating some of the molecular basis of pathology in Parkinson's disease and related disorders, and for developing and evaluating effective disease-specific therapeutics to reduce or eliminate one of the underlying sources of toxicity in these diseases.

In vitro, α S amyloid aggregation has been typically triggered under strong stirring or shearing forces at physiological temperature, pH and ionic strength and *ca.* 50–100 μ M protein concentrations.^{5,6} Under these conditions, the air/water interface and/or the hydrophobic coatings of sample containers or stirring bars have been recently shown to play an essential role in triggering the initial self-assembly of α S through heterogeneous nucleation,^{6–8} as a consequence of the particular amphipathic and surface-active properties of the protein.⁷ Based on these findings, particular types of hydrophobic surfaces such as polytetrafluoroethylene (PTFE) beads, synthetic lipid vesicles or other surface-active materials^{9–12} have been recently used to accelerate primary nucleation of α S *in vitro*. Among all these experimental conditions, those involving lipid vesicles could represent the most physiologically relevant ones, although at the same time, at a neutral pH, synthetic vesicles composed of physiologically relevant lipids have been reported to be unable to trigger α S aggregation,¹² and only vesicles with very high contents of specific acidic lipids (typically small unilamellar vesicles, SUVs, containing 100% dimyristoylphosphatidylserine, DMPS), seem to be efficient in catalyzing α S aggregation.^{12,13}

Our understanding of the mechanisms that initiate α S aggregation inside the cells are even more elusive, although particular, yet undefined, cellular microenvironments appear to be required for the accumulation of α S amyloid aggregates inside cells, as the sole overexpression of the protein seems to be unable to trigger the *de novo* nucleation of α S amyloid formation, and additional cellular insults are typically required.¹⁴ Importantly, recent experimental evidences show that the α S amyloid structures that have been resolved at high resolution, in all cases generated *in vitro* by heterogeneous nucleation at the air/water interface,^{15–18} differ remarkably from the amyloid structures obtained from patient brain extracts,^{19,20} suggesting alternative *in vivo* amyloid pathways from those explored until now *in vitro*.

In this context, we set out to expand the conformational landscape of amyloid aggregation and to understand the role of interfacial effects on the primary nucleation of the protein under different conditions. We have discovered that α S self-assembles in the absence of an active hydrophobic/hydrophilic interface by homogeneous nucleation under conditions of limited protein hydration, and that, when the protein undergoes this process, there is a preference for an antiparallel β -sheet arrangement of the amyloid structure, in contrast to the typical parallel β -sheet

orientation acquired during heterogeneous primary nucleation. Interestingly, we have observed that the liquid-to-solid transition of α S droplets generated *in vitro* by liquid–liquid phase separation (LLPS) is likely triggered by this mechanism of homogeneous nucleation, in agreement with the particularly low water activity of such environments. Our findings, therefore, directly show the multiplicity of nucleation mechanisms and aggregate polymorphs within the α S amyloid aggregation landscape, and the role that water plays in selecting one type of mechanism and polymorph over others, suggesting that different cellular microenvironments with different protein hydration properties would lead to the formation of remarkably different amyloid polymorphs.

Results and discussion

Commonly used *in vitro* α S aggregation conditions require hydrophobic/hydrophilic interfaces

Under the most typical *in vitro* conditions used to trigger α S aggregation (PBS buffer, *ca.* 150 mM ionic strength, pH 7.4, 37 °C), we observed the formation of α S amyloid fibrils with the typical sigmoidal kinetic traces, although high protein concentrations and strong stirring were required (Fig. 1A). In order to compare aggregation kinetics and avoid possible effects of surface material of different sample containers¹¹ (see Fig. S1†), all the aggregation kinetics data shown in this study were performed in hydrophilic PEG-ylated plates,^{21,22} unless otherwise stated. Under these conditions, the aggregation kinetic curves obtained were highly variable (Fig. 1A), as previously reported,^{5,23,24} likely as a consequence of the stochastic and mutable nature of the air/water interface area of the sample at conditions of high-speed stirring. Indeed, we have observed that the nature and curvature of the air/water interface is

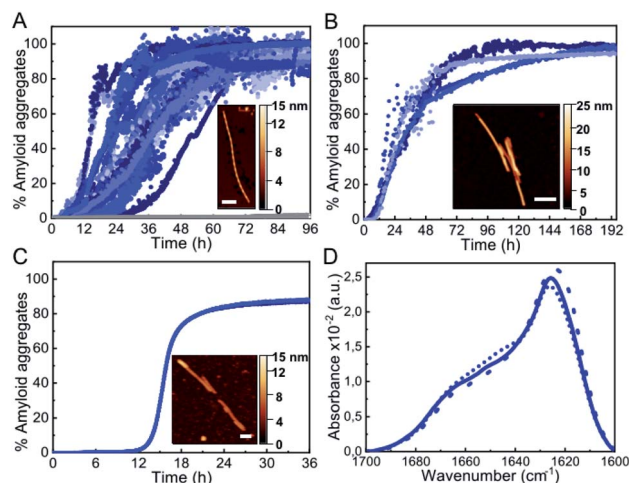


Fig. 1 Characterization of α S aggregation at typical hydrophobic/hydrophilic interfaces. (A) Aggregation kinetics of 500 μ M α S under shaking conditions (700 rpm). (B) Aggregation kinetics of 100 μ M α S in quiescent conditions in the presence of a PTFE bead or (C) DMPS SUVs. The inset shows a representative AFM image of each type of aggregate. Scale bar: 200 nm. (D) IR spectra of the aggregates formed with shaking (solid line), or in the presence of a PTFE bead (dashed line) or SUVs (dotted line).



determinant for the induction of α S aggregation under these conditions, in agreement with previous reports,⁶ since the presence of air bubbles rather than a flat air/water interface particularly accelerates nucleation even in quiescent conditions (Fig. S2†). The amyloid aggregates formed in this way are long, unbranched twisted fibrils of 10 ± 1 nm in height, 620 ± 400 nm in length ($n = 50$) and a twisting periodic pitch of 66 ± 3 nm ($n = 25$) according to atomic force microscopy (AFM) analysis. In order to analyze the effect of the air/water interface under this and other experimental conditions, we used hydrophilic poly(methyl methacrylate) (PMMA) caps that adequately fit into the wells and remove the air headspace, thus preventing the formation of the air/water interface.⁸ When the caps were used, no aggregation was observed (grey line in Fig. 1A), and when the caps were eventually removed then aggregation was observed as expected (Fig. S2†). Under quiescent conditions (without stirring), however, α S was not observed to aggregate for more than 250 h/10 days (even at 500 μ M, Fig. S2A†), in agreement with previous studies that have reported that, under similar conditions, α S was unable to aggregate even after several months of incubation.²⁴

An alternative approach used to enhance *in vitro* α S aggregation involves the addition of PTFE beads, although this approach has been generally combined with agitation systems.^{25,26} Here, we have analyzed the effect of adding a hydrophobic PTFE bead of a similar surface area to that of the air/water interface in our experiments (*ca.* 32 and 38 mm², respectively) to the protein solution at quiescent conditions (100 μ M α S in PBS buffer pH 7.4, 37 °C) and observed that nucleation at the surface of the PTFE bead was much faster than at the air/water interface (Fig. 1B), likely due to the stronger hydrophobic nature of PTFE as compared to air.²⁷ The amyloid fibrils formed under these conditions are typically 8.8 ± 0.8 nm in height and 360 ± 90 nm in length ($n = 15$), with no apparent twisted morphology according to AFM analysis. Synthetic lipid vesicles have also been used to trigger α S aggregation, although only SUVs composed of an artificially high content of saturated phosphatidylserine lipids (typically 100% DMPS) have been observed to trigger α S aggregation *in vitro* at nearly neutral pH.^{12,13} We were able to reproduce the aggregation kinetics of α S under the above conditions (Fig. 1C). The fibrillar species so generated are typically 6.3 ± 0.6 nm in height and 800 ± 400 nm in length ($n = 15$) and lack the twisted morphology that was observed for the fibrils generated at the air/water interface under stirring. Despite the apparent differences in morphology, the amyloid fibrils generated at the three different types of hydrophobic/hydrophilic interfaces most typically used *in vitro* to trigger α S aggregation show remarkably similar infrared (IR) spectra (Fig. 1D) with the typical absorption band at *ca.* 1625–1615 cm⁻¹ associated with intermolecular β -sheet amyloid aggregates.^{28,29}

Addition of low-to-mild alcohol concentrations accelerates α S amyloid nucleation

Biophysical characterization of protein folding and aggregation exploits often co-solvents to trigger changes in protein conformation or environment. Alcohols, particularly the fluorinated

alcohol 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), are perhaps the most used type of co-solvents to investigate protein aggregation and have been used in the past to study α S *in vitro* under shaking/stirring conditions.^{30,31} Here we have used quiescent conditions and found that low concentrations of alcohols such as methanol (MeOH) or TFE (see Fig. S3† for the analysis of other types of alcohols), increased significantly the rate of α S aggregation (100 μ M α S in PBS buffer pH 7.4, 37 °C, in quiescence; these conditions have been used for all further aggregation experiments) and increasing concentrations of alcohols resulted in shortened aggregation lag times (Fig. 2A and B). Although all the aggregates generated in the presence or absence of low concentrations of alcohols show remarkably similar IR spectra, with the typical amyloid-specific IR intense signal at ≈ 1625 cm⁻¹ (Fig. 1D, 2C, S3C and D†), significant variations in the morphology of the aggregates were observed by means of AFM imaging (Fig. 1A–C and 2D–G). For example, in the case of 5% TFE, the aggregates show a fibrillar structure with an average of 10 ± 1 nm in height, and 600 ± 300 nm in length ($n = 20$) with a twisting periodic pitch of 61 ± 2 nm length, but the 10% MeOH aggregates are preferentially globular, with average heights of 6 ± 2 nm and widths of 47 ± 8 nm ($n = 50$). Note that slight variations in the aggregation kinetics were observed when using other sample containers (Fig. S1†), although the general effects and relative trends were very similar for the different conditions in all containers analyzed.

Interestingly, we noticed that within a given alcohol concentration range, which varied depending on the type of alcohol used, but was surprisingly narrow in any case, there was a drastic change from a very long (typically >20 h) to a much shorter (<5–10 min) lag phase (Fig. 2 and S3†). This

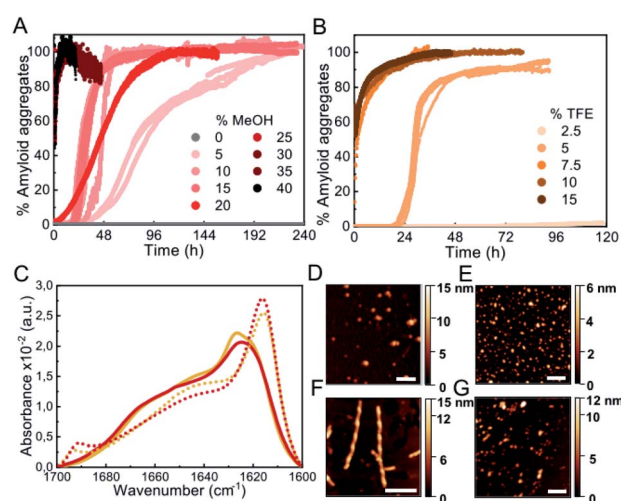


Fig. 2 Characterization of α S aggregation in the presence of low-to-mild alcohol concentrations. (A and B) Aggregation kinetics of 100 μ M α S in the presence of different concentrations of MeOH (A) or TFE (B). Three representative replicas are shown from more than 10 experiments with three different protein batches. (C) FT-IR spectra of aggregates formed in 10% MeOH (red solid line), 5% TFE (orange solid line) or 15% TFE (orange dotted line). (D–G) AFM images of aggregates formed in presence of 10% MeOH (D), 35% MeOH (E), 5% TFE (F) and 15% TFE (G). Scale bar: 200 nm.



phenomenon was observed, for example, when going from 5 to 7.5% TFE or from 15 to 25% MeOH. Under the fast nucleation conditions, the formed aggregates were preferentially globular, with average heights \approx 5–6 nm and lengths \approx 40–50 nm for the aggregates generated in 15% TFE or 35% MeOH, likely as a result of the preference for the stabilization of structures that maximize the volume of the aggregate while minimizing the surface area in contact to the poor hydrating solution. In all cases, however, the aggregates exhibited amyloid features including ThT binding (although the intensity of ThT fluorescence emission was significantly lowered as compared to the aggregates generated with longer lag phases), the amyloid IR fingerprint (intense signal corresponding to intermolecular β -sheet aggregates; Fig. 2C, S3C and D \dagger), and the distinctive X-ray diffraction pattern indicative of amyloid cross- β structure (Fig. S4 \dagger). In addition, these aggregates show seeding capabilities similar to the aggregates generated at lower alcohol concentrations, independently of their apparent size (Fig. S5 \dagger), a feature characteristic of amyloid fibrillar-like aggregates. Note, however, that the IR spectra exhibit important peculiarities for the aggregates formed after short lag times (Fig. 2C, dotted lines), when compared to those requiring long lag times (Fig. 1D, 2C, continuous lines). Particularly, the main signal is shifted to \approx 1615 cm^{-1} , and a new, low-frequency signal appears at \approx 1690 cm^{-1} (more on this below, in the context of the results in Fig. 6).

When we investigated the origin of the increased rates of α S aggregation by alcohols, we found that polarity alone cannot account for the results in the aggregation kinetics observed for the different types of alcohols analyzed (Fig. S6 \dagger), in agreement with previous studies.^{29–31} In addition to changes in the dielectric constant of the solution, alcohols have been reported to disrupt hydrophobic interactions and strongly affect the protein–water interactions, reducing the protein surface tension and consequently the protein hydration shell. Increasing concentrations of alcohols, particularly the hydrophobic ones such as TFE, lead, therefore, to increasing degrees of protein dehydration.^{32,33} On the basis of this idea, Webb and colleagues proposed a de-solvation model assuming TFE–water mixtures as ideal solutions,³¹ and the application of such model predicted that α S, and other proteins, would be preferentially de-solvated at moderated TFE concentrations in which they are prone to aggregate (although the nucleation occurring at interfaces was not considered in Webb's model).

Addition of high concentrations of salts, particularly kosmotropic salts, leads to accelerated α S amyloid nucleation

In order to investigate whether a decrease in protein hydration is a relevant factor in accelerating or even inducing α S aggregation, we analyzed the effect of salts, particularly kosmotropic salts, which have an opposing effect on electrostatics and hydrophobic interactions with respect to alcohols but, at high concentrations, are known to cause thinning of the hydration shell of proteins, similarly to alcohols, thus reducing protein solubility.^{34,35} Upon increasing concentrations of salts in the 0.5–1 M range of ionic strength, both kosmotropic salts, such as

NaCl and Na_2SO_4 (Fig. 3), and chaotropic salts, such as NaSCN (Fig. S7 \dagger), a significant acceleration of α S amyloid aggregation was observed. At higher ionic strength concentrations, 1–3 M for NaCl and 1–2 M for Na_2SO_4 or NaSCN, all salts used in this study behaved similarly, with aggregation kinetics that varied slightly with salt concentration, and with characteristic lag phases $>$ 10 h. However, there was a range of salt concentrations in which different behaviors between kosmotropic and chaotropic salts were observed. For the kosmotropic NaCl and Na_2SO_4 salts, the aggregation kinetics changed drastically at very high salt concentrations towards a mechanism with a remarkably fast nucleation step (with a lag-phase $<$ 5–10 min; Fig. 3A and B), while in the case of the highly chaotropic NaSCN salt, a sharp deceleration of the overall aggregation process was observed (Fig. S7 \dagger). These results are in agreement with the ability of each type of salt used (Na_2SO_4 , NaCl and NaSCN) to lower protein hydration and, thus to modify protein solubility (*i.e.* a strong kosmotropic, salting-out salt, a mild kosmotropic, salting out salt and a strong chaotropic, salting-in salt, respectively).³⁵ Indeed, when analyzing in more detail the salt concentration range at which the slow-to-fast nucleation transition took place, we found that the preference for the fast nucleation mechanism occurred at lower salt concentrations for the highly kosmotropic Na_2SO_4 salt, as compared to the milder kosmotropic NaCl salt.

Also, as previously observed for low-to-mild concentrations of alcohols, the difference between the two α S aggregation kinetic regimes, with either long or remarkably short lag phases, was concomitant with a difference in the structural

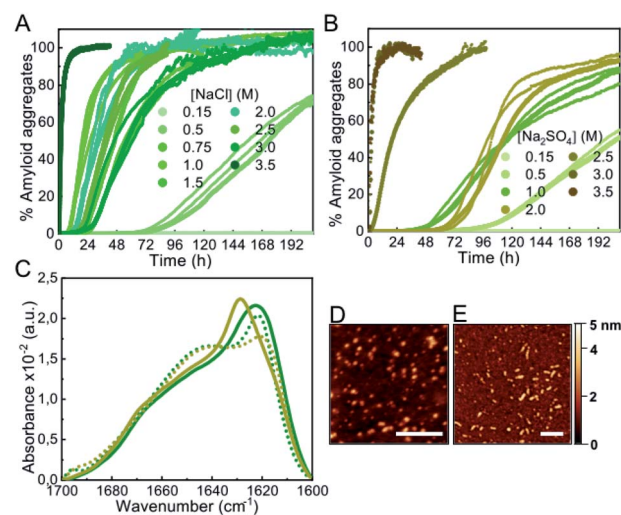


Fig. 3 Characterization of α S aggregation in the presence of kosmotropic salts. (A and B) Aggregation kinetics of 100 μM α S incubated in the presence of different concentrations of NaCl (A) or Na_2SO_4 (B) (concentrations expressed in ionic strength). Three representative replicas are shown from more than 10 measurements with three different protein batches. (C) IR spectra of aggregates formed in 2 M NaCl (green solid line), 3.5 M NaCl (green dotted line), 2 M Na_2SO_4 (brown solid line) and 3 M Na_2SO_4 (brown dotted line) (concentrations expressed in ionic strength). Representative AFM images of aggregates formed in 2 M NaCl (D) and 3.5 M NaCl (E). Scale bar: 200 nm.



properties of the amyloid aggregates formed, as observed by IR analysis (Fig. 3C). The aggregates formed in high salt concentrations seemed to be preferentially small for all salts. For example the AFM-derived dimensions of the aggregates generated at 2 M or 3.5 M NaCl were 3.2 ± 0.2 nm in height, 20 ± 2 nm in length, versus 3.3 ± 0.2 nm in height, 23 ± 3 nm in length, respectively ($n = 50$) (Fig. 3D and E).

Addition of macromolecular crowders also accelerates α S nucleation

The third type of co-solvent or additive most frequently used for probing protein hydration changes is represented by inert synthetic polymers used as macromolecular crowding agents, which are preferentially excluded from the hydration shells of proteins, causing the preferential stabilization of compact protein conformations and complexes according to the excluded volume theory,^{36,37} as well as a reduction in protein hydration.^{38,39} In analogy with the results found with low alcohol concentrations and high salt concentrations, we found that mild concentrations (150 mg ml^{-1}) of three different types of crowding agents were able to accelerate α S aggregation ($t_{\text{lag}} \approx 10$ h; Fig. 4A), in agreement with previous studies,^{30,40,41} although in those studies strong protein sample agitation was used to trigger α S aggregation.

The aggregates formed under these conditions were preferentially fibrillar in the case of dextran 70 and ficoll 70 with similar dimensions according to AFM analysis: 6.0 ± 0.8 nm in height and 380 ± 170 nm in length ($n = 30$) in the case of dextran, and 6.3 ± 0.5 nm in height, 340 ± 170 nm in length ($n = 15$) for ficoll (Fig. 4C and D). In the case of PEG 8, however, more globular-like amyloid aggregates were observed (not

shown). In any case, the three types of aggregates displayed an increase in ThT fluorescence signal and the β -sheet amyloid IR fingerprint. Indeed, we observed a remarkable similarity in the IR spectra of all the aggregates generated through slow nucleation process (see Fig. 1D, 2C, 3C and 4B). Upon increasing the crowding agent concentration up to $300\text{--}400 \text{ mg ml}^{-1}$, however, no change in amyloid aggregation mechanisms with a short lag phase was observed (not shown), unlike in the presence of alcohols or salts, probably because of the well-documented enhancement of surface-catalyzed protein fibril formation in the presence of macromolecular crowders.⁴²

α S forms amyloid aggregates without the presence of an active nucleation surface under limited hydration conditions

Given that at moderate alcohol concentrations and at salting-out concentrations of kosmotropic salts we observed a drastic acceleration in the apparent rate of α S nucleation (Fig. S8†), we set out to characterize the type of primary nucleation that triggers the aggregation process at these conditions as compared to that occurring at lower additive concentrations. We first compared the kinetics of aggregation with and without hydrophilic caps designed to fit into the wells of the plates and remove the air/water interface.⁸ These experiments were, however, rather complex and because of the slow aggregation reactions (lasting *ca.* 5–7 days) and the imperfect fit of the caps into the wells, the stochastic appearance of air bubbles in a significant number of samples was inevitable (Fig. S2B†). For those samples where no bubbles were formed within the first 100 h of incubation, no α S aggregation was observed under quiescent conditions in the presence of low concentrations of alcohols or salts (Fig. S9†), indicating that under these conditions, α S heterogeneous nucleation at the air/water interface was accelerated with no signs of significant homogeneous nucleation.

At higher alcohol or salt concentrations, however, the nucleation process became remarkably fast, with identical behavior of the unmodified and the N-terminally acetylated forms of the protein (the latter being the most frequent physiological form in the cells⁴³) (Fig. S10†), thus alternative approaches were needed in order to analyze the role of the air/water interface on the amyloid nucleation process under these conditions. First, we performed surface tension experiments in a Langmuir tensiometer by the Wilhelmy method⁴⁴ in order to analyze the ability of α S to adsorb and accumulate at the air/water interface under different conditions of either slow or fast primary nucleation. As expected, in the absence of MeOH, the addition of α S to the solution led to the partitioning of the protein between the bulk of the solution and the air/water interface, and the adsorption of the protein to the interface resulted in a significant reduction of surface tension that could be directly monitored in the Langmuir tensiometer (Fig. 5A). At protein concentrations above the saturation concentration in our experimental set up (*ca.* 60 nM of α S for an estimated air/water interface of 254.5 mm^2), the protein generates a protein monolayer with a surface tension of $52 \pm 2 \text{ mN m}^{-1}$ (*vs.* $70.2 \pm 2 \text{ mN m}^{-1}$ in the absence of protein) (see Fig. 5A, blue circles).

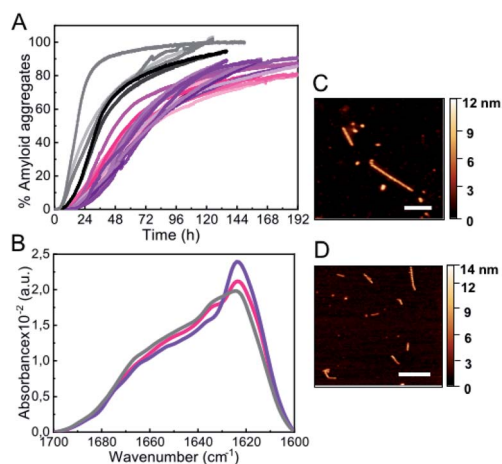


Fig. 4 Characterization of α S aggregation in the presence of macromolecular crowders. (A) Aggregation kinetics of $100 \mu\text{M}$ α S incubated in the presence of 150 g l^{-1} dextran 70 (light-to-dark pink), ficoll 70 (light-to-dark purple) and PEG 8 (light-to-dark grey). Three representative replicas are shown from more than 10 measurements with three different protein batches. (B) IR spectra of aggregates formed in the presence of dextran 70 (pink), ficoll 70 (purple) and PEG 8 (grey). Representative AFM images of aggregates formed in dextran 70 (C) and ficoll 70 (D). Scale bar: 200 nm.



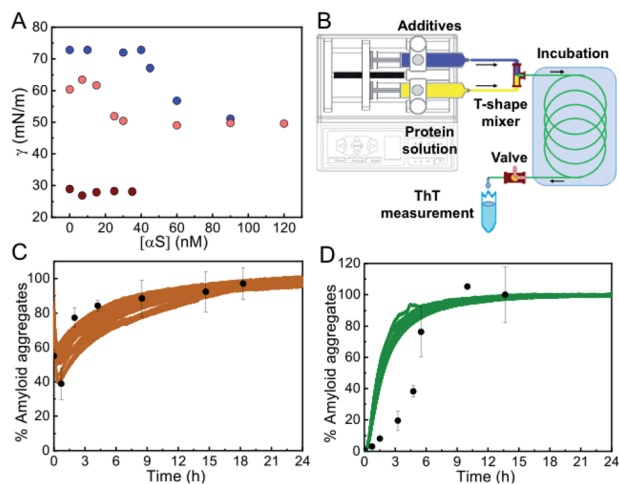


Fig. 5 Propensity of αS to aggregate in the absence of an active hydrophobic/hydrophilic interface. (A) Surface tension measurements of αS solutions in PBS alone (blue), with 10% MeOH (pink) or with 35% MeOH (brown); average measurement error 0.82, 1.15 and 2.07 $mN m^{-1}$ for each solution condition, respectively. (B) Outline of the microfluidic system used for the experiments shown in panels (C) and (D). (C and D) Aggregation kinetics of 100 μM αS in the presence of 15% TFE (C) or 3.5 M NaCl (D) incubated in the microfluidic system (black points). Bars represent standard errors for $n = 3-4$ measurements per aggregation time point. Solid colored lines show data from standard aggregations in the microplate.

When the same experiment was performed in the presence of 10% MeOH, the interface saturation by αS was obtained at lower protein concentrations (≈ 25 nM), generating a protein monolayer with a constant surface tension of 52 ± 2 $mN m^{-1}$, indicating that the protein has a higher propensity to accumulate at the interface at 10% MeOH, likely as a consequence of a higher propensity to acquire the amphipathic α -helical structure. Upon increasing MeOH concentration in the protein-free solution, the surface tension, however, decreased to $\approx 28 \pm 2$ $mN m^{-1}$ at 35% MeOH, already below the value of the surface tension generated by the αS monolayer (52 ± 2 $mN m^{-1}$), indicating that under these conditions αS would not partition into the air/water interface. Accordingly, we did not observe any variation in the surface tension of the 35% MeOH solution upon addition of αS .

To further prove that αS forms amyloid aggregates in the absence of any hydrophobic surface that could initiate heterogeneous αS nucleation under limited hydration conditions, we used a microfluidic setup (see scheme of the system in Fig. 5B) in which the protein solution was mixed with the appropriate concentration of additives and incubated for a specific time only in contact with hydrophilic material (polyetheretherketone, PEEK). Using this device, we were able to reproduce the kinetics of aggregation that we observed previously in the plates, but this time without the presence of the air/water interface or any other hydrophobic surface that could initiate αS heterogeneous nucleation (Fig. 5C and D) (note that no apparent pre-formed aggregation nuclei were observed in the protein batch samples, see Fig. S11†). Indeed, remarkably similar kinetics and yields of aggregation were obtained with

drastically different surface materials and surface-to-volume ratios of the containers (in the case of the PEEK tubing the surface-to-volume ratio is 5-times higher than in the microplate wells). The small deviations observed between kinetics of αS aggregation in the presence of 3.5 M NaCl in the plate and in the microfluidic system (Fig. 5D) are most likely related to an acceleration of protein heterogeneous nucleation at the air/water interface in the plate under these conditions, since, at 3.5 M NaCl, and unlike at 35% MeOH, the protein is expected to partition into the air/water interface where heterogeneous nucleation is probably triggered at faster rates than the nucleation in the bulk due to an increased local protein concentration. Taken together, our results indicate that αS can form amyloid aggregates under conditions of limited hydration in the bulk of the solution through homogeneous nucleation.

αS preferentially forms parallel β -sheet amyloid aggregates by heterogeneous nucleation and antiparallel β -sheet amyloid aggregates by homogeneous nucleation

When we compared the IR spectra of the aggregates generated through either heterogeneous or homogeneous primary nucleation, we observed at least two remarkable differences (Fig. 2C and 3C). First we observed an additional band in the amide I region, at *ca.* 1690 cm^{-1} , in the aggregates generated through homogeneous nucleation, indicative of the presence of antiparallel β -sheet structure.⁴⁵⁻⁴⁷ Also, we noticed a general shift in the peak of the amyloid-characteristic amide I band from *ca.* 1625 cm^{-1} for the aggregates generated through heterogeneous nucleation to lower wavenumbers (*ca.* 1615 cm^{-1}) for the aggregates generated through homogeneous nucleation. We attribute this red-shift of the amyloid-characteristic amide I band to a higher flexibility and/or solvent exposition of the β -sheet core^{47,48} in this type of aggregates.

In order to further corroborate the parallel and antiparallel arrangement of the β -sheet architecture of the two structural classes of amyloid αS aggregates, we analyzed the intermolecular fluorescence excimer formation of pyrene molecules attached to different positions of the polypeptide chain, particularly at positions 6, 24, 56, 69, 85, 90 and 140 in both types of amyloid aggregates. According to previous detailed structural analysis on parallel β -sheet αS fibrils (all formed through heterogeneous nucleation at the air/water interface),¹⁵⁻¹⁸ positions 56, 69, 85 and 90 are located in the β -sheet amyloid core, position 24 is located close to the N-terminal part of the amyloid core and positions 6 and 140 are located at the very N-terminal and C-terminal ends of the protein sequence, respectively. For this structural group of aggregates, therefore, when labeled with pyrene, we observed, as expected, excimer formation (emission band at around 470 nm) at the positions of the amyloid core, in addition to the monomeric pyrene emission bands (375-395 nm) (see Fig. S12A and B†). This behavior was better visualized when using the excimer to monomer intensity ratio (E/M), which indeed can be used as a pyrene-pyrene proximity indicator.⁴⁹ Still, for the positions away from the core we did observe significant excimer formation, implying that in a parallel β -sheet arrangement even residues located in





Fig. 6 Intermolecular pyrene excimer formation analysis of the different β -sheet α S amyloid aggregates. (A) Pyrene E/M intensity ratio values obtained for the α S aggregates labeled with a 1 : 10 pyrene- α S/unlabeled- α S ratio at different sequence positions formed in PBS with 10% MeOH (A, red), PBS with 35% MeOH (A, shaded red), PBS with 2 M NaCl (B, green) or PBS with 3.5 M NaCl (shaded green), pH 7.4.

regions distant from the amyloid core are likely in close proximity, with transient intermolecular interactions, due to the flexible nature of those regions. However, in the case of the amyloid aggregates generated under conditions of very fast nucleation (Fig. 6, striped red and green), no significant excimer formation was observed for any of the α S positions analyzed, in agreement with a relative antiparallel orientation of the α S monomers within this type of amyloid aggregate.

Homogeneous primary nucleation leads to amyloid aggregates with different thermodynamic stability with respect to the aggregates generated by heterogeneous nucleation

Our results indicate that α S aggregation can be triggered by alternative nucleation mechanisms leading to distinct amyloid polymorphs with different internal protofilament structure depending on the extent of protein hydration. This is particularly clear when alcohols, such as TFE or MeOH, are used to decrease protein hydration. At low alcohol concentrations, the formation of parallel β -sheet aggregates is preferred, while at higher concentrations the antiparallel configuration is stabilized. In order to analyze the influence of the extent of protein hydration on the stability of the resulting α S aggregates, we increased the MeOH concentration of the solution and compared the percentage of parallel and antiparallel aggregates formed (Fig. 7 and S13[†]).

As seen in Fig. 7A, the parallel β -sheet arrangement is preferentially formed at MeOH concentrations <15%, while the antiparallel orientation is preferred at >25% MeOH. Between 15–25% MeOH, however, a mixture of both types of aggregates is observed, indicating that in this remarkably narrow regime of MeOH concentrations and, thus, of protein hydration conditions, both types of primary nucleation mechanisms are competing. When parallel β -sheet aggregates generated at low alcohol concentrations were transferred to conditions where the amyloid pathways of formation of antiparallel β -sheet aggregates were preferred and *vice versa* (Fig. 7A), the aggregates did not dissociate, according to SDS-PAGE analysis (not shown), as long as the MeOH concentration was higher than 5%, and they maintained their original β -sheet arrangement (Fig. S12C–F[†]). Their structures, however, were severely destabilized (Fig. S14[†]),

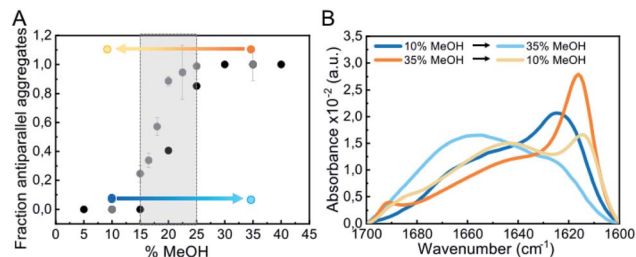


Fig. 7 Impact of alcohol concentration on the aggregation behavior of α S. (A) Fraction of antiparallel aggregates found in the plateau phase of aggregation reactions of 100 μ M α S in PBS pH 7.4 (37 $^{\circ}$ C) in the presence of different MeOH concentrations as derived from IR deconvolution (black dots) or pyrene E/M ratio (grey dots) analysis. For the pyrene data, error bars show the standard deviation of triplicate experiments, while for the IR data the uncertainty obtained from the global spectra fitting was 0.02 (see ESI and Methods in ESI[†]). The stability of parallel (generated at 10% MeOH) and antiparallel (generated at 35% MeOH) β -sheet aggregates under conditions at which the other type of aggregates is preferentially formed was analyzed (marked as blue and orange points and arrows, respectively). (B) Stability of the aggregates indicated in panel A by IR spectra.

with a significant increase in random coil content in both cases (Fig. 7B), which strongly affected their seeding capabilities (Fig. S5[†]). Analogous results were obtained for parallel and antiparallel β -sheet aggregates generated with NaCl (Fig. S12[†]). Note that when the antiparallel β -sheet aggregates were transferred to conditions of full protein hydration (PBS only), the aggregates fully dissociate very rapidly, while the parallel aggregates remained stable and reached a maximum β -sheet content (Fig. S14[†]). These results indicate that the extent of protein hydration in different environmental conditions modulate the intermolecular interactions leading to a strong effect in both the kinetics (in particular the early nucleation events) and the thermodynamics of α S amyloid assembly.

Antiparallel β -sheet aggregates represent the most stable structure of the preferred amyloid pathway triggered by homogeneous nucleation under limited hydration conditions

In vitro-generated amyloid aggregates of relevant disease-related proteins have long been observed to adopt in-register parallel β -sheet topology and the antiparallel β -sheet architecture has been, until now, assigned primarily for what has been referred to as stable (sometimes off-pathway) toxic oligomers.^{50,51} Only very few cases of small synthetic peptides⁵² and disease-related amyloidogenic systems, such as the Iowa-mutant variant of A β peptide,⁵³ have been reported to form antiparallel β -sheet amyloid fibrils. We recently reported that a particularly toxic form of α S oligomers with an antiparallel β -sheet architecture was generated under conditions of very limited protein hydration, particularly during protein lyophilization.⁵⁴ In the present study, we have shown that α S can assemble into cross- β amyloid aggregates with significant antiparallel β -sheet structure in a range of limited hydration conditions and that these aggregates can have as much β -sheet content as the parallel β -sheet fibrils generated under more commonly used standard



conditions according to IR spectra analysis (Table S1†), despite their difference in the supramolecular structure. Indeed, the antiparallel β -sheet amyloid aggregates seem to have a smaller size as compared to the typical parallel β -sheet fibrils and, therefore, if they are eventually generated *in vivo*, they would be much more diffusive and, therefore, difficult to visualize or isolate.

The origin for the preference of the parallel or the antiparallel β -sheet structure in the α S amyloid aggregates is likely related with the type of primary nucleation under the particular solution conditions. When α S aggregation is triggered by heterogeneous nucleation, the pre-nucleus of amyloid structure formed at a given hydrophobic/hydrophilic interface would inevitably adopt a parallel intermolecular β -sheet arrangement given the restrictions in the disposition and orientation of the polypeptide chains anchored through their N-terminal amphipathic region to the interface. When the aggregation is triggered by homogeneous nucleation, however, there is no restriction in the orientation of the protein molecules in the bulk, and the antiparallel orientation of the β -sheets would be preferred over the parallel arrangement, as the stability of the hydrogen bonds in such configuration is generally higher.^{55,56} An alternative explanation for the stabilization of the antiparallel arrangement at limited hydration conditions would be the strengthening of electrostatic interactions between the positively-charged N-terminal and the negatively-charged C-terminal regions of the protein. However, under conditions of high salt concentrations, where these interactions would be minimized, we still observe the formation of antiparallel β -sheet amyloid aggregates, and, importantly, the same behavior as the WT protein was observed for the C-terminally truncated α S variant (α S 1–103) (Fig. S10†).

Our observation that limited hydration conditions promote the formation of α S amyloid aggregates rich in intermolecular antiparallel β -sheets has been, indeed, reported for other amyloidogenic peptides (derived from A β and Sup35).^{52,57} In addition, a multitude of *a priori* non-amyloidogenic proteins belonging to different structural classes, as well as disordered peptides such as poly(L-lysine), have been reported to adopt an intermolecular antiparallel β -sheet conformation during the lyophilization process^{58,59} or under conditions of partial protein dehydration occurring at high temperatures,⁶⁰ or upon adsorption to hydrophobic surfaces without preferential protein orientations.^{61–63} All these findings together, therefore, suggest that the formation of antiparallel β -sheet amyloid aggregates under limited hydration conditions may be a more general phenomenon of polypeptide chains, particularly when nucleating in bulk by homogeneous nucleation.

The aggregates formed inside α S droplets generated by LLPS resemble those generated by homogeneous primary nucleation with a preference for an antiparallel β -sheet structure

Limited hydration environments can be found in the cell, particularly in the interior of protein-rich liquid droplets, also referred to as biomolecular condensates or membrane-less compartments, generated by protein-driven LLPS processes,

and such environments have been reported to be particularly favorable for protein aggregation into amyloid structures (also referred to as liquid-to-solid transition) in a number of amyloidogenic proteins associated with disease.^{64,65} Indeed, recent experimental evidences suggest a role of these protein droplets on the *in vivo* aggregation of these amyloidogenic proteins and the induction of pathology.⁶⁶ Very recently, it has been reported that α S droplet formation by LLPS precedes its aggregation in cellular⁶⁷ and animal models⁶⁸ and the liquid-to-solid transition of α S droplets has been recapitulated *in vitro*.

With the aim of elucidating if homogeneous primary nucleation and thus the formation of antiparallel β -sheet aggregates can be triggered inside α S droplets generated by LLPS, we have reproduced the conditions of reported *in vitro* α S droplet formation⁶⁸ (Fig. 8B) and observed aggregation inside the droplets very rapidly (within 2 h of incubation, not shown), with essentially all the protein being aggregated in less than 20 h (Fig. 8C), seen as ThT-positive aggregates. Under similar conditions without droplet formation, no aggregation was observed at the same time scale (Fig. S15†). The rate of amyloid formation inside the droplets is, therefore, remarkably fast, already suggesting a homogeneous primary nucleation mechanism. When we investigated the nature of the amyloid aggregates formed, we observed that the aggregates exhibited relatively low ThT binding (not shown) and had relatively small sizes (2 h ultracentrifugation at $627.000 \times g$ were required to obtain a pellet), features compatible with antiparallel β -sheet amyloid aggregates. Importantly, when we characterized the

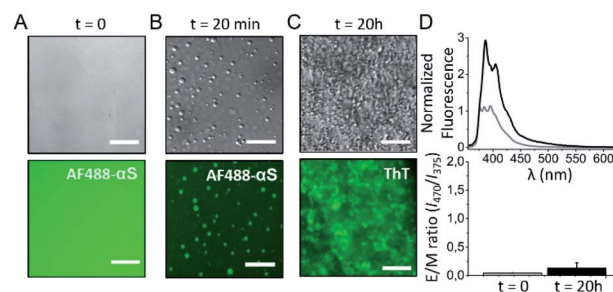


Fig. 8 Analysis of the amyloid aggregates formed by the liquid-to-solid transition of α S droplets generated by LLPS. α S droplet formation was triggered by incubating 200 μ M protein in 25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.4 in the presence of 10% PEG8000 in a droplet set up (see Fig. S15†). (A) Representative images acquired immediately after sample preparation by differential interference contrast (DIC, top panels) and widefield fluorescence (bottom panels) microscopy. (B) After 20 min of incubation, protein droplets were already observed. (C) After 20 h of incubation, the protein sample was full of amyloid aggregates. For the fluorescence images in panels A and B, 1 μ M AF488 α S was added to the protein solutions and the AF488 fluorescence signal was recorded. In the fluorescence image of panel C, all the protein was unlabeled and 100 μ M ThT was added at time = 0. A GFP excitation/emission filter set was used for the fluorescence microscopy acquisitions in all cases. Scale bar: 25 μ m. (D) Representative pyrene spectra (top) and E/M ratio analysis (bottom) at time 0 h (grey) and 20 h (black) of incubation of a protein sample treated as in (A–C) top panels, which also contained 20 μ M pyrene- α S labeled at position 85. Error bars represent data obtained in two independent experiments.



inter-molecular assembly of the β -strands in the aggregates using the pyrene excimer formation strategy, no excimer formation was observed when the pyrene probe was located in position 85 (Fig. 8D), the position that shows the highest E/M ratio among all parallel arrangements characterized. Indeed, the pyrene fluorescence spectrum (Fig. 8D) is identical to that of the previously characterized antiparallel β -sheet amyloid aggregates (Fig. S12A†).

Our data on the *in vitro* liquid-to-solid transition of α S droplets generated by LLPS strongly suggest, therefore, that the amyloid aggregates so generated have an antiparallel β -sheet structure, resembling the aggregates that we have observed to be generated by homogeneous primary nucleation in the bulk of the solution under poor hydration conditions in the presence of co-solvents or high concentrations of salts.

Limited hydration conditions are required to trigger nucleation and the extent of protein hydration dictates the preferred type of primary nucleation and the type of amyloid polymorph generated

Despite the in principle intuitive relevance of protein hydration on the process of protein aggregation, the role of water in amyloid formation has been often overlooked. There is a limited number of studies in which this effect has been studied, most of them using a theoretical, molecular dynamics simulation approach.^{69–72} In one of the few experimental studies using small amyloidogenic peptides, the authors used reverse micelles as a tool to modulate the accessible number of water molecules for the peptides, and demonstrated that the degree of hydration is an important determinant for the rate of initial self-assembly for the formation of both parallel and antiparallel β -sheet peptide aggregates.⁵² We here have used different co-solvents and molecules whose only shared characteristic is that they are preferentially excluded from the protein surface, which results in the collapse of the protein hydration shell and, therefore, in a decreased protein hydration, thus promoting and stabilizing protein intra and intermolecular hydrogen bonding.⁷³ By systematically analyzing the effect of different concentrations of the different types of additives on the kinetics of α S aggregation and the structural types of aggregates formed under conditions where α S is unable to efficiently nucleate in a reasonable time, we have been able to observe a significant decrease in the lag phase of α S aggregation kinetics upon limited hydration conditions, with no apparent drastic changes in the structure or compaction of the monomeric structural ensemble of the protein at least under mild dehydrating conditions (Fig. S16†). Importantly, two aggregation kinetic regimes were observed depending on the extent of protein hydration, one corresponding to kinetics with lag phases in the order of 20 h, *i.e.* at least two orders of magnitude shorter than in the absence of additives, and another regime with lag phases shorter than 5 min, *i.e.* at least four orders of magnitude shorter than in the absence of additives (see Fig. S8†). Even if possible secondary processes could contribute to the reduction in the apparent lag phase under the different conditions,³ our data show that under the conditions tested, a significant acceleration

of primary nucleation occurs in the two additive concentration regimes with respect to the conditions in the absence of additives. Importantly, we here have demonstrated that while α S aggregation is triggered by heterogeneous primary nucleation in the first regime, homogeneous primary nucleation is the driving force of aggregation in the second regime, indicating that the extent of protein hydration is determinant for both types of primary nucleation. The initial self-assembly of amyloid structures either in the parallel or antiparallel arrangement, therefore, and in analogy to protein folding, requires overcoming a high de-solvation barrier⁷² arising from the removal of water molecules solvating the hydrophobic stretches that typically forms the amyloid core (the NAC region in the case of α S), as reported for the amyloid aggregation of the A β peptide.^{52,71} Conditions of poor protein hydration, therefore, would significantly decrease the de-solvation barrier and the intermolecular hydrogen bonding barrier for nucleation.

At slightly reduced hydration conditions, α S nucleation can only take place effectively at hydrophobic/hydrophilic interfaces probably as a consequence of a local increase in protein concentration and a protein conformation/orientation selection at the interface, which, together with a more favorable intermolecular protein hydrogen bonding environment due to limited hydration conditions, allows for the formation of a sufficient number of simultaneous intermolecular interactions to offset the loss of polypeptide chain entropy, which is already low, as the protein molecules are anchored at the interface. α S, given its amphipathic nature, prompts a preferential adsorption at hydrophobic/hydrophilic interfaces in order to simultaneously maximize the hydrophilic interactions in the aqueous environment and the hydrophobic force at the hydrophobic surface,⁷ and there, we and others have observed that the protein is able to nucleate the formation of amyloid aggregates.^{6,8} Indeed, hydrophobic/hydrophilic interfaces have been found to be critical for the aggregation of many other amyloidogenic proteins and peptides that also share the amphiphilic character with α S, including disordered peptides such as amyloid β (A β) peptide⁷⁴ and folded proteins such as insulin.⁷⁵ Under more limited hydration conditions, however, we have observed that the nucleation process becomes favored, even at low micromolar protein concentrations (Fig. S17†), and, therefore, it can take place very effectively in the bulk solution without the need of an active surface to concentrate the protein molecules or decrease their translational and configurational entropies. When homogeneous primary nucleation is then triggered, a different set of intermolecular interactions are established in the pre-nucleus which results in the formation of remarkably different amyloid aggregates with respect to those generated through heterogeneous nucleation, with a preference for an antiparallel β -sheet arrangement. At intermediate hydration conditions, as it would be expected, both homogeneous and heterogeneous nucleation were observed to co-exist, resulting in the formation of mixtures of aggregate polymorphs.

Interestingly, we have shown that primary homogeneous nucleation and the formation of antiparallel β -sheet amyloid aggregates could be a preferred amyloid pathway during the process of liquid-to-solid transition of α S droplets *in vivo*.



Further investigation would be required to demonstrate the involvement of both homogeneous and heterogeneous nucleation in the formation of Lewy-body pathology and the induction of disease in *in vivo* models.

Conclusions

In the present article, we have expanded the conformational landscape of amyloid aggregation and proved that α S is able to self-assemble into amyloid aggregates by homogeneous primary nucleation, without the need of an active surface, and that when the protein undergoes this process, there is a preference for an antiparallel β -sheet arrangement, in contrast to the parallel β -sheet architecture adopted when heterogeneous nucleation dominates. Indeed, the parallel arrangement is likely to be preferred in this case because of the restricted conformations that the protein is forced to adopt when anchored to a hydrophobic surface. Interestingly, the antiparallel intermolecular β -sheet structure has been previously observed in stable, particularly toxic oligomers of α S and other amyloidogenic systems and has been indeed proposed to be distinctive of these toxic species. We here demonstrate that the formation of such structure in α S represents an additional amyloid pathway to that previously explored, which is highly favoured under limited hydration conditions, with kinetics orders of magnitude faster than previously observed, and that it might indeed represent a general amyloid pathway of polypeptide chains when nucleating by homogeneous primary nucleation. Interestingly, we have observed that such nucleation mechanism is favored inside α S droplets generated *in vitro* by LLPS and might, therefore, be relevant in the *in vivo* liquid-to-solid transition of α S droplets, as well as, perhaps, that of other amyloidogenic proteins, an event proposed to be relevant in the pathology of amyloid-related neurodegenerative diseases.⁶⁶ In addition, we have found that the extent of protein hydration is a key determinant not only for triggering α S self-assembly (maintaining α S monomeric and preventing it from misfolding and self-assembly under highly hydrating conditions), but also for dictating the preference for the type of primary nucleation (heterogeneous *vs.* homogeneous) and the type of structural amyloid polymorph generated (parallel *vs.* antiparallel β -sheet structure). Because of the variety of hydration conditions in different cellular microenvironments, including some with very limited water accessibility such as the interior of phase separated protein rich microdroplets or membraneless compartments, our findings suggest that, *in vivo*, α S could undergo the formation of remarkably different amyloid polymorphs, by either heterogeneous or homogeneous nucleation, depending on the particular location of the protein in the cells, which could be ultimately related to the multiplicity of α S polymorphs that have been associated with distinct neurodegenerative disorders.⁷⁶ Interestingly, a decrease in the water content in brain cells, likely as a consequence of an increased total intracellular protein concentration with advancing age has been reported,^{77–79} which may also contribute to the increased incidence of amyloid formation and, therefore, amyloid diseases in the aged population.

Experimental

Materials and methods

Protein expression and purification. Wild type (WT) α S, as well as α S variants, were expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and purified as described previously.^{80,81} In the case of the N-terminally acetylated variant, a simultaneous double transfection with α S plasmid and pNatB (pACYduet-naa20-naa25) plasmid (Addgene, UK) was used.⁸² The cysteine-containing α S variants were expressed and purified as described for the WT protein but including 5 mM DTT in all purification steps.

Aggregation assays. In ThT-monitored aggregation assays, 100 μ M α S monomer was incubated in PBS buffer pH 7.4, 50 μ M ThT, 0.01% azide, in the presence of given concentrations co-solvents or salts at 37 °C until reaction was complete. 500 μ M α S was used for aggregation in PBS in the absence of co-solvents or salts under shaking conditions (700 rpm using *in situ* orbital agitation in the plate reader). Non-Binding 96-Well Microplate (μ Clear®, Black, F-Bottom/Chimney Well) (Greiner bio-one North America Inc., USA) were used and the plates were covered with adhesive foil to prevent evaporation. All buffer samples and additive stock solutions were pre-filtered with 0.22 μ m filters and both the multi-well plates and microfluidic devices were thoroughly cleaned before use. Additional control experiments were performed in order to exclude the presence of pre-formed nuclei in the original protein batches (Fig. S11†). Kinetic profiles were recorded in a FLUOstar plate reader (BMG Labtech, Germany); excitation at 450 \pm 5 nm and emission at 485 \pm 5 nm. See ESI† for kinetic curves analysis. For pyrene-labeled α S, aggregation assays were performed as described for the WT protein with a 1 : 10 labeled-to-unlabeled α S ratio and containing 200 μ M TCEP to prevent disulfide bridge formation between cysteines during the aggregation.

Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. α S end-point aggregates, after two centrifugation–resuspension cycles in order to remove unreacted monomers from the solution, were resuspended in deuterated buffer to a final protein concentration of *ca.* 4 mg ml^{−1}. Samples were then deposited between two CaF₂ polished windows separated by a PTFE Spacer (Harrick Scientific Products Inc., USA). Spectra were collected in transmission mode at room temperature using a VERTEX 70 FTIR Spectrometer (Bruker, USA) equipped with a cryogenic MCT detector cooled in liquid nitrogen. IR spectra were processed and analyzed using standard routines in OPUS (Bruker, USA), RAMOPN (NRC, National Research Council of Canada) and Spectra-Calc-Arithmetic© (Galactic Inc., USA).⁴⁵ Global fitting analysis of IR spectra of α S aggregates generated at different MeOH concentrations were performed as indicated in ESI.†

Atomic force microscopy. Aggregated α S samples were diluted to a protein concentration 0.1–0.5 μ M and deposited on cleaved Muscovite Mica V-5 (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, Pennsylvania, USA). Slides were washed with double distilled water and allowed to dry before imaging acquisition on a Bruker Multimode 8 (Bruker; Billerica, USA) using a FMG01



gold probe (NT-MDT Spectrum Instruments Ltd., Russia) in intermittent-contact mode in air. Images were processed using Gwyddion and the width measurements were corrected for the tip shape and size (10 nm).

Surface tension measurements. The surface tension of PBS solutions in the presence or absence of different MeOH and α S concentrations was measured using a DeltaPi 4-channel Langmuir tensiometer (Kibron Inc., Helsinki, Finland). Prior to measurements, the trough was thoroughly cleaned with ethanol and Milli-Q water (18.2 M Ω cm) and dried with a vacuum pump. The probes were burned with a jet flame before and after the experiment. The tensiometer was calibrated with PBS at 25 °C under constant shaking and then MeOH was added when necessary at the indicated concentrations. The protein was added at the appropriate concentrations after buffer equilibration. The surface tension of the different solutions was recorded until an equilibrium value was reached (30 min – 2 h depending on the solution conditions) within the accuracy of the measurement (± 0.01 mN m $^{-1}$).

Generation of the microfluidic system. The microfluidic system was made of polyetheretherketone (PEEK), and was assembled by the following components: (1) capillary tubing for additive inlets. The outer and inner diameters were 0.06 and 0.04 inches, respectively. (2) T-shape micromixer (IDEX Health and Science, USA) with a swept volume of 0.95 μ l to promote an efficient and fast micromixing of additives. (3) Capillary tubing for protein incubation. The outer and inner diameters were 0.06 and 0.04 inches, respectively. The tubing length was 280 mm. (4) A 2-way valve to assure a tight air system shut-off. Reagents were injected in the microfluidic systems with a flow rate of 300 μ l min $^{-1}$ using a Harvard PHD Ultra $\text{\textcircled{R}}$ syringe pump. The surface-to-volume (S/V) ratio for the PEEK tubing where the protein sample was incubated was 3.93 (while a value of 0.77 was estimated for the wells of the PEG-ylated microplate).

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by MINECO (RYC-2012-12068, NC), MINECO/FEDER, EU (BFU2015-64119-P, NC), MICIU/FEDER, EU (PGC2018-096335-B-100, NC), MICIU/FEDER, EU (RTI2018-099019-A-I00, VS), MCI/AEI/FEDER, UE (PGC2018-099857-B-I00, FMG) and Basque Government (IT1264-19, FMG and IT1196-19, JLRA), and Fundaci3n Biof3sica Bizkaia and the Basque Excellence Research Centre (BERC) program of the Basque Government (FMG, JLRA). We thank the Proteomics Unit of Servicios Cient3fico T3cnicos del CIBA (IACS-Universidad de Zaragoza), ProteoRed ISCIII member for mass spectrometry analysis and Advanced Microscopy Laboratory (LMA; Dr Jos3 Luis Diez-Ferrer) for access to and help with AFM imaging. We also want to thank Dr Ram3n Hurtado for assistance in fiber X-ray diffraction, Dr Janet Kumita for help with the acquisition of PMMA caps, Pablo F. Garrido for help with the FT-IR spectra

global fitting and Dr Pierpaolo Bruscolini and Prof. Paolo Arosio for insightful discussions.

References

- 1 M. Grazia Spillantini, R. Anthony Crowther, R. Jakes, N. J. Cairns, P. L. Lantos and M. Goedert, *Neurosci. Lett.*, 1998, **251**, 205–208.
- 2 H. Naiki, K. Higuchi, K. Matsushima, A. Shimada, W. H. Chen, M. Hosokawa and T. Takeda, *Anal. Biochem.*, 1989, **62**, 768–773.
- 3 P. Arosio, T. P. J. Knowles and S. Linse, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 7606–7618.
- 4 S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, C. M. Dobson and T. P. J. Knowles, *J. Mol. Biol.*, 2012, **421**, 160–171.
- 5 K. A. Conway, J. D. Harper and P. T. Lansbury, *Nat. Med.*, 1998, **4**, 1318–1320.
- 6 J. Pronchik, X. He, J. T. Giurleo and D. S. Talaga, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9797–9803.
- 7 C. Wang, N. Shah, G. Thakur, F. Zhou and R. M. Leblanc, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6702–6704.
- 8 S. Campioni, G. Carret, S. Jordens, L. Nicoud, R. Mezzenga and R. Riek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 2866–2875.
- 9 M. Necula, C. N. Chirita and J. Kuret, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 46674–46680.
- 10 L. Giehm, C. L. P. Oliveira, G. Christiansen, J. S. Pedersen and D. E. Otzen, *J. Mol. Biol.*, 2010, **401**, 115–133.
- 11 R. Gaspar, G. Meisl, A. K. Buell, L. Young, C. F. Kaminski, T. P. J. Knowles, E. Sparr and S. Linse, *Q. Rev. Biophys.*, 2017, **50**, e6.
- 12 C. Galvagnion, J. W. P. Brown, M. M. Ouberaï, P. Flagmeier, M. Vendruscolo, A. K. Buell, E. Sparr and C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 7065–7070.
- 13 C. Galvagnion, A. K. Buell, G. Meisl, T. C. T. Michaels, M. Vendruscolo, T. P. J. Knowles and C. M. Dobson, *Nat. Chem. Biol.*, 2015, **11**, 229–234.
- 14 M. Delenclos, J. D. Burgess, A. Lamprokostopoulou, T. F. Outeiro, K. Vekrellis and P. J. McLean, *J. Neurochem.*, 2019, **150**, 566–576.
- 15 R. Guerrero-Ferreira, N. M. I. Taylor, D. Mona, P. Ringler, M. E. Lauer, R. Riek, M. Britschgi and H. Stahlberg, *Elife*, 2018, **7**, 1–18.
- 16 M. D. Tuttle, G. Comellas, A. J. Nieuwkoop, D. J. Covell, D. A. Berthold, K. D. Kloepper, J. M. Courtney, J. K. Kim, A. M. Barclay, A. Kendall, W. Wan, G. Stubbs, C. D. Schwieters, V. M. Y. Lee, J. M. George and C. M. Rienstra, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2016, **23**, 409–415.
- 17 M. Vilar, H.-T. Chou, T. Luhrs, S. K. Maji, D. Riek-Loher, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg and R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 8637–8642.
- 18 Y. Li, C. Zhao, F. Luo, Z. Liu, X. Gui, Z. Luo, X. Zhang, D. Li, C. Liu and X. Li, *Cell Res.*, 2018, **28**, 897–903.
- 19 M. Schweighauser, Y. Shi, A. Tarutani, F. Kametani, A. G. Murzin, B. Ghetti, T. Matsubara, T. Tomita, T. Ando, K. Hasegawa, S. Murayama, M. Yoshida, M. Hasegawa, S. H. W. Scheres and M. Goedert, *Nature*, 2020, **585**, 464–469.



- 20 T. Strohäker, B. C. Jung, S. H. Liou, C. O. Fernandez, D. Riedel, S. Becker, G. M. Halliday, M. Bennati, W. S. Kim, S. J. Lee and M. Zweckstetter, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 1–12.
- 21 A. K. Buell, C. Galvagnion, R. Gaspar, E. Sparr, M. Vendruscolo, T. P. J. Knowles, S. Linse and C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, **111**, 7671–7676.
- 22 G. T. Corbett, Z. Wang, W. Hong, M. Colom-Cadena, J. Rose, M. Liao, A. Asfaw, T. C. Hall, L. Ding, A. DeSousa, M. P. Frosch, J. Collinge, D. A. Harris, M. S. Perkinson, T. L. Spires-Jones, T. L. Young-Pearse, A. Billinton and D. M. Walsh, *Acta Neuropathol.*, 2020, **139**, 503–526.
- 23 L. Giehm and D. E. Otzen, *Anal. Biochem.*, 2010, **400**, 270–281.
- 24 L. Giehm, N. Lorenzen and D. E. Otzen, *Methods*, 2011, **53**, 295–305.
- 25 M. K. Janowska, K. P. Wu and J. Baum, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 1–10.
- 26 J. Pujols, S. Peña-Díaz, M. Conde-Giménez, F. Pinheiro, S. Navarro, J. Sancho and S. Ventura, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**, 478.
- 27 M. K. Bennett and W. A. Zisman, *J. Phys. Chem.*, 1959, **63**, 1241–1246.
- 28 G. Zandomenighi, M. R. H. Krebs, M. G. McCammon and M. Fändrich, *Protein Sci.*, 2009, **13**, 3314–3321.
- 29 A. Natalello and S. M. Doglia, in *Methods in Molecular Biology*, ed. E. García-Fruitós, Springer New York, New York, NY, 2015, vol. 1258, pp. 347–369.
- 30 L. A. Munishkina, C. Phelan, V. N. Uversky and A. L. Fink, *Biochemistry*, 2003, **42**, 2720–2730.
- 31 V. L. Anderson and W. W. Webb, *Biophys. J.*, 2012, **102**, 897–906.
- 32 G. Buhrman, V. De Serrano and C. Mattos, *Structure*, 2003, **11**, 747–751.
- 33 A. Deshpande, S. Nimsadkar and S. C. Mande, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2005, **61**, 1005–1008.
- 34 X. Chen, T. Yang, S. Kataoka and P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12272–12279.
- 35 R. L. Baldwin, *Biophys. J.*, 1996, **71**, 2056–2063.
- 36 A. P. Minton, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 971–985.
- 37 A. P. Minton, *J. Pharm. Sci.*, 2005, **94**, 1668–1675.
- 38 R. Harada, Y. Sugita and M. Feig, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4842–4849.
- 39 V. A. Parsegian, R. P. Rand and D. C. Rau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 3987–3992.
- 40 L. A. Munishkina, A. Ahmad, A. L. Fink and V. N. Uversky, *Biochemistry*, 2008, **47**, 8993–9006.
- 41 L. A. Munishkina, J. Henriques, V. N. Uversky and A. L. Fink, *Biochemistry*, 2004, **43**, 3289–3300.
- 42 T. Hoppe and A. P. Minton, *Biophys. J.*, 2015, **108**, 957–966.
- 43 B. Fauvet, M. K. Mbefo, M. B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M. T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, D. Eliezer, D. J. Moore, B. Schneider, P. Aebischer, O. M. El-Agnaf, E. Masliah and H. A. Lashuel, *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 15345–15364.
- 44 A. Faghri and Y. Zhang, in *Transport Phenomena in Multiphase Systems*, Elsevier, 2006, pp. 331–420.
- 45 J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana and F. M. Goñi, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1993, **59**, 23–56.
- 46 A. Barth and C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.*, 2002, **35**, 369–430.
- 47 W. Dzwolak, R. Ravindra, C. Nicolini, R. Jansen and R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3762–3768.
- 48 M. Müller, R. Buchet and U. P. Fringeli, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 10810–10825.
- 49 S. Thirunavukkuarasu, E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, 2008, **378**, 1064–1073.
- 50 M. S. Celej, R. Sarroukh, E. Goormaghtigh, G. D. Fidelio, J.-M. Ruyschaert and V. Raussens, *Biochem. J.*, 2012, **443**, 719–726.
- 51 E. Cerf, R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, S. Derclaye, Y. F. Dufrène, V. Narayanaswami, E. Goormaghtigh, J.-M. Ruyschaert and V. Raussens, *Biochem. J.*, 2009, **421**, 415–423.
- 52 S. Mukherjee, P. Chowdhury and F. Gai, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 531–535.
- 53 W. Qiang, W. M. Yau, Y. Luo, M. P. Mattson and R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 4443–4448.
- 54 S. W. Chen, S. Drakulic, E. Deas, M. Ouberai, F. A. Aprile, R. Arranz, S. Ness, C. Roodveldt, T. Williams, E. J. DeGenst, D. Klenerman, N. W. Wood, T. P. J. Knowles, C. Alfonso, G. Rivas, A. Y. Abramov, J. M. Valpuesta, C. M. Dobson and N. Cremades, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, **112**, E1994–E2003.
- 55 K.-C. Chou, M. Pottle, G. Némethy, Y. Ueda and H. A. Scheraga, *J. Mol. Biol.*, 1982, **162**, 89–112.
- 56 K. Kobayashi, J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.*, 1995, **107**, 79–81.
- 57 S. Mukherjee, P. Chowdhury and F. Gai, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 4596–4602.
- 58 S. J. Prestrelski, N. Tedeschi, T. Arakawa and J. F. Carpenter, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 661–671.
- 59 K. Griebenow and A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 10969–10976.
- 60 A. Dong, J. Prestrelski, D. Allison and F. Carpenter, *J. Pharm. Sci.*, 1995, **84**, 415–424.
- 61 E. J. Castillo, J. L. Koenig and J. M. Anderson, *Biomaterials*, 1986, **7**, 89–96.
- 62 E. J. Castillo, J. L. Koenig, J. M. Anderson and N. Jentoft, *Biomaterials*, 1986, **7**, 9–16.
- 63 E. J. Castillo, J. L. Koenig, J. M. Anderson and J. Lo, *Biomaterials*, 1985, **6**, 338–345.
- 64 Y. Lin, Y. Fichou, Z. Zeng, N. Y. Hu and S. Han, *ACS Chem. Neurosci.*, 2020, **11**, 615–627.
- 65 W. M. Babinchak, R. Haider, B. K. Dumm, P. Sarkar, K. Surewicz, J. K. Choi and W. K. Surewicz, *J. Biol. Chem.*, 2019, **294**, 6306–6317.
- 66 S. Alberti and D. Dormann, *Annu. Rev. Genet.*, 2019, **53**, 171–194.
- 67 S. Ray, N. Singh, R. Kumar, K. Patel, S. Pandey, D. Datta, J. Mahato, R. Panigrahi, A. Navalkar, S. Mehra, L. Gadhe, D. Chatterjee, A. S. Sawner, S. Maiti, S. Bhatia, J. A. Gerez, A. Chowdhury, A. Kumar, R. Padinhateeri, R. Riek,



- G. Krishnamoorthy and S. K. Maji, *Nat. Chem.*, 2020, **12**, 705–716.
- 68 M. C. Hardenberg, T. Sinnige, S. Casford, S. Dada, C. Poudel, L. Robinson, M. Fuxreiter, C. Kaminski, G. S. Kaminski Schierle, E. A. A. Nollen, C. M. Dobson and M. Vendruscolo, *bioRxiv*, 2020, DOI: 10.1101/2020.06.08.140798v2.
- 69 M. Balbirnie, R. Grothe and D. S. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 2375–2380.
- 70 S. M. Decatur and S. A. Petty, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13488.
- 71 B. Tarus, J. E. Straub and D. Thirumalai, *J. Mol. Biol.*, 2005, **345**, 1141–1156.
- 72 M. G. Krone, L. Hua, P. Soto, R. Zhou, B. J. Berne and J. E. Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11066–11072.
- 73 T. Vajda and A. Perczel, *J. Pept. Sci.*, 2014, **20**, 747–759.
- 74 A. K. Srivastava, J. M. Pittman, J. Zerweck, B. S. Venkata, P. C. Moore, J. R. Sachleben and S. C. Meredith, *Protein Sci.*, 2019, **28**, 1567–1581.
- 75 F. Grigolato, C. Colombo, R. Ferrari, L. Rezabkova and P. Arosio, *ACS Nano*, 2017, **11**, 11358–11367.
- 76 W. Peelaerts, L. Bousset, A. Van der Perren, A. Moskalyuk, R. Pulizzi, M. Giugliano, C. Van den Haute, R. Melki and V. Baekelandt, *Nature*, 2015, **522**, 340–344.
- 77 D. Naber, U. Korte and K. Krack, *Exp. Gerontol.*, 1979, **14**, 59–63.
- 78 Z. Nagy, K. Nagy and G. Lustyik, *Exp. Brain Res.*, 1982, (suppl. 5), 118–122.
- 79 E. Nagy, I. Nagy, K. Nagy, V. Nagy and A. Kalmar, *Exp. Gerontol.*, 1981, **16**, 229–240.
- 80 W. Hoyer, T. Antony, D. Cherny, G. Heim, T. M. Jovin and V. Subramaniam, *J. Mol. Biol.*, 2002, **322**, 383–393.
- 81 I. M. Van Der Wateren, T. P. J. Knowles, A. K. Buell, C. M. Dobson and C. Galvagnion, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 5506–5516.
- 82 M. Johnson, A. T. Coulton, M. A. Geeves and D. P. Mulvihill, *PLoS One*, 2010, **5**, 1–5.



Anexo II: Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species and Their Possible Roles in Disease



The role of water in the primary nucleation of protein amyloid aggregation

José D. Camino, Pablo Gracia, Nunilo Cremades*

Biocomputation and Complex Systems Physics Institute (BIFI)-Joint Unit BIFI-IQFR(CSIC), Universidad de Zaragoza, Zaragoza 50018, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Amyloid aggregation
Primary nucleation
Water activity
Intrinsically disordered proteins
Homogeneous nucleation
Liquid-liquid phase separation

ABSTRACT

The understanding of the complex conformational landscape of amyloid aggregation and its modulation by relevant physicochemical and cellular factors is a prerequisite for elucidating some of the molecular basis of pathology in amyloid related diseases, and for developing and evaluating effective disease-specific therapeutics to reduce or eliminate the underlying sources of toxicity in these diseases. Interactions of proteins with solvating water have been long considered to be fundamental in mediating their function and folding; however, the relevance of water in the process of protein amyloid aggregation has been largely overlooked. Here, we provide a perspective on the role water plays in triggering primary amyloid nucleation of intrinsically disordered proteins (IDPs) based on recent experimental evidences. The initiation of amyloid aggregation likely results from the synergistic effect between both protein intermolecular interactions and the properties of the water hydration layer of the protein surface. While the self-assembly of both hydrophobic and hydrophilic IDPs would be thermodynamically favoured due to large water entropy contributions, large desolvation energy barriers are expected, particularly for the nucleation of hydrophilic IDPs. Under highly hydrating conditions, primary nucleation is slow, being facilitated by the presence of nucleation-active surfaces (heterogeneous nucleation). Under conditions of poor water activity, such as those found in the interior of protein droplets generated by liquid-liquid phase separation, however, the desolvation energy barrier is significantly reduced, and nucleation can occur very rapidly in the bulk of the solution (homogeneous nucleation), giving rise to structurally distinct amyloid polymorphs. Water, therefore, plays a key role in modulating the transition free energy of amyloid nucleation, thus governing the initiation of the process, and dictating the type of preferred primary nucleation and the type of amyloid polymorph generated, which could vary depending on the particular microenvironment that the protein molecules encounter in the cell.

1. Introduction

Many neurodegenerative disorders, including Alzheimer's, Parkinson's and the prion disease, are characterized by a conformational conversion of normally soluble, intrinsically disordered proteins (IDPs) or peptides into pathological aggregated species, by a process of self-assembly that leads ultimately to the formation of amyloid fibrils. These amyloid aggregates are primarily composed of one type of protein or peptide that adopts a characteristic and distinctive tertiary structure, named cross- β structure [1–6]. In this particular structure, typically described for long fibrillar aggregates, individual β -strands, allocated perpendicularly to the fibril axis, forms an array of β -sheets that run the length of the fibril [3,5,6]. The high stability of this protein conformation [7], as well as the high structural polymorphism found for the amyloid structure [8,9], arises primarily from the strength, and permutability, of the intermolecular hydrogen bond networks generated

between groups of the main chain of the polypeptide chains. As a consequence, the amyloid cross- β structure is a generic feature of the polypeptide chain itself [10,11], and it can be, therefore, adopted by any peptide and protein regardless of their amino acid sequence or native fold under the appropriate environmental conditions. The predisposition of a given protein or peptide to form amyloid aggregates, however, is modulated by its primary sequence, and more specifically by its amino acid composition [12].

Amyloid aggregation depends on both intrinsic and extrinsic factors. Some intrinsic factors are the number, type and distribution of charge/polar and apolar residues along the polypeptide sequence and the propensity to adopt secondary structure elements [13–15]. IDPs generally lack or present a very low content of aromatic hydrophobic residues, which, together with the typical asymmetrical accumulation of positively and negatively charged residues in different regions of the protein, prevents their folding in the absence of other cellular components. In

* Corresponding author.

E-mail address: ncc@unizar.es (N. Cremades).

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106520>

Received 14 October 2020; Received in revised form 26 November 2020; Accepted 30 November 2020

Available online 5 December 2020

0301-4622/© 2020 The Authors.

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

addition, they have a high net charge at neutral pH, typically negative, which maintains the monomeric conformation highly soluble and hydrated [16,17]. However, some IDPs show certain regions with an inherent propensity to aggregate into amyloid fibrils, which indeed can be predicted from some of the intrinsic factors listed above [14,15]. The initiation of the amyloid aggregation reaction also depends on the physicochemical properties of the environmental conditions in which the polypeptide chains are located, such as protein concentration, pH, ionic strength, temperature, presence of nucleation-active surfaces and hydration degree.

Proteins have evolved in aqueous solutions for millions of years and water is ubiquitously indispensable for life on Earth. Indeed, water activity, the effective water content expressed as its mole fraction, in the interior of cells play a pivotal role in the physiology of living organisms, affecting both the thermodynamics and the kinetics of chemical and biochemical reactions. The solvating water molecules that surround the protein surface (the hydration shell) are fundamental in mediating protein folding, structure and function. The hydration shell or hydration layer of proteins typically extends to around 5-10 Å from the protein surface and the water molecules in this region (sometimes referred to as 'biological' water), because of their interactions with the protein surface, show different properties compared to 'bulk' water [18,19]. The density of water on the surface of proteins has been reported to be significantly higher than that of bulk water [20]. Consequently, the hydration shell water has slower reorientation times and, therefore, slower dynamics and can be highly structured, with some water molecules being so strongly bound to the protein surface that they can crystallize together during protein crystallization and are, thus, occasionally described as being part of the protein structure [19]. Protein function is also linked to its mobility, which, in turn, is coupled to water motion. While the bulk solvent fluctuations control the shape and global motions of proteins, the fluctuations of the dynamics of the hydration shell modulate the protein internal motions, which determine protein function [21–26]. In addition to the structure and function of proteins, water plays a major role in protein folding, ensuring that hydrophobic residues are predominantly sequestered in the protein interior and the water molecules are squeezed out from the hydrophobic core, resulting in an essentially dry, packed protein core [27–30]. Similarly, the folding accompanies a large decrease in the water-accessible surface area with the result that many of the water molecules forming the dense layer of the unfolded state are released to the bulk [31,32]. In addition, water participates in the stabilization of the folded structure through hydrogen bond networks with the protein and the screening of electrostatic interactions, and in some proteins it contributes also to the stabilization of hydrophobic cavities essential for the protein function [33].

In contrast, the effects of water on protein aggregation have been largely overlooked as many interpretations of experimental and computational studies have been carried out from a protein centric perspective. However, the need to include the crucial importance of water in order to understand the biophysical basis of amyloid formation is increasingly appreciated [26,34,35]. Water plays likely multifarious roles at different stages of protein amyloid aggregation, for example during protofilament assembly, as water molecules from the hydration layer need to be released from the interaction surface of protofilaments in order to generate a dry interface [36,37]. A similar effect of water released together with a reduction of the monomer reconfiguration rate once water has been expelled that permits the locking of the monomer to the fibrillar seed, has also been described during the process of fibril elongation [38]. In this perspective we will discuss some of the fundamental effects of water on the first steps of amyloid self-assembly and the role that water activity plays in triggering the amyloid process and governing the type of preferred nucleation mechanism and amyloid pathway. The conclusions presented can help rationalise some aspects of primary nucleation of amyloid aggregation in the context of proteins embedded in aqueous solutions which can experience differences in water activity (i.e. effective water concentration) depending on the

microenvironment that they encounter in the cell.

2. Protein amyloid formation and primary nucleation

Historically, the functional native state of a protein, be it a protein with a particular fold or an IDP conformation, was thought of as the most stable conformation they could adopt. Nowadays, the functional native state of proteins is considered to correspond to a local minimum of the protein conformational landscape, isolated from the more thermodynamically favoured cross- β sheet conformation by energetic barriers [39,40]. Indeed, the cross- β sheet conformation of the peptide backbone has been theoretically shown to be the thermodynamically most stable structure for all possible polypeptides both in vacuum and in aqueous environments by first principle calculations [41] and it has been demonstrated experimentally for a number of proteins and peptides [40].

The process whereby a protein transitions from its native state to the amyloid state implies a highly complex molecular rearrangement of the protein upon self-assembly. The formation of the first amyloid nuclei upon monomer assembly, termed primary nucleation [42–44], typically requires to overcome an extremely high energy barrier [45,46]. For the vast majority of amyloid-prone proteins under hydrated conditions, therefore, amyloid formation kinetics are characterised by a slow, rate-limiting nucleation step [47,48]. Once the first amyloid-competent nuclei are formed, aggregate elongation through monomer addition [47] and/or secondary nucleation at the surface of pre-existing fibrils [49,50] dominate the reaction [44], resulting in the characteristic sigmoidal kinetic traces with a long lag-phase followed by an exponential growth phase that lasts until the equilibrium between aggregates and monomers is reached.

Primary nucleation can occur either in the bulk of the solution, as homogeneous nucleation, or at a particular interface able to catalyse the otherwise energetically disfavoured monomer-monomer interaction, as heterogeneous nucleation [51]. Hydrophobic/hydrophilic interfaces have been found to be critical for the aggregation of many amyloidogenic proteins and peptides at highly hydration conditions, including IDPs such as α -synuclein [52,53], involved in Parkinson's disease, or A β peptide [51], involved in Alzheimer's disease, as well as folded proteins such as insulin [54], involved in insulin-derived amyloidosis. As a matter of fact, currently established *in vitro* assays for studying the aggregation of these proteins necessarily involve a nucleation-inducing interface [55–58] and, therefore, provide insights into the heterogeneous nucleation mechanisms. The amphipathic nature of the sequences of these proteins and peptides, either when unfolded or in helical structural elements, prompt their preferential adsorption at hydrophobic/hydrophilic interfaces in order to simultaneously maximize the hydrophilic interactions in the aqueous environment and the hydrophobic force at the hydrophobic surface [59], and there, they initiate their self-assembly [51,53,57,60,61]. The initiation of primary heterogeneous nucleation, therefore, depends on the relative affinities of the different protein species (monomeric vs oligomeric) for the interface and the degree to which the interfacially-associated monomer lowers the free energy barrier for nucleation. As it has been suggested, this decrease in the nucleation energy barrier is likely associated in part to an increase in local protein concentration and a selection of suitable orientations and nucleation-prone conformations of the polypeptide chains at the interface [57]. In addition, the different behaviour of the water molecules at the interface, i.e. in the vicinity of the hydrophobic surface, with respect to the bulk might play an important role in decreasing the solvation free energy barrier for nucleation at the interface [58]. Under highly hydrating conditions, at physiological pH, temperature and ionic strength, A β peptide and α -synuclein heterogeneous primary nucleation has been shown to dominate over homogeneous nucleation [51,53,58]. Indeed, in the absence of hydrophobic solid surfaces, such as those from the sample containers or stirring bars, the air/water interface typically acts as amyloid nucleating interface in protein solutions *in vitro*

[51,53,57,58]. Other surface-active materials such as polytetrafluoroethylene (PTFE) beads or synthetic lipid vesicles of particular lipid compositions have also been used to accelerate primary nucleation in these systems [51,62–64].

Recently, it has been reported that certain amyloidogenic IDPs, such as tau [65,66], TDP-43 [67,68] and α -synuclein [58,69,70], are able to phase-separate from the aqueous solution generating protein droplets by a process of liquid-liquid phase separation (LLPS) both *in vitro* and *in vivo*, and that in such environment amyloid aggregation is a particularly favourable process. The aggregation into amyloid aggregates inside these phase separated protein droplets, also referred to as liquid-to-solid transition, has been suggested to play a role in the *in vivo* aggregation of amyloidogenic IDPs associated to neurodegenerative diseases [71].

3. The distinct hydration properties of IDPs

The influence of the hydration shell of proteins, particularly that of the IDPs, has been proposed to have a key role in protein aggregation and amyloid formation [35]. The properties of the hydration water molecules of IDPs have been shown to be remarkably different with respect to globular, folded proteins, with much faster dynamics, which in turn is reflected by faster protein dynamics [24,25]. As a consequence, small variations in the solution conditions strongly affect the structure and dynamics of the hydration shell and, therefore, the conformational ensemble of the IDPs, a property that has been suggested to be important for their functional plasticity [72].

In terms of protein self-assembly in IDPs, the consequence of having a highly dynamic conformational reconfiguration would in principle play against aggregation, as it is more difficult that various protein molecules in aggregation-competent conformations associate together for the required time to establish persistent interactions before any of the protein molecules reconfigures to a non-aggregation conformation. If the mobility of water is, however, decreased by the presence of ions [73], osmolytes [74,75], membranes or by cellular crowding or a cellular environment with poor water activity [76], IDP self-association would be, therefore, promoted. Accordingly, when the mobility of human prostatic acidic phosphatase (PAP) fragment PAPf39 and prion protein was reduced by temperature or protein sequence modification, respectively, the aggregation rates of both proteins increased [77,78]. A similar reduction of the monomeric reconfiguration rate was observed for α -synuclein when decreasing the pH of the solution [79]. In this study, the rate of intramolecular diffusion in monomeric α -synuclein was determined by tryptophan-cysteine quenching when the protein is freely diffusing in the bulk of the solution under solvent conditions that have been reported to accelerate or decelerate aggregation, and a correlation between the two parameters was found. The authors suggested that the relative rates between backbone reconfiguration of the monomeric protein and bimolecular association is what dictates the probability and, thus, the rate of the initial amyloid self-assembly. However, this study on the dependence of α -synuclein monomer reconfiguration rate on its self-assembly rate does not take into account that the nucleation of the protein under the conditions used to correlate the propensity for amyloid formation occurs by heterogeneous nucleation at the air/water interface, where the protein backbone reconfiguration rates are likely to differ significantly from those the authors measured in the bulk of the solution. It would be interesting to correlate the conformational reconfiguration rates of the protein when adsorbed at hydrophobic/hydrophilic interfaces with protein aggregation rates, as the monomeric reconfiguration rate, strongly modulated by the protein hydration conditions, likely contributes to the rate of initial protein self-association.

In addition to having an intrinsic highly dynamic hydration shell, the monomeric conformation of amyloidogenic IDPs have been shown to possess a dramatically tuneable energy landscape depending on the particular properties of the solution conditions and thus the properties of the hydration shell. Indeed, some studies have suggested that certain monomeric conformations or intramolecular interactions of particular

amyloidogenic IDPs are required for their self-assembly, and that those are favoured under limited hydration conditions. For example, Thirumalai and co-workers, using MD simulations, proposed that a particular intramolecular salt bridge in the A β peptide (both A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂), essential for its initial self-assembly, requires the expulsion of discrete and tightly bound water molecules that are solvating the residues involved in this interaction [80]. The consequence is that the formation of this key salt bridge in the monomeric protein at highly hydration conditions is highly improbable. In contrast, conditions that favour protein desolvation would result in the stabilization of conformations with the intramolecular bridge formed that would favour oligomer nucleation [80]. Similarly, also using MD simulations, Balupuri *et al.* suggested that the properties of the water network of the hydration shell in the α -synuclein monomeric ensemble are important for the occurrence of an α -strand structure between residues 72-74, which the authors proposed to be relevant for the initial self-assembly of the protein [81]. An earlier experimental study on α -synuclein reported relevant structural changes in the monomeric structural ensemble under conditions of partial desolvation, which in turn promoted its aggregation [82]. Similar structural changes were observed for different desolvation conditions such as the addition of trifluoroethanol or the increase of temperature. Specifically, the authors reported a loss of polyproline-II and a gain in helical secondary structure, as a result of weakened water-protein interactions, and suggested that similar structural changes might occur in other aggregation-prone IDPs [82].

4. The role of water in triggering amyloid self-assembly

Both experimental and computational studies indicate that amyloid formation, protofilament assembly and fibril growth can be thermodynamically driven by a favourable change in entropy associated with the release of confined water molecules from the protein surface to the bulk [37,83–86]. However, only a small number of studies have addressed the effects of water on amyloid primary nucleation [34,35,87]. Most of these studies have been performed by computer simulations, given the experimental difficulties in directly monitoring water activity during protein self-assembly. An interesting study of A β peptide (A β ₁₋₄₂) used a combination of MD simulations with fluctuating thermodynamics analysis to investigate the dimerization of the peptide and found that the interaction of the protein with surrounding water, i.e. the solvation free energy, plays a critical role in its aggregation [88]. They observed that A β monomer release from a membrane environment, where it is initially located, to an aqueous phase after being processed is driven by favourable changes in protein potential energy and configurational entropy, but it is also accompanied by an unfavourable increase in solvation free energy, which the authors suggested is the driving force for dimerization in the bulk of the solution. According to the fluctuating thermodynamics analysis of A β ₁₋₄₂ and that of other amyloidogenic proteins with varying propensities to aggregate, the authors suggested that proteins with higher solvation free energies are more prone to aggregate.

Few experimental studies have implicated dehydration in protein aggregation processes. One of the earliest studies used infrared band-shift to probe backbone hydration of bovine pancreatic ribonuclease A. The authors found a correlation between the status of backbone dehydration, modulated by the addition of ethanol, and protein aggregation [89]. Another example was reported by Mukhopadhyay's group [90]. Using the bovine κ -casein model as amyloidogenic protein, the authors showed that the monomeric state of this protein represents a collapsed IDP globule that contains highly ordered water molecules with profoundly restrained dynamics in the interior of the globule, which would need to be released for β -sheet formation. In a following publication from the same group and using the same protein model, the authors used time-resolved fluorescence spectroscopy to monitor the water dynamics of the amyloid state as compared to the monomeric conformation, and found that there is a significant desolvation of the protein

molecules upon amyloid formation [86]. Their results, therefore, strongly indicate that, at least for this system, amyloid formation can be driven by a positive change in water entropy. Interestingly, other amyloidogenic IDPs such as Sup35, polyQ, α -synuclein and tau have been shown to adopt a collapsed globule conformation under amyloidogenic conditions [91–94]. In the case of tau protein, however, the opposite behavior has also been observed, where extended conformations of the protein were found responsible for amyloid aggregation [95,96].

A seminal experimental study demonstrating the role of protein dehydration on the aggregation kinetics was reported by Gai and collaborators [97]. They studied the dependence of the aggregation kinetics of two amyloid peptides, A β ₁₆₋₂₂ and Sup35₇₋₁₃, on their hydration degree, which was modulated by the use of reverse micelles. The authors varied the number of water molecules inside the micellar core, which in turn varied the physicochemical properties of the entrapped water, and found that protein dehydration promotes aggregation by reducing the water shell protection of the monomeric peptides. In a different study Arya et al., [98] studied the dynamical behaviour of the hydration water molecules along the α -synuclein sequence, and observed differences in the properties of the interfacial water molecules in the central, amyloidogenic region of the protein (the NAC domain) with respect to the N-terminal and C-terminal regions. Concretely, they reported the presence of a relevant number of quasi-bound water molecules within the amyloidogenic region, with significantly restrained dynamics, and, consequently, much longer residence times, as a consequence of the highly hydrophobic character of this protein segment [99]. The fact that the same protein region that presented these trapped or confined water molecules coincides with the region proposed to initiate amyloid self-assembly [100] is in agreement with the idea of the presence of particularly high desolvation free energy barriers for α -synuclein initial self-assembly. In order to reduce the desolvation barrier, Anderson et al. [82] added co-solvents to α -synuclein solution, particularly trifluoroethanol, and found that aggregation was particularly enhanced under conditions where protective protein-solvent interactions are minimized. Consequently, both intramolecular and intermolecular protein interactions are favoured. More recently, Bokor et al. investigated the role the hydration shell plays in the structures of monomeric, oligomeric and fibrillar α -synuclein using a novel approach that evaluates wide-line ¹H NMR spectroscopy results through a thermodynamic framework [101]. Their results indicated that half of the mobile solvation water fraction of monomeric α -synuclein is lost upon oligomer or fibril formation. Similar conclusions showing expulsion of confined water molecules from the protein surface upon amyloid formation were also obtained for tau protein [84,85], the prion protein [102] and insulin [103].

Collectively, these studies show the relevance of water on the initiation of amyloid aggregation in different amyloidogenic systems. One of the reasons why IDPs seem to be more prone to amyloid aggregation might be, thus, related to their larger solvent-accessible surface area as compared to globular, folded proteins. This, together with the presence of restrained water molecules around the solvent-exposed hydrophobic amyloidogenic protein segments and highly confined water molecules in the interior of the globule conformations of the typical amyloidogenic IDPs adopted under aggregation-prone conditions, would lead to a large contribution of the solvation entropy to the overall free energy of amyloid aggregation. Other factors, such as additional unfolding free energy barriers for nucleation in the case of globular proteins, also differentiates amyloid aggregation between globular proteins and IDPs [104]. The higher number of interactions between the polypeptide chains and the solvation water molecules in the IDPs, due to their overall higher proportion of polar and charged residues, however, also indicates a large desolvation energy barrier that would need to be overcome for the initial protein self-assembly. MD simulations showed that protofilament formation is 1,000 times slower for a highly hydrophilic polypeptide than for a highly hydrophobic one [37]. From these studies, therefore, it is evident that water has at least a dual effect on primary amyloid nucleation. On the one side, the initiation of self-assembly of an

amyloidogenic protein or peptide is thermodynamically favoured in aqueous solutions due to a large solvation entropy contribution, so that the more solvated the monomeric conformation, the more thermodynamically favourable its self-assembly. On the other side, the rate of initial self-assembly, associated with the energy barrier that the protein molecules need to overcome for nucleation, might be very slow for highly solvated IDPs, as indicated by a number of experimental observations [57,58,97]. This is also in line with the conclusions obtained from the studies on the backbone reconfiguration rates of the monomeric forms of some amyloidogenic IDPs and their propensity to aggregate [51,78,79]. A reduction in the water activity of the protein microenvironment would result in a reduction of the free energy barrier for nucleation and thus an acceleration of the primary nucleation, and, consequently an acceleration of the overall amyloid aggregation process.

5. Reconciling ideas for the role of water in the heterogeneous primary nucleation

As introduced before, in most of the computational and modelling studies of initial intermolecular protein self-assembly of A β peptide or α -synuclein, two of the most important disease-associated amyloidogenic systems, the nucleation is typically assumed to occur in the bulk of the solution (homogeneous nucleation), while the experimental information of protein aggregation used to correlate the theoretical approaches corresponds in most cases to aggregation processes that have been initiated at the surface of an active interface (heterogeneous nucleation), typically at the air/water interface. While these studies provide relevant insights into the homogeneous nucleation of the proteins/peptides, the analysis of heterogeneous nucleation requires the incorporation of the interaction of the proteins with the nucleation-active interfaces and the modulation of the conformational ensemble and dynamics of the monomeric protein when adsorbed to the interface.

We have recently studied the initiation of α -synuclein amyloid formation in the presence of the air/water interface, but in the absence of other nucleation-active interfaces, at quiescent conditions (without sample agitation) and found that, in agreement with previous studies [57,61], under high hydration conditions the protein is unable to form a significant number of aggregate nuclei either by homogeneous or heterogeneous nucleation. Consequently, no apparent amyloid aggregation was observed for more than 7-10 days of incubation, despite the interface being fully covered by the protein. In contrast, when the same experiments were performed with the addition of co-solvents to induce mild protein dehydration, we observed induction of aggregation within the first 1-2 days of incubation, independently of the type of co-solvent used to promote the thinning of the protein hydration shell [58]. These results complement those previously performed by the groups of Uversky [105] and Eliezer and Webb [82,106], which already suggested an important role of protein desolvation in triggering α -synuclein aggregation under conditions at which we now know nucleation occurs at the hydrophobic/hydrophilic interfaces, i.e. by heterogeneous nucleation. The heterogeneous primary nucleation of α -synuclein at the air/water interface at quiescent conditions requires, therefore, a reduction of the water activity of the protein solution, as compared to the highly diluted typical *in vitro* conditions, in order to form a significant number of nuclei at the interface to trigger the macroscopic reaction. The ideas and concepts extracted from the computational and modelling studies of amyloid self-assembly assuming homogeneous primary nucleation seems, therefore, to hold also for heterogeneous primary nucleation. In both cases, a reduction of the desolvation free energy barrier favours amyloid nucleation.

6. A significant reduction in water activity of the solution favours homogeneous nucleation

We have recently observed that α -synuclein can form amyloid aggregates without the need of a nucleation-active surface through

homogeneous nucleation under limited hydration conditions, such as those induced by the addition of certain co-solvents known to thinning the protein hydration shell, or those found in the interior of α -synuclein droplets by LLPS [58]. Interestingly, we have observed that when the protein undergoes this process, there is a preference for a remarkably different amyloid polymorph, with an antiparallel intermolecular β -sheet arrangement, in contrast to the parallel β -sheet architecture adopted when heterogeneous nucleation dominates. We have proposed that the origin for the preference of the parallel or the antiparallel β -sheet structure in the α -synuclein amyloid aggregates is likely related to the type of primary nucleation favoured under the particular solution conditions. When α -synuclein aggregation is triggered by heterogeneous nucleation, the pre-nucleus of amyloid structure formed at a given hydrophobic/hydrophilic interface would inevitably adopt a parallel intermolecular β -sheet arrangement given the restrictions in the disposition and orientation of the polypeptide chains anchored through their N-terminal amphipathic region to the interface. When the aggregation is triggered by homogeneous nucleation, however, there is no restriction in the orientation of the protein molecules in the bulk, and the antiparallel orientation of the β -sheets would be preferred over the parallel arrangement, as the stability of the hydrogen bonds in such configuration is generally higher [107,108].

The formation of amyloid aggregates rich in intermolecular antiparallel β -sheets under limited hydration conditions has been also reported for other amyloidogenic peptides. Mukherjee *et al.* studied the aggregation of a series of amyloidogenic peptides, including $A\beta_{16-22}$ and Sup35⁷⁻¹³, and found that when polypeptide aggregation was significantly accelerated under limited hydration conditions, the aggregates formed showed a preference for antiparallel β -sheet conformations [97,109]. This amyloid β -sheet configuration has also been found for hydrophobic peptides, such as the $A\beta_{16-22}$ or $A\beta_{24-36}$ peptide, when nucleating in the bulk under hydrated conditions [110], although for longer peptides both parallel [111–114] and antiparallel [74,115,116] configurations have been observed upon self-assembly by MD simulations.

The intermolecular antiparallel β -sheet structure has been previously proposed to be distinctive of stable, particularly toxic oligomers of α -synuclein and other amyloidogenic systems [117–120]. Due to the stability of such oligomers, as result of their slow elongation and disaggregation rates, and the differences in the β -sheet arrangement of their structure as compared to the typical amyloid fibrils generated by heterogeneous nucleation, these oligomers have been proposed to be off-pathway by some researchers. However, in the light of our recent findings, at least some of these oligomers are best described as on-pathway species of an amyloid aggregation pathway triggered by homogeneous nucleation under limited hydration conditions. Indeed, a significant number of protocols to generate the stable antiparallel β -sheet oligomers reported to date include a lyophilisation step (or the peptide/protein stock is lyophilised) that is critical for their formation.

Interestingly, a multitude of a priori non-amyloidogenic proteins belonging to different structural classes, including ordered proteins, such as lactate dehydrogenase, phosphofructokinase, γ -interferon, bovine pancreatic trypsin inhibitor or chymotrypsin, and disordered peptides including poly(L-lysine) have been also reported to aggregate acquiring an antiparallel β -sheet structure during the lyophilisation process [121–123]. The degree of aggregation of the folded proteins under lyophilisation has been related to the degree to which the protein unfolds under dehydration, as addition of protein stabilizers that preserve the native structure during dehydration minimises aggregation [121,124]. Similarly, hydrophobic surfaces provide denaturing conditions for globular, folded proteins able to interact with such surfaces through solvent-exposed hydrophobic regions. At the same time, a local reduction of the water activity at the interface with the hydrophobic surface would facilitate the formation of intermolecular hydrogen bonds and, thus, surface-induced aggregation. This phenomenon has been observed for a number of folded proteins such as β -lactoglobulin, which

when adsorbed to hydrophilic/hydrophobic interfaces suffers self-aggregation with the formation of intermolecular antiparallel β -sheet structure [125]. Other examples of aggregation with a preference for antiparallel β -sheet structure upon adsorption on hydrogels without apparent preferential protein orientations (which otherwise would favour the formation of intermolecular parallel β -sheet structure) have been reported for lysozyme, mucin and γ -globulin by Castillo *et al.* [126–128]. The authors also reported protein denaturation as a preliminary step for surface-induced aggregation, which at the same time was favoured in the presence of more hydrophobic hydrogels [126].

Conditions of limited protein hydration occurring at high temperatures have also been reported to induce the aggregation of a large number of proteins regardless of their native structural topology [129], including bovine serum albumin [130], azurin [131], β -lactoglobulin [132], cholera toxin [133], adenylate cyclase [134], cytochrome c [135], chymotrypsinogen [136], acetylcholinesterase [137] and ribonuclease A [138]. A common feature in all these studies is the formation of aggregates with an intermolecular hydrogen-bonded antiparallel β -sheet structure, represented by the low-frequency band around 1620 cm^{-1} and associated weaker high-frequency band around 1685 cm^{-1} in the amide I region of the infrared spectra [129].

All these studies together, therefore, suggest that the formation of antiparallel β -sheet amyloid aggregates might be a general process of the polypeptide chains that is triggered under limited hydration conditions by a mechanism of homogeneous primary nucleation similar to that we have described recently for α -synuclein [58].

7. Amyloid aggregation inside protein droplets generated by LLPS

Liquid-liquid phase separation (LLPS), also referred to as demixing, has been long observed within certain aqueous mixtures of two or more components such as synthetic polymers, proteins, salts, nucleic acids or polysaccharides. More recently, growing experimental evidence indicates that this process can also occur inside cells giving rise to what has been referred to as membrane-less organelles. These are formed mostly by proteins, either specific multivalent modular folded proteins or particular types of IDPs, and, in some cases, also by RNA/DNA molecules [139–141]. The formation of these phase-separated cellular compartments, as well as the content and relative proportion of these condensates, is tightly regulated by the cell [141], in agreement with the relevant role these membrane-less organelles have in the context of important cellular functions such as biochemical catalysis, RNA transcription, cell cycle and autophagy control among others [142]. Consequently, a change in the phase-separating behaviour of the molecular components or a failure in the regulation of the formation/dissolution of these protein droplets can bring about pathological effects. One of such undesired consequences is the liquid-to-solid transition of the protein droplets with the formation of amyloid aggregates [141].

The driving force for LLPS in aqueous solutions has been proposed to be the relative strength of the interactions between macromolecules and between the macromolecules and water according to the Flory-Huggins theory [143,144]. However, the ordering of hydration water molecules has been proposed to be also key to phase separation [143,144]. Experimental observations of *in vitro* polymer-driven LLPS suggest that alteration of water properties, induced by either the polymers and salts of the solutions or factors such as temperature or pressure, modulates phase separation and it has been proposed that such alterations induced by IDPs play an important role in intracellular phase separation [145,146]. For example, salts have been shown to affect protein-driven LLPS, even in systems in which electrostatics have been shown to represent a minor factor, with a relevant role of salt-mediated changes in hydration energies [145]. Also, hydrostatic pressure, which alters water structure, has been shown to modulate *in vitro* LLPS of lysozyme [147,148]. Another example is the role of water in the temperature-

induced phase separation of a number of hydrophobic polymers [145], although a general effect of water in temperature-dependent phase separation processes of both hydrophilic and hydrophobic IDPs is expected [149,150]. LLPS, therefore, might be triggered by a balance of enthalpically favourable intermolecular interactions and the increase of solvent entropy by the release of water molecules from the solute surface to the bulk [151].

In the interior of the protein droplets, where protein-protein interactions are preferred over protein-water interactions and water has been largely expelled, a significant local concentration of the protein and consequently a significant reduction in water content is expected. For example, estimations of the protein concentration and water content of an elastin-like polypeptide droplet with respect to the typical diluted conditions indicated that inside the droplet the concentration of the protein increased ca. 100 times and the water content decreased to ca. 60 % [152]. In such conditions, and according to our recently reported results [58], protein self-assembly with the formation of antiparallel β -sheet amyloid aggregates by a homogeneous primary nucleation could be favoured. We have observed such mechanism to occur inside α -synuclein droplets generated *in vitro* by LLPS. Under highly hydrating conditions, the desolvation free energy barrier for α -synuclein self-assembly in the absence of any hydrophobic surface that could accelerate nucleation (see Fig. 1A-B) is remarkably high, and thus kinetically disfavoured (Fig. 1C). Under conditions of protein phase separation, however, a significant number of water molecules of the protein hydration shell have been already expelled to the bulk of the solution in order to generate the protein droplets, and, consequently, amyloid aggregation is greatly enhanced by reducing the initial self-assembly energy barrier (see Fig. 1D). While the local concentration of the protein in the interior of the protein droplets certainly favours aggregation, we have observed that the sole exposition of low micromolar concentrations of α -synuclein to limited hydration conditions is enough to dramatically accelerate amyloid homogeneous nucleation [58]. Recent work on the liquid-to-solid transition of tau after LLPS shows that the type of interaction promoting LLPS might be responsible for dictating whether the system proceeds to maturation and amyloid aggregation [153]. In particular, hydrophobic interactions and, indeed, interfacial dehydration, have been proposed to be required for amyloid formation in this system.

Given the intrinsic ability of certain amyloidogenic IDPs to phase separate from the cytoplasm/nucleoplasm, and the general process of amyloid aggregation of the polypeptide chains by homogeneous nucleation under limited hydration conditions that we have described above, we propose that amyloid homogeneous nucleation might be a relevant *in vivo* amyloid pathway for α -synuclein and other amyloidogenic IDPs.

8. Conclusions

By understanding the mechanisms and factors that trigger self-association in amyloidogenic IDPs we may better interpret how amyloid aggregation initiates *in vivo* and how this process yields different amyloid polymorphs that could be related to distinct neurodegenerative disorders. The increasing number of recent studies on the nature of water structure and dynamics around IDPs and its influence on their interactions and ability to suffer LLPS and self-assembly strengthen the notion that water plays a central role in protein amyloid aggregation and in particular in its primary nucleation step. The initiation of amyloid aggregation likely results from a synergistic effect between both intermolecular protein interactions and the properties of the water hydration layer of the protein surface. While the self-assembly into amyloid structures of the typical hydrophilic IDPs would be thermodynamically favoured, due to a large water entropy contribution, a large desolvation energy barrier, however, prevents their nucleation under hydration conditions. This scenario seems to be the case for both heterogeneous and homogeneous primary nucleation. Indeed, the extent of water activity of the protein microenvironment seems to be essential not only for

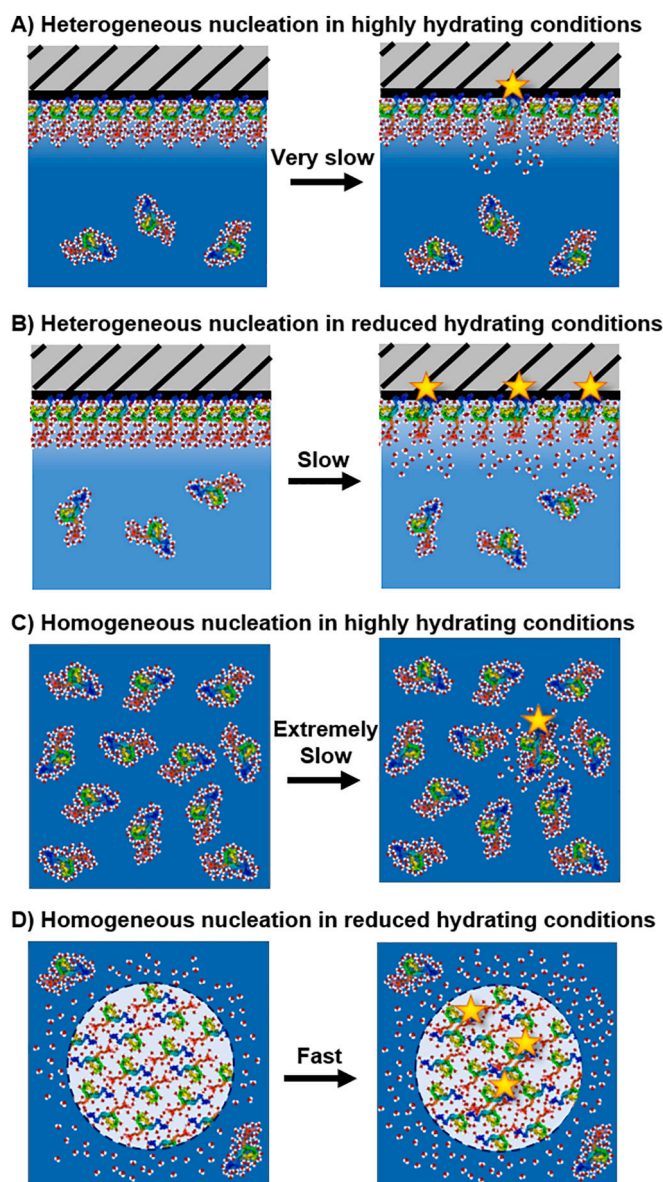


Fig. 1. Scheme for the possible role of water in heterogeneous and homogeneous amyloid nucleation. The process of amyloid aggregation in IDPs, and particularly its primary nucleation step, can be thermodynamically favoured, due to a large water entropy contribution. The process, however, is kinetically disfavoured under highly hydrating conditions because of the large desolvation free energy barrier of the monomeric state of the typically highly polar, amyloidogenic IDPs. Hydrophobic surfaces can catalyse amyloid nucleation in aqueous solutions (heterogeneous nucleation), although it is typically a rather slow process under highly hydrating conditions (panel A; highly hydrating protein environment is depicted in dark blue), as for example described in α -synuclein, but can be accelerated under conditions of reduced protein hydration (panel B; protein environment with a reduced water activity is depicted in light blue). In the absence of nucleation-active surfaces, homogeneous amyloid nucleation is an extremely slow process under highly hydrating conditions (panel C), but it is dramatically accelerated under conditions of limited hydration, such as those found in the interior of protein droplets generated by LLPS (panel D; the interior of the protein droplet, with a significantly reduced water activity, is depicted in very light blue).

regulating the energy barrier of primary nucleation (either heterogeneous or homogeneous), but also for dictating the preference for the type of primary nucleation and the type of structural amyloid polymorphs generated. Under highly hydrating conditions, the large desolvation free energy for the initial peptide assembly, largely due to the high content in

polar and charged residues of the typical amyloidogenic IDPs, would maintain the peptides monomeric. But at lower hydration conditions, the reduction in the free energy barrier would trigger aggregation either by heterogeneous or homogeneous primary nucleation depending on the presence of hydrophobic surfaces and the extent of water content of the protein microenvironment. Interestingly, water may also have a crucial role in the formation of protein droplets by LLPS, and in this microenvironment of particularly low water activity amyloid aggregation is kinetically and thermodynamically highly favourable. Under such conditions, therefore, the protein can initiate its self-assembly into amyloid aggregates by homogeneous primary nucleation.

The interior of a cell is a highly crowded environment with an overall restriction in the water accessibility and dynamics as compared to the highly diluted protein solutions of typical *in vitro* experiments. The majority of water inside cells has been proposed to be involved in slow (at least an order of magnitude slower than bulk water), collective motions, with only trace amounts of “bulk-like” water, despite 50-70% water content by volume [154]. Also, different cellular compartments and microenvironments have very different physicochemical properties and water activities, which likely has a direct impact on the structural conformation of IDPs [155] and on the magnitude of their energy barrier for amyloid nucleation. Water strongly modulates the energy barrier for nucleation, preventing nucleation at highly hydrating conditions, favouring heterogeneous nucleation in the presence of nucleation-active surfaces at diluted conditions, or favouring homogeneous nucleation under conditions of limited hydration conditions such as those found in the interior of membrane-less organelles. Establishing whether homogeneous or heterogeneous primary nucleation occurs *in vivo* and their involvement in the formation of amyloid aggregates in disease requires further investigation. However, at this point, it is reasonable to speculate that the presence of multiple cellular microenvironments, with a range of water contents and dynamics, might lead to the formation of amyloid aggregates by both nucleation mechanisms. And that, in consequence, structurally different amyloid polymorphs could be formed depending on the cellular context that the protein encounters. Interestingly, a decrease in the water content in brain cells, likely as a consequence of an increased total intracellular protein concentration with advancing age has been reported [156–158], which may also contribute to the increased incidence of amyloid formation and, therefore, neurodegenerative diseases in the aged population.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

NC dedicates this manuscript to Prof. Christopher M. Dobson. “*Thank you Chris for being much more than a scientific mentor to me. Your intelligence, your wisdom, your passion, your empathy and your sense of humour will always be with me*”. The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO), the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (MICIU) and the European Commission (FEDER) (Grants RYC-2012-12068, BFU2015-64119-P and PGC2018-096335-B-I00).

References

- [1] A.W.P. Fitzpatrick, G.T. Debelouchina, M.J. Bayro, D.K. Clare, M.A. Caporini, V. S. Bajaj, C.P. Jaronec, L. Wang, V. Ladizhansky, S.A. Müller, et al., Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 5468–5473.
- [2] M. Fändrich, C.M. Dobson, The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation, *EMBO J.* 21 (2002) 5682–5690.
- [3] D. Eisenberg, M. Jucker, The amyloid state of proteins in human diseases, *Cell* 148 (2012) 1188–1203.
- [4] J.L. Jiménez, J.I. Guijarro, E. Orlova, J. Zurdo, C.M. Dobson, M. Sunde, H. R. Saibil, Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing, *EMBO J.* 18 (1999) 815–821.
- [5] M. Sunde, L.C. Serpell, M. Bartlam, P.E. Fraser, M.B. Pepys, C.C.F. Blake, Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction, *J. Mol. Biol.* 273 (1997) 729–739.
- [6] M.R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M.I. Ivanova, S.A. Sievers, M.I. Apostol, M.J. Thompson, M. Balbirnie, J.J.W. Wiltzius, H.T. McFarlane, et al., Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers, *Nature* 447 (2007) 453–457.
- [7] T.P.J. Knowles, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, The amyloid state and its association with protein misfolding diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 384–396.
- [8] R. Tycko, Amyloid Polymorphism: Structural Basis and Neurobiological Relevance, *Neuron* 86 (2015) 632–645.
- [9] W. Close, M. Neumann, A. Schmidt, M. Hora, K. Annamalai, M. Schmidt, B. Reif, V. Schmidt, N. Grigorieff, M. Fändrich, Physical basis of amyloid fibril polymorphism, *Nat. Commun.* 9 (2018) 699.
- [10] C.M. Dobson, Protein misfolding, evolution and disease, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 329–332.
- [11] C.M. Dobson, Protein folding and misfolding, *Nature* 426 (2003) 884–890.
- [12] E.D. Ross, H.K. Edskes, M.J. Terry, R.B. Wickner, Primary sequence independence for prion formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 12825–12830.
- [13] F. Chiti, M. Stefani, N. Taddei, G. Ramponi, C.M. Dobson, Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates, *Nature* 424 (2003) 805–808.
- [14] G.G. Tartaglia, M. Vendruscolo, The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1395–1401.
- [15] S. Ventura, J. Zurdo, S. Narayanan, M. Parreño, R. Mangues, B. Reif, F. Chiti, E. Giannoni, C.M. Dobson, F.X. Aviles, et al., Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 7258–7263.
- [16] R.M. Kramer, V.R. Shende, N. Motl, C.N. Pace, J.M. Scholtz, Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility, *Biophys. J.* 102 (2012) 1907–1915.
- [17] S.-H. Chong, S. Ham, Interaction with the surrounding water plays a key role in determining the aggregation propensity of proteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 3961–3964.
- [18] D. Laage, T. Elsaesser, J.T. Hynes, Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules, *Chem. Rev.* 117 (2017) 10694–10725.
- [19] M.-C. Bellissent-Funel, A. Hassanali, M. Havenith, R. Henchman, P. Pohl, F. Sterpone, D. van der Spoel, Y. Xu, A.E. Garcia, Water Determines the Structure and Dynamics of Proteins, *Chem. Rev.* 116 (2016) 7673–7697.
- [20] D.I. Svergun, S. Richard, M.H. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, G. Zaccai, Protein hydration in solution: experimental observation by x-ray and neutron scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2267–2272.
- [21] P.W. Fenimore, H. Frauenfelder, B.H. McMahon, F.G. Parak, Slaving: solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 16047–16051.
- [22] C. Mattea, J. Qvist, B. Halle, Dynamics at the protein-water interface from 170 spin relaxation in deeply supercooled solutions, *Biophys. J.* 95 (2008) 2951–2963.
- [23] L. Aggarwal, P. Biswas, Hydration Water Distribution around Intrinsically Disordered Proteins, *J. Phys. Chem. B* 122 (2018) 4206–4218.
- [24] G. Schirò, Y. Fichou, F.-X. Gallat, K. Wood, F. Gabel, M. Moulin, M. Härtle, M. Heyden, J.-P. Colletier, A. Orecchini, et al., Translational diffusion of hydration water correlates with functional motions in folded and intrinsically disordered proteins, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6490.
- [25] F.-X. Gallat, A. Laganowsky, K. Wood, F. Gabel, L. van Eijck, J. Wuttke, M. Moulin, M. Härtle, D. Eisenberg, J.-P. Colletier, et al., Dynamical coupling of intrinsically disordered proteins and their hydration water: comparison with folded soluble and membrane proteins, *Biophys. J.* 103 (2012) 129–136.
- [26] A.D. Stephens, G.S. Kaminski Schierle, The role of water in amyloid aggregation kinetics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 58 (2019) 115–123.
- [27] R. Zhou, X. Huang, C.J. Margulis, B.J. Berne, Hydrophobic collapse in multidomain protein folding, *Science* 305 (2004) 1605–1609.
- [28] M.B. Hillyer, B.C. Gibb, Molecular Shape and the Hydrophobic Effect, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 67 (2016) 307–329.
- [29] K.A. Dill, Dominant forces in protein folding, *Biochemistry* 29 (1990) 7133–7155.
- [30] R.L. Baldwin, Dynamic hydration shell restores Kauzmann’s 1959 explanation of how the hydrophobic factor drives protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 13052–13056.
- [31] C.-J. Tsai, J.V.J. Maizel, R. Nussinov, The hydrophobic effect: a new insight from cold denaturation and a two-state water structure, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37 (2002) 55–69.
- [32] M. Kinoshita, Importance of translational entropy of water in biological self-assembly processes like protein folding, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 1064–1080.
- [33] Y. Levy, J.N. Onuchic, Water and proteins: a love-hate relationship, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 3325–3326.
- [34] T. Vajda, A. Perczel, Role of water in protein folding, oligomerization, amyloidosis and miniprotein, *J. Pept. Sci.* 20 (2014) 747–759.
- [35] D. Thirumalai, G. Reddy, J.E. Straub, Role of water in protein aggregation and amyloid polymorphism, *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 83–92.
- [36] J. Zheng, B. Ma, C.-J. Tsai, R. Nussinov, Structural stability and dynamics of an amyloid-forming peptide GNNQQNY from the yeast prion sup-35, *Biophys. J.* 91 (2006) 824–833.

- [37] G. Reddy, J.E. Straub, D. Thirumalai, Dry amyloid fibril assembly in a yeast prion peptide is mediated by long-lived structures containing water wires, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 21459–21464.
- [38] N. Schwierz, C.V. Frost, P.L. Geissler, M. Zacharias, Dynamics of Seeded A β 40-Fibril Growth from Atomistic Molecular Dynamics Simulations: Kinetic Trapping and Reduced Water Mobility in the Locking Step, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 527–539.
- [39] E. Gazit, The “Correctly Folded” state of proteins: is it a metastable state? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 257–259.
- [40] A.J. Baldwin, T.P.J. Knowles, G.G. Tartaglia, A.W. Fitzpatrick, G.L. Devlin, S. L. Shammass, C.A. Waudby, M.F. Mossuto, S. Meehan, S.L. Gras, et al., Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 14160–14163.
- [41] A. Perczel, P. Hudák, V.K. Pálfi, Dead-end street of protein folding: thermodynamic rationale of amyloid fibril formation, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 14959–14965.
- [42] W.-F. Xue, S.W. Homans, S.E. Radford, Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 8926–8931.
- [43] T.P.J. Knowles, C.A. Waudby, G.L. Devlin, S.I.A. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E.M. Terentjev, M.E. Welland, C.M. Dobson, An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly, *Science* (80-) 326 (2009) 1533–1537.
- [44] P. Arosio, T.P.J. Knowles, S. Linse, On the lag phase in amyloid fibril formation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 7606–7618.
- [45] A.K. Buell, A. Dhulesia, D.A. White, T.P.J. Knowles, C.M. Dobson, M.E. Welland, Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) 5247–5251.
- [46] S. Auer, C.M. Dobson, M. Vendruscolo, Characterization of the nucleation barriers for protein aggregation and amyloid formation, *HFSP J.* 1 (2007) 137–146.
- [47] J.T. Jarrett, P.T. Lansbury, Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB, *Biochemistry* 31 (1992) 12345–12352.
- [48] E. Chatani, N. Yamamoto, Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid formation, *Biophys. Rev.* 10 (2018) 527–534.
- [49] M. Törnquist, T.C.T. Michaels, K. Sanagavarapu, X. Yang, G. Meisl, S.I.A. Cohen, T.P.J. Knowles, S. Linse, Secondary nucleation in amyloid formation, *Chem. Commun. (Camb)* 54 (2018) 8667–8684.
- [50] S. Linse, Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation, *Biophys. Rev.* 9 (2017) 329–338.
- [51] A.K. Srivastava, J.M. Pittman, J. Zerweck, B.S. Venkata, P.C. Moore, J. R. Sachleben, S.C. Meredith, β -Amyloid aggregation and heterogeneous nucleation, *Protein Sci* 28 (2019) 1567–1581.
- [52] S. Campioni, G. Carret, S. Jordens, L. Nicoud, R. Mezzenga, R. Riek, The presence of an air-water interface affects formation and elongation of α -synuclein fibrils, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 2866–2875.
- [53] J. Pronchik, X. He, J.T. Giurleo, D.S. Talaga, In vitro formation of amyloid from α -synuclein is dominated by reactions at hydrophobic interfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9797–9803.
- [54] F. Grigolato, C. Colombo, R. Ferrari, L. Rezakbova, P. Arosio, Mechanistic origin of the combined effect of surfaces and mechanical agitation on amyloid formation, *ACS Nano* 11 (2017) 11358–11367.
- [55] F. Librizzi, C. Rischel, The kinetic behavior of insulin fibrillation is determined by heterogeneous nucleation pathways, *Protein Sci.* 14 (2005) 3129–3134.
- [56] J. Habchi, S. Chia, C. Galvagnion, T.C.T. Michaels, M.M.J. Bellaiche, F.S. Ruggeri, M. Sanguanini, I. Idini, J.R. Kumita, E. Sparr, et al., Cholesterol catalyses A β 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes, *Nat. Chem.* 10 (2018) 673–683.
- [57] S. Campioni, G. Carret, S. Jordens, L. Nicoud, R. Mezzenga, R. Riek, The presence of an air-water interface affects formation and elongation of α -Synuclein fibrils, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 2866–2875.
- [58] J.D. Camino, P. Gracia, S.W. Chen, J. Sot, I. de la Arada, V. Sebastián, J.L. R. Arondo, F. Goñi, C.M. Dobson, N. Cremades, The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates, *Chem. Sci.* 11 (2020) 11902–11914.
- [59] C. Wang, N. Shah, G. Thakur, F. Zhou, R.M. Leblanc, Alpha-synuclein in alpha-helical conformation at air-water interface: implication of conformation and orientation changes during its accumulation/aggregation, *Chem. Commun. (Camb)* 46 (2010) 6702–6704.
- [60] R. Gaspar, J. Pallbo, U. Weinger, S. Linse, E. Sparr, Ganglioside lipids accelerate α -synuclein amyloid formation, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1866 (2018) 1062–1072.
- [61] C. Galvagnion, A.K. Buell, G. Meisl, T.C.T. Michaels, M. Vendruscolo, T.P. J. Knowles, C.M. Dobson, Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation, *Nat. Chem. Biol.* 11 (2015) 229–234.
- [62] J. Pronchik, X. He, J.T. Giurleo, D.S. Talaga, In vitro formation of amyloid from α -synuclein is dominated by reactions at hydrophobic interfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9797–9803.
- [63] M. Neclua, C.N. Chirita, J. Kuret, Rapid anionic micelle-mediated alpha-synuclein fibrillation in vitro, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46674–46680.
- [64] C. Galvagnion, J.W.P. Brown, M.M. Ouberaï, P. Flagmeier, M. Vendruscolo, A. K. Buell, E. Sparr, C.M. Dobson, Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 7065–7070.
- [65] S. Ambadipudi, J. Biernat, D. Riedel, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, Liquid–liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau, *Nat. Commun.* 8 (2017) 275.
- [66] X. Zhang, Y. Lin, N.A. Eschmann, H. Zhou, J.N. Rauch, I. Hernandez, E. Guzman, K.S. Kosik, S. Han, RNA stores tau reversibly in complex coacervates, *PLOS Biol.* 15 (2017), e2002183.
- [67] H.B. Schmidt, R. Rohatgi, In Vivo Formation of Vacuolated Multi-phase Compartments Lacking Membranes, *Cell Rep* 16 (2016) 1228–1236.
- [68] W.M. Babinchak, R. Haider, B.K. Dumm, P. Sarkar, K. Surewicz, J.-K. Choi, W. K. Surewicz, The role of liquid-liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 6306–6317.
- [69] S. Ray, N. Singh, R. Kumar, K. Patel, S. Pandey, D. Datta, J. Mahato, R. Panigrahi, A. Navalkar, S. Mehra, et al., α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation, *Nat. Chem* 12 (2020) 705–716.
- [70] M.C. Hardenberg, T. Sinnige, S. Casford, S. Dada, C. Poudel, L. Robinson, M. Fuxreiter, C. Kaminski, G.S. Kaminski Schierle, E.A.A. Nollen, et al., Observation of an α -synuclein liquid droplet state and its maturation into Lewy body-like assemblies, *bioRxiv*, 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.06.08.140798>.
- [71] S. Alberti, D. Dormann, Liquid–Liquid Phase Separation in Disease, *Annu. Rev. Genet.* 53 (2019) 171–194.
- [72] P. Rani, P. Biswas, Local Structure and Dynamics of Hydration Water in Intrinsically Disordered Proteins, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 10858–10867.
- [73] K. Takano, Amyloid beta conformation in aqueous environment, *Curr. Alzheimer Res.* 5 (2008) 540–547.
- [74] I. Jahan, S.M. Nayeem, Effect of Osmolytes on Conformational Behavior of Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein, *Biophys. J.* 117 (2019) 1922–1934.
- [75] L.A. Ferreira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Role of solvent properties of water in crowding effects induced by macromolecular agents and osmolytes, *Mol. Biosyst.* 13 (2017) 2551–2563.
- [76] A.M.C. Fragniere, S.R.W. Stott, S.V. Fazal, M. Andreasen, K. Scott, R.A. Barker, Hyperosmotic stress induces cell-dependent aggregation of α -synuclein, *Sci. Rep* 9 (2019) 2288.
- [77] K.R. Srivastava, L.J. Lapidus, Prion protein dynamics before aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 3572–3577.
- [78] K.R. Srivastava, K.C. French, F.O. Tzul, G.I. Makhatazde, L.J. Lapidus, Intramolecular diffusion controls aggregation of the PAPP39 peptide, *Biophys. Chem.* 216 (2016) 37–43.
- [79] B. Ahmad, Y. Chen, L.J. Lapidus, Aggregation of α -synuclein is kinetically controlled by intramolecular diffusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 2336–2341.
- [80] B. Tarus, J.E. Straub, D. Thirumalai, Dynamics of Asp23-Lys28 salt-bridge formation in Abeta10-35 monomers, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 16159–16168.
- [81] A. Balupuri, K.-E. Choi, N.S. Kang, Computational insights into the role of α -strand/sheet in aggregation of α -synuclein, *Sci. Rep.* 9 (2019) 59.
- [82] V.L. Anderson, W.W. Webb, D. Eliezer, Interplay between desolvation and secondary structure in mediating cosolvent and temperature induced alpha-synuclein aggregation, *Phys. Biol.* 9 (2012) 56005.
- [83] G. Reddy, J.E. Straub, D. Thirumalai, Dynamics of locking of peptides onto growing amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 11948–11953.
- [84] A. Pavlova, C.-Y. Cheng, M. Kinnebrew, J. Lew, F.W. Dahlquist, S. Han, Protein structural and surface water rearrangement constitute major events in the earliest aggregation stages of tau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E127–E136.
- [85] Y. Fichou, G. Schirò, F.-X. Gallat, C. Laguri, M. Moulin, J. Combet, M. Zamponi, M. Hürtlein, C. Picart, E. Mossou, et al., Hydration water mobility is enhanced around tau amyloid fibers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 6365–6370.
- [86] S. Arya, A.K. Singh, T. Khan, M. Bhattacharya, A. Datta, S. Mukhopadhyay, Water Rearrangements upon Disorder-to-Order Amyloid Transition, *J. Phys. Chem. Lett* 7 (2016) 4105–4110.
- [87] M. Balbirnie, R. Grothe, D.S. Eisenberg, An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β -sheet structure for amyloid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 2375–2380.
- [88] S.-H. Chong, S. Ham, Distinct role of hydration water in protein misfolding and aggregation revealed by fluctuating thermodynamics analysis, *Acc. Chem. Res.* 48 (2015) 956–965.
- [89] J. Zhang, Y.-B. Yan, Oligomerization and aggregation of bovine pancreatic ribonuclease A: backbone hydration probed by infrared band-shift, *Protein Pept. Lett.* 15 (2008) 650–657.
- [90] S. Arya, S. Mukhopadhyay, Ordered Water within the Collapsed Globules of an Amyloidogenic Intrinsically Disordered Protein, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 9191–9198.
- [91] R.H. Walters, R.M. Murphy, Examining polyglutamine peptide length: a connection between collapsed conformations and increased aggregation, *J. Mol. Biol.* 393 (2009) 978–992.
- [92] R. Krishnan, J.L. Goodman, S. Mukhopadhyay, C.D. Pacheco, E.A. Lemke, A. A. Deniz, S. Lindquist, Conserved features of intermediates in amyloid assembly determine their benign or toxic states, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 11172–11177.
- [93] M. del Carmen Fernández-Ramírez, R. Hervás, M. Menéndez, D.V. Laurents, M. Carrión-Vázquez, Tau amyloidogenesis begins with a loss of its conformational polymorphism, *bioRxiv* (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.158923>.
- [94] S. Basak, G.V.R.K. Prasad, J. Varkey, K. Chattopadhyay, Early sodium dodecyl sulfate induced collapse of α -synuclein conformation with its amyloid formation, *ACS Chem. Neurosci.* 6 (2015) 239–246.

- [95] N.A. Eschmann, E.R. Georgieva, P. Ganguly, P.P. Borbat, M.D. Rappaport, Y. Akdogan, J.H. Freed, J.-E. Shea, S. Han, Signature of an aggregation-prone conformation of tau, *Sci. Rep.* 7 (2017) 44739.
- [96] D. Chen, K.W. Drombosky, Z. Hou, L. Sari, O.M. Kashmer, B.D. Ryder, V.A. Perez, D.R. Woodard, M.M. Lin, M.I. Diamond, et al., Tau local structure shields an amyloid-forming motif and controls aggregation propensity, *Nat. Commun.* 10 (2019) 2493.
- [97] S. Mukherjee, P. Chowdhury, F. Gai, Effect of dehydration on the aggregation kinetics of two amyloid peptides, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 531–535.
- [98] S. Arya, A.K. Singh, K. Bhasne, P. Dogra, A. Datta, P. Das, S. Mukhopadhyay, Femtosecond Hydration Map of Intrinsically Disordered α -Synuclein, *Biophys. J.* 114 (2018) 2540–2551.
- [99] R. Barnes, S. Sun, Y. Fichou, F.W. Dahlquist, M. Heyden, S. Han, Spatially Heterogeneous Surface Water Diffusivity around Structured Protein Surfaces at Equilibrium, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 17890–17901.
- [100] B.I. Giasson, I.V. Murray, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2380–2386.
- [101] M. Bokor, Á. Tantos, P. Tompa, K.-H. Han, K. Tompa, WT and A53T α -Synuclein Systems: Melting Diagram and Its New Interpretation, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3997.
- [102] V. Dalal, S. Arya, S. Mukhopadhyay, Confined Water in Amyloid-Competent Oligomers of the Prion Protein, *ChemPhysChem* 17 (2016) 2804–2807.
- [103] E. Chatani, Y. Tsuchisaka, Y. Masuda, R. Tsenkova, Water molecular system dynamics associated with amyloidogenic nucleation as revealed by real time near infrared spectroscopy and aquaphotomics, *PLoS One* 9 (2014), e101997.
- [104] F. Chiti, C.M. Dobson, Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 15–22.
- [105] L.A. Munishkina, J. Henriques, V.N. Uversky, A.L. Fink, Role of Protein-Water Interactions and Electrostatics in α -Synuclein Fibril Formation, *Biochemistry* 43 (2004) 3289–3300.
- [106] V.L. Anderson, W.W. Webb, A desolvation model for trifluoroethanol-induced aggregation of enhanced green fluorescent protein, *Biophys. J.* 102 (2012) 897–906.
- [107] K. Kobayashi, J.R. Granja, M.R. Ghadiri, β -Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel β -Sheets, *Angew. Chemie Int. Ed. English* 34 (1995) 95–98.
- [108] K.C. Chou, M. Pottle, G. Némethy, Y. Ueda, H.A. Scheraga, Structure of beta-sheets. Origin of the right-handed twist and of the increased stability of antiparallel over parallel sheets, *J. Mol. Biol.* 162 (1982) 89–112.
- [109] S. Mukherjee, P. Chowdhury, F. Gai, Infrared Study of the Effect of Hydration on the Amide I Band and Aggregation Properties of Helical Peptides, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 4596–4602.
- [110] D.K. Klimov, D. Thirumalai, Dissecting the assembly of Abeta16-22 amyloid peptides into antiparallel beta sheets, *Structure* 11 (2003) 295–307.
- [111] L. Qu, S. Fudo, K. Matsuzaki, T. Hoshino, Computational Study on the Assembly of Amyloid β -Peptides in the Hydrophobic Environment, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 67 (2019) 959–965.
- [112] B. Ma, R. Nussinov, Stabilities and conformations of Alzheimer's beta -amyloid peptide oligomers (Abeta 16-22, Abeta 16-35, and Abeta 10-35): Sequence effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 14126–14131.
- [113] M. López de la Paz, G.M.S. de Mori, L. Serrano, G. Colombo, Sequence dependence of amyloid fibril formation: insights from molecular dynamics simulations, *J. Mol. Biol.* 349 (2005) 583–596.
- [114] C. Lee, S. Ham, Characterizing amyloid-beta protein misfolding from molecular dynamics simulations with explicit water, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 349–355.
- [115] T. Zhang, Y. Tian, Z. Li, S. Liu, X. Hu, Z. Yang, X. Ling, S. Liu, J. Zhang, Molecular Dynamics Study to Investigate the Dimeric Structure of the Full-Length α -Synuclein in Aqueous Solution, *J. Chem. Inf. Model.* 57 (2017) 2281–2293.
- [116] Y. Chebaro, N. Mousseau, P. Derreumaux, Structures and thermodynamics of Alzheimer's amyloid-beta $A\beta$ (16-35) monomer and dimer by replica exchange molecular dynamics simulations: implication for full-length $A\beta$ fibrillation, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 7668–7675.
- [117] E. Cerf, R. Sarroukh, S. Tamamizu-Kato, L. Breydo, S. Derclaye, Y.F. Dufrène, V. Narayanaswami, E. Goormaghtigh, J.-M. Ruyschaert, V. Raussens, Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide, *Biochem. J.* 421 (2009) 415–423.
- [118] M.S. Celej, R. Sarroukh, E. Goormaghtigh, G.D. Fidelio, J.-M. Ruyschaert, V. Raussens, Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure, *Biochem. J.* 443 (2012) 719–726.
- [119] S.W. Chen, S. Drakulic, E. Deas, M. Ouberai, F.A. Aprile, R. Arranz, S. Ness, C. Rooveldt, T. Guilleams, E.J. De-Genst, et al., Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E1994–E2003.
- [120] Y. Zou, Y. Li, W. Hao, X. Hu, G. Ma, Parallel β -Sheet Fibril and Antiparallel β -Sheet Oligomer: New Insights into Amyloid Formation of Hen Egg White Lysozyme under Heat and Acidic Condition from FTIR Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 4003–4013.
- [121] K.G. Carrasquillo, C. Sanchez, K. Griebenow, Relationship between conformational stability and lyophilization-induced structural changes in chymotrypsin, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 (2000) 41–53.
- [122] K. Griebenow, A.M. Klibanov, Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995) 10969–10976.
- [123] S.J. Prestrelski, N. Tedeschi, T. Arakawa, J.F. Carpenter, Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers, *Biophys. J.* 65 (1993) 661–671.
- [124] J.F. Carpenter, S.J. Prestrelski, T. Arakawa, Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies, *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1993) 456–464.
- [125] T. Lefèvre, M. Subirade, Formation of intermolecular beta-sheet structures: a phenomenon relevant to protein film structure at oil-water interfaces of emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 263 (2003) 59–67.
- [126] E.J. Castillo, J.L. Koenig, J.M. Anderson, Characterization of protein adsorption on soft contact lenses. IV. Comparison of in vivo spoilage with the in vitro adsorption of tear proteins, *Biomaterials* 7 (1986) 89–96.
- [127] E.J. Castillo, J.L. Koenig, J.M. Anderson, N. Jentoft, Protein adsorption on soft contact lenses. III. Mucin, *Biomaterials* 7 (1986) 9–16.
- [128] E.J. Castillo, J.L. Koenig, J.M. Anderson, J. Lo, Protein adsorption on hydrogels. II. Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces, *Biomaterials* 6 (1985) 338–345.
- [129] A. Dong, S.J. Prestrelski, S.D. Allison, J.F. Carpenter, Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 415–424.
- [130] A.H. Clark, C.D. Tuffnell, Small-angle x-ray scattering studies of thermally-induced globular protein gels, *Int. J. Pept. Protein Res.* 16 (1980) 339–351.
- [131] W.K. Surewicz, A.G. Szabo, H.H. Mantsch, Conformational properties of azurin in solution as determined from resolution-enhanced Fourier-transform infrared spectra, *Eur. J. Biochem.* 167 (1987) 519–523.
- [132] H.L. Casal, U. Köhler, H.H. Mantsch, Structural and conformational changes of beta-lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature, *Biochim. Biophys. Acta* 957 (1988) 11–20.
- [133] W.K. Surewicz, J.J. Leddy, H.H. Mantsch, Structure, stability, and receptor interaction of cholera toxin as studied by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* 29 (1990) 8106–8111.
- [134] E. Labryère, M. Mock, W.K. Surewicz, H.H. Mantsch, T. Rose, H. Munier, R. S. Sarfati, O. Bärzu, Structural and ligand-binding properties of a truncated form of Bacillus anthracis adenylate cyclase and of a catalytically inactive variant in which glutamine substitutes for lysine-346, *Biochemistry* 30 (1991) 2619–2624.
- [135] A. Muga, H.H. Mantsch, W.K. Surewicz, Membrane binding induces destabilization of cytochrome c structure, *Biochemistry* 30 (1991) 7219–7224.
- [136] A.A. Ismail, H.H. Mantsch, P.T. Wong, Aggregation of chymotrypsinogen: portrait by infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1121 (1992) 183–188.
- [137] U. Görne-Tschelnokov, D. Naumann, C. Weise, F. Hucho, Secondary structure and temperature behaviour of acetylcholinesterase. Studies by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Eur. J. Biochem.* 213 (1993) 1235–1242.
- [138] S. Seshadri, K.A. Oberg, A.L. Fink, Thermally denatured ribonuclease A retains secondary structure as shown by FTIR, *Biochemistry* 33 (1994) 1351–1355.
- [139] S.F. Banani, H.O. Lee, A.A. Hyman, M.K. Rosen, Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 285–298.
- [140] A.A. Hyman, C.A. Weber, F. Jülicher, Liquid-liquid phase separation in biology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 39–58.
- [141] Y. Shin, C.P. Brangwynne, Liquid phase condensation in cell physiology and disease, *Science* 357 (2017).
- [142] Y.-P. Chiu, Y.-C. Sun, D.-C. Qiu, Y.-H. Lin, Y.-Q. Chen, J.-C. Kuo, J. Huang, Liquid-liquid phase separation and extracellular multivalent interactions in the tale of galectin-3, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1229.
- [143] M.L. Huggins, Thermodynamic properties of solutions of long-chain compounds, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 43 (1942) 1–32.
- [144] P.J. Flory, Thermodynamics of High Polymer Solutions, *J. Chem. Phys.* 10 (1942) 51–61.
- [145] B.Y. Zaslavsky, V.N. Uversky, In Aqua Veritas: The Indispensable yet Mostly Ignored Role of Water in Phase Separation and Membrane-less Organelles, *Biochemistry* 57 (2018) 2437–2451.
- [146] H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R.M. Vernon, H.S. Chan, R.H.A. Winter, Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications, *Chem. Eur. J.* 25 (2019) 13049–13069.
- [147] J. Schulze, J. Möller, J. Weine, K. Julius, N. König, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, Phase behavior of lysozyme solutions in the liquid-liquid phase coexistence region at high hydrostatic pressures, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 14252–14256.
- [148] R. Winter, Pressure Effects on the Intermolecular Interaction Potential of Condensed Protein Solutions, *Subcell. Biochem.* 72 (2015) 151–176.
- [149] Y. Lin, J. McCarty, J.N. Rauch, K.T. Delaney, K.S. Kosik, G.H. Fredrickson, J.-E. Shea, S. Han, Narrow equilibrium window for complex coacervation of tau and RNA under cellular conditions, *Elife* 8 (2019), e42571.
- [150] R. Wuttke, H. Hofmann, D. Nettels, M.B. Borgia, J. Mittal, R.B. Best, B. Schuler, Temperature-dependent solvation modulates the dimensions of disordered proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 5213–5218.
- [151] S.S. Ribeiro, N. Samanta, S. Ebbinghaus, J.C. Marcos, The synergic effect of water and biomolecules in intracellular phase separation, *Nat. Rev. Chem.* 3 (2019) 552–561.

- [152] S.E. Reichheld, L.D. Muiznieks, F.W. Keeley, S. Sharpe, Direct observation of structure and dynamics during phase separation of an elastomeric protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E4408–E4415.
- [153] Y. Lin, Y. Fichou, A.P. Longhini, L.C. Llanes, Y. Yin, G.C. Bazan, K.S. Kosik, S. Han, Liquid-liquid phase separation of tau driven by hydrophobic interaction facilitates fibrillization of tau, *bioRxiv*, 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.08.05.237966>.
- [154] J.T. King, E.J. Arthur, C.L. Brooks, K.J. Kubarych, Crowding induced collective hydration of biological macromolecules over extended distances, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 188–194.
- [155] F.-X. Theillet, A. Binolfi, T. Frembgen-Kesner, K. Hingorani, M. Sarkar, C. Kyne, C. Li, P.B. Crowley, L. Gierasch, G.J. Pielak, et al., Physicochemical properties of cells and their effects on intrinsically disordered proteins (IDPs), *Chem. Rev.* 114 (2014) 6661–6714.
- [156] I. Nagy, K. Nagy, V. Nagy, A. Kalmár, E. Nagy, Alterations in total content and solubility characteristics of proteins in rat brain and liver during ageing and centrophenoxine treatment, *Exp. Gerontol.* 16 (1981) 229–240.
- [157] D. Naber, U. Korte, K. Krack, Content of water-soluble and total proteins in the aging human brain, *Exp. Gerontol.* 14 (1979) 59–63.
- [158] I.Z. Nagy, K. Nagy, G. Lustyik, Protein and water contents of aging brain, *Exp. brain Res. Suppl* 5 (1982) 118–122.

Anexo III: The role of water in the primary nucleation of protein amyloid aggregation



Review

Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species and Their Possible Roles in Disease

Pablo Gracia ¹, José D. Camino ¹, Laura Volpicelli-Daley ² and Nunilo Cremades ^{1,*}

¹ Joint Unit BIFI-IQFR (CSIC), Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), University of Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain; pgracia@bifi.es (P.G.); jcamino@bifi.es (J.D.C.)

² Center for Neurodegeneration and Experimental Therapeutics, Department of Neurology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA; lvolpicellidaley@uabmc.edu

* Correspondence: ncc@unizar.es

Received: 30 September 2020; Accepted: 27 October 2020; Published: 28 October 2020



Abstract: α -Synuclein amyloid aggregation is a defining molecular feature of Parkinson's disease, Lewy body dementia, and multiple system atrophy, but can also be found in other neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. The process of α -synuclein aggregation can be initiated through alternative nucleation mechanisms and dominated by different secondary processes giving rise to multiple amyloid polymorphs and intermediate species. Some aggregated species have more inherent abilities to induce cellular stress and toxicity, while others seem to be more potent in propagating neurodegeneration. The preference for particular types of polymorphs depends on the solution conditions and the cellular microenvironment that the protein encounters, which is likely related to the distinct cellular locations of α -synuclein inclusions in different synucleinopathies, and the existence of disease-specific amyloid polymorphs. In this review, we discuss our current understanding on the nature and structure of the various types of α -synuclein aggregated species and their possible roles in pathology. Precisely defining these distinct α -synuclein species will contribute to understanding the molecular origins of these disorders, developing accurate diagnoses, and designing effective therapeutic interventions for these highly debilitating neurodegenerative diseases.

Keywords: α -synuclein; amyloid aggregation; oligomer; fibril; polymorph; neurodegenerative disorders; synucleinopathies

1. Introduction

Many neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease and prion disease, are characterized by protein inclusions that are formed by the conformational conversion of normally soluble proteins or peptides into oligomeric intermediates and eventually amyloid aggregates and fibrils by a process referred to as amyloid aggregation [1,2] (Figure 1). Amyloid aggregates, typically with a fibrillar morphology, are protein self-assembled structures composed primarily of one type of protein or peptide, which adopt a characteristic structural architecture, termed the cross- β structure [3–8]. This particular structure consists of arrays of extended β -sheets that run the length of the fiber, in which individual β -strands are arranged in an orientation perpendicular to the fibril axis [3,4,7]. The molecular mechanisms by which proteins adopt this structure is of unquestionable interest, and much progress has been recently made through the development of new experimental approaches, and by combining experimental and theoretical methods using the formalism of chemical kinetics [9–12]. However, there are still important questions that remain to be clarified such as how and why a specific protein starts to self-assemble, how the acquisition of the amyloid structure occurs, and how this process induces toxicity.

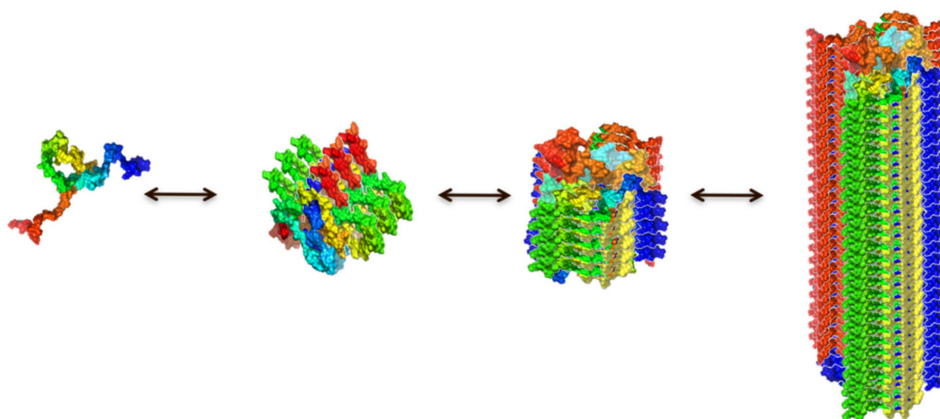


Figure 1. Schematic representation of the process of amyloid formation according to a nucleation-conversion-polymerization model. This model has been proposed for the process of α S aggregation when triggered at conditions of heterogeneous primary nucleation [10]: the initially formed oligomers slowly convert into partially formed β -sheet oligomers that further elongate and generate fully-formed mature fibrils. Note that this is a very simplified linear representation of the real funnel-like conformational landscape of the process.

The pathogenicity of amyloid formation has been associated with both a loss of function of the proteins that aggregate, and a gain of toxic function through the generation and accumulation of aggregated forms of the protein [2,13], which spread within cells and propagate toxicity from cell to cell [14,15]. Preventing the progression and the toxicity associated with amyloid formation, however, requires precise definitions of the protein species that are toxic, and those that are able to spread and recruit more protein units into toxic amyloid aggregates. There is continuous discussion as to which protein aggregated species are more damaging to cells, either the fibrillar-end products of the aggregation reaction or the soluble oligomeric intermediate species [10,13,16–21]. Both oligomeric and fibrillar species of multiple proteins and peptides can induce toxicity by similar mechanisms including membrane perturbation, calcium and metal ion imbalance, oxidative stress, and overload of chaperone and ubiquitin proteasome systems [22–29], which suggests generic aggregation and toxicity pathways between different amyloidogenic proteins and peptides [1,13], as well as possible common mechanisms of toxicity between oligomeric and fibrillar species.

The understanding of the role of the various aggregated species on neurodegeneration has increased even more in complexity with recent studies showing that oligomeric species can be generated via fibril disaggregation processes [10,30,31] and by secondary nucleation mechanisms where the fibrillar surface can catalyze the formation of oligomeric species [32,33]. These results suggest that the fibrillar species and amyloid inclusions can act as a source of soluble oligomeric species, which in turn can generate new fibrillar species. At the same time, variations in the solution conditions or the particular cellular context that the protein encounters leads to structurally different amyloid conformations, also referred to as polymorphs, which have been associated with specific types of pathologies [18,34,35].

In this review, we will focus on the current knowledge of the multitude of α -synuclein (α S) aggregated species generated through amyloid self-assembled processes and the possible roles these species could have in the development and spreading of neurodegeneration, and in the induction of distinctive types of synucleinopathies.

2. α -Synuclein Aggregation and Synucleinopathies

α S is an intrinsically disordered protein of 140 amino acids, widely expressed throughout the body, particularly in the central nervous system, including the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc), excitatory neurons in the cortex, amygdala and olfactory bulb and

inhibitory neurons in the globus pallidus, subthalamic nucleus and substantia nigra pars reticulata [36]. Its primary sequence can be divided into three regions. The N-terminal domain (residues 1–60), which has a predisposition to fold into amphipathic α -helices, particularly upon interaction with lipid membranes [37,38]. The central hydrophobic region (residues 61–95), named nonamyloid β component (NAC) region (due to historical reasons to differentiate this amyloid-prone region in α S from the amyloid β peptide involved in Alzheimer's disease [39,40]), which has a predisposition to fold into either α -helix conformation upon interaction with highly negatively charged lipid membranes [41,42], or β -sheet structure upon self-assembly [43]. And the proline-rich and highly negatively charged (at neutral pH) C-terminal region (residues 96–140), with no structure-forming propensity. There has been some controversy as to what would be the native conformation of the protein at physiological conditions [44]. The most accepted current paradigm is that the protein remains unfolded (as an intrinsically disordered protein, IDP) [45,46] in the cytosol, although with some tertiary contacts between the C-terminal and the NAC and N-terminal regions of the protein [47,48]. Approximately 1/3 fraction of α S in neurons adopts a partially folded α -helical structure [49] upon binding to membranes [50]. The functional conformation of the protein, at least for its role in synaptic vesicle trafficking and neurotransmission release, has been proposed to consist on α -helix-rich oligomers that are assembled on the cellular membranes [49]. However, under pathological conditions, α S self-assembles into amyloid aggregates, with the typical cross- β structure, which can ultimately form amyloid-rich inclusions.

The presence of these amyloid inclusions is the histopathological signature of a number of neurodegenerative disorders collectively referred to as synucleinopathies [51,52]. The three major synucleinopathies include Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA). PD is characterized by motor symptoms such as tremor at rest, slowness of movement, and balance problems. Up to 80% of PD patients develop cognitive changes called PD-dementia [53,54]. Patients with DLB initially present cognitive changes and hallucinations prior to the development of parkinsonism. MSA is characterized by similar motor defects to PD as well as cerebellar ataxia, and autonomic failure. MSA is more similar to prion diseases in that it rapidly progresses and life expectancy is much shorter compared to PD. In addition, a significant proportion of Alzheimer's disease patients also have α S pathology, although in most cases restricted to the amygdala, unlike synucleinopathies [55].

PD is the second most common form of neurodegeneration following Alzheimer's disease. The mean age of onset of the sporadic forms of the disease, which represent 90% of the cases, is approximately 65 years old. In the hereditary forms associated with the α S gene (SNCA), however, there is a much earlier onset of the disease (the most potent mutation being the G51D) with a faster and more severe progression of pathology [56–58]. α S gene (SNCA) duplication, triplication and polymorphisms also cause PD [59–61]. Autosomal dominant inherited mutations in genes including LRRK2 and GBA cause late onset PD with symptoms similar to sporadic PD, while autosomal recessive mutations in other genes such as PINK1 cause early onset forms of parkinsonism [62,63]. LRRK2 and GBA pathological mutations have been reported to increase the formation of α S inclusions [64–67]. It is important to note that not all individuals with LRRK2 mutations show neuronal α S inclusions in postmortem brains, and whether individuals with autosomal recessive mutations have α S pathology (typically referred to as Lewy body pathology) remains questionable. The typical motor symptoms of the disease are a consequence of the degeneration of dopaminergic neurons in the SNc in the basal ganglia of the brain resulting in bradykinesia and rigidity [68]. In addition, there are neuropsychiatric symptoms that occur at later stages, and other non-motor symptoms that have been recently suggested to occur at the early stages of the disease [68].

α S inclusions inside neurons are referred to as Lewy bodies (LBs) and Lewy neurites (LNs) in PD and DLB. In MSA, however, α S accumulates primarily into inclusions found in the cytosol of oligodendrocytes, called glial cytoplasmic inclusions, although a small percentage of neurons can also have α S inclusions [51]. The aggregation of α S into amyloid aggregates is thought to play a key role in the initiation and spreading of these diseases, although controversy remains whether LBs or smaller

polymorphs of aggregates contribute to neuronal defects and toxicity. α S is not only pathologically but also genetically linked to disease. Hereditary mutations in the SNCA gene or duplications and triplications of the wild-type gene lead to autosomal dominant forms of PD and DLB, with an earlier age of disease onset [59,69,70]. In these familial cases, accumulation of α S in LBs and LNs is also observed [51,71], and the cases of triplications in the SNCA gene typically result in a more severe disease progression than in the cases of gene duplication. In addition, a genome-wide association study has shown that individuals with certain polymorphisms of the SNCA gene have a higher risk of developing sporadic PD and MSA [60,72], and some of these polymorphisms have been linked to a higher expression of α S in neurons [73]. Further, the injection of α S amyloid fibrils into the brains of healthy mice induce α S inclusion formation and PD-like pathology [14,74,75].

The genetic evidence, along with the neuropathologic evidence for accumulation of α S in patients with PD and other synucleinopathies, indicates a central role for α S in the pathogenesis of both the inherited and sporadic forms of these diseases. Indeed, evidence suggests a mechanistic link between even slightly higher levels of α S and the formation of α S amyloid aggregates within neurons and the induction of neurodegeneration, likely through the generation and accumulation of toxic α S aggregated species during the process of amyloid self-assembly [76,77].

3. α -Synuclein Aggregation Mechanisms and Pathways

The transition of a protein from its functional, typically monomeric state to the amyloid state is a highly complex process that depends on both intrinsic features of the particular protein and the environmental conditions. Early analysis of in vitro kinetics of formation of amyloid fibrils show that the overall process includes a nucleation step (Figures 1 and 2A), where oligomeric species and a sufficient number of fibril nuclei are formed, followed by an exponential step, reflecting the nuclei-dependent growth through monomer addition, generating protofilaments and eventually mature amyloid fibrils. This type of mechanism has been described by a nucleation-polymerization model [78]. The typical sigmoidal kinetic profiles observed for amyloid formation were interpreted as a greater ease of monomer addition onto already formed aggregates compared to the *de novo* formation of aggregates directly from monomers through nucleation. Consequently, by adding preformed fibrils to a monomeric solution, the nucleation step is bypassed, and the kinetic curves show only the exponential growth step, typically reflecting the elongation process (Figure 2B). The growth of the fibrils by monomer addition onto the fibrillar ends ensures that the structural properties adopted by the newly added protein molecules are identical to those of the molecules of the fibrillar parents in a phenomenon called templating [79], which is analogous to that observed in crystallization. More complex models have been later developed for analyzing the amyloid aggregation mechanism of certain amyloidogenic proteins. One such model is the so-termed nucleation-conversion-polymerization model which includes a structural conversion of the early formed oligomers into β sheet-enriched, elongation competent oligomers [80,81] (see Figure 1).

3.1. Primary Nucleation

Aggregation of α S is typically initiated in vitro by subjecting the protein solution to agitation, either shaking or stirring [82]. Under diluted, highly hydrating conditions, at neutral pH and physiological ionic strength and temperature, α S is not observed to aggregate for more than 7–10 days of incubation without sample agitation. However, when the sample is strongly agitated, aggregation is triggered within 1–3 days, depending on protein concentration and agitation speed. In those conditions, nucleation initiates at the air/water interface or any other hydrophobic/hydrophilic interface present in the sample, such as the hydrophobic coatings of sample containers or stirring bars, by heterogeneous primary nucleation [83,84]. The role of agitation in promoting aggregation could be altering and/or increasing the surface of the nucleation-active air/water interface, and increasing the apparent elongation rate through the multiplication of growth-competent aggregate sites by shearing-induced fibril fragmentation. Given the propensity of the N-terminal region of α S to acquire

amphipathic α -helices, the protein preferentially partitions or adsorbs at hydrophobic/hydrophilic interfaces, in order to simultaneously maximize the hydrophilic interactions in the aqueous environment and the hydrophobic force at the hydrophobic surface [85]. At the interface, the protein initiates self-assembly (under highly hydration conditions), likely as a result of the local increase in protein concentration and the selection of nucleation-efficient conformations upon adsorption. This feature has been indeed used to develop other strategies of inducing aggregation, such as the addition of hydrophobic nanoparticles [86], or larger beads [87], or even lipid vesicles composed of particular (typically non-physiological) types of phospholipids, which have resulted in good nucleation-active surfaces [88,89]. Interestingly, this is not a unique property of α S, since hydrophobic/hydrophilic interfaces have been found to be critical for the aggregation of many other amyloidogenic proteins and peptides, including IDPs such as the A β peptide [90], and folded proteins such as insulin [91].

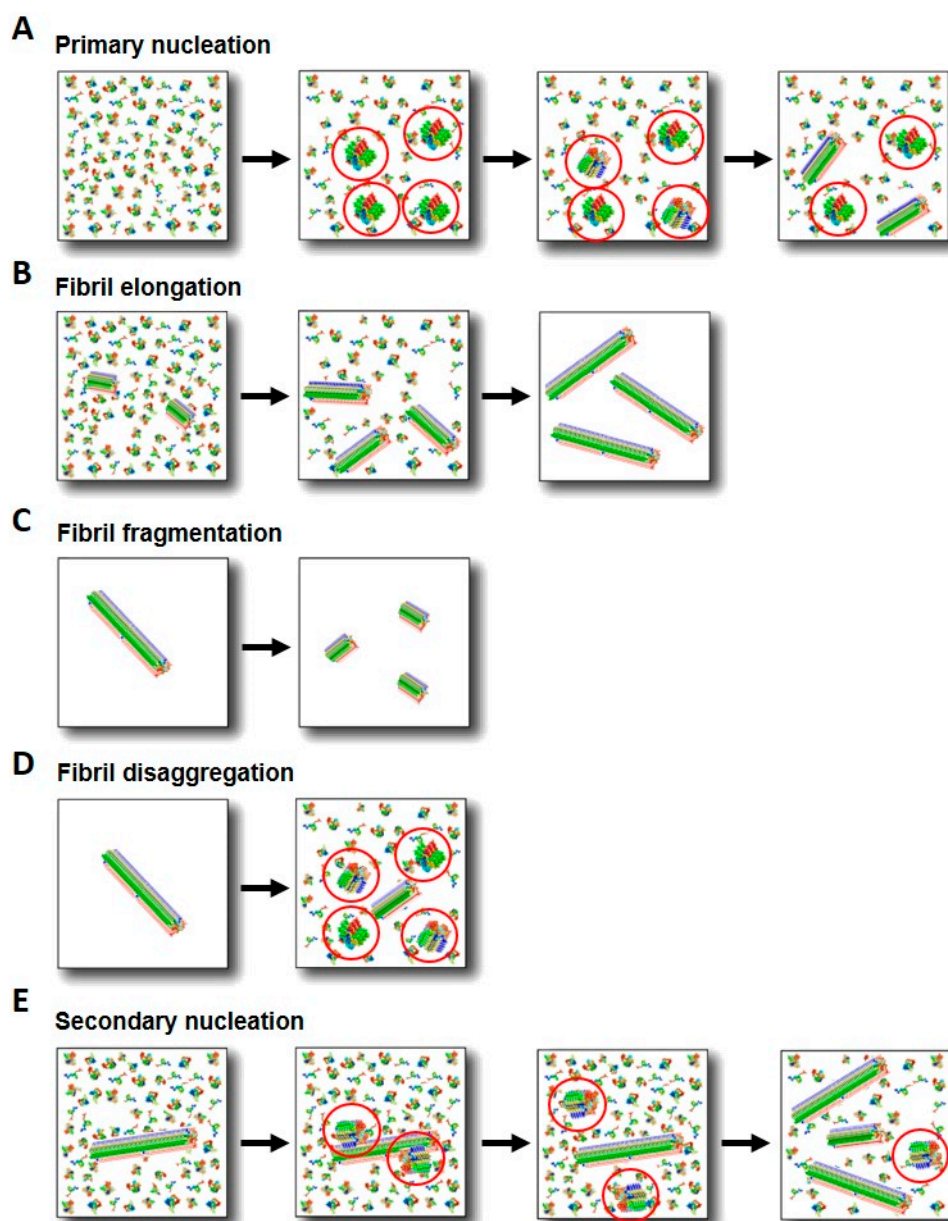


Figure 2. Schematic representation of the different processes that can take place during amyloid fibril formation. Oligomeric species, highlighted with circles for a better visualization, can be generated through primary nucleation (A), but also through fibril disaggregation (D) or secondary nucleation (E) processes. Fibril elongation (B) and fragmentation (C) are also represented.

We have recently observed, however, that α S can form amyloid aggregates without the need of a nucleation-active surface through homogeneous nucleation under limited hydration conditions, and that when the protein undergoes this process, there is a preference for remarkably different amyloid polymorphs. Specifically, there is a preference for an antiparallel β -sheet arrangement, in contrast to the parallel β -sheet architecture adopted when heterogeneous nucleation dominates [92]. The formation of amyloid aggregates rich in intermolecular antiparallel β -sheets under limited hydration conditions has been also reported for other amyloidogenic peptides, and a multitude of a priori non-amyloidogenic proteins belonging to different structural classes, as well as disordered peptides such as poly(L-lysine) [83,93–99].

The antiparallel intermolecular β -sheet structure has been also previously observed in stable, particularly toxic oligomers of α S and other amyloidogenic systems and has been proposed to be distinctive of these toxic species [100–103]. These oligomers have been suggested to be off-pathway by some researchers. In the light of our new findings, they are, however, best described as on-pathway of an amyloid aggregation process triggered by homogeneous nucleation under limited hydration conditions. We noticed that a significant number of protocols to generate the stable antiparallel β -sheet oligomers reported include a lyophilization step or the peptide/protein stock is lyophilized. These stable oligomers represent a good model to investigate the structural and biological properties of pre-fibrillar amyloid oligomers, bearing in mind that some of their properties might differ significantly from those of the parallel β -sheet oligomeric intermediates generated under the typical *in vitro* aggregation reactions (i.e., at the air/water interface), which are more difficult to trap.

One of the cellular microenvironments with a particularly low content of water (by definition) is the interior of protein-rich droplets, generated by liquid-liquid phase separation (LLPS). These phase separated protein droplets likely play a role in the *in vivo* aggregation of a number of amyloidogenic proteins such as tau [104,105], TDP-43 [106,107] and α S [108,109]. Although the mechanism of the liquid-to-solid transition of these protein droplets is unclear, our recent data on the amyloid aggregation inside α S droplets generated *in vitro* suggest that the process is triggered by homogeneous primary nucleation resulting in the formation of amyloid aggregates with a preference for an intermolecular antiparallel β -sheet structure [92]. Whether this mechanism occurs in the liquid-to-solid transition of α S droplets *in vivo* and can take place in other protein-rich droplets of other amyloidogenic proteins needs to be explored.

3.2. Secondary Processes

In addition to primary nucleation (Figure 2A) and templating-based aggregate elongation (Figure 2B), other processes have been shown to be important in the overall amyloid aggregation process, insofar they give rise to different α S self-assembled species, including fibril fragmentation, disaggregation and fibril-catalyzed secondary nucleation [10,12,110–112]. Fibril fragmentation (Figure 2C) implies the rupture of elongated fibrils into smaller fragments, thus resulting in the multiplication of growth-competent fibrillar ends accessible for monomer addition. This can occur at any phase of the self-assembly process [113] and significantly accelerates the apparent fibril growth rate [12]. Prolonged exposure of fibrils to mechanical stress results in the decrease of their length distribution toward a limit that is solely determined by the mechanical properties of the fibrils [114], while maintaining their fibrillar nature. There is no evidence, therefore, that fibril fragmentation can originate significant fractions of oligomeric species. This process is greatly enhanced by shear forces such as those existing in typical α S *in vitro* aggregation setups, but its effect *in vivo* remains unclear.

Oligomeric species are typically assumed to be formed during primary nucleation (Figure 2A), but they can also be generated through secondary processes. The release of α S oligomeric species from fibril disaggregation (Figure 2D) has been observed *in vitro* upon dilution of fibrils [10,112,115], with significant fractions of oligomeric species generated when the fibrils are at concentrations below approximately 1 μ M [10]. This process that has been observed *in vitro*, could be favored in the cellular context through the disaggregation activity of chaperones (see Section 6) or other fibril

destabilizing agents [30] and could be highly relevant in the cell-to-cell transfer if fibrils are released to the extracellular space.

α S amyloid fibrils can be formed with a greatly reduced lag-phase duration by secondary nucleation processes catalyzed at the surface of the amyloid fibrils (Figure 2E). This process implies the *de novo* assembly of monomers onto the surface of pre-assembled aggregates and represents, therefore, a particular type of heterogeneous nucleation. The aggregation of the A β 42 peptide into amyloid fibrils under typical physiological conditions *in vitro* has been shown to be dominated by secondary nucleation processes, once primary nucleation has been triggered [116]. The consequence is a significant amplification of the number of aggregates during the reaction, with the generation of significant concentrations of toxic oligomers [32]. Therefore, secondary nucleation processes have been suggested to play an important role in amyloid spreading in disease scenarios [110,117,118]. In the case of α S, secondary nucleation occurs at mildly acidic pH conditions (under highly hydration conditions) [118], such as those present in endosomes and lysosomes in the cell, and its relevance *in vivo* remains unknown.

3.3. Physicochemical Factors Affecting Amyloid Aggregation Process

A number of physicochemical factors in the solution conditions have been proposed to modulate not only the rate but also the route of amyloid formation in α S and other amyloidogenic proteins and peptides. Different amyloid polymorphs are accumulated upon slight variations in the solution conditions of the aggregation reaction. Among all the factors, three appear to be key in α S: pH, ionic strength and water activity. pH has been shown to modulate the relative rates of elongation and secondary nucleation processes, which not only can affect the structure of the most populated amyloid polymorphs, as explained below, but also the overall rate of aggregate multiplication and, therefore, *in vivo* spreading [118]. The differences in ionic strength seem to affect primarily the folding and packing of the fibrillar structure and thus the preference for a particular amyloid polymorph [119]. In addition, relatively high ionic strengths, including physiological concentrations, increase the formation of higher-order assemblies of fibrils [118], an effect that might be relevant during LB formation. Water activity and, therefore, the protein hydration state have been recently demonstrated to be a key determinant not only for triggering α S self-assembly (maintaining α S monomeric and preventing it from misfolding and self-assembly under highly hydration conditions), but also for dictating the preference for the type of primary nucleation (heterogeneous vs homogeneous) and the type of structural amyloid polymorph generated (parallel vs antiparallel β -sheet structure). Conditions of very poor water activity such as those encountered inside protein-rich droplets, generated by LLPS, have been reported to be particularly efficient in triggering α S amyloid aggregation both *in vitro* and *in vivo* [105,108,109].

Depending on the microenvironment that α S encounters in the cell, therefore, alternative amyloid aggregation mechanisms and pathways would be triggered, leading to the formation of remarkably different amyloid polymorphs.

4. Multiplicity of α -Synuclein Aggregated Species

Two distinct major pools of protein aggregated species can be distinguished during the general process of amyloid aggregation: soluble oligomers, and insoluble fibrillar species. Each of these pools, however, encompasses an array of individual species both in terms of size and structure. In addition, significant variability in terms of ultrastructure has been observed between amyloid aggregates, both in terms of oligomers and fibrils, even if they have similar sizes and secondary structure contents [119,120].

4.1. Fibrillar Polymorphs

In the last few years, and with the great advances of solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) and cryo-electron microscopy (cryo-EM) techniques, a number of structures of different α S fibril polymorphs generated *in vitro* with recombinant protein have been resolved at atomic resolution,

and significant structural differences between the different fibril polymorphs have been observed. In some structures the protofilament fold is similar, typically forming a Greek key structure [121,122], with the differences arising in the packing of the protofilaments (the type of inter-protofilament interactions and mutual disposition between protofilaments) (see Figure 3). Most of the reported fibril structures contain the same central region of the protein as the amyloid core, including residues 35–100 [119,121–123]. The number and location of β -strands within this region, however, varies between fibril polymorphs generated under different solution conditions, with the ionic strength, the presence of polyanions or the pH of the solution as main factors for fibril structure variability. These observations, therefore, already highlight the relevance of electrostatic interactions in the intramolecular and intermolecular forces that define the overall structure in the different amyloid polymorphs [119,124,125]. Two regions within the amyloid core have been suggested to be important for stabilizing the amyloid structure [123], concretely 71–82 region, which was also found to be essential for the initiation of the aggregation process [126], and 45–57 region, where most of the pathological point mutations are located.

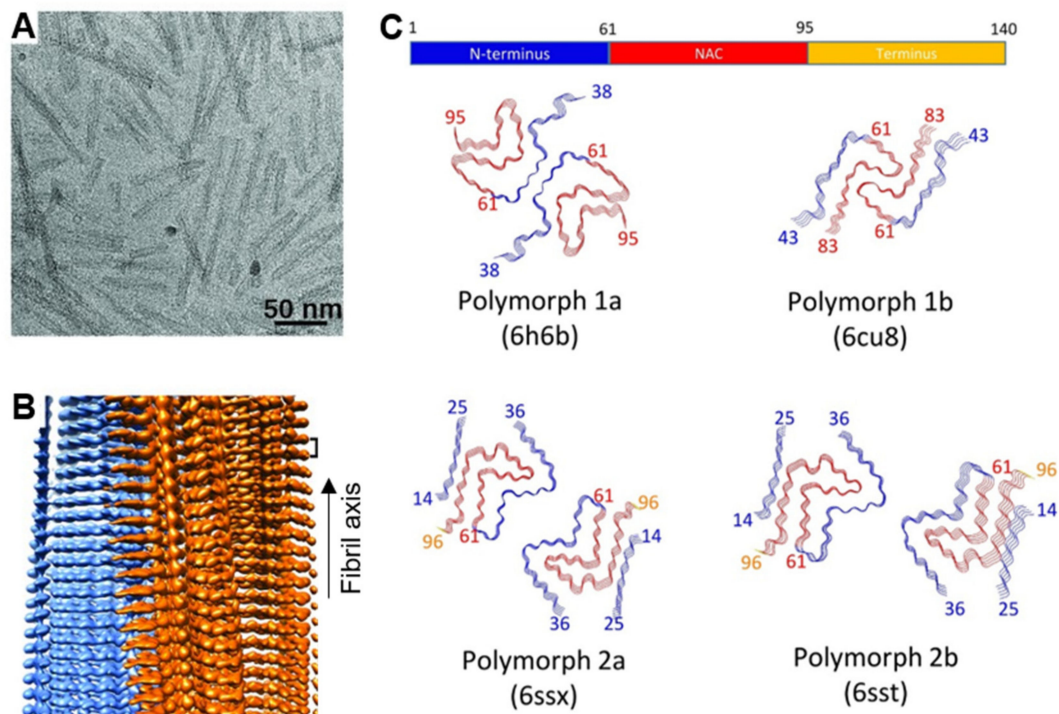


Figure 3. Structural features of α S fibrils. (A) Representative atomic force microscopy (AFM) and (B) 3D cryo-EM reconstruction image of a sample of α S fibrils. Adapted from Figure 1B,C, Guerrero-Ferreira, R. et al. 2018, eLife, published under the Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) [123]. (C) Summary of the structural differences of α S fibril polymorphs resolved by cryo-EM. Reproduced from Figure 4, Guerrero-Ferreira, R. et al. 2019, eLife, published under the Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (CC BY 4.0; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) [119,120].

The large scale structural differences between amyloid polymorphs induced by small changes in buffer conditions [119] highlights the large variability of structural rearrangements and interaction networks able to stabilize an amyloid fold of the same protein. These different polymorphs have very similar overall free energies, which results in a flat amyloid misfolding landscape with many local minima. This landscape contrasts with the funnel-shaped landscape found for the folding of most proteins, where the folded, native structure represents the lowest global energy minimum [127,128]. Indeed, the type of landscape of the amyloid conformation is the consequence of the type of interactions

that stabilize this particular conformation, which are dominated by hydrogen bonds between the main-chain atoms of the polypeptide chain [129]. The contributions of the interactions between side chain groups to the overall energy of the amyloid structure are typically less relevant, although they seem to be crucial for the definition of the type of amyloid polymorph preferred during the nucleation step, which is ultimately defined by the solution conditions.

In this scenario, it would seem very plausible that alternative amyloid polymorphs could be formed in different cellular types and perhaps in different microenvironments of the same cell. If amyloid aggregation would be a favorable process, the consequences would be that multiple amyloid polymorphs could co-exist even in the interior of the same cell. The large energetic barrier for primary nucleation makes typically α S aggregation a kinetically unfavorable process (under highly hydration conditions and in the absence of pre-formed fibrils). Once triggered, the faster rates of elongation and secondary processes, as compared to the rate of primary nucleation [118], would result in the prevalence of the polymorphs that multiply quicker, i.e., the system is typically governed by a kinetic rather than a thermodynamic partitioning. If fragmentation and elongation are the preferred secondary processes, then it could be possible that only one major type of polymorph dominates the amyloid population, which would be defined by the initial type of interactions that are established during primary nucleation. If, under other conditions, secondary nucleation is more favorable than elongation, with rates comparable with that of primary nucleation, then various types of polymorphs could co-exist, since the structure of the aggregates generated by secondary nucleation does not typically reflect the structure of their fibrillar parents [130]. The structure of the aggregates generated by secondary nucleation, in analogy to what is found for those formed under primary nucleation, depends mainly on the solution conditions [130]. These are important points that are not always taken into consideration when analyzing for example the structure of *in vivo*-generated amyloid aggregates by NMR or cryo-EM after amplifying the number of aggregates by *in vitro* seeding reactions. In such seeding reactions, secondary nucleation processes could be governing which would favor the formation of amyloid aggregates with structures significantly different from those of the parent fibrils. The predominance of one type of amyloid polymorph over others depends primarily, therefore, on the properties of the protein microenvironment, as those dictate the structure of the pre-nucleus during primary and secondary nucleation, as well as the relative rates of primary and secondary nucleation, and elongation.

The same molecular event of α S amyloid aggregation is associated with not only PD but also other neurodegenerative disorders. In the particular case of MSA, the α S inclusions are localized in different cellular types with respect to the other synucleinopathies, which suggests that, at least for this disease, α S aggregation is likely triggered by an alternative mechanism to that associated with PD or DLB. In agreement with this idea, pathological α S in glial cytoplasmic inclusions or in LBs has been reported to be conformationally and biologically distinct [17,35]. The intracellular environment is, therefore, determinant for the accumulation of particular types of amyloid polymorphs. These results are in line with earlier studies that suggested the existence of disease-specific α S amyloid polymorphs. In a seminal study, injection of amyloid-like fibrillar structures derived from MSA patient's brain extracts into experimental animals induced neurodegeneration accompanied by α S deposition in all cases. However, none of the animals inoculated with α S fibrillar species obtained from PD brains developed neurological deficits [17,35]. Parallel studies were performed with *in vitro*-generated amyloid polymorphs and showed the variety of seeding capacities and neurotoxic properties of the different α S aggregated species analyzed [18,131]. Recently, the structure of α S inclusions extracted from the putamen of deceased MSA patients was compared to those extracted from the cortex and amygdala of deceased DLB patients by means of cryo-EM. All the MSA patients analyzed showed very similar filament structures, which were very different from the filaments extracted from DLB cases, and in both cases remarkably different from those that have been formed *in vitro* up to date with recombinant proteins [132]. These findings highlight the urgent need to find α S aggregation conditions *in vitro* that truly recapitulate the aggregation pathways triggered *in vivo*. Despite the similar amyloid folds, two types of α S filament polymorphs in MSA brains were distinguished, being the so-called

Type-II structure preferred in patients with a longer life span [132]. An interesting feature observed in MSA patients' brain derived fibrils was the presence of an additional molecule, of yet unknown nature, that connects the two protofilaments in both Type I and Type II filaments [132]. This molecule establishes electrostatic interactions with positively charged residues in α S, specifically the side chains of residues K43, K45 and H50. These interactions might be strongly altered by the G51D and A53E disease-associated α S mutations, which could lead to altered fibrillar structures and stabilities, which, in turn, could be related to the characteristics of these hereditary forms: early disease onset, shorter disease duration (compared to sporadic PD) and severe cognitive and psychiatric disturbances. Overall, these findings are in line with the idea that different conformations of α S contribute to the type of neurodegenerative disease as well as disease prognosis.

Along the most recent improvements regarding identifying and studying the variety of amyloid polymorphs in synucleinopathies, protein misfolding cyclic amplification (PMCA) [133] together with real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) [134] are providing highly valuable insights into the characteristics of patient-derived α S aggregated species as well as helping to bring about new diagnostic tools in the field of neurodegeneration [135]. Both techniques allow replicating and amplifying the structure of abnormal α S by repeatedly fragmenting the parent aggregates and using them as templates for seeding reactions with recombinant monomeric α S in the presence of the thioflavin T probe. By comparing the seeding kinetics, important information about the seeding efficiency of patient-derived or in vitro-generated amyloid polymorphs can be extracted. Both assays have been used with fibrillar material extracted from brain or gastrointestinal tissue of PD, MSA and DLB patients and the aggregates generated were demonstrated to faithfully recapitulate the biochemical, structural and neurotoxic properties of the parent, in vivo-generated aggregates [136–142]. These assays can distinguish between cerebrospinal fluid samples from patients diagnosed with PD or MSA [143], and are being further developed with the aim of using them as diagnostic and prognostic tools for the distinct types of synucleinopathies.

4.2. Oligomeric Polymorphs

The process of amyloid fibril formation requires the transition of the protein by a series of multiple oligomeric intermediates that differ in terms of size (from dimers to large assemblies containing typically less than a hundred of protein units) and structure (from essentially disordered structures similar to those of their monomer precursors to β -sheet rich structures close to that displayed in the fully formed fibrillar state). The distinction between oligomers and short fibrils is not always trivial and size alone might not be a good parameter for this. A distinctive characteristic of fibrils is that they elongate from their ends by association of monomers from the solution and that the elongated structures have the same structure and β -sheet content as their aggregate parents. In contrast, the elongation of oligomers would result in more elongated structures with a significantly higher β -sheet content. A critical parameter, therefore, for the definition of oligomers is the degree of β -sheet content as compared to that of the fibrillar structures, which should be used in addition to the size of the aggregates.

Given the multiplicity of types of oligomers in route to fibril formation and their inherent transient intermediate nature in the process, their study and characterization have been proved to be extremely challenging. Single-molecule techniques, however, have provided valuable information of such species. Two structural groups of α S oligomers formed during the lag-phase of fibril formation under typical in vitro reactions (i.e., under conditions of heterogeneous nucleation at the air/water interface) were identified by single-molecule Förster resonance energy transfer [10]. The initially formed oligomers present a diffuse, proteases sensitive and non-toxic structure (referred to as type-A oligomers). These oligomers slowly convert into more compact and stable, protease resistant, toxic oligomers (referred to as type-B oligomers), with partially-formed β -sheet structure. These oligomers elongate later through monomer addition to form protofilaments and eventually mature fibrils (see Figure 1) [10,144]. In order to study these different structural oligomeric forms further, we and others have developed strategies

to prepare samples of analogous stable oligomeric forms that result in more than 90% of the sample enriched in each particular type of oligomer. These oligomeric samples have been characterized in detail and have been reported to be stable for days.

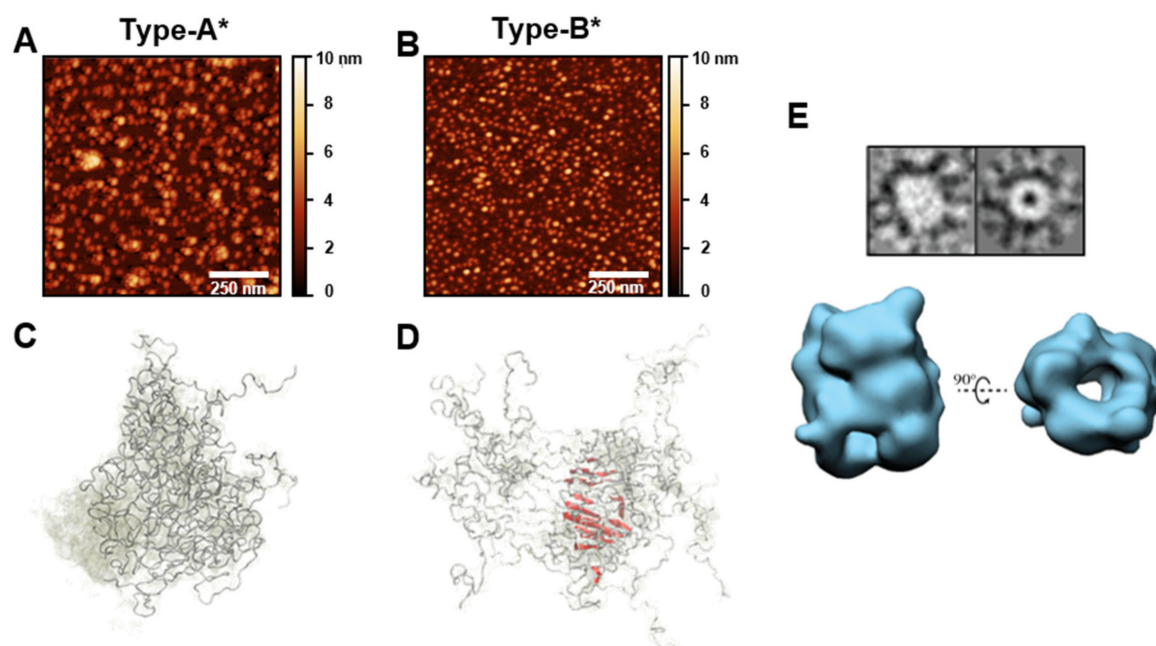


Figure 4. Structural features of two structurally different types of α S oligomers. Some of the most detailed structural information on α S oligomers has been obtained by the use of enriched samples of structurally homogeneous oligomeric species that have been trapped by the addition of molecules that prevent the conversion of oligomers to fibrils (for example the molecule EGCG, that results in the accumulation of type-A* oligomers) or the induction of alternative amyloid pathways by the modulation of the solution conditions that result in the kinetic stabilization of oligomeric species (i.e., induction of homogeneous nucleation under limited hydration conditions such as lyophilization, which results in the formation of type-B* oligomers). (A,B) Typical morphology of type-A* oligomers (A) and type-B* oligomers (B) probed by AFM. (C,D) Structural models of type-A* oligomers (C) and type-B* oligomers (D) according to the information obtained from solution and ssNMR data (from Fusco et al., *Science* 2017, reprinted with permission from AAAS) [145]. (E) Morphology and 3D-reconstruction models of type-B* oligomers according to cryo-EM image analysis (reprinted from Chen et al., PNAS 2015) [103].

The strategy used to prepare samples enriched in a type of oligomers analogous to type-B oligomers consists in inducing the aggregation of the protein through a particular amyloid pathway at dehydrating conditions (i.e., during lyophilization), under which homogeneous nucleation is favored [92]. This pathway results in the accumulation of kinetically trapped, antiparallel β -sheet, toxic oligomers whose rates of disaggregation into monomers and elongation into fibrils are extremely slow. These oligomers were referred to as type-B* oligomers to remark that they are analogous to type-B oligomers but not exactly the same, as type-B oligomers are generated during the heterogeneous primary nucleation of parallel β -sheet amyloid fibrils [103]. Despite the differences in the β -sheet arrangement of the amyloid structure between type-B and type-B* oligomers, they are similar in a number of features, reflecting their analogous nature. Both types of oligomers have similar sizes, an intermediate secondary structure between the monomeric and the fully-formed mature fibrils, similar affinities for lipid membranes and similar toxic mechanisms, with apparently identical cellular dysfunction effects [10,26,27,103,145]. One remarkable difference is their ability to elongate: while type-B oligomers quickly elongate into fully-formed fibrils, type-B* oligomers have their elongation abilities disrupted, likely as a result of the antiparallel intermolecular β -sheet structure. Other amyloid-like aggregates with an antiparallel β -sheet structure show a preference for small aggregates rather than the typical

parallel β -sheet amyloid aggregates with long fibrillar morphologies [92]. Therefore, caution is needed when extrapolating to the type-B oligomers the biological effects identified for type-B*, or the analogous situation in other amyloidogenic proteins or peptides. Both types of oligomers seem to behave similarly in terms of induction of toxicity, but in terms of seeding properties, and therefore spreading capabilities, they behave very differently.

In the case of the oligomers analogous to type-A, formed during the heterogeneous primary nucleation of the protein, the stabilization strategy consisted in using a molecule (epigallocatechin gallate, EGCG) that binds to this structural type of oligomer and prevents its structural conversion and progression into type-B oligomers and eventually amyloid fibrils [145]. We referred to these oligomers trapped by the action of an inhibitor molecule that remains bound to the aggregates as type-A* oligomers to reflect the fact that they consist on a complex between type-A oligomers and several molecules of EGCG. Additionally, EGCG has been shown to modify chemically α S but without major effects on oligomer formation [146]. Both type-A and type-A* oligomers have similar sizes, have a disordered structure and are benign to the cells [10,145], but the presence of several molecules of EGCG in the surface of the oligomer might affect some properties with respect to the unbound oligomer form.

Both type-A* and type-B* oligomers have similar size distributions, with the majority of the species showing sizes of ca. 15–40-mers (for the type-B* oligomers an average of ca. 30 protein molecules was estimated) [103,145]. The vast majority of the species in both samples present a rather homogeneous structure: essentially disordered in the case of type-A* oligomers, and with a β -sheet core composed of 70–88 residues in the case of type-B* oligomers. Indeed, the structural homogeneity of both oligomeric samples have allowed their structural characterization by ssNMR [145] and the 3D cryo-EM structural reconstruction in the case of type-B* oligomers (at 18-Å resolution) [103] (see Figure 4). The structural reconstruction by cryo-EM showed that the oligomers presented a cylindrical morphology, similar to that previously reported for toxic prefibrillar oligomers [147], with a diameter of ca. 10 nm, that coincide with the diameter found for α S mature fibrils. However, in contrast to the α S fibrils whose structure has been determined up to date, these oligomers show a hollow core, suggesting that the interactions between β -sheets are predominantly hydrophilic and mediated by water molecules. This structural arrangement results in a significant fraction of hydrophobic residues exposed to the solvent at the surface of the oligomer structure [103], which explains the particular ability of this type of oligomer to interact with the interior of the lipid bilayers of cellular membranes and disrupt membrane integrity, leading to the toxic consequences for the cell [145]. Similar water-mediated protofilament interactions with the concomitant formation of fibrils with a hollow-core have been reported for other amyloidogenic polypeptides related to disease [5,8,148]. In the case of α S fibrils, all the structures obtained by cryo-EM analysis and composed of multiple protofilaments (typically two) show a hydrophobic interface between protofilaments that is stabilized by a few ionic salt bridges. This protofilament arrangement results in most of the hydrophobic residues of the protein buried in the interior of the mature fibrils and a fibrillar surface mostly hydrophilic. In contrast, a highly hydrophobic fibrillar surface is inferred, indeed similar to that of the type-B* oligomers, when the nature of the solvent exposed surface of analogous fibrils was analyzed and compared with monomeric and Type-A* oligomers using the 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) probe [103,149]. This apparent contradiction needs to be resolved, as the solvent-exposed hydrophobic surface seems to be highly correlated with toxicity in amyloid aggregates [150].

Other α S oligomeric structures that have been reported to be formed during fibril formation include annular oligomers, as visualized by transmission electron microscopy (TEM) and AFM [151,152], but not further structural determination was reported for such oligomers and their relationships with the fibrillar structures and other types of oligomers remain unknown. Oligomeric forms generated during fibril formation have been isolated, in some cases purified by gel filtration, and remain stable under a variety of conditions, which allowed certain structural and mechanistic characterization [101,153–156],

with some features, such as size (average of 29–31 monomers per oligomer), antiparallel β -sheet structure [101] and amyloid core regions [153], reminiscent to those of the type-B* oligomers.

A large number of α S oligomeric species have been described as a result of their stabilization by particular types of molecules able to either bind to or covalently modify α S, such as selegiline [153], baicalein [157,158] or dopamine and its analogs [159,160]. Although significant differences in morphology, size and secondary structure for the different α S oligomeric species have been shown, a general trend is observed. Most of the reported stabilized oligomers were either mainly disordered, which were generally reported to be nontoxic to neuronal cells, or presented certain, but limited, β -sheet structure, which showed significant level of toxicity in cells [120], suggesting that these two main types of oligomers could be general to the various α S aggregation pathways that have been explored up to date.

5. Possible Roles of α -Synuclein Species in Cell Toxicity

Aberrant folding and aggregation of certain amyloidogenic proteins has been suggested to be the initial trigger of amyloid diseases, later followed by a cascade of events such as calcium and metal ion dyshomeostasis, oxidative stress and proteostasis impairment. This initial trigger has been related with the ability of certain aggregated species to bind and disrupt cellular membranes. Amyloid aggregates from different proteins and peptides, including some not related *a priori* with human diseases, have been shown to induce cellular toxicity by similar mechanisms of membrane perturbation [161,162]. These experimental observations suggested that this mechanism of toxicity is indeed a common feature for this type of aggregates that share the same toxic structural determinants [1,13]. While the intrinsic toxic properties of the aggregates are independent of cellular proteostasis, their accumulation and life span strongly depends on the cellular proteostasis activity [163].

The nature of the most toxic aggregated species formed during amyloid aggregation, in particular for α S, remains a subject of intense debate in the field. Both oligomers and fibrils have been shown to be toxic in different contexts and comparative studies have reported contradictory results, although the nature of the aggregates, particularly for the oligomeric species, is generally not defined with the precision required to derive strong conclusions. There is multiple experimental evidence for an important role of particular types of oligomers in α S amyloid toxicity. Structural-toxicity studies on in vitro-generated α S oligomers have generally shown that disordered oligomers are benign to cells, while oligomers with partially formed β -sheet cores and highly hydrophobic surfaces are the most inherently toxic α S species upon exposure to cells [120]. While these studies were performed with in vitro-generated α S aggregates, similar cellular effects were observed in a human iPSC-derived α S triplication neuronal model with endogenous α S aggregation, suggesting that analogous types of α S aggregated species are also formed in vivo [26,27]. The ability of the rudimentary cross- β oligomers to induce toxicity has been proposed to arise, at least in part, from their ability to bind lipid membranes and insert their flexible, hydrophobic β -sheet core into the interior of the lipid bilayer [145]. The combination of these structural features is absent in the monomeric and early disordered oligomeric forms [145,164], as well as in the highly rigid (in some cases with rigidities close to steel [165]) fibrillar structure. The insertion of this type of oligomers into the lipid membranes causes, then, a cascade of toxic effects in the cells such as calcium and metal ion imbalance, oxidative stress, mitochondrial and lysosomal dysfunction, and eventually cell death [26,27,166–169]. In addition, the exposure of hydrophobic residues and hydrogen-bond unsatisfied amino acid groups on the surface of these inherently intermediate, partially folded species, likely result in the aberrant and promiscuous interaction of these species with other proteins and cellular components that could disrupt their correct biological functions. This situation would explain some of the reported cellular effects of α S oligomers such as synaptosomal and mitochondria dysfunction [170,171] and the impairment of the ubiquitin-proteasomal systems [172,173].

Although α S fibrillar aggregates are able to bind to cellular membranes, they appear to remain bound to the membrane without inserting their β -sheet core into the lipid membrane, in contrast to the

toxic β -sheet oligomers [145] and, consequently, their effects on membrane perturbation are milder in terms of mass concentration, unless a massive overload of fibrils are bound to the same cell at the same time. However, similar qualitative effects, such as intracellular ion homeostasis perturbation [174] and cellular proteostasis [173], mitochondria [175] and lysosome dysfunction [176], have been observed for both fibrillar and β -sheet oligomers, suggesting possible common mechanisms of toxicity between oligomeric and fibrillar species. Recent evidence shows that distinct fibrillar α S polymorphs cluster at the plasma membrane of neurons to a clearly different extent, and also exhibit different seeding abilities. These results were interpreted in terms of variations in the organization of membrane receptors induced by distinctive types of α S fibrillar polymorphs [177]. In some reports, α S fibrils have been shown to induce an inflammatory response [178,179], although further studies are required to elucidate the role of α S aggregates on the induction of a chronic inflammation, proposed to be an important factor in triggering neurodegeneration.

6. Possible Roles of α -Synuclein Species in Cell-to-Cell Propagation

Misfolded forms of α S, and other proteins associated with neurodegenerative disorders, have been shown to self-propagate and spread between interconnected regions of the central nervous system acting as infectious agents propagating neurodegeneration, in a similar manner as it has been described for prions [179]. The spatiotemporal progression of α S pathology and the progressive nature of PD and other synucleinopathies [179] suggests the presence of specific anatomic α S spreading pathways.

Cell-to-cell transmission of α S aggregates has been experimentally observed [179] and more directly evidenced in grafted fetal mesencephalic neurons in PD patients after a host-to-graft α S misfolded transmission [180,181]. Indeed, the α S pathology transmission model has been used to develop cell and animal models of α S pathology as the exposure of neurons to extracellular pre-formed α S fibrils induces intracellular endogenous inclusions resembling those found in disease brains, the loss of dopaminergic neurons in the SNc and the associated motor-behavior defects, recapitulating the core features of PD [75].

We recently published a study that compared the ability of short (50 nm) fibrils and seeding-incompetent oligomers (type-B* oligomers) to cause PD-related phenotypes in mice. Striatal injections of short fibrils or elongation-deficient oligomers caused loss of dopamine neurons in the SNc [75]. The short fibrils caused also recruitment of endogenous α S into pS129-positive inclusions that resembled LB pathology, loss of dopamine terminals in the striatum, and induction of motor behavior phenotypes. However, the seeding-incompetent oligomers caused some loss of dopamine neurons in the SNc, reflecting their toxicity, but they did not produce α Syn inclusions or behavioral phenotypes. Short amyloid fibrils, and likely elongation-efficient oligomers (type-B oligomers) that can recruit and corrupt endogenous α S, are responsible for the majority of these phenotypes. Long fibrils, however, were unable to internalize efficiently and therefore spread from cell to cell. These results highlight the role of the size of the amyloid aggregates in the induction of intraneuronal α S inclusions, and suggest a potential toxic effect of those processes that could occur in the cell and result in the accumulation of small amyloid-like aggregates, such as fibril fragmentation, fibril disaggregation or uncompleted aggregation. One example is the action of the Hsp70 chaperone disaggregation system that has been reported to be able to either reduce α S aggregation and spreading [182] or enhance α S amyloid aggregation by releasing spread-competent α S species [182]. The *in vitro* Hsp70-mediated disaggregation of α S fibrils results primarily in the release of monomeric protein units from the fibrillar ends [182]. Under optimal conditions (optimal chaperone-to-co-chaperone ratios and ATP availability), the chaperone system is highly efficient and, therefore, the lifetime of possible toxic intermediate species generated during the disaggregation process (either very short fibrils or oligomers) would be very short and the overall Hsp70 system disaggregation activity would be beneficial to eliminate α S toxicity [182]. However, if the disaggregation process is not completed because some of the components of the chaperone complex are not optimal or the ATP availability is very limited at some point of the reaction in the cell, this could result in the transient generation of toxic short fibrils and oligomers which

could then diffuse and cause aberrant interactions with cellular components and spread efficiently from cell to cell, as proposed in [183].

Disease-related familial mutations could alter the population distribution of amyloid polymorphs, which could be related with their potential contribution to the pathogenesis [122,125]. Initial cryo-EM structures of WT α S fibrils indicated that at least four of the five mutation sites found in familial PD (E46K, A53T/E, G51D and H50Q) are preferentially located at the protofilament interfaces, rather than at the kernel of the amyloid structures. The presence of such mutations were suggested to affect severely the protofilament arrangement and then the stability of mature fibrils, which was correlated with the potential increase in the fraction of toxic oligomeric species within the cells [125]. The E46K pathological mutation, however, was later reported to adopt a significantly different amyloid fold as compared to the amyloid structure adopted by the WT protein at similar conditions [124,125]. The acquisition of this alternative fibril kernel conformation by the E46K mutation results in a significantly higher propensity to seed the formation of new fibrils as compared to the WT fibrils [124,125], which could influence the speed of α S pathology spreading. It is interesting to note that the E46K mutation seems to be the only hereditary α S mutation that manifests in a clinical picture closer to DLB; the other mutations being more associated to PD.

7. Post-Translational Modifications

α S has a number of PTMs, with phosphorylation, ubiquitination and nitration highly related to pathology [184]. Phosphorylation has been identified on various serine and tyrosine residues, mostly located at the C-terminal region of the protein. Despite being the most PTM studied in α S, its role in physiology and disease remain controversial [185]. Phosphorylation on serine 87 (pS87- α S), in the NAC region, appears to be increased in PD brains but, paradoxically, reduces the membrane-interaction ability and blocks α S fibril formation in vitro [186]. Other studies using a rat model, however, point toward a neuroprotective effect of pS87- α S [187]. The phosphorylation of some residues such as tyrosine 125 (p125- α S) has been reported to have a beneficial role regarding neurotoxicity [188], while the same modification at serine 129 (pS129- α S) is indicative of pathology. It has been found that more than 90% of the α S in the LBs of PD patients' brains is phosphorylated at serine 129 [184], while only ca. 4% in healthy brains [184]. This particular PTM has been shown to increase the rate of α S amyloid aggregation [184], as well as the toxicity associated with this process [189]. Although other studies have suggested a protective role based on its influence in reducing α S membrane binding [190] and increasing the conformational flexibility of the monomeric protein (which would prevent fibril formation) [191]. In the same line, constitutively expressed pS129- α S did not induce neurotoxicity in an overexpression rat model, while non-phosphorylated α S did [192].

Another important type of PTM in α S is the ubiquitination of lysine residues located at the N-terminal region of the protein. This region typically falls outside the amyloid core, although its ubiquitination has been observed to inhibit amyloid formation [193]. Significant steric repulsions for amyloid formation and structural differences in the fibrils would be expected upon ubiquitination in this region of the protein given the size of ubiquitin with respect to that of the α S. Indeed, this PTM can occur downstream fibril formation, given that most of the lysine residues of the N-terminal region are exposed to the solvent and readily accessible for ubiquitination according to the currently available cryo-EM structures [194].

Nitration of certain tyrosine residues are also commonly observed in pathologically relevant α S inclusions and in some cases, such as nitration of tyrosine 39, have been reported to stabilize soluble oligomeric species via dityrosine crosslinking [195].

The only available atomic structure of a post-translationally modified α S fibril carries the N-terminally acetylated modification, and no differences with the unmodified protein fibrils were observed [122]. This PTM is a mild modification located at a very distant region of the amyloid core in the amyloid fibrils. It would be relevant to determine the influence of other PTMs, particularly those

related to pathology, on the stability and structure of the α S oligomers and fibrils and their effect on cells, as well as to define whether these modifications occur primarily before or after α S oligomerization.

8. Summary

It is gradually being accepted in the field that certain types of soluble oligomeric species of α S are more inherently toxic than larger fibrillar aggregates. These oligomers can be generated *de novo* from cytosolic α S or α S associated with membranes. However, recent experimental evidence shows that fibrils and large intracellular inclusions can also be a source of soluble oligomers by fibril disaggregation [10] and secondary nucleation processes [32], which could explain, at least in part, the similarities in the toxic effects observed between oligomeric and fibrillar species. Mutations in α S that destabilize the dimeric interface of mature fibrils, such as the pathological mutations H50Q, G51D and A53T/V/E, may lead to a larger population of soluble toxic oligomers. However, these mutations are extremely rare, so understanding the cellular mechanisms which favor β -sheet oligomer formation need to be further elucidated. These can include: slight increases in α S levels, defects in lysosome activity, oxidation and PTMs that can occur particularly in dopamine neurons, induction of the formation of intracellular α S droplets by LLPS, aberrant activity of chaperone systems or expression of other mutant genes that can impact any of the above processes. Templated recruitment of endogenous α S also occurs and, for this, particularly short fibrils appear to be the most potent α S species [75]. Multiple types of aggregates are, therefore, populated during the process of self-assembly and might be involved in different stages of the development of pathology, some species being directly involved in the induction of neurotoxicity and others in the propagation of pathology [77].

A combination of three parameters appear to be key for the potential toxicity of α S aggregates, and likely aggregates from other amyloidogenic proteins: size, a highly exposed hydrophobic surface, and structural flexibility. Recent experimental evidence of remarkably different seeding capabilities of structurally alternative amyloid polymorphs suggests that other structural properties play also a role in α S aggregate toxicity. Further studies on structure-toxicity relationships on different α S aggregate polymorphs will help to define the molecular basis of toxicity and spreading in α S aggregates. It is important to identify also the structural determinants in the aggregates that dictates the preference for the recruitment of monomeric molecules either at the ends of the fibrillar structure or at its longitudinal surface and, thus, for the type of secondary process that governs the system, as this is an important source of polymorph variability. Further experimentation is required to (i) elucidate the detail structure of soluble toxic oligomers and the polymorphism associated with this type of α S species, (ii) how solution conditions, pathological mutations and PTMs impact on their structure and stability and (iii) the type of oligomer and fibril polymorphs that form *in vivo* in a disease-related context and that could be associated with the distinct types of synucleinopathies. The type of α S fibril polymorphs isolated from patient-derived brain samples are remarkably different from the fibril polymorphs that up to date have been generated *in vitro* and whose structures have been characterized [132,196]. It would be relevant to characterize the structural types of α S oligomers and fibrils that are formed in alternative conditions, and therefore through alternative amyloid pathways, to those explored *in vitro*. In particular, those generated through liquid-to-solid transitions inside α S droplets generated by LLPS, which have been recently suggested to precede α S amyloid formation *in vivo*, and that are likely to occur through very different amyloid mechanisms to those of the typical processes studied *in vitro* under diluted and highly hydrated conditions [92]. Gaining a better understanding of the type of amyloid pathways and primary and secondary processes occurring *in vivo*, as well as the nature and structure of the types of polymorphs of oligomers and fibrils formed, will help not only to identify the molecular basis of α S aggregation in disease, but also to design future treatments and develop new diagnostic tools for the early diagnosis of distinct types of synucleinopathies.

Author Contributions: All authors contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO), grant number BFU2015-64119-P (N.C.), the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (MICIU) and the European Commission (FEDER), grant number PGC2018-096335-B-100 (N.C.), and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) of the National Health Institute (NIH), grant number R01NS102257 (L.V.-D.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Dobson, C.M. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 329–332. [[CrossRef](#)]
2. Dobson, C.M. Protein folding and misfolding. *Nature* **2003**, *426*, 884–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sunde, M.; Serpell, L.C.; Bartlam, M.; Fraser, P.E.; Pepys, M.B.; Blake, C.C.F. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 729–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sawaya, M.R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M.I.; Sievers, S.A.; Apostol, M.I.; Thompson, M.J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J.J.W.; McFarlane, H.T.; et al. Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* **2007**, *447*, 453–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jiménez, J.L.; Guijarro, J.I.; Orlova, E.; Zurdo, J.; Dobson, C.M.; Sunde, M.; Saibil, H.R. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* **1999**, *18*, 815–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fändrich, M.; Dobson, C.M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5682–5690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Eisenberg, D.; Jucker, M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **2012**, *148*, 1188–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Fitzpatrick, A.W.P.; Debelouchina, G.T.; Bayro, M.J.; Clare, D.K.; Caporini, M.A.; Bajaj, V.S.; Jaroniec, C.P.; Wang, L.; Ladizhansky, V.; Müller, S.A.; et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5468–5473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cohen, S.I.A.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M.; Knowles, T.P.J. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 160–171. [[CrossRef](#)]
10. Cremades, N.; Cohen, S.I.A.; Deas, E.; Abramov, A.Y.; Chen, A.Y.; Orte, A.; Sandal, M.; Clarke, R.W.; Dunne, P.; Aprile, F.A.; et al. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein. *Cell* **2012**, *149*, 1048–1059. [[CrossRef](#)]
11. Knowles, T.P.J.; White, D.A.; Abate, A.R.; Agresti, J.J.; Cohen, S.I.A.; Sperling, R.A.; De Genst, E.J.; Dobson, C.M.; Weitz, D.A. Observation of spatial propagation of amyloid assembly from single nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14746–14751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Knowles, T.P.J.; Waudby, C.A.; Devlin, G.L.; Cohen, S.I.A.; Aguzzi, A.; Vendruscolo, M.; Terentjev, E.M.; Welland, M.E.; Dobson, C.M. An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science* **2009**, *326*, 1533–1537. [[CrossRef](#)]
13. Bucciantini, M.; Giannoni, E.; Chiti, F.; Baroni, F.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Dobson, C.M.; Stefani, M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **2002**, *416*, 507–511. [[CrossRef](#)]
14. Luk, K.C.; Kehm, V.; Carroll, J.; Zhang, B.; O'Brien, P.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.Y. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **2012**, *338*, 949–953. [[CrossRef](#)]
15. Volpicelli-Daley, L.A.; Luk, K.C.; Patel, T.P.; Tanik, S.A.; Riddle, D.M.; Stieber, A.; Meaney, D.F.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.-Y. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **2011**, *72*, 57–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Winner, B.; Jappelli, R.; Maji, S.K.; Desplats, P.A.; Boyer, L.; Aigner, S.; Hetzer, C.; Loher, T.; Vilar, M.; Campioni, S.; et al. In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4194–4199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Prusiner, S.B.; Woerman, A.L.; Mordes, D.A.; Watts, J.C.; Rampersaud, R.; Berry, D.B.; Patel, S.; Oehler, A.; Lowe, J.K.; Kravitz, S.N.; et al. Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E5308–E5317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Peelaerts, W.; Bousset, L.; Van Der Perren, A.; Moskalyuk, A.; Pulizzi, R.; Giugliano, M.; Van Den Haute, C.; Melki, R.; Baekelandt, V. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* **2015**, *522*, 340–344. [[CrossRef](#)]
19. Ferreira, S.T.; Klein, W.L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2011**, *96*, 529–543. [[CrossRef](#)]
20. Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 349–357. [[CrossRef](#)]
21. Hayden, E.Y.; Teplow, D.B. Amyloid β -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **2013**, *5*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Irvine, G.B.; El-Agnaf, O.M.; Shankar, G.M.; Walsh, D.M. Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Mol. Med.* **2008**, *14*, 451–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ross, C.A.; Pickart, C.M. The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 703–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Quist, A.; Doudevski, I.; Lin, H.; Azimova, R.; Ng, D.; Frangione, B.; Kagan, B.; Ghiso, J.; Lal, R. Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10427–10432. [[CrossRef](#)]
25. Pedersen, J.T.; Chen, S.W.; Borg, C.B.; Ness, S.; Bahl, J.M.; Heegaard, N.H.H.; Dobson, C.M.; Hemmingsen, L.; Cremades, N.; Teilum, K. Amyloid- β and α -Synuclein Decrease the Level of Metal-Catalyzed Reactive Oxygen Species by Radical Scavenging and Redox Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3966–3969. [[CrossRef](#)]
26. Deas, E.; Cremades, N.; Angelova, P.R.; Ludtmann, M.H.R.; Yao, Z.; Chen, S.; Horrocks, M.H.; Banushi, B.; Little, D.; Devine, M.J.; et al. Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxidants Redox Signal.* **2016**, *24*, 376–391. [[CrossRef](#)]
27. Angelova, P.R.; Ludtmann, M.H.R.; Horrocks, M.H.; Negoda, A.; Cremades, N.; Klenerman, D.; Dobson, C.M.; Wood, N.W.; Pavlov, E.V.; Gandhi, S.; et al. Ca²⁺ is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 1792–1801. [[CrossRef](#)]
28. Stefani, M.; Dobson, C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 678–699. [[CrossRef](#)]
29. Arispe, N.; Rojas, E.; Pollard, H.B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: Blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 567–571. [[CrossRef](#)]
30. Martins, I.C.; Kuperstein, I.; Wilkinson, H.; Maes, E.; Vanbrabant, M.; Jonckheere, W.; Van Gelder, P.; Hartmann, D.; D'Hooge, R.; De Strooper, B.; et al. Lipids revert inert A β amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* **2008**, *27*, 224–233. [[CrossRef](#)]
31. Kim, H.-Y.; Cho, M.-K.; Riedel, D.; Fernandez, C.O.; Zweckstetter, M. Dissociation of Amyloid Fibrils of α -Synuclein in Supercooled Water. *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 5124–5126. [[CrossRef](#)]
32. Cohen, S.I.A.; Linse, S.; Luheshi, L.M.; Hellstrand, E.; White, D.A.; Rajah, L.; Otzen, D.E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M.; Knowles, T.P.J. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9758–9763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jeong, J.S.; Ansaloni, A.; Mezzenga, R.; Lashuel, H.A.; Dietler, G. Novel mechanistic insight into the molecular basis of amyloid polymorphism and secondary nucleation during amyloid formation. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 1765–1781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Falcon, B.; Zivanov, J.; Zhang, W.; Murzin, A.G.; Garringer, H.J.; Vidal, R.; Crowther, R.A.; Newell, K.L.; Ghetti, B.; Goedert, M.; et al. Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature* **2019**, *568*, 420–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Peng, C.; Gathagan, R.J.; Covell, D.J.; Medellin, C.; Stieber, A.; Robinson, J.L.; Zhang, B.; Pitkin, R.M.; Olufemi, M.F.; Luk, K.C.; et al. Cellular milieu imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies. *Nature* **2018**, *557*, 558–563. [[CrossRef](#)]
36. Taguchi, K.; Watanabe, Y.; Tsujimura, A.; Tanaka, M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J. Comp. Neurol.* **2016**, *524*, 1236–1258. [[CrossRef](#)]
37. Bartels, T.; Ahlstrom, L.S.; Leftin, A.; Kamp, F.; Haass, C.; Brown, M.F.; Beyreuther, K. The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2116–2124. [[CrossRef](#)]

38. Georgieva, E.R.; Ramlall, T.F.; Borbat, P.P.; Freed, J.H.; Eliezer, D. Membrane-Bound α -Synuclein Forms an Extended Helix: Long-Distance Pulsed ESR Measurements Using Vesicles, Bicelles, and Rodlike Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12856–12857. [[CrossRef](#)]
39. George, J.M.; Jin, H.; Woods, W.S.; Clayton, D.F. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* **1995**, *15*, 361–372. [[CrossRef](#)]
40. Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D.A.; Kondo, J.; Ihara, Y.; Saitoh, T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11282–11286.
41. Viennet, T.; Wördehoff, M.M.; Uluca, B.; Poojari, C.; Shaykhalishahi, H.; Willbold, D.; Strodel, B.; Heise, H.; Buell, A.K.; Hoyer, W.; et al. Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α -Synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Braun, A.R.; Lacy, M.M.; Ducas, V.C.; Rhoades, E.; Sachs, J.N. α -Synuclein's Uniquely Long Amphipathic Helix Enhances its Membrane Binding and Remodeling Capacity. *J. Membr. Biol.* **2017**, *250*, 183–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Serpell, L.C.; Berriman, J.; Jakes, R.; Goedert, M.; Crowther, R.A. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4897–4902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mor, D.E.; Ugras, S.E.; Daniels, M.J.; Ischiropoulos, H. Dynamic structural flexibility of α -synuclein. *Neurobiol. Dis.* **2016**, *88*, 66–74. [[CrossRef](#)]
45. Fauvet, B.; Mbefo, M.K.; Fares, M.B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M.T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N.; et al. α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345–15364. [[CrossRef](#)]
46. Waudby, C.A.; Camilloni, C.; Fitzpatrick, A.W.P.; Cabrita, L.D.; Dobson, C.M.; Vendruscolo, M.; Christodoulou, J. In-Cell NMR Characterization of the Secondary Structure Populations of a Disordered Conformation of α -Synuclein within *E. coli* Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dedmon, M.M.; Lindorff-Larsen, K.; Christodoulou, J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M. Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 476–477. [[CrossRef](#)]
48. Bertonecini, C.W.; Jung, Y.S.; Fernandez, C.O.; Hoyer, W.; Griesinger, C.; Jovin, T.M.; Zweckstetter, M. Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1430–1435. [[CrossRef](#)]
49. Lee, H.-J.; Patel, S.; Lee, S.-J. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 6016–6024. [[CrossRef](#)]
50. Meade, R.M.; Fairlie, D.P.; Mason, J.M. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease—lessons and emerging principles. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14*, 29. [[CrossRef](#)]
51. Grazia Spillantini, M.; Anthony Crowther, R.; Jakes, R.; Cairns, N.J.; Lantos, P.L.; Goedert, M. Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* **1998**, *251*, 205–208. [[CrossRef](#)]
52. McCann, H.; Stevens, C.H.; Cartwright, H.; Halliday, G.M. α -Synucleinopathy phenotypes. *Park. Relat. Disord.* **2014**, *20*, S62–S67. [[CrossRef](#)]
53. Aarsland, D.; Kurz, M.W. The epidemiology of dementia associated with Parkinson disease. *J. Neurol. Sci.* **2010**, *289*, 18–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. McKeith, I.G.; Boeve, B.F.; Dickson, D.W.; Halliday, G.; Taylor, J.-P.; Weintraub, D.; Aarsland, D.; Galvin, J.; Attems, J.; Ballard, C.G.; et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* **2017**, *89*, 88–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hamilton, R.L. Lewy Bodies in Alzheimer's Disease: A Neuropathological Review of 145 Cases Using α -Synuclein Immunohistochemistry. *Brain Pathol.* **2006**, *10*, 378–384. [[CrossRef](#)]
56. Zarranz, J.J.; Alegre, J.; Gómez-Esteban, J.C.; Lezcano, E.; Ros, R.; Ampuero, I.; Vidal, L.; Hoenicka, J.; Rodriguez, O.; Atarés, B.; et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 164–173. [[CrossRef](#)]

57. Appel-Cresswell, S.; Vilarino-Guell, C.; Encarnacion, M.; Sherman, H.; Yu, I.; Shah, B.; Weir, D.; Thompson, C.; Szu-Tu, C.; Trinh, J.; et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 811–813. [[CrossRef](#)]
58. Lesage, S.; Anheim, M.; Letournel, F.; Bousset, L.; Honoré, A.; Rozas, N.; Pieri, L.; Madióna, K.; Dürr, A.; Melki, R.; et al. G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* **2013**, *73*, 459–471. [[CrossRef](#)]
59. Singleton, A.B.; Farrer, M.; Johnson, J.; Singleton, A.; Hague, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Peuralinna, T.; Dutra, A.; Nussbaum, R.; et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **2003**, *302*, 841. [[CrossRef](#)]
60. Soldner, F.; Stelzer, Y.; Shivalila, C.S.; Abraham, B.J.; Latourelle, J.C.; Barrasa, M.I.; Goldmann, J.; Myers, R.H.; Young, R.A.; Jaenisch, R. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of α -synuclein modulates target gene expression. *Nature* **2016**, *533*, 95–99. [[CrossRef](#)]
61. Miller, D.W.; Hague, S.M.; Clarimon, J.; Baptista, M.; Gwinn-Hardy, K.; Cookson, M.R.; Singleton, A.B. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* **2004**, *62*, 1835–1838. [[CrossRef](#)]
62. Valente, E.M.; Abou-Sleiman, P.M.; Caputo, V.; Muqit, M.M.K.; Harvey, K.; Gispert, S.; Ali, Z.; Del Turco, D.; Bentivoglio, A.R.; Healy, D.G.; et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **2004**, *304*, 1158–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zimprich, A.; Biskup, S.; Leitner, P.; Lichtner, P.; Farrer, M.; Lincoln, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Uitti, R.J.; Calne, D.B.; et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **2004**, *44*, 601–607. [[CrossRef](#)]
64. Volpicelli-Daley, L.A.; Abdelmotilib, H.; Liu, Z.; Stoyka, L.; Daher, J.P.L.; Milnerwood, A.J.; Unni, V.K.; Hirst, W.D.; Yue, Z.; Zhao, H.T.; et al. G2019S-LRRK2 Expression Augments α -Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 7415–7427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bieri, G.; Brahic, M.; Bousset, L.; Couthouis, J.; Kramer, N.J.; Ma, R.; Nakayama, L.; Monbureau, M.; Defensor, E.; Schüle, B.; et al. LRRK2 modifies α -syn pathology and spread in mouse models and human neurons. *Acta Neuropathol.* **2019**, *137*, 961–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ryan, E.; Seehra, G.; Sharma, P.; Sidransky, E. GBA1-associated parkinsonism: New insights and therapeutic opportunities. *Curr. Opin. Neurol.* **2019**, *32*, 589–596. [[CrossRef](#)]
67. Henderson, M.X.; Cornblath, E.J.; Darwich, A.; Zhang, B.; Brown, H.; Gathagan, R.J.; Sandler, R.M.; Bassett, D.S.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.Y. Spread of α -synuclein pathology through the brain connectome is modulated by selective vulnerability and predicted by network analysis. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 1248–1257. [[CrossRef](#)]
68. Kalia, L.V.; Lang, A.E. Parkinson's disease. *Lancet* **2015**, *386*, 896–912. [[CrossRef](#)]
69. Ibáñez, P.; Bonnet, A.-M.; Débarges, B.; Lohmann, E.; Tison, F.; Pollak, P.; Agid, Y.; Dürr, A.; Brice, A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* **2004**, *364*, 1169–1171. [[CrossRef](#)]
70. Pankratz, N.; Foroud, T. Genetics of Parkinson disease. *Genet. Med.* **2007**, *9*, 801–811. [[CrossRef](#)]
71. Spillantini, M.G.; Schmidt, M.L.; Lee, V.M.-Y.; Trojanowski, J.Q.; Jakes, R.; Goedert, M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, *388*, 839–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Satake, W.; Nakabayashi, Y.; Mizuta, I.; Hirota, Y.; Ito, C.; Kubo, M.; Kawaguchi, T.; Tsunoda, T.; Watanabe, M.; Takeda, A.; et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1303–1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Maraganore, D.M.; de Andrade, M.; Lesnick, T.G.; Strain, K.J.; Farrer, M.J.; Rocca, W.A.; Pant, P.V.K.; Frazer, K.A.; Cox, D.R.; Ballinger, D.G. High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**, *77*, 685–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Volpicelli-daley, L.a.; Luk, K.C.; Patel, T.P.; Tanik, S.a.; Dawn, M.; Stieber, A.; Meany, D.F.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Alpha Syn Fibrils. *Neuron* **2011**, *72*, 57–71. [[CrossRef](#)]
75. Froula, J.M.; Castellana-Cruz, M.; Anabtawi, N.M.; Camino, J.D.; Chen, S.W.; Thrasher, D.R.; Freire, J.; Yazdi, A.A.; Fleming, S.; Dobson, C.M.; et al. Correction: Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 1142. [[CrossRef](#)]
76. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366. [[CrossRef](#)]

77. Cremades, N.; Dobson, C.M. The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiol. Dis.* **2018**, *109*, 178–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Jarrett, J.T.; Lansbury, P.T. Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: Studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12345–12352. [[CrossRef](#)]
79. Wood, S.J.; Wypych, J.; Steavenson, S.; Louis, J.C.; Citron, M.; Biere, A.L. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19509–19512. [[CrossRef](#)]
80. Serio, T.R.; Cashikar, A.G.; Kowal, A.S.; Sawicki, G.J.; Moslehi, J.J.; Serpell, L.; Arnsdorf, M.F.; Lindquist, S.L. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* **2000**, *289*, 1317–1321. [[CrossRef](#)]
81. Garcia, G.A.; Cohen, S.I.A.; Dobson, C.M.; Knowles, T.P.J. Nucleation-conversion-polymerization reactions of biological macromolecules with prenucleation clusters. *Phys. Rev. E* **2014**, *89*, 32712. [[CrossRef](#)]
82. Conway, K.A.; Harper, J.D.; Lansbury, P.T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1318–1320. [[CrossRef](#)]
83. Castillo, E.J.; Koenig, J.L.; Anderson, J.M. Characterization of protein adsorption on soft contact lenses. IV. Comparison of in vivo spoilage with the in vitro adsorption of tear proteins. *Biomaterials* **1986**, *7*, 89–96. [[CrossRef](#)]
84. Pronchik, J.; He, X.; Giurleo, J.T.; Talaga, D.S. In vitro formation of amyloid from α -synuclein is dominated by reactions at hydrophobic interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9797–9803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Wang, C.; Shah, N.; Thakur, G.; Zhou, F.; Leblanc, R.M. α -Synuclein in α -helical conformation at air-water interface: Implication of conformation and orientation changes during its accumulation/aggregation. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6702–6704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Vácha, R.; Linse, S.; Lund, M. Surface effects on aggregation kinetics of amyloidogenic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11776–11782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Grey, M.; Linse, S.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Sparr, E. Membrane interaction of α -synuclein in different aggregation states. *J. Parkinsons. Dis.* **2011**, *1*, 359–371. [[CrossRef](#)]
88. Galvagnion, C.; Brown, J.W.P.; Ouberai, M.M.; Flagmeier, P.; Vendruscolo, M.; Buell, A.K.; Sparr, E.; Dobson, C.M. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 7065–7070. [[CrossRef](#)]
89. Lv, Z.; Hashemi, M.; Banerjee, S.; Zagorski, K.; Rochet, J.-C.; Lyubchenko, Y.L. Assembly of α -synuclein aggregates on phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2019**, *1867*, 802–812. [[CrossRef](#)]
90. Srivastava, A.K.; Pittman, J.M.; Zerweck, J.; Venkata, B.S.; Moore, P.C.; Sachleben, J.R.; Meredith, S.C. β -Amyloid aggregation and heterogeneous nucleation. *Protein Sci.* **2019**, *28*, 1567–1581. [[CrossRef](#)]
91. Zuzak, R.; Dorel, R.; Krawiec, M.; Such, B.; Kolmer, M.; Szymonski, M.; Echavarren, A.M.; Godlewski, S. Nonacene Generated by On-Surface Dehydrogenation. *ACS Nano* **2017**, *11*, 9321–9329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Camino, J.D.; Gracia, P.; Chen, S.W.; Sot, J.; de la Arada, I.; Sebastián, V.; Arrondo, J.L.R.; Goñi, F.M.; Dobson, C.M.; Cremades, N. The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet α -synuclein aggregates. *Chem. Sci.* **2020**. Advance Article. [[CrossRef](#)]
93. Prestrelski, S.J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T.; Carpenter, J.F. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 661–671. [[CrossRef](#)]
94. Mukherjee, S.; Chowdhury, P.; Gai, F. Infrared study of the effect of hydration on the amide I band and aggregation properties of helical peptides. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 4596–4602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mukherjee, S.; Chowdhury, P.; Gai, F. Effect of dehydration on the aggregation kinetics of two amyloid peptides. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 531–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Griebenow, K.; Klibanov, A.M. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10969–10976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Castillo, E.J.; Koenig, J.L.; Anderson, J.M.; Lo, J. Protein adsorption on hydrogels. II. Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces. *Biomaterials* **1985**, *6*, 338–345. [[CrossRef](#)]

98. Castillo, E.J.; Koenig, J.L.; Anderson, J.M.; Jentoft, N. Protein adsorption on soft contact lenses. III. Mucin. *Biomaterials* **1986**, *7*, 9–16. [[CrossRef](#)]
99. Dong, A.; Prestrelski, S.J.; Allison, S.D.; Carpenter, J.F. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 415–424. [[CrossRef](#)]
100. Zou, Y.; Li, Y.; Hao, W.; Hu, X.; Ma, G. Parallel β -Sheet Fibril and Antiparallel β -Sheet Oligomer: New Insights into Amyloid Formation of Hen Egg White Lysozyme under Heat and Acidic Condition from FTIR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 4003–4013. [[CrossRef](#)]
101. Celej, M.S.; Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Fidelio, G.D.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 719–726. [[CrossRef](#)]
102. Cerf, E.; Sarroukh, R.; Tamamizu-Kato, S.; Breydo, L.; Derclaye, S.; Dufrêne, Y.F.; Narayanaswami, V.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. Antiparallel β -sheet: A signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 415–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Chen, S.W.; Drakulic, S.; Deas, E.; Ouberai, M.; Aprile, F.A.; Arranz, R.; Ness, S.; Roodveldt, C.; Guilliams, T.; De-Genst, E.J.; et al. Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E1994–E2003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Kanaan, N.M.; Hamel, C.; Grabski, T.; Combs, B. Liquid-liquid phase separation induces pathogenic tau conformations in vitro. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2809. [[CrossRef](#)]
105. Wegmann, S.; Eftekharzadeh, B.; Tepper, K.; Zoltowska, K.M.; Bennett, R.E.; Dujardin, S.; Laskowski, P.R.; MacKenzie, D.; Kamath, T.; Commins, C.; et al. Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J.* **2018**, *37*. [[CrossRef](#)]
106. Schmidt, H.B.; Rohatgi, R. In Vivo Formation of Vacuolated Multi-phase Report In Vivo Formation of Vacuolated Multi-phase Compartments Lacking Membranes. *CellReports* **2016**, *16*, 1228–1236.
107. Babinchak, W.M.; Haider, R.; Dumm, B.K.; Sarkar, P.; Surewicz, K.; Choi, J.K.; Surewicz, W.K. The role of liquid-liquid phase separation in aggregation of the TDP-43 low-complexity domain. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 6306–6317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Ray, S.; Singh, N.; Kumar, R.; Patel, K.; Pandey, S.; Datta, D.; Mahato, J.; Panigrahi, R.; Navalkar, A.; Mehra, S.; et al. α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 705–716. [[CrossRef](#)]
109. Hardenberg, M.C.; Sinnige, T.; Casford, S.; Dada, S.; Poudel, C.; Robinson, L.; Fuxreiter, M.; Kaminski, C.; Kaminski Schierle, G.S.; Nollen, E.A.A.; et al. Observation of an α -synuclein liquid droplet state and its maturation into Lewy body-like assemblies. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
110. Gaspar, R.; Meisl, G.; Buell, A.K.; Young, L.; Kaminski, C.F.; Knowles, T.P.J.; Sparr, E.; Linse, S. Secondary nucleation of monomers on fibril surface dominates α -synuclein aggregation and provides autocatalytic amyloid amplification. *Q. Rev. Biophys.* **2017**, *50*, e6. [[CrossRef](#)]
111. Campioni, S.; Carret, G.; Jordens, S.; Nicoud, L.; Mezzenga, R.; Riek, R. The presence of an air-water interface affects formation and elongation of α -synuclein fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2866–2875. [[CrossRef](#)]
112. Skamris, T.; Marasini, C.; Madsen, K.L.; Foderà, V.; Vestergaard, B. Early Stage Alpha-Synuclein Amyloid Fibrils are Reservoirs of Membrane-Binding Species. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Arosio, P.; Knowles, T.P.J.; Linse, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 7606–7618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Huang, Y.Y.; Knowles, T.P.J.; Terentjev, E.M. Strength of Nanotubes, Filaments, and Nanowires From Sonication-Induced Scission. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3945–3948. [[CrossRef](#)]
115. Tipping, K.W.; Karamanos, T.K.; Jakhria, T.; Iadanza, M.G.; Goodchild, S.C.; Tuma, R.; Ranson, N.A.; Hewitt, E.W.; Radford, S.E. pH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5691–5696. [[CrossRef](#)]
116. Frankel, R.; Törnquist, M.; Meisl, G.; Hansson, O.; Andreasson, U.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Frohm, B.; Cedervall, T.; Knowles, T.P.J.; et al. Autocatalytic amplification of Alzheimer-associated A β 42 peptide aggregation in human cerebrospinal fluid. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Cohen, S.I.A.; Arosio, P.; Presto, J.; Kurudenkandy, F.R.; Biverstål, H.; Dolfe, L.; Dunning, C.; Yang, X.; Frohm, B.; Vendruscolo, M.; et al. A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 207–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

118. Buell, A.K.; Galvagnion, C.; Gaspar, R.; Sparr, E.; Vendruscolo, M.; Knowles, T.P.J.; Linse, S.; Dobson, C.M. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 7671–7676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Guerrero-Ferreira, R.; Taylor, N.M.I.; Arteni, A.A.; Kumari, P.; Mona, D.; Ringler, P.; Britschgi, M.; Lauer, M.E.; Makky, A.; Verasdock, J.; et al. Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cryo-electron microscopy. *Elife* **2019**, *8*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Cremades, N.; Chen, S.W.; Dobson, C.M. Structural Characteristics of α -Synuclein Oligomers. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2017**, *329*, 79–143.
121. Tuttle, M.D.; Comellas, G.; Nieuwkoop, A.J.; Covell, D.J.; Berthold, D.A.; Kloepper, K.D.; Courtney, J.M.; Kim, J.K.; Barclay, A.M.; Kendall, A.; et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 409–415. [[CrossRef](#)]
122. Li, B.; Ge, P.; Murray, K.A.; Sheth, P.; Zhang, M.; Nair, G.; Sawaya, M.R.; Shin, W.S.; Boyer, D.R.; Ye, S.; et al. Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3609. [[CrossRef](#)]
123. Guerrero-Ferreira, R.; Taylor, N.M.I.; Mona, D.; Ringler, P.; Lauer, M.E.; Riek, R.; Britschgi, M.; Stahlberg, H. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife* **2018**, *7*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Boyer, D.R.; Li, B.; Sun, C.; Fan, W.; Zhou, K.; Hughes, M.P.; Sawaya, M.R.; Jiang, L.; Eisenberg, D.S. The α -synuclein hereditary mutation E46K unlocks a more stable, pathogenic fibril structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 3592–3602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Zhao, K.; Li, Y.; Liu, Z.; Long, H.; Zhao, C.; Luo, F.; Sun, Y.; Tao, Y.; Su, X.; Li, D.; et al. Parkinson's disease associated mutation E46K of α -synuclein triggers the formation of a distinct fibril structure. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2643. [[CrossRef](#)]
126. Giasson, B.I.; Murray, I.V.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380–2386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Dill, K.A.; MacCallum, J.L. The protein-folding problem, 50 years on. *Science* **2012**, *338*, 1042–1046. [[CrossRef](#)]
128. Anfinsen, C.B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* **1973**, *181*, 223–230. [[CrossRef](#)]
129. Knowles, T.P.J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 384–396. [[CrossRef](#)]
130. Peduzzo, A.; Linse, S.; Buell, A.K. The properties of α -synuclein secondary nuclei are dominated by the solution conditions rather than the seed fibril strain. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 909–918. [[CrossRef](#)]
131. Woerman, A.L.; Stöhr, J.; Aoyagi, A.; Rampersaud, R.; Krejcirova, Z.; Watts, J.C.; Ohyama, T.; Patel, S.; Widjaja, K.; Oehler, A.; et al. Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E4949–E4958. [[CrossRef](#)]
132. Schweighauser, M.; Shi, Y.; Tarutani, A.; Kametani, F.; Murzin, A.G.; Ghetti, B.; Matsubara, T.; Tomita, T.; Ando, T.; Hasegawa, K.; et al. Structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature* **2020**, *585*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Saborio, G.P.; Permanne, B.; Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **2001**, *411*, 810–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Atarashi, R.; Satoh, K.; Sano, K.; Fuse, T.; Yamaguchi, N.; Ishibashi, D.; Matsubara, T.; Nakagaki, T.; Yamanaka, H.; Shirabe, S.; et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 175–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. De Luca, C.M.G.; Elia, A.E.; Portaleone, S.M.; Cazzaniga, F.A.; Rossi, M.; Bistaffa, E.; De Cecco, E.; Narkiewicz, J.; Salzano, G.; Carletta, O.; et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for α -synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Transl. Neurodegener.* **2019**, *8*, 24. [[CrossRef](#)]
136. Fenyi, A.; Leclair-Visonneau, L.; Clairembault, T.; Coron, E.; Neunlist, M.; Melki, R.; Derkinderen, P.; Bousset, L. Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *129*, 38–43. [[CrossRef](#)]
137. Van der Perren, A.; Gelders, G.; Fenyi, A.; Bousset, L.; Brito, F.; Peelaerts, W.; Van den Haute, C.; Gentleman, S.; Melki, R.; Baekelandt, V. The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* **2020**, *139*, 977–1000. [[CrossRef](#)]

138. Shah Nawaz, M.; Mukherjee, A.; Pritzkow, S.; Mendez, N.; Rabadia, P.; Liu, X.; Hu, B.; Schmeichel, A.; Singer, W.; Wu, G.; et al. Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature* **2020**, *578*, 273–277. [[CrossRef](#)]
139. Yao, Y.; Dong, X.; Guan, H.; Lu, Q. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion test for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in an 18-year-old woman: A case report. *Medicine* **2017**, *96*, e8699. [[CrossRef](#)]
140. Van Rumund, A.; Green, A.J.E.; Fairfoul, G.; Esselink, R.A.J.; Bloem, B.R.; Verbeek, M.M. α -Synuclein real-time quaking-induced conversion in the cerebrospinal fluid of uncertain cases of parkinsonism. *Ann. Neurol.* **2019**, *85*, 777–781. [[CrossRef](#)]
141. Reddy, V.D.; Hamed, A.; Settipalle, N.; Jande, S.; Rahman, S.; Szabella, M.E.; Boghossian, J. Real-time Quaking-induced Conversion Assay for the Diagnosis of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in a Living Patient. *Infect. Dis. Res. Treat.* **2019**, *12*. [[CrossRef](#)]
142. Jung, B.C.; Lim, Y.-J.; Bae, E.-J.; Lee, J.S.; Choi, M.S.; Lee, M.K.; Lee, H.-J.; Kim, Y.S.; Lee, S.-J. Amplification of distinct α -synuclein fibril conformers through protein misfolding cyclic amplification. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e314. [[CrossRef](#)]
143. Calabrese, C.; Davidson, N.R.; Demircioğlu, D.; Fonseca, N.A.; He, Y.; Kahles, A.; Lehmann, K.-V.; Liu, F.; Shiraishi, Y.; Soulette, C.M.; et al. Genomic basis for RNA alterations in cancer. *Nature* **2020**, *578*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Iljina, M.; Garcia, G.A.; Horrocks, M.H.; Tosatto, L.; Choi, M.L.; Ganzinger, K.A.; Abramov, A.Y.; Gandhi, S.; Wood, N.W.; Cremades, N.; et al. Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E1206–E1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Fusco, G.; Chen, S.W.; Williamson, P.T.F.; Cascella, R.; Perni, M.; Jarvis, J.A.; Cecchi, C.; Vendruscolo, M.; Chiti, F.; Cremades, N.; et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* **2017**, *358*, 1440–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Palhano, F.L.; Lee, J.; Grimster, N.P.; Kelly, J.W. Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7503–7510. [[CrossRef](#)]
147. Lashuel, H.A.; Petre, B.M.; Wall, J.; Simon, M.; Nowak, R.J.; Walz, T.; Lansbury, P.T.J. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 1089–1102. [[CrossRef](#)]
148. Zhang, R.; Hu, X.; Khant, H.; Ludtke, S.J.; Chiu, W.; Schmid, M.F.; Frieden, C.; Lee, J.-M. Interprotofilament interactions between Alzheimer's A β 1-42 peptides in amyloid fibrils revealed by cryoEM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4653–4658. [[CrossRef](#)]
149. Celej, M.S.; Jares-Erijman, E.A.; Jovin, T.M. Fluorescent N-Arylamino-naphthalene Sulfonate Probes for Amyloid Aggregation of α -Synuclein. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4867–4879. [[CrossRef](#)]
150. Mannini, B.; Mulvihill, E.; Sgromo, C.; Cascella, R.; Khodarahmi, R.; Ramazzotti, M.; Dobson, C.M.; Cecchi, C.; Chiti, F. Toxicity of protein oligomers is rationalized by a function combining size and surface hydrophobicity. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2309–2317. [[CrossRef](#)]
151. Lashuel, H.A.; Hartley, D.; Petre, B.M.; Walz, T.; Lansbury, P.T.J. Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* **2002**, *418*, 291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Conway, K.A.; Lee, S.J.; Rochet, J.C.; Ding, T.T.; Williamson, R.E.; Lansbury, P.T.J. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 571–576. [[CrossRef](#)]
153. Paslawski, W.; Mysling, S.; Thomsen, K.; Jørgensen, T.J.D.; Otzen, D.E. Co-existence of two different α -synuclein oligomers with different core structures determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 7560–7563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Lorenzen, N.; Nielsen, S.B.; Buell, A.K.; Kaspersen, J.D.; Arosio, P.; Vad, B.S.; Paslawski, W.; Christiansen, G.; Valnickova-Hansen, Z.; Andreasen, M.; et al. The role of stable α -synuclein oligomers in the molecular events underlying amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3859–3868. [[CrossRef](#)]
155. Giehm, L.; Svergun, D.I.; Otzen, D.E.; Vestergaard, B. Low-resolution structure of a vesicle disrupting α -synuclein oligomer that accumulates during fibrillation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3246–3251. [[CrossRef](#)]
156. Gallea, J.I.; Celej, M.S. Structural insights into amyloid oligomers of the Parkinson disease-related protein α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26733–26742. [[CrossRef](#)]

157. Hong, D.-P.; Fink, A.L.; Uversky, V.N. Structural characteristics of alpha-synuclein oligomers stabilized by the flavonoid baicalein. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 214–223. [[CrossRef](#)]
158. Zhu, M.; Rajamani, S.; Kaylor, J.; Han, S.; Zhou, F.; Fink, A.L. The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26846–26857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Lee, H.-J.; Baek, S.M.; Ho, D.-H.; Suk, J.-E.; Cho, E.-D.; Lee, S.-J. Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Exp. Mol. Med.* **2011**, *43*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Pham, C.L.L.; Leong, S.L.; Ali, F.E.; Kenche, V.B.; Hill, A.F.; Gras, S.L.; Barnham, K.J.; Cappai, R. Dopamine and the dopamine oxidation product 5,6-dihydroxyindole promote distinct on-pathway and off-pathway aggregation of alpha-synuclein in a pH-dependent manner. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 771–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Glabe, C.G.; Kaye, R. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology* **2006**, *66*, S74–S78. [[CrossRef](#)]
162. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Labbadia, J.; Morimoto, R.I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 435–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Fusco, G.; De Simone, A.; Gopinath, T.; Vostrikov, V.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M.; Veglia, G. Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Smith, J.F.; Knowles, T.P.J.; Dobson, C.M.; Macphee, C.E.; Welland, M.E. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15806–15811. [[CrossRef](#)]
166. Hoffmann, A.-C.; Minakaki, G.; Menges, S.; Salvi, R.; Savitskiy, S.; Kazman, A.; Vicente Miranda, H.; Mielenz, D.; Klucken, J.; Winkler, J.; et al. Extracellular aggregated alpha synuclein primarily triggers lysosomal dysfunction in neural cells prevented by trehalose. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 544. [[CrossRef](#)]
167. Volles, M.J.; Lansbury, P.T.J. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4595–4602. [[CrossRef](#)]
168. Stefanovic, A.N.D.; Stöckl, M.T.; Claessens, M.M.A.E.; Subramaniam, V. α -Synuclein oligomers distinctively permeabilize complex model membranes. *FEBS J.* **2014**, *281*, 2838–2850. [[CrossRef](#)]
169. Danzer, K.M.; Haasen, D.; Karow, A.R.; Moussaud, S.; Habeck, M.; Giese, A.; Kretschmar, H.; Hengerer, B.; Kostka, M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 9220–9232. [[CrossRef](#)]
170. Prots, I.; Grosch, J.; Brazdis, R.-M.; Simmnacher, K.; Veber, V.; Havlicek, S.; Hannappel, C.; Krach, F.; Krumbiegel, M.; Schütz, O.; et al. α -Synuclein oligomers induce early axonal dysfunction in human iPSC-based models of synucleinopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7813–7818. [[CrossRef](#)]
171. Ludtmann, M.H.R.; Angelova, P.R.; Horrocks, M.H.; Choi, M.L.; Rodrigues, M.; Baev, A.Y.; Berezhnov, A.V.; Yao, Z.; Little, D.; Banushi, B.; et al. α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Emmanouilidou, E.; Stefanis, L.; Vekrellis, K. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol. Aging* **2010**, *31*, 953–968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Lindersson, E.; Beedholm, R.; Højrup, P.; Moos, T.; Gai, W.; Hendil, K.B.; Jensen, P.H. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12924–12934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P.H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B.H.; et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2575. [[CrossRef](#)]
175. Wang, X.; Becker, K.; Levine, N.; Zhang, M.; Lieberman, A.P.; Moore, D.J.; Ma, J. Pathogenic alpha-synuclein aggregates preferentially bind to mitochondria and affect cellular respiration. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 41. [[CrossRef](#)]
176. Flavin, W.P.; Bousset, L.; Green, Z.C.; Chu, Y.; Skarpathiotis, S.; Chaney, M.J.; Kordower, J.H.; Melki, R.; Campbell, E.M. Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol.* **2017**, *134*, 629–653. [[CrossRef](#)]

177. Shrivastava, A.N.; Bousset, L.; Renner, M.; Redeker, V.; Savistchenko, J.; Triller, A.; Melki, R. Differential Membrane Binding and Seeding of Distinct α -Synuclein Fibrillar Polymorphs. *Biophys. J.* **2020**, *118*, 1301–1320. [[CrossRef](#)]
178. Peralta Ramos, J.M.; Iribarren, P.; Bousset, L.; Melki, R.; Baekelandt, V.; Van der Perren, A. Peripheral Inflammation Regulates CNS Immune Surveillance Through the Recruitment of Inflammatory Monocytes Upon Systemic α -Synuclein Administration. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 80. [[CrossRef](#)]
179. Gustot, A.; Gallea, J.I.; Sarroukh, R.; Celej, M.S.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease. *Biochem. J.* **2015**, *471*, 323–333. [[CrossRef](#)]
180. Kordower, J.H.; Brundin, P. Lewy body pathology in long-term fetal nigral transplants: Is Parkinson's disease transmitted from one neural system to another? *Neuropsychopharmacology* **2009**, *34*, 254. [[CrossRef](#)]
181. Li, J.-Y.; Englund, E.; Holton, J.L.; Soulet, D.; Hagell, P.; Lees, A.J.; Lashley, T.; Quinn, N.P.; Rehncrona, S.; Björklund, A.; et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 501–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Taguchi, Y.V.; Gorenberg, E.L.; Nagy, M.; Thrasher, D.; Fenton, W.A.; Volpicelli-Daley, L.; Horwich, A.L.; Chandra, S.S. Hsp110 mitigates α -synuclein pathology in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 24310–24316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Tittelmeier, J.; Sandhof, C.A.; Ries, H.M.; Druffel-Augustin, S.; Mogk, A.; Bukau, B.; Nussbaum-Krammer, C. The HSP110/HSP70 disaggregation system generates spreading-competent toxic α -synuclein species. *EMBO J.* **2020**, *39*, e103954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Fujiwara, H.; Hasegawa, M.; Dohmae, N.; Kawashima, A.; Masliah, E.; Goldberg, M.S.; Shen, J.; Takio, K.; Iwatsubo, T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 160–164. [[CrossRef](#)]
185. Xu, Y.; Deng, Y.; Qing, H. The phosphorylation of α -synuclein: Development and implication for the mechanism and therapy of the Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **2015**, *135*, 4–18. [[CrossRef](#)]
186. Paleologou, K.E.; Oueslati, A.; Shakked, G.; Rospigliosi, C.C.; Kim, H.-Y.; Lamberto, G.R.; Fernandez, C.O.; Schmid, A.; Chegini, F.; Gai, W.P.; et al. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 3184–3198. [[CrossRef](#)]
187. Oueslati, A.; Paleologou, K.E.; Schneider, B.L.; Aebischer, P.; Lashuel, H.A. Mimicking phosphorylation at serine 87 inhibits the aggregation of human α -synuclein and protects against its toxicity in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 1536–1544. [[CrossRef](#)]
188. Chen, L.; Periquet, M.; Wang, X.; Negro, A.; McLean, P.J.; Hyman, B.T.; Feany, M.B. Tyrosine and serine phosphorylation of α -synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 3257–3265. [[CrossRef](#)]
189. Chen, L.; Feany, M.B. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 657–663. [[CrossRef](#)]
190. Kuwahara, T.; Tonegawa, R.; Ito, G.; Mitani, S.; Iwatsubo, T. Phosphorylation of α -synuclein protein at Ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7098–7109. [[CrossRef](#)]
191. Paleologou, K.E.; Schmid, A.W.; Rospigliosi, C.C.; Kim, H.-Y.; Lamberto, G.R.; Fredenburg, R.A.; Lansbury, P.T.J.; Fernandez, C.O.; Eliezer, D.; Zweckstetter, M.; et al. Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16895–16905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Gorbatyuk, O.S.; Li, S.; Sullivan, L.F.; Chen, W.; Kondrikova, G.; Manfredsson, F.P.; Mandel, R.J.; Muzyczka, N. The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 763–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Meier, F.; Abeywardana, T.; Dhall, A.; Marotta, N.P.; Varkey, J.; Langen, R.; Chatterjee, C.; Pratt, M.R. Semisynthetic, site-specific ubiquitin modification of α -synuclein reveals differential effects on aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5468–5471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Guerrero-Ferreira, R.; Kovacik, L.; Ni, D.; Stahlberg, H. New insights on the structure of alpha-synuclein fibrils using cryo-electron microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2020**, *61*, 89–95. [[CrossRef](#)]

195. Souza, J.M.; Giasson, B.I.; Chen, Q.; Lee, V.M.; Ischiropoulos, H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18344–18349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Strohäker, T.; Jung, B.C.; Liou, S.H.; Fernandez, C.O.; Riedel, D.; Becker, S.; Halliday, G.M.; Bennati, M.; Kim, W.S.; Lee, S.J.; et al. Structural heterogeneity of α -synuclein fibrils amplified from patient brain extracts. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anexo IV: Defining α -synuclein species responsible for Parkinson disease phenotypes in mice



Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice

Received for publication, January 25, 2019, and in revised form, May 22, 2019. Published, Papers in Press, May 29, 2019, DOI 10.1074/jbc.RA119.007743

Jessica M. Froula^{†1}, Marta Castellana-Cruz^{§1,2}, Nadia M. Anabtawi[‡], José D. Camino[¶], Serene W. Chen[§], Drake R. Thrasher[‡], Jennifer Freire[‡], Allen A. Yazdi[‡], Sheila Fleming^{||}, Christopher M. Dobson^{§2}, Janet R. Kumita^{§2}, Nunilo Cremades^{¶3}, and Laura A. Volpicelli-Daley^{†4}

From the[†]Department of Neurology, Center for Neurodegeneration and Experimental Therapeutics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama 35294, the[¶]Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI)–Joint Unit BIFI–IQFR (CSIC), University of Zaragoza, Zaragoza 50018, Spain, the[§]Centre for Misfolding Diseases, Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1EW, United Kingdom, and the^{||}Department of Pharmaceutical Sciences, Northeast Ohio Medical University, Rootstown, Ohio 44272

Edited by Paul E. Fraser

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by fibrillar neuronal inclusions composed of aggregated α -synuclein (α -syn). These inclusions are associated with behavioral and pathological PD phenotypes. One strategy for therapeutic interventions is to prevent the formation of these inclusions to halt disease progression. α -Synuclein exists in multiple structural forms, including disordered, nonamyloid oligomers, ordered amyloid oligomers, and fibrils. It is critical to understand which conformers contribute to specific PD phenotypes. Here, we utilized a mouse model to explore the pathological effects of stable β -amyloid-sheet oligomers compared with those of fibrillar α -synuclein. We biophysically characterized these species with transmission EM, atomic-force microscopy, CD spectroscopy, FTIR spectroscopy, analytical ultracentrifugation, and thioflavin T assays. We then injected these different α -synuclein forms into the mouse striatum to determine their ability to induce PD-related phenotypes. We found that β -sheet oligomers produce a small but significant loss of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). Injection of small β -sheet fibril fragments, however, produced the most robust phenotypes, including reduction of striatal dopamine terminals, SNc loss of dopamine neurons, and motor-behavior defects. We conclude that although the β -sheet oligomers cause some toxicity, the potent effects of the short fibrillar fragments can be attributed to their ability to recruit monomeric α -synuclein and spread *in vivo* and hence contribute to the development of PD-like phenotypes. These results suggest that strategies to reduce the formation and propagation of β -sheet fibrillar species could be an important route for therapeutic intervention in PD and related disorders.

Multiple neurodegenerative diseases are characterized by amyloid inclusions that are formed by the assembly of monomeric proteins into oligomeric intermediates that then grow to form protofilaments, and eventually fibrils (1). In Parkinson's disease (PD),⁵ these inclusions are referred to as Lewy bodies and Lewy neurites and are composed primarily of α -synuclein (2), but they also include other proteins such as p62 and ubiquitin (3). They develop from the nucleated polymerization of endogenous α -synuclein that is then thought to spread within neurons and to propagate to interconnected neuronal networks in a spatially and temporally predictable manner (4, 5). The role of α -synuclein in neurodegeneration and in generating symptoms in PD is not yet completely clear and is an area of active research. It is important to note that neurodegeneration is likely to be caused by a combination of factors in addition to α -synuclein inclusion formation such as impaired proteostasis, mitochondrial dysfunction, and activation of inflammation. On the basis of data that support the cell-to-cell spreading of α -synuclein aggregates, however, therapeutic strategies such as immunotherapy are in development in the hope of blocking the invasion of pathogenic α -synuclein species into additional brain regions and hence slowing the progression of PD (6).

Preventing the progression of α -synuclein inclusion formation, however, requires precise definitions of the species that are more highly toxic and those that are capable of promoting the formation of new aggregates by recruiting endogenous monomeric α -synuclein. Assemblies of structurally diverse oligomers and fibrils have varying degrees of pathogenicity (7–9). In a cellular environment, monomeric α -synuclein interacts with membranes and adopts an α -helical, tetrameric conformation (10–12). Monomeric α -synuclein can also assemble into fibrils in an array of heterogeneous oligomeric species that are often transient in nature. Recently, methods have been developed to produce and stabilize oligomers of α -synuclein (7, 13), enabling

This work was supported in part by the Michael J. Fox Foundation (to L. V.-D. and N. C.) and Grant P50NS108675 (Alabama Udall Center). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article was selected as one of our Editors' Picks.

This article contains Figs. S1–S5.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Supported by the Cambridge Centre for Misfolding Disease.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 34-876555415; E-mail: ncc@unizar.es.

⁴ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 205-996-7695; E-mail: lvolpicellidaley@uabmc.edu.

⁵ The abbreviations used are: PD, Parkinson's disease; AUC, analytical ultracentrifugation; AFM, atomic-force microscopy; PFA, paraformaldehyde; ThioT, thioflavin T; TEM, transmission electron microscopy; ANOVA, analysis of variance; DAT, dopamine transporter; TH, tyrosine hydroxylase; SNc, substantia nigra pars compacta; p- α -synuclein, phosphorylated α -synuclein; O, oligomer; F-L, F-long; F-M, F-Mix; F-S, F-short; OC, omyloid fibril antibody.

these to be extensively characterized. One particularly well-defined type of α -synuclein oligomeric species is composed of ~15–30 protein molecules, adopts a spherical appearance, and contains a rudimentary β -sheet structural core with very limited capability of binding the amyloid-specific dye thioflavin T (ThioT) and of elongating and recruiting new α -synuclein molecules. Addition of these oligomers to cells in culture disrupts membranes, generates reactive oxygen species, increases cytosolic calcium, and increases cell death (7, 13, 14). In contrast, the typical fibrillar forms of α -synuclein show the general amyloid features, including the ability to bind ThioT, the presence of a cross- β core structure, and an elongated filamentous morphology of 10–15 nm diameter. Exposure of neurons to extracellular α -synuclein fibrils induces intracellular endogenous α -synuclein to form inclusions that are morphologically and biochemically similar to those found in diseased brains; they form dense Lewy body-like aggregates in the soma, thread-like Lewy neurites in the neuropil, are insoluble in nonionic detergents, are primarily composed of fibrillar aggregates, and are phosphorylated, ubiquitinated, and proteinase K-resistant (4, 5, 15, 16). Inclusion formation leads to loss of dopaminergic neurons in the SNc with associated motor dysfunctional phenotypes, recapitulating the core features of PD. It has been shown that extensive sonication of α -synuclein fibrils increases the abundance of inclusions (17, 18). Such fragmentation, however, can generate a heterogeneous ensemble of species, including oligomers as well as short and long fibrillar fragments, which likely contributes to the current variability of observed phenotypes in the pre-formed fibril mouse model (19). More precise biophysical characterization combined with *in vivo* experiments is required to define which species contribute more strongly to the neuropathological and neurodegenerative phenotypes.

Here, we produce, isolate, and define reproducible conformers of mouse α -synuclein and monitor the neuropathological and neurodegenerative outcomes in mice injected with different well-defined forms of the protein, namely monomers, stable kinetically-trapped β -sheet oligomers, and fibril fragments. Unilateral injection of the β -sheet oligomers causes a slight but significant loss of dopamine neurons in the SNc, but it does not induce inclusion formation or produce defects in motor behavior; these findings can be attributable to the inability of these oligomers to grow by addition of the monomeric protein. The injections of preparations of short fibrils (70 nm), however, result in the formation of inclusions, the loss of dopamine terminals in the striatum, dopaminergic neurons in the SNc, and motor-behavior defects.

Results

Biophysical and morphological characterization of α -synuclein conformers

To determine the capacity of different structural forms of α -synuclein in the mouse brain to induce PD-related phenotypes, we used recombinant mouse α -synuclein protein for the preparations of the different forms given the lower efficiency of seeding when using cross-species (*i.e.* human) α -synuclein forms (see Fig. 3) (20). We first characterized

the stability and structural features of oligomers and fibrils. α -Synuclein fibrils were generated by shaking monomeric α -synuclein for 7 days at 37 °C, and the resulting structures shown by transmission EM (TEM) and atomic-force microscopy (AFM) indicated a long, filamentous structure as observed previously (“F-long, F-L”) with an average length of 266 ± 0.5 nm (Fig. 1, A–D). Shorter fibrils were then generated by sonication reducing the average length to 120 ± 4.0 nm; these fragments still, however, varied in length from 40 to 225 nm (“F-Mix, F-M”) (Fig. 1, E–H). Samples enriched in shorter fragments were generated by passing the solution of F-M through a 0.22- μ m filter (21, 22), resulting in an average length of 70 ± 3.3 nm and a more homogeneous distribution of 40–125 nm (“F-short, F-S”) (Fig. 1, I–L). Stabilized oligomeric species were generated using the procedure described previously for the human variant of the protein (7, 14); these oligomers were observed in TEM and AFM images to have a spherical morphology that was similar to that observed for oligomers generated by human α -synuclein. Their size was more uniform than that of the fibrillar samples, with an average length of 54 ± 0.7 nm and a range of 40–70 nm (Fig. 1, M–P). To confirm that the procedures used to generate the oligomers and fibrils did not cause degradation of α -synuclein, oligomer, F-L, F-M, and F-S were incubated with urea to dissociate the fibrils and oligomers into monomers. α -Synuclein was identified using SDS-PAGE, and bands were visualized using either “instant blue” or silver stain. Protein remains unaltered in all the protein samples, except for some minor monomer degradation that occurred in the oligomeric samples with minimal consequences for the study (Fig. S1).

Indeed, the stable, purified oligomers generated by mouse α -synuclein show identical morphological and structural features as the previously reported oligomers of human α -synuclein (Fig. 2A) (7). As shown previously for human oligomers, analytical ultracentrifugation (AUC) revealed that mouse oligomers showed two main distributions: one centered at 10S corresponding to a population of oligomers composed of an average of 18 α -synuclein molecules (260 kDa), and the other at 15S, corresponding to oligomers composed of an average of 29 α -synuclein molecules (420 kDa) (Fig. 2A), and similar to the size distribution of human oligomers. Also similar to the previously characterized human oligomers, mouse oligomers showed an intermediate structure between the disordered monomer and the β -sheet-rich amyloid fibrils, with an average of 30% of β -sheet structure (F-L, F-M, and F-S show ~60–65%) according to Fourier transform IR (FTIR) and far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy analysis (Fig. 2, B and C) (7, 13). They also showed marginal ability to bind ThioT molecules (Fig. 2D), unlike F-L, F-M, and F-S, which showed similar ThioT binding. In addition, the FTIR data also showed a marked difference between the oligomers and the fibrils, whereas the spectra of the fibrils contained an absorbance peak at 1620 cm^{-1} and no absorbance peak at 1695 cm^{-1} , characteristic of a parallel β -sheet configuration; the spectra of the oligomers clearly showed both peaks demonstrating an antiparallel β -sheet arrangement. An antiparallel conformation for stabilized oligomers and parallel conformation for fibrils has previously been

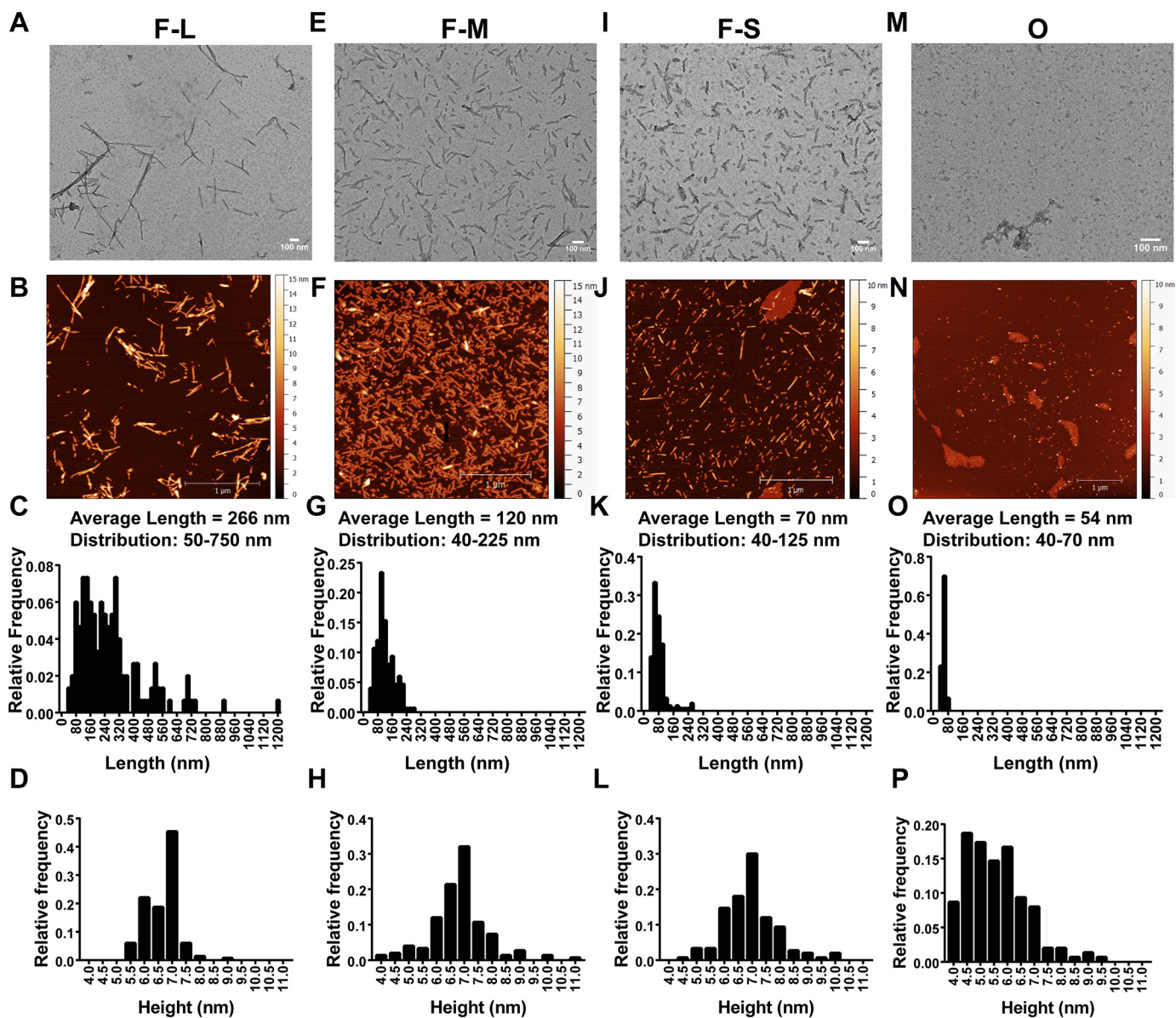


Figure 1. Morphological characterization of the mouse α -synuclein species used in the *in vivo* mouse studies. TEM and AFM images of fibrils (F-L) (A and B), sonicated fibrils (F-M) (E and F), sonicated fibrils enriched in short fragments (F-S) (I and J), and O (M and N). C–P, AFM was used to quantify the length and height of each species shown in the histograms.

observed for human α -synuclein and other amyloidogenic proteins and peptides, such as β -amyloid (23, 24), and the acquisition of the antiparallel β -sheet arrangement has been associated with a lower structural stability and a significantly reduced efficiency in elongation and seeding (7, 25). Indeed, the stable oligomeric species (O) of α -synuclein appear to be trapped species that need to dissociate and reassemble into species with parallel β -sheet structure to readily assemble into fibrils. Antibodies have been generated that recognize toxic conformations of proteins implicated in neurodegeneration (26, 27). The A11 antibodies selectively recognize potentially toxic conformations of proteins implicated in neurodegeneration, particularly pre-fibrillar oligomers, whereas the amyloid fibril OC antibody recognizes fibrils. Dot-blots using these antibodies showed that, as expected, OC recognized FL, FM, and FS. A11 recognized the oligomer preparation but also recognized the soni-

cated fibrils. A11, however, did not recognize the long fibrils (Fig. S2). These data indicate that the process of fragmenting longer fibrils can produce toxic oligomers, as shown previously (13).

Seeding efficiency of fibrils and oligomers *in vitro* and *in neurons*

We first wanted to assess the degree of compatibility between human and mouse α -synuclein in *in vitro* seeding reactions (Fig. 3A). Mouse and human fibrils (5 μ M) were combined with 100 μ M mouse α -synuclein monomer, and the formation of ThioT-positive amyloid fibrils was measured over time. Mouse fibrils seeded the formation of ThioT-positive amyloid fibrils from mouse α -synuclein monomer more rapidly than human fibrils, as shown previously (20). Interestingly, the initial rate of seeding using fibrils and monomers of human α -synuclein pro-

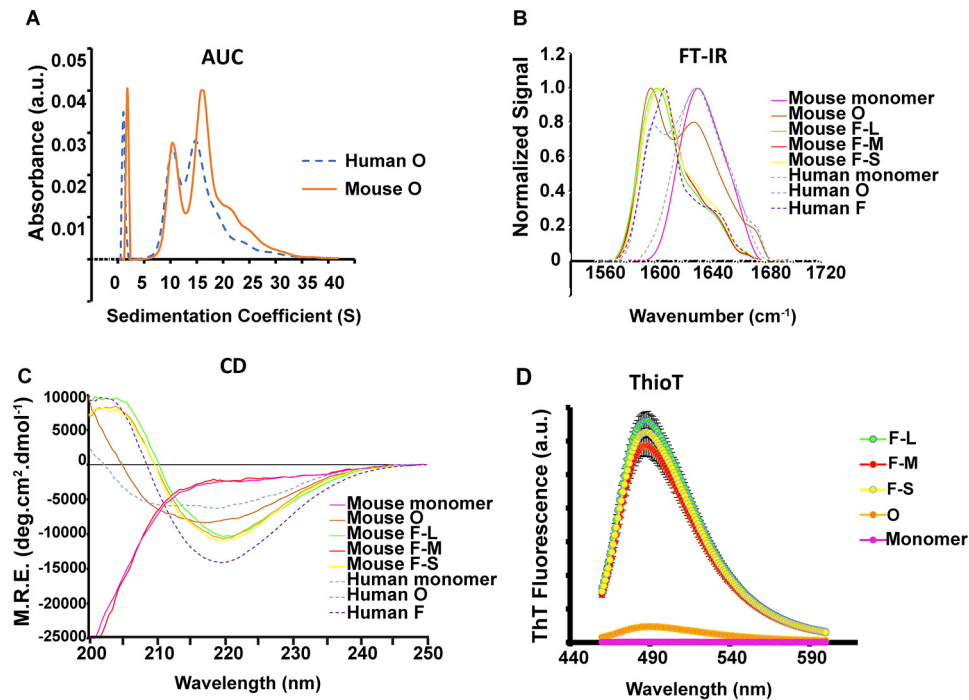


Figure 2. Structural characterization of α -synuclein species used in the *in vivo* mouse studies. *A*, absorbance unit (*a.u.*) sedimentation velocity measurement of human (blue dashed line) and mouse oligomers (orange line) shows 10S and 15S species. *B*, FTIR spectra show that F-L, F-M, and F-S species are primarily composed of parallel β -sheets (band at 1620–1630) and that the oligomeric (mouse and human) species are primarily antiparallel (band at 1620–1630 cm^{-1} and shoulder at 1695 cm^{-1}). The mouse and human oligomers have β -sheet structures of about 40 and 65%, respectively. *C*, CD shows that β -sheet content of oligomers (mouse and human) are intermediate between monomer and fibrils. *M.R.E.*, mean residue ellipticity. *D*, ThioT binding shows that the fibrils adopt an amyloid conformation; the oligomers show limited ThioT binding, and the monomer shows no ThioT binding.

tein was slower than that observed for mouse α -synuclein and was significantly slower when mouse α -synuclein fibrils were used to seed solutions of human α -synuclein monomers. Thus, the seeding efficiency was found to be higher when the species of α -synuclein seeds matches that of the free monomers; therefore, in the *in vivo* seeding studies that involve endogenous expression of mouse α -synuclein, it is recommended to use fibrillar seeds generated from mouse α -synuclein.

Using mouse protein, the ability of the oligomers and the different sizes of fibrils to seed formation of ThioT-positive amyloid fibrils were also determined (Fig. 3*B*). Seeding with the oligomers was highly inefficient and produced negligible fibril formation over time, a finding consistent with previous data for the human protein showing that these oligomers are trapped in a conformation distinct from that of the fibrillar species that is unable to efficiently elongate (7). In contrast, all the fibrillar samples used in this study were highly efficient in the seeding reactions.

To examine the ability of different α -synuclein fibrils to seed inclusion formation in neurons, 0.05 μM concentrations of monomeric, O, F-L, F-M, or F-S were added to WT primary hippocampal neurons, and the abundance of phosphorylated α -synuclein, a marker of pathological α -synuclein inclusion formation in cells, was measured (Fig. 3, *C* and *D*) (28). Neither monomeric nor oligomeric α -synuclein was found to produce p- α -synuclein inclusions, a result consistent with the finding that these forms of α -synuclein were not able to seed fibril formation *in vitro*. Immunofluorescence appeared diffuse and faint in experiments with both forms of α -synuclein. F-M and F-S produced similar quantities of inclusions, the majority of

which appeared as bright and thread-like structures similar to Lewy neurites found in synucleinopathy brains. In contrast, a small quantity of p- α -synuclein was visible in neurons exposed to the long fibrils, which is significantly lower compared with the levels observed in neurons exposed to fragmented fibrils (Fig. 3, *C* and *D*). To determine whether fibrils are more efficient at inducing α -synuclein inclusion formation because they are more efficiently internalized than oligomers, an internalization assay using α -synuclein labeled with Alexa488 was performed (29). This assay utilizes trypan blue to quench the fluorescence of extracellular α -synuclein conformers to distinguish extracellular from intracellular α -synuclein. In addition, when trypan blue binds to proteins on the membrane surface, it fluoresces when excited at 560 nm, allowing visualization of soma and neurites. Both short Alexa488-labeled α -synuclein fibrils (F-S) and O were internalized, whereas unsonicated fibrils showed minimal internalization, as demonstrated previously (Fig. 3*E*) (29). Surprisingly, oligomers showed significantly increased internalization compared with fibrils, indicating that the efficiency of fibril uptake does not account for robust inclusion formation. Table 1 summarizes the structural and morphological features of all the α -synuclein species used in this study.

Formation of inclusions in the brain by fibrils and oligomers

To determine the extent to which the oligomers and the different lengths of fibrils seed the formation of α -synuclein inclusions in the brain, mice received unilateral striatal injections of each species with the mass concentrations in the samples measured immediately after injection. Monomeric α -synuclein was

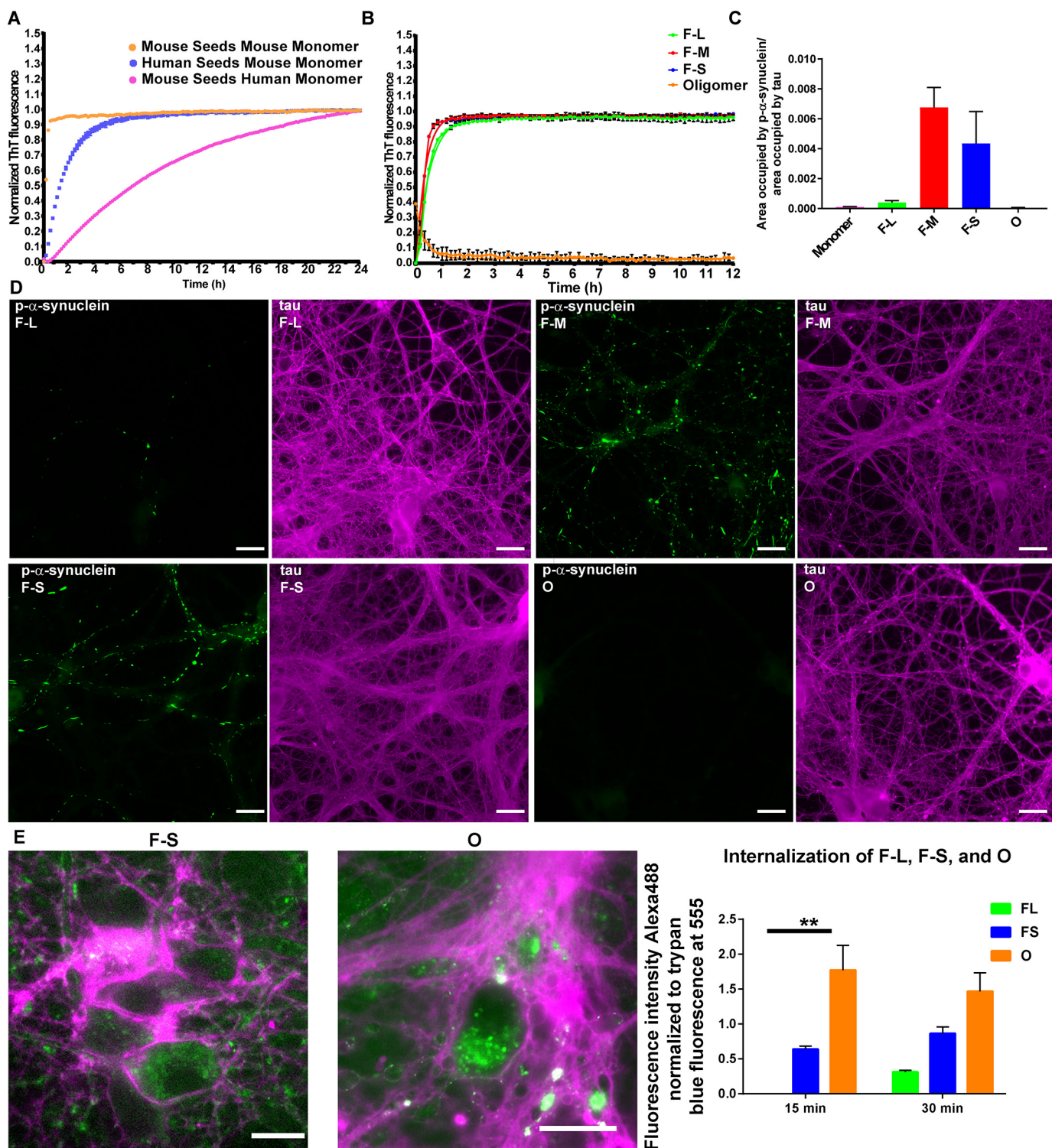


Figure 3. Seeding ability of the difference assembled forms of α -synuclein species *in vitro* and in primary neurons. *A* and *B*, monomer (100 μ M) was incubated with 5 μ M fibrillar or oligomeric seeds, and the fluorescence of samples incubated with ThioT was quantified over time. *C* and *D*, for the primary hippocampal neurons, 70 nm F-L, F-M, F-S, or oligomers were added to the neurons, and after 7 days, the neurons were fixed, and inclusion formation was visualized using an antibody to p- α -synuclein (green). Immunofluorescence for tau (magenta) shows the distribution of axons (scale bar, 50 μ m). Image *E* was used to quantify the percent area occupied by p- α -synuclein fluorescence normalized to the area occupied by tau fluorescence. The data are presented as the mean \pm S.E. *E*, primary hippocampal neurons were preincubated with Alexa488-tagged F-L, F-S or O for 30 min at 4 $^{\circ}$ C to allow binding to the cell surface. The neurons were then incubated for 15 or 30 min at 37 $^{\circ}$ C to allow internalization. Fluorescence of external α -synuclein-Alexa488 was quenched using trypan blue. Images show representative α -synuclein-Alexa488 fibrils or oligomers. When trypan blue binds to proteins on the cell surface, it fluoresces at 560 nm, which is shown in the images as magenta (scale bar, 50 μ m). The fluorescence intensity of Alexa488 from 10 fields per condition was quantified and normalized to trypan blue immunofluorescence. The internalization experiments were repeated two times. **, $p < 0.01$.

Table 1
Summary of biophysical characteristics of the species of α -synuclein used in this study

NA means not applicable.

| Species | Average length | Secondary structure | Configuration | Amyloid | Seeding-competent |
|-----------------------------------|----------------|---------------------|---------------|---------|-------------------|
| Monomer | NA | Random coil | NA | No | No |
| Fibrils | 266 | 60% β -sheet | Parallel | Yes | Yes |
| Fragmented fibrils (mix, "F-M") | 120 | 60% β -sheet | Parallel | Yes | Yes |
| Fragmented fibrils (short, "F-S") | 70 | 60% β -sheet | Parallel | Yes | Yes |
| Oligomers ("O") | 54 | 30% β -sheet | Anti-parallel | No | No |

also injected as a control. In the case of the oligomeric samples, the concentration of α -synuclein was determined by absorbance at 280 nm (the extinction coefficient used was $8278 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for oligomers); the fibrillar samples were first dissociated into monomeric units using guanidinium hydrochloride, and the concentration of protein in the sample was then determined (the extinction coefficient used was $7450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The concentration of the oligomers was determined to be $300 \mu\text{M}$ and that of F-L, F-M, and F-S to be $150 \mu\text{M}$, although the fibrils were initially prepared using $300 \mu\text{M}$ α -synuclein. Since this study was initiated, we published a recommendation that fibrils should be freshly made before injections, rather being frozen, and that the concentration of fibrils should be measured immediately before injection (19). Thus, the concentration of oligomers injected was twice that of the fibrils in terms of monomer equivalents.

The mice were perfused 3 months after injection of the α -synuclein species. Immunohistochemistry was performed using an antibody specific for α -synuclein phosphorylated at serine 129, one of the post-translational modifications of α -synuclein in Lewy neurites and Lewy bodies in synucleinopathy brains (28). In synucleinopathy models, there is very little pSer-129- α -synuclein in neurons from control WT mice. However, exposure of neurons to fibrils produces α -synuclein-abundant inclusions that are highly phosphorylated (5). These fibril-induced inclusions have also been shown in previous studies to be ubiquitin- and p62-positive and are insoluble in detergent (5, 16, 30–32). Importantly, when neurons from α -synuclein knockout mice are exposed to fibrils, the neurons show minimal pSer-129- α -synuclein immunoreactivity (4). In both monomer- and oligomer-injected mice (Fig. 4A), immunoreactivity for p- α -synuclein appeared to be diffuse in the cytosol, possibly representing a pool of monomeric α -synuclein protein targeted for degradation (33). Unilateral striatal injections of F-L, F-M, and F-S all resulted in the formation of p- α -synuclein-positive inclusions that produced more intense signals compared with oligomer-injected mice. The inclusions appeared as Lewy neurite-like threads in the neuropil and skein-like inclusions in the soma. The abundance of neurons with inclusions in the soma was measured using a semi-quantitative rating scale (Fig. S3), and the average level within the animals in each group was calculated. Table 2 shows the list of the brain areas containing inclusions along with a ranking based on the quantification process in the different brain areas. The brain areas with the most abundant inclusions included the cortex, amygdala, and striatum. Except for the SNc, which only showed inclusions on the side ipsilateral to the injection, all the brain areas investigated showed bilat-

eral inclusions after unilateral injections of α -synuclein species in the striatum, although the ipsilateral side consistently showed more inclusions than the contralateral side (Fig. 4C). The fragmented fibrils (F-M and F-S) produced significantly more inclusions than nonfragmented fibrils (F-L), although there were no significant differences in the abundance of inclusions between F-M- and F-S-injected mice (Fig. 3).

Appearance of p- α -synuclein inclusions in different brain regions at different time points following injections of fibrillar species

The most abundant inclusions appear in the cortex, amygdala, and SNc. These brain regions all project to the striatum (34), suggesting that the aggregates are internalized into the axon terminals, and the resulting inclusions spread within the neuron to the soma. This is consistent with findings that after addition of fibrils to neurons of nontransgenic mice endogenously expressing α -synuclein, inclusions appear first in axons and then at later time points in the soma (4), and is also consistent with the highest concentration of α -synuclein being at the presynaptic terminals (35). To confirm the observation that inclusions appear in brain nuclei that project to the striatum, we co-injected the fibrillar samples with retrotracer beads into the right dorsolateral striatum. Neither the retrotracer beads nor p- α -synuclein-positive inclusions had appeared in the SNc (Fig. 5A) or amygdala 1 week after injections. In the cortex, however, small fluorescent p- α -synuclein puncta that were co-localized with retrotracer beads were visible. Two weeks after injection, however, p- α -synuclein-positive inclusions were visible in the SNc, cortex, and amygdala in the same area as the retrotracer beads. By 4 weeks after injection, p- α -synuclein-positive inclusions were abundant in all three brain regions. These data show that the formation of p- α -synuclein-positive inclusions after injection of fibrils is not apparent until about 1 week after injections and that the cortex is the first area affected.

Loss of dopamine terminals in the striatum and dopamine neurons in the SNc

Unilateral injection of sonicated fibrils into the striatum was previously shown to produce a significant, $\sim 35\%$, loss of dopaminergic neurons in the SNc relative to mice injected with saline solution (5). The loss occurred 6 months following injection of fibrils, although there were no statistically significant differences in the numbers of tyrosine hydroxylase (TH)-positive dopamine neurons 3 months after injection. Here, we used unbiased stereology to quantify the numbers of TH-positive neurons in the ipsilateral and contralateral SNc of mice

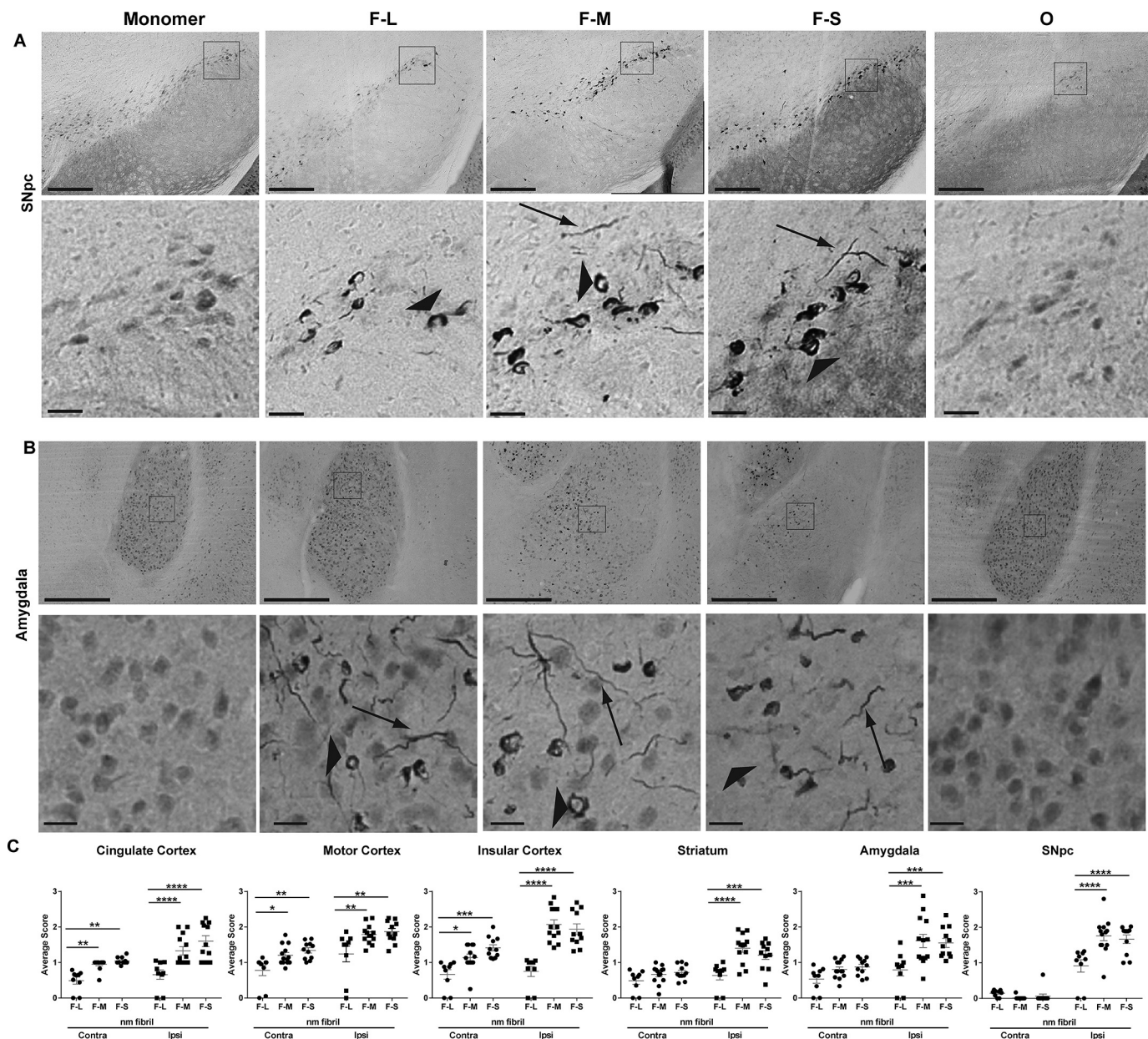


Figure 4. Inclusion formation in the mouse brain after injection of different forms of α -synuclein. C57BL/6J mice received unilateral striatal injections of 2 μ l of soluble monomer (300 μ M), F-L (150 μ M), F-M (150 μ M), F-S (150 μ M), and O (300 μ M). After 3 months, mice were perfused, and immunohistochemistry was performed using an antibody to p- α -synuclein. Representative images from the SNc (A) and amygdala (B) are shown. Arrowheads indicate inclusions in the soma, and arrows indicate Lewy neurite-like inclusions. C, abundance of inclusions was measured by an investigator blinded to experimental conditions (supporting material 1). Numbers of mice are as follows: monomer (12); F-L (11); F-M (12); F-S (11); and O (15). Data are shown as the mean score \pm S.E. and were analyzed using a two-way ANOVA, α -synuclein species/cingulate $F(2,30) = 37.85, p < 0.0001$; α -synuclein species/motor cortex $F(2,30) = 7.9, p < 0.002$; α -synuclein species/insular cortex $F(2,30) = 22.3, p < 0.0001$; α -synuclein species/striatum $F(2,30) = 8.5, p < 0.001$; α -synuclein species/amygdala $F(2,30) = 6.6, p = 0.004$; α -synuclein species/SNc $F(2,30) = 6.2, p < 0.005$. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Scale bar, 100 μ m (top panels); 20 μ m (bottom panels).

unilaterally injected with the different α -synuclein species. Three months after injection, only F-S produced a significant, $\sim 30\%$, loss of dopaminergic neurons compared with monomer-injected mice in the ipsilateral SNc (Fig. 6). The number of dopaminergic neurons on the side ipsilateral to the injection site were significantly reduced relative to the noninjected side (Fig. 6B). Oligomers produced a significant reduction in the number of neurons on the side ipsilateral to the injection site relative to the noninjected side. To determine whether dopamine neurons are dying in mice injected

with α -synuclein species or whether TH levels are simply being down-regulated, double-labeling immunofluorescence measurements for TH and NeuN (Fig. S4) were performed in the SNc. Compared with mice that received unilateral injections of monomeric α -synuclein, there was a slight, but not statistically significant, reduction in the number of NeuN-positive neurons in the mice that received unilateral injections of F-S. The TH immunofluorescence in the F-S- and O-injected mice appeared beaded compared with monomer-injected mice, suggestive of dying neurons. How-

Table 2**Mice received unilateral striatal injections of F-S and were perfused 3 months later**

Immunohistochemistry was performed on brain sections using an antibody to p- α -synuclein. The abundance of inclusions in these brain areas was rated on a scale from 0 to 3 (see Fig. S1), and the brain areas are listed in order of average score. Brains from nine independent mice were scored to obtain the average score.

| Brain area | Average p- α -synuclein score–ipsilateral | Average p- α -synuclein score–contralateral |
|------------------------|--|--|
| Motor cortex | 1.6 | 1.1 |
| Somatosensory cortex | 1.6 | 1 |
| Insular cortex | 1.6 | 1 |
| SNC | 1.6 | 0 |
| Auditory cortex | 1.4 | 0.9 |
| Lateral orbital cortex | 1.3 | 0.9 |
| Amygdala | 1.3 | 0.6 |
| Ectorhinal cortex | 1.3 | 0.9 |
| Striatum | 1.1 | 0.5 |
| Cingulate cortex | 1.0 | 1.0 |
| Visual cortex | 1.0 | 0.4 |
| Piriform cortex | 1.0 | 0.5 |
| Nucleus accumbens | 0.4 | 0.4 |
| Retrosplenial cortex | 0.7 | 0.3 |
| Subiculum | 0.6 | 0 |
| Hippocampus | 0.4 | 0 |
| Mammillary nucleus | 0.5 | 0.1 |
| Olfactory tubercle | 0.2 | 0 |
| Fimbria | 0 | 0 |
| Cerebellar flocculus | 0 | 0 |
| Colliculus | 0 | 0 |

ever, there were also TH-positive neurons that appeared healthy. These findings suggest the existence TH-positive dopaminergic and nondopaminergic neuron subtypes in the SNC that resist toxic α -synuclein fibrils.

The loss of dopamine terminals from the striatum was measured by immunofluorescence detection of the dopamine transporter (DAT) (Fig. 6, C and D). Mice injected with both F-M and F-S showed a significant, ~30%, reduction in DAT-positive dopamine terminals relative to monomer-injected mice. However, only F-M-injected mice showed a statistically significant loss of TH-positive axons in the SNC (Fig. S5). The difference between DAT and TH labeling in the striatum could simply result from technical differences in immunofluorescence labeling or differences between vesicularly-localized DAT versus cytosolically-localized TH. Alternatively, the possible interaction between α -synuclein aggregates and DAT may alter the trafficking and localization of this transporter, which could potentially be an interesting line of investigation for the future. In addition, unlike the unilateral loss of dopamine neurons in the SNC, the loss of dopamine terminals in the striatum was bilateral. Thus, smaller fibrils of α -synuclein cause a loss of dopamine neurons and dopamine terminals at 3 months following injections.

Motor-behavior defects caused by fibrils and oligomers

We next determined whether injection of fibrils and the consequent loss of dopaminergic neurons and terminals were associated with defects in motor behavior. After 3 months, only mice that received unilateral injections of F-S showed a significant increase relative to untreated mice in the time needed to descend a pole, a well-established test for “bradykinesia” (Fig. 7) (36). Using the cage hang test, a test of motor strength, it was found that only F-S-injected mice also dropped from the lid of a cage in consistently shorter times compared with control mice, also indicative of motor defects (5). There were no signif-

icant differences among any of the groups of treated mice in an open field test for time spent in the center of the field (a measure of “anxiety”) or in the speed of movement. A cylinder test modified specifically for mice (37) also showed no differences among the groups in the average numbers of hind limb steps or rears. Injections of short fragments of fibrils therefore show much greater defects in behavioral tests of bradykinesia and motor strength compared with much larger fibrils and toxic but propagation-deficient oligomers.

Discussion

Designing therapeutic strategies to halt the progression and spread of synucleinopathies such as PD requires characterization of the specific forms of α -synuclein that are responsible for given phenotypes, including the formation of inclusions in multiple brain areas, the loss of dopamine terminals, the reduction in the numbers of neurons in the SNC, and the loss of normal motor behavior. In this study, we have used a combination of biophysical, biochemical, and behavioral assays to demonstrate that small aggregates composed primarily of small fragments of α -synuclein fibrils are able to induce typical features of PD when injected into the brains of healthy mice. Such aggregates are able to grow and recruit endogenous monomeric α -synuclein, suggesting that these species are important agents for the spreading of toxicity and disease. By contrast, stable oligomeric aggregates of α -synuclein, which do not undergo elongation, were unable to induce the formation of inclusions by endogenous α -synuclein, to cause loss of dopamine terminals in the striatum, to cause loss of dopamine neurons in the SNC, or to cause deficiencies in motor behavior. The oligomers, however, caused a significant loss of dopamine neurons in the SNC on the side ipsilateral to the injection compared with the contralateral side, a finding consistent with their established cytotoxic nature but lack of seeding potency (7, 14, 38, 39). Considering all the present results together, we demonstrate that other properties, in addition to toxicity, such as the ability of aggregates to seed the formation of new aggregates and to spread between cells, are important for the induction of PD phenotypes in an animal model and that the α -synuclein species that are most efficient in spreading pathology are small fibrillar aggregates, particularly fibrillar oligomers with high-seeding efficiency. Indeed, our results suggest that the ability of aggregated species to recruit monomeric protein molecules and to generate new toxic aggregates is a more important feature than the inherent toxicity of the injected species for the development of PD-related phenotypes (i.e. highly-toxic, seeding-deficient oligomers versus less toxic and seeding-competent small fibrils). In addition, our results suggest that the major disease-spreading agents consist of seeding-efficient α -synuclein small fibrillar aggregates rather than the possible specific conformers generated from the toxic cascade of events induced by the toxic aggregates and that could be transferred from damaged to healthy cells. Finally, given the potential highly toxic and seeding-competent nature of the fibrillar oligomers generated during the aggregation reaction, in contrast to the seeding-deficient features of the kinetically trapped oligomers used in this study, as well as their high efficiency in enabling cell internalization compared with the fibrillar species, we hypothesize that

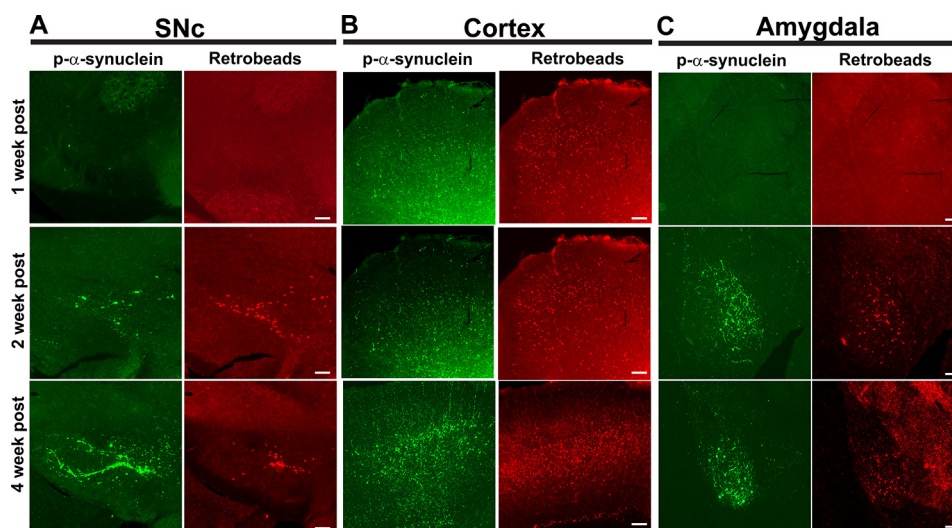


Figure 5. Appearance of p- α -synuclein inclusions in brain areas that project to the striatum. Fibrils and retrotracer beads were co-injected unilaterally into the striatum. After 1 week ($n = 3$), 2 weeks ($n = 3$), or 4 weeks ($n = 3$), mice were perfused, and immunofluorescence to p- α -synuclein (green) was performed. The retrotracer beads are shown in red, and the merged images include p- α -synuclein, retrotracer beads, and Hoechst (blue). Representative images from the SNc, motor cortex, and amygdala are shown.

these species are also likely to be important players in the development and spreading of disease. Indeed, we have recently observed that the interaction of extracellular short fibrillar species with cells results in the generation of on-pathway oligomers that are readily internalized⁶ and that could therefore efficiently seed the intracellular formation of new toxic aggregates. Overall, our results highlight the importance of fibrillar aggregates of α -synuclein in the induction of PD-related phenotypes. Future studies to examine the mechanisms by which larger inclusions can fragment within the cell to become new and efficient nuclei for the propagation of α -synuclein inclusions and disease phenotypes will be of great interest, including disaggregation by chaperones or lysosomal proteases (40).

Our results suggest that inhibiting the accumulation of small fibrillar α -synuclein fragments generated either during the process of protein aggregation or by the fragmentation or disaggregation of longer fibrils have the potential to be a therapeutic strategy against PD progression. Indeed, immunotherapy using antibodies raised against α -synuclein are in phase II clinical trials (6). However, antibodies that are not selective for fibrillar α -synuclein also reduce the total concentration of α -synuclein and may have deleterious effects because decreasing levels of α -synuclein impairs dopamine transmission (41, 42). Antibodies that selectively target fibrillar aggregates and reduce their ability to spread from cell-to-cell could therefore reduce the rate of disease propagation. One example is BIIB054, which selectively binds fibrillar α -synuclein (43), and in mouse models of PD, intraperitoneal injections of this antibody inhibited inclusion formation, dopamine neuron loss, and defects in motor behavior.

It has been shown that formation of α -synuclein oligomers *in vivo* by expression of human α -synuclein pathological variants using lentivirus induces loss of dopamine neurons (44). The oligomers used in this study have antiparallel β -sheet structure, whereas the fibrillar structures are parallel, and so they are

unable to elongate as they are kinetically trapped. It is likely that oligomers containing a parallel β -sheet structure are transient species involved in the formation of fibrils and are therefore able to elongate and proliferate. In addition, it is also likely that a range of different types of oligomeric species exist *in vivo*, including species bearing post-translational modifications, which are likely to share with the fibrillar species the ability to disrupt membranes and to perturb other cellular processes such as mitochondrial function (45, 46).

Overall, our data highlight the importance of precise biophysical definitions of the aggregated forms of α -synuclein that are responsible for the major events of dysfunction related to PD. In this study, injection of the small fibrillar fragments (~70 nm in length) produced p- α -synuclein inclusions, neuronal loss, and motor dysfunction. The fibril preparation, similar to that used in previous studies (5, 30), containing longer fragments (40–225 nm) produced p- α -synuclein inclusions but did not cause significant dopamine neuron loss or behavioral phenotypes at 3 months following injections. This result indicates that fibril preparations enriched for small fragments will produce the most robust phenotypes. Although the fibril model is becoming widely accepted for reproducing PD-like pathology, variability has been reported in obtaining phenotypes that could be caused by heterogeneous fibril preparations with a wide range of fibril sizes.

Although the length of fragments does not substantially influence the seeding of fibril formation *in vitro*, smaller fragments are required for seeding of α -synuclein pathology in neurons and in the brain. This is likely to be because the smaller fragments bind more efficiently to cell-surface receptors such as Lag3, Na⁺K⁺-ATPase, and heparin sulfate proteoglycans, and only the smaller fragments can be internalized by endocytosis (47–49). Furthermore, smaller fragmented fibrils are the most likely species to be released from neurons and to propagate throughout the brain.

Our study adds to the results of earlier investigations that demonstrated that aggregates consisting solely of α -sy-

⁶ N. Cremades, submitted for publication.

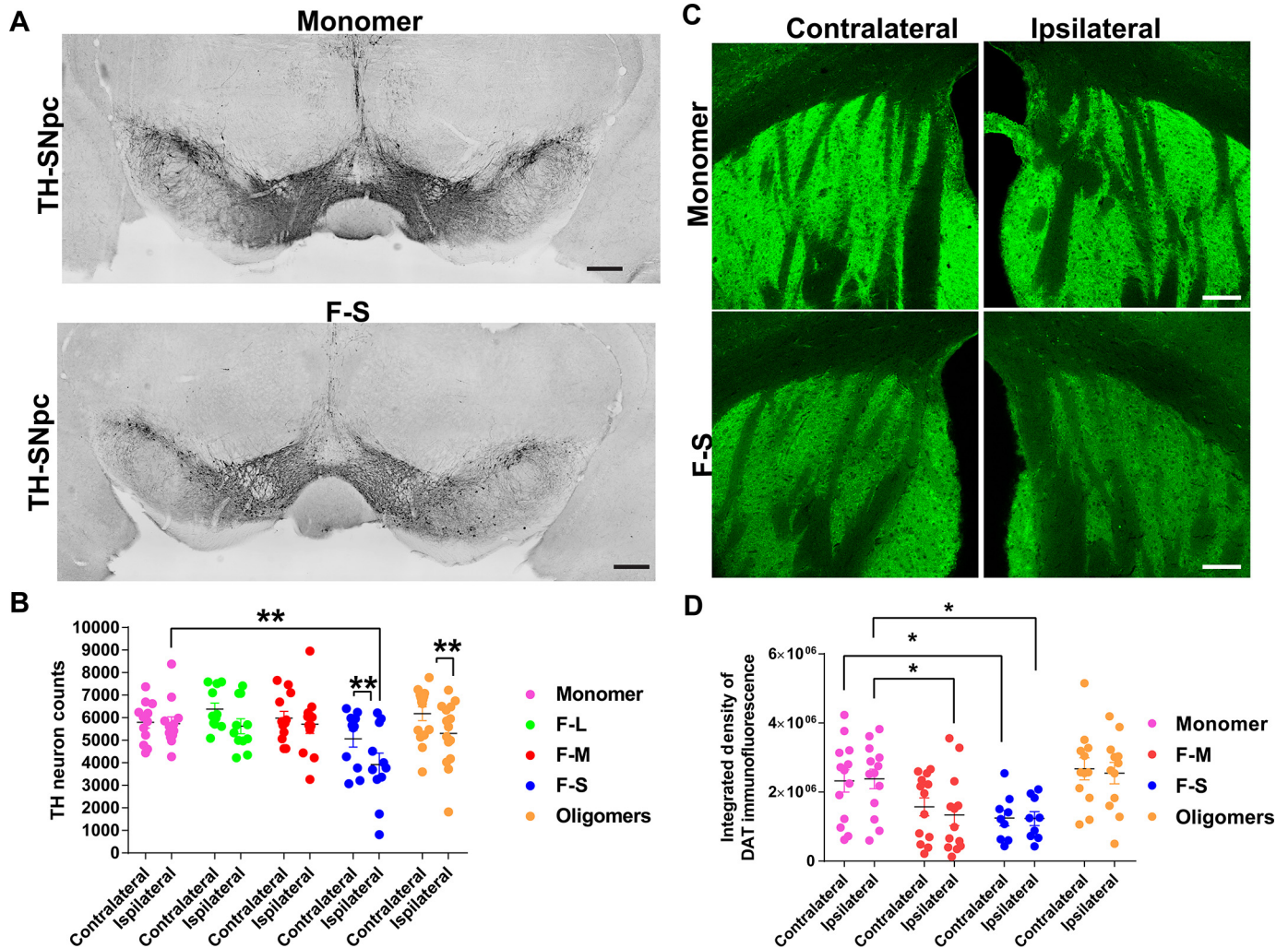


Figure 6. Quantitation of TH-positive neurons in the SNc and DAT terminals in striatum following unilateral striatal injections of different α -synuclein species. C57BL/6J mice received unilateral striatal injections of 2 μ l of soluble monomer (300 μ M), F-L (150 μ M), F-M (150 μ M), F-S (150 μ M), and O (300 μ M). After 3 months, the mice were perfused, and immunostaining was performed. Numbers of mice are as follows: monomer (12); F-L (11); F-M (12); F-S (11); and O (15). *A*, representative images of tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in the SNc of monomer- and F-S-injected mice. *B*, unbiased stereology of tyrosine hydroxylase-positive neurons performed by an investigator blinded to experimental conditions. Data are shown as the mean counts \pm S.E. and analyzed using a two-way ANOVA, α -synuclein species $F(5,67) = 2.7$, $p = 0.03$. *C*, immunofluorescence performed using an antibody to DAT. Images were captured using confocal microscopy. Representative images of the striatum from monomer and F-S-injected mice are shown. *D*, ImageJ was used to quantify the integrated fluorescence intensity of DAT in the striatum. Data are shown as the mean counts \pm S.E. and analyzed using a two-way ANOVA, α -synuclein species $F(3,43) = 5.7$, $p = 0.002$. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. Scale bar, 100 μ m.

nuclein can generate PD phenotypes (5, 16, 30, 31, 50). However, in the future, it will be of great interest to characterize the structural properties of aggregates purified from diseased brains. Interestingly, brain extracts from patients with multiple system atrophy have been reported to be more effective than those from PD brains at inducing α -synuclein inclusion formation and disease spreading when injected into experimental animals (51, 52). α -Synuclein species involved in Lewy body disease may bind receptors in the cortex and limbic regions more readily than do species involved in PD, which may bind more efficiently to receptors in the SNc. Future studies are required to determine how different aggregates contribute to specific disease phenotypes. Overall, our findings indicate that small fibrillar aggregates of α -synuclein are necessary for inducing pathology and spreading, and they suggest that therapeutics should aim to reduce formation and accumulation of such species.

Experimental procedures

Animals

All animal protocols were performed at AAALAC-accredited sites and approved by the University of Alabama at Birmingham Institutional Animal Care and Use Committee. C57BL/6J male mice were obtained from The Jackson Laboratory and housed in groups of no more than five animals per cage. Food and water were accessible 24 h, and animals were kept on a 12-h light/dark cycle.

Preparation of α -synuclein species

α -Synuclein monomer was purified according to previously published protocols (53). The presence of endotoxin was detected using the Pierce LAL chromogenic endotoxin quantitation kit and cleaned using Pierce high-capacity endotoxin removal spin columns. Endotoxin levels were measured to be

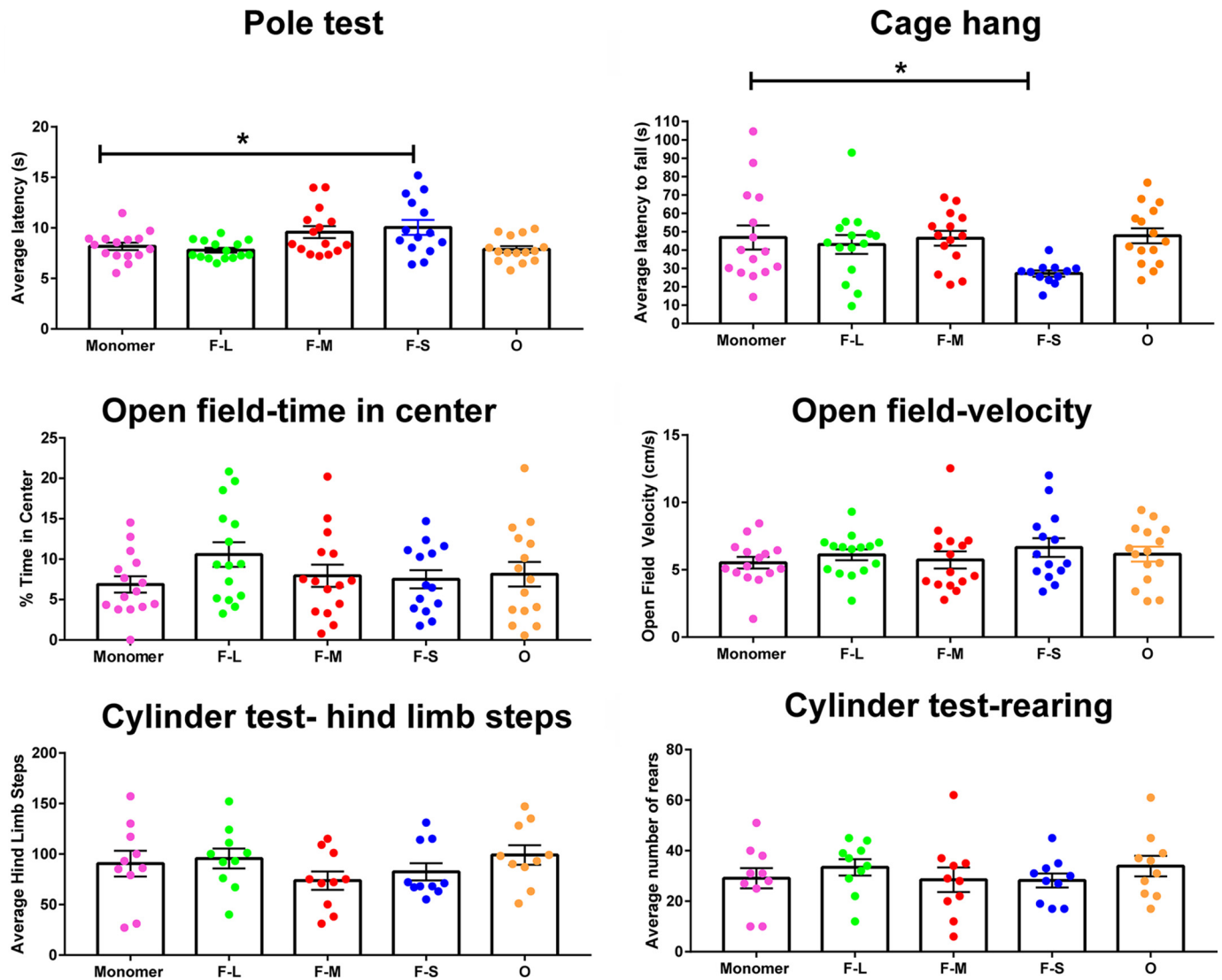


Figure 7. Motor behavior of mice following unilateral striatal injections of different α -synuclein species. C57BL/6J mice received unilateral striatal injections of 2 μ l of monomer (300 μ M), F-L (150 μ M), F-M (150 μ M), F-S (150 μ M), and O (300 μ M). Three months later, mice were subjected to the following behavior tests: open field, pole test, cage hang, and cylinder test (modified for mice). Numbers of mice for pole test, cage hang, and open field are as follows: monomer (12); F-L (11); F-M (12); F-S (11); and O (15). Numbers of mice for cylinder test are as follows: monomer (10); F-L (10); F-M (10); F-S (10); and O (10). The data were analyzed by one-way ANOVA: pole test $F(4,69) = 4.7$, $p = 0.002$; cage hang $F(4,66) = 2.86$, $p = 0.03$; open field/% time center $F(4,69) = 1.1$, $p =$ not significant; open field/velocity $F(4,69) = 0.6$, $p =$ not significant; hind limb steps $F(4,45) = 1.1$, $p =$ not significant; rearing $F(4,45) = 0.5$, $p =$ not significant. *, $p < 0.05$.

less than 0.0113 ng/ml. α -Synuclein fibrils were prepared as published previously (53). Before surgeries, fibrils were sonicated using a 1/8-inch probe tip sonicator (Thermo Fisher Scientific catalog no. FB120110) at 30% power for 30 s total, 1 s on and 1 s off. Short fibrils were isolated using an EMD Millipore Millex0.22- μ m filter unit. Immediately before injection of monomeric α -synuclein, α -synuclein protein was spun at 20,000 \times g at 4 $^{\circ}$ C. β -Sheet kinetically trapped α -synuclein oligomers were freshly prepared as described previously (7, 13, 14). Briefly, 6 mg of lyophilized protein was resuspended in PBS buffer at a pH of 7.4 and at a concentration of 12 mg \cdot ml $^{-1}$. The solution was filtered through a 0.22- μ m cutoff filter and subsequently incubated at 37 $^{\circ}$ C for 24 h in stationary mode and without agitation. Small numbers of fibrillar species formed during the incubation were removed by ultracentrifugation for 1 h at 90,000 rpm (using a TLA-120.2 Beckman rotor; 288,000 \times g). The excess of

monomers and small oligomers in the sample was then removed by means of several filtration steps using 100-kDa cut-off membranes, which resulted in the enrichment and concentration of the oligomeric α -synuclein species. The oligomers prepared in this manner have been found to be stable for many days (7). They were shipped from The University of Cambridge, the same day of preparation and injected the day of receipt (1/2 days after preparation) to ensure a stable, characterized conformation.

Biophysical characterization of α -synuclein conformers

A comparative morphological and structural analysis of the different conformers has been performed using a variety of complementary biophysical techniques, and a detailed structural analysis has recently been carried out with oligomers of human α -synuclein using both cryo-EM and solution and solid-

state NMR spectroscopy (7, 14). TEM images were obtained using a Philips CEM100 transmission electron microscope (CAIC, University of Cambridge, UK). The samples were applied to Formvar carbon-coated nickel grids, washed with double-distilled H₂O, and negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate. AFM images were acquired using tapping mode in a Multimode 8 atomic force microscope (Bruker, Billerica, MA). The different α -synuclein species (0.1–1 μ M, 10 μ l) were applied onto a layer of freshly cleaved mica and allowed to air-dry. The samples were washed with water to remove any salts and dried again before imaging. Images were processed with Gwyddion open source software (<http://www.gwyddion.net>).⁷ Sedimentation velocity measurements using AUC were carried out at 20 °C at 38,000–43,000 rpm (106,750–136,680 \times g) by using a Beckman-Coulter Optima XL-I analytical ultracentrifuge with an An-50 Ti rotor (Beckman-Coulter, Brea, CA). The sedimentation coefficient distributions, corrected to standard conditions by using the SEDNTERP program (54), were calculated via least-squares boundary modeling of sedimentation velocity data using the *c(s)* and *lsg(s)* methods, as implemented in the SEDFIT program (www.analyticalultracentrifugation.com)⁷ (58). FTIR spectra of the different α -synuclein species (100–400 μ M) were acquired in PBS and analyzed in a Bruker BioATRCell II using a Bruker Equinox 55 FTIR spectrophotometer (Bruker Optics Ltd., UK) equipped with a liquid nitrogen-cooled mercury cadmium telluride detector and a silicon internal reflection element. For each spectrum, 256 interferograms were recorded at 2 cm⁻¹ resolution. Data processing of the amide I region (1720–1580 cm⁻¹) was performed with the Opus software package (Bruker Optics Ltd., UK) and consisted of a background subtraction of the buffer spectrum, atmospheric compensation, and baseline subtraction. All absorbance spectra were normalized for comparison. Far-UV CD spectra of the different α -synuclein species were acquired at 20 °C between 200 and 250 nm, using a scan speed of 50 nm min⁻¹ and a bandwidth of 1 nm. 10 accumulations were recorded for each sample, using a 1-mm path length cuvette and a J-810 Jasco spectropolarimeter (Tokyo, Japan), equipped with a thermostated cell holder. The signal was converted to mean residue ellipticity. ThioT fluorescence measurements were performed in a 2 \times 10-mm path length cuvette, using a Varian Cary Eclipse fluorimeter (Palo Alto, CA) in a temperature-controlled cell holder, exciting the sample at 446 nm and recording the emission fluorescence spectrum between 460 and 600 nm (5-nm slitwidths). Each protein species (10 μ M) was incubated with ThioT (50 μ M, 416 nm = 26,620 M⁻¹ cm⁻¹) for 30 min before performing the measurement. For the seeding experiments, 10 μ M of each protein species (or 5 μ M in the case of the cross-seeding experiments) were added to a solution of 100 μ M α -synuclein monomer, 50 μ M ThioT, and 0.02% (w/v) sodium azide. The ThioT fluorescence was recorded in a BMG Fluostar Optima (BMG LABTECH, Aylesbury, Bucks, UK) using an excitation filter of 440 nm and an emission filter of 480 nm, at a constant temperature of 37 °C.

Primary neurons were plated at 100,000 neurons per well in a 24-well tray onto poly-D-lysine-coated coverslips and maintained in Neurobasal media, Glutamax, and B27 as described previously. The different conformers of α -synuclein were added to neurons at 7 days *in vitro* at a final concentration of 70 nM. Neurons were fixed 7 days later, and immunofluorescence to p- α -synuclein (Abcam) and tau (Dako) was performed as described previously (4).

Internalization assay was essentially performed as described (29) with some modifications. We thus generated Alexa488-labeled fibrils and oligomers using the α -synuclein mutant E122C to incorporate the fluorophore at the upstream position of the recognized C-terminal truncation sites. E122C α -synuclein was purified and labeled using Life Technologies, Inc., Alexa488 C₅-maleimide. The labeled protein was purified from free dye using a P10 desalting column and a Sephadex G-25 matrix. To perform the internalization experiments, primary neurons were incubated for 30 min in cold PBS containing α -synuclein–Alexa488 fibrils or oligomers (final concentration 70 nM) to allow the species to bind the plasma membrane. The neurons were then transferred to 37 °C to allow internalization. Extracellular α -syn–Alexa488 fibrils were quenched with freshly made trypan blue, final concentration 1 mM in PBS. Images were captured using a Zeiss Axio Observer Z1 with Colibri LED illumination. The excitation/emission was 470/550 nm for the fibrils and 560/630 nm for trypan blue. The average intensity of each frame captured was quantified using Fiji and normalized to the fluorescence signal from trypan blue bound to the neuronal membrane.

Surgeries

Surgeries were performed using C57BL/6J mice aged 2–4 months using a digital stereotaxic frame (David Kopf). For the duration of surgery, mice were deeply anesthetized with vaporized isoflurane on a gas mask fitted to a digital stereotaxic frame. Mouse respiration was monitored throughout the procedure. Proteins for injection were drawn to a gas-tight syringe with a 26s-gauge needle (Hamilton) and controlled by a digital pump. Two μ l of protein were injected, and subsequent withdrawal of the needle occurred over the course of 12 min. Solutions were injected into the right dorsal striatum using the following coordinates: 0.2 mm anterior and 2.0 mm lateral to the bregma, and 2.6 mm ventral relative to the skull. Scalp incisions were closed with EZ-Clips (Thermo Fisher Scientific).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Mice injected with various α -syn conformations were anesthetized post-injection with isoflurane and transcardially perfused with a saline solution (0.9% NaCl, 0.005% sodium nitroprusside, and 10 units/ml heparin sodium) followed by freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA) buffered in phosphate-buffered saline (PBS). Brains were removed, postfixed for 24 h in 4% PFA and PBS solution, floated into 30% sucrose PBS solution for up to 3 days, frozen in methylbutane solution (–50 °C), and stored at –80 °C. Brain tissue was sectioned at 40 μ M with a freezing microtome. Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed as described previously (55). Antibodies included the following: p- α -synuclein (EP1536Y

⁷ Please note that the JBC is not responsible for the long-term archiving and maintenance of this site or any other third party hosted site.

(Abcam)) (56); tyrosine hydroxylase (Abcam); and dopamine transporter (a generous gift from Dr. Allan Levey, Emory University) (57). For the DAT and TH immunofluorescence in the striatum, confocal images of coronal sections (bregma: −0.5 mm anterior/posterior) were captured, and ImageJ was used to quantify the integrated intensity of the dorsal portion of the striatum.

Behavior assays

All behavioral tests were performed with the help of our Neuroscience Behavioral Core, University of Alabama at Birmingham. Mice were acclimated to the test environment for at least 30 min prior to testing and were given at least a 1-day rest between each test.

Open field test—Each mouse was placed at the side of a 100 × 100 × 50-cm white Plexiglas open field. A computerized tracking system (Ethovision) recorded movement for 5 min from which we derived the following: the amount of time spent in the center of the test apparatus, and the velocity of movement.

Cylinder test—Mice were placed in a covered Plexiglas cylinder with activity recorded for 5 min by Ethovision software on a camera positioned below the cylinder. An experimenter blinded to the treatment conditions scored each video. The following behaviors were scored: number of rears, front limb steps, hind limb steps, and total steps (37).

Pole test—Mice were placed on top of a wooden pole (diameter 1 cm; height 50 cm) wrapped in chicken wire. Each subject completed five trials with a 1-min rest between each trial. Time to turn with nose facing down and time to reach the bottom of the pole were recorded and combined to derive the total time to descend. If a mouse did not climb down the pole after 2 min, the trial time was not included in that animal's average total time to descend.

Cage hang—Mice were placed on a cage top elevated 50 cm above a cage filled with bedding. The cage lid was shaken slightly and flipped over to measure latency to fall over the course of three trials (>1-min rest between each trial). A trial less than 10 s was performed again, and trials were concluded at 3 min if a mouse was still hanging.

Stereology

Stereology was completed using an Olympus BX51 microscope and StereoInvestigator software (MBF Biosciences) using the Neuroscience Molecular Detection and Stereology Core, University of Alabama at Birmingham. Contours were drawn around 6–7 serial sections containing SNc. Unbiased stereological estimation of total TH-positive neurons in the SNc contralateral and ipsilateral to injection was performed using the Optical Fractionator probe by an investigator blinded to experimental conditions.

Statistical analyses

Data were analyzed using GraphPad Prism. One-way or two-way ANOVA were performed. Outliers were identified using the ROUT method in GraphPad Prism. The only data in which two outliers were identified were in the cage hang motor test.

Author contributions—J. M. F., M. C.-C., N. M. A., J. D. C., D. R. T., A. A. Y., S. F., N. C., and L. A. V.-D. data curation; J. M. F., M. C.-C., J. F., N. M. A., J. D. C., S. W. C., J. F., S. F., J. R. K., N. C., and L. A. V.-D. formal analysis; J. R. K., N. C., and L. A. V.-D. supervision; J. M. F., M. C.-C., N. M. A., J. D. C., S. W. C., J. F., S. F., J. R. K., N. C., and L. A. V.-D. investigation; J. M. F., M. C.-C., N. M. A., J. D. C., S. W. C., D. R. T., J. F., A. A. Y., J. R. K., N. C., and L. A. V.-D. methodology; J. M. F., M. C.-C., C. M. D., N. C., and L. A. V.-D. writing-original draft; J. M. F., M. C.-C., C. M. D., J. R. K., N. C., and L. A. V.-D. writing-review and editing; N. C. and L. A. V.-D. conceptualization; N. C., and L. A. V.-D. validation; N. C. and L. A. V.-D. visualization; C. M. D., N. C., and L. A. V.-D. resources; N. C. and L. A. V.-D. software; N. C. and L. A. V.-D. funding acquisition; N. C. and L. A. V.-D. project administration.

Acknowledgments—We thank Andrew West for advice and suggestions on this work and Valentina Krendelchtchikova for help with purifying protein.

References

1. Cremades, N., and Dobson, C. M. (2018) The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiol. Dis.* **109**, 178–190 [CrossRef Medline](#)
2. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997) α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 [CrossRef Medline](#)
3. Kuusisto, E., Parkkinen, L., and Alafuzoff, I. (2003) Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of α -synuclein, ubiquitin, and p62. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1241–1253 [CrossRef Medline](#)
4. Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. A., Riddle, D. M., Stieber, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2011) Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **72**, 57–71 [CrossRef Medline](#)
5. Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2012) Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949–953 [CrossRef Medline](#)
6. Volpicelli-Daley, L., and Brundin, P. (2018) Prion-like propagation of pathology in Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neurol.* **153**, 321–335 [CrossRef Medline](#)
7. Chen, S. W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberaï, M., Aprile, F. A., Arranz, R., Ness, S., Roodveldt, C., Guilliams, T., De-Genst, E. J., Klenerman, D., Wood, N. W., Knowles, T. P., Alfonso, C., Rivas, G., et al. (2015) Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E1994–E2003 [CrossRef Medline](#)
8. Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P. H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B. H., and Melki, R. (2013) Structural and functional characterization of two α -synuclein strains. *Nat. Commun.* **4**, 2575 [CrossRef Medline](#)
9. Melki, R. (2018) How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol. Dis.* **109**, 201–208 [CrossRef Medline](#)
10. Dettmer, U., Newman, A. J., Soldner, F., Luth, E. S., Kim, N. C., von Saucken, V. E., Sanderson, J. B., Jaenisch, R., Bartels, T., and Selkoe, D. (2015) Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat. Commun.* **6**, 7314 [CrossRef Medline](#)
11. Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T. C. (2014) α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E4274–E4283 [CrossRef Medline](#)
12. Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Südhof, T. C. (2003) A broken α -helix in folded α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **278**, 15313–15318 [CrossRef Medline](#)








13. Cremades, N., Cohen, S. I., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertocini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P., Dobson, C. M., and Klenerman, D. (2012) Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* **149**, 1048–1059 [CrossRef](#) [Medline](#)
14. Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T. F., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Cremades, N., Ying, L., Dobson, C. M., and De Simone, A. (2017) Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* **358**, 1440–1443 [CrossRef](#) [Medline](#)
15. Osterberg, V. R., Spinelli, K. J., Weston, L. J., Luk, K. C., Woltjer, R. L., and Unni, V. K. (2015) Progressive aggregation of α -synuclein and selective degeneration of Lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell Rep.* **10**, 1252–1260 [CrossRef](#) [Medline](#)
16. Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Kubo, M., Shimozawa, A., Akiyama, H., and Hasegawa, M. (2014) Pathological α -synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 88 [CrossRef](#) [Medline](#)
17. Abdelmotilib, H., Maltbie, T., Delic, V., Liu, Z., Hu, X., Fraser, K. B., Moehle, M. S., Stoyka, L., Anabtawi, N., Krendelchtchikova, V., Volpicelli-Daley, L. A., and West, A. (2017) α -Synuclein fibril-induced inclusion spread in rats and mice correlates with dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **105**, 84–98 [CrossRef](#) [Medline](#)
18. Tarutani, A., Suzuki, G., Shimozawa, A., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S., and Hasegawa, M. (2016) The effect of fragmented pathogenic α -synuclein seeds on prion-like propagation. *J. Biol. Chem.* **291**, 18675–18688 [CrossRef](#) [Medline](#)
19. Polinski, N. K., Volpicelli-Daley, L. A., Sortwell, C. E., Luk, K. C., Cremades, N., Gottler, L. M., Froula, J., Duffy, M. F., Lee, V. M. Y., Martinez, T. N., and Dave, K. D. (2018) Best practices for generating and using α -synuclein pre-formed fibrils to model Parkinson's disease in rodents. *J. Parkinsons Dis.* **8**, 303–322 [CrossRef](#) [Medline](#)
20. Luk, K. C., Covell, D. J., Kehm, V. M., Zhang, B., Song, I. Y., Byrne, M. D., Pitkin, R. M., Decker, S. C., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2016) Molecular and biological compatibility with host α -synuclein influences fibril pathogenicity. *Cell Rep.* **16**, 3373–3387 [CrossRef](#) [Medline](#)
21. Xu, G., Gonzales, V., and Borchelt, D. R. (2002) Rapid detection of protein aggregates in the brains of Alzheimer patients and transgenic mouse models of amyloidosis. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **16**, 191–195 [CrossRef](#) [Medline](#)
22. Chang, E., and Kuret, J. (2008) Detection and quantification of τ aggregation using a membrane filter assay. *Anal. Biochem.* **373**, 330–336 [CrossRef](#) [Medline](#)
23. Celej, M. S., Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Fidelio, G. D., Ruyschaert, J. M., and Raussens, V. (2012) Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem. J.* **443**, 719–726 [CrossRef](#) [Medline](#)
24. Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrêne, Y. F., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., and Raussens, V. (2009) Antiparallel β -sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid β -peptide. *Biochem. J.* **421**, 415–423 [CrossRef](#) [Medline](#)
25. Qiang, W., Yau, W. M., Luo, Y., Mattson, M. P., and Tycko, R. (2012) Antiparallel β -sheet architecture in Iowa-mutant β -amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 4443–4448 [CrossRef](#) [Medline](#)
26. Kaye, R., Canto, I., Breydo, L., Rasool, S., Lukacsovich, T., Wu, J., Albay, R., 3rd., Pensalfini, A., Yeung, S., Head, E., Marsh, J. L., and Glabe, C. (2010) Conformation dependent monoclonal antibodies distinguish different replicating strains or conformers of prefibrillar A β oligomers. *Mol. Neurodegener.* **5**, 57 [CrossRef](#) [Medline](#)
27. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486–489 [CrossRef](#) [Medline](#)
28. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002) α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* **4**, 160–164 [CrossRef](#) [Medline](#)
29. Karpowicz, R. J., Jr., Haney, C. M., Mihaila, T. S., Sandler, R. M., Petersson, E. J., and Lee, V. M. (2017) Selective imaging of internalized proteopathic α -synuclein seeds in primary neurons reveals mechanistic insight into transmission of synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* **292**, 13482–13497 [CrossRef](#) [Medline](#)
30. Paumier, K. L., Luk, K. C., Manfredsson, F. P., Kanaan, N. M., Lipton, J. W., Collier, T. J., Steece-Collier, K., Kemp, C. J., Celano, S., Schulz, E., Sandoval, I. M., Fleming, S., Dirr, E., Polinski, N. K., Trojanowski, J. Q., et al. (2015) Intrastriatal injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol. Dis.* **82**, 185–199 [CrossRef](#) [Medline](#)
31. Rey, N. L., Steiner, J. A., Maroof, N., Luk, K. C., Madaj, Z., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Brundin, P. (2016) Widespread transneuronal propagation of α -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J. Exp. Med.* **213**, 1759–1778 [CrossRef](#) [Medline](#)
32. Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D. M., and Hasegawa, M. (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* **136**, 1128–1138 [CrossRef](#) [Medline](#)
33. Popova, B., Kleinknecht, A., and Braus, G. H. (2015) Posttranslational modifications and clearing of α -synuclein aggregates in yeast. *Biomolecules* **5**, 617–634 [CrossRef](#) [Medline](#)
34. Pan, W. X., Mao, T., and Dudman, J. T. (2010) Inputs to the dorsal striatum of the mouse reflect the parallel circuit architecture of the forebrain. *Front. Neuroanat.* **4**, 147 [CrossRef](#) [Medline](#)
35. Vargas, K. J., Schrod, N., Davis, T., Fernandez-Busnadiego, R., Taguchi, Y. V., Laugks, U., Lucic, V., and Chandra, S. S. (2017) Synucleins have multiple effects on presynaptic architecture. *Cell Rep.* **18**, 161–173 [CrossRef](#) [Medline](#)
36. Ogawa, N., Hirose, Y., Ohara, S., Ono, T., and Watanabe, Y. (1985) A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **50**, 435–441 [Medline](#)
37. Dirr, E. R., Ekhatior, O. R., Blackwood, R., Holden, J. G., Masliah, E., Schultheis, P. J., and Fleming, S. M. (2018) Exacerbation of sensorimotor dysfunction in mice deficient in Atp13a2 and overexpressing human wildtype α -synuclein. *Behav. Brain Res.* **343**, 41–49 [CrossRef](#) [Medline](#)
38. Deas, E., Cremades, N., Angelova, P. R., Ludtmann, M. H., Yao, Z., Chen, S., Horrocks, M. H., Banushi, B., Little, D., Devine, M. J., Gissen, P., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Gandhi, S., and Abramov, A. Y. (2016) α -Synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 376–391 [CrossRef](#) [Medline](#)
39. Angelova, P. R., Ludtmann, M. H., Horrocks, M. H., Negoda, A., Cremades, N., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Pavlov, E. V., Gandhi, S., and Abramov, A. Y. (2016) Ca²⁺ is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. *J. Cell Sci.* **129**, 1792–1801 [CrossRef](#) [Medline](#)
40. Gao, X., Carroni, M., Nussbaum-Krammer, C., Mogk, A., Nillegoda, N. B., Szlachetka, A., Guilbride, D. L., Saibil, H. R., Mayer, M. P., and Bukau, B. (2015) Human Hsp70 disaggregase reverses Parkinson's-linked α -synuclein amyloid fibrils. *Mol. Cell* **59**, 781–793 [CrossRef](#) [Medline](#)
41. Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., and Rosenthal, A. (2000) Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**, 239–252 [CrossRef](#) [Medline](#)
42. Zharikov, A. D., Cannon, J. R., Tapias, V., Bai, Q., Horowitz, M. P., Shah, V., El Ayadi, A., Hastings, T. G., Greenamyre, J. T., and Burton, E. A. (2015) shRNA targeting α -synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model. *J. Clin. Invest.* **125**, 2721–2735 [CrossRef](#) [Medline](#)
43. Weihofen, A., Liu, Y., Arndt, J. W., Huy, C., Quan, C., Smith, B. A., Baeriswyl, J. L., Cavegn, N., Senn, L., Su, L., Marsh, G., Auluck, P. K., Montrasio, F., Nitsch, R. M., Hirst, W. D., et al. (2019) Development of an aggregate-selective, human-derived α -synuclein antibody B1B054 that ameliorates disease phenotypes in Parkinson's disease models. *Neurobiol. Dis.* **124**, 276–288 [CrossRef](#) [Medline](#)
44. Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A.,

EDITORS' PICK: α -Syn species responsible for PD phenotypes

- Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., *et al.* (2011) *In vivo* demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 4194–4199 [CrossRef Medline](#)
45. Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C. T., Burton, E. A., Hastings, T. G., and Greenamyre, J. T. (2016) α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* **8**, 342ra78 [CrossRef Medline](#)
46. Mor, D. E., Tsika, E., Mazzulli, J. R., Gould, N. S., Kim, H., Daniels, M. J., Doshi, S., Gupta, P., Grossman, J. L., Tan, V. X., Kalb, R. G., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Wolfe, J. H., and Ischiropoulos, H. (2017) Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nat. Neurosci.* **20**, 1560–1568 [CrossRef Medline](#)
47. Holmes, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M. O., Brodsky, F. M., Marasa, J., Bagchi, D. P., Kotzbauer, P. T., Miller, T. M., Papy-Garcia, D., and Diamond, M. I. (2013) Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3138–E3147 [CrossRef Medline](#)
48. Mao, X., Ou, M. T., Karuppagounder, S. S., Kam, T. I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G. E., Brahmachari, S., Shin, J. H., Kang, H. C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., *et al.* (2016) Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* **353**, aah3374 [CrossRef Medline](#)
49. Shrivastava, A. N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L. G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Léna, C., Aperia, A., Melki, R., and Triller, A. (2015) α -Synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J.* **34**, 2408–2423 [CrossRef Medline](#)
50. Luk, K. C., Kehm, V. M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2012) Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.* **209**, 975–986 [CrossRef Medline](#)
51. Prusiner, S. B., Woerman, A. L., Mordes, D. A., Watts, J. C., Rampersaud, R., Berry, D. B., Patel, S., Oehler, A., Lowe, J. K., Kravitz, S. N., Geschwind, D. H., Glidden, D. V., Halliday, G. M., Middleton, L. T., Gentleman, S. M., *et al.* (2015) Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E5308–E5317 [CrossRef Medline](#)
52. Peng, C., Gathagan, R. J., Covell, D. J., Medellin, C., Stieber, A., Robinson, J. L., Zhang, B., Pitkin, R. M., Olufemi, M. F., Luk, K. C., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2018) Cellular milieu imparts distinct pathological α -synuclein strains in α -synucleinopathies. *Nature* **557**, 558–563 [CrossRef Medline](#)
53. Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., and Lee, V. M. (2014) Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat. Protoc.* **9**, 2135–2146 [CrossRef Medline](#)
54. Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., and Pelletier, S. L. (1992) in *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* (Harding, S. E., Rowe, A. J., and Horton, J. C., eds) pp. 90–125, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
55. Volpicelli-Daley, L. A., and Levey, A. (2004) Immunohistochemical localization of proteins in the nervous system. *Curr. Protoc. Neurosci.* 2004 Chapter 1, Unit 1.2 [CrossRef Medline](#)
56. Rutherford, N. J., Brooks, M., and Giasson, B. I. (2016) Novel antibodies to phosphorylated α -synuclein serine 129 and NFL serine 473 demonstrate the close molecular homology of these epitopes. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 80 [CrossRef Medline](#)
57. Hersch, S. M., Yi, H., Heilman, C. J., Edwards, R. H., and Levey, A. I. (1997) Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J. Comp. Neurol.* **388**, 211–227 [CrossRef Medline](#)
58. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* **78**, 1606–1619 [CrossRef Medline](#)

Anexo V: The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces neuronal dysfunction

The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells

Roberta Cascella ¹, Serene W. Chen^{2,3}, Alessandra Bigi ¹, José D. Camino⁴, Catherine K. Xu ³, Christopher M. Dobson ³, Fabrizio Chiti ¹, Nunilo Cremades ⁴✉ & Cristina Cecchi ¹✉

The self-assembly of α -synuclein (α S) into intraneuronal inclusion bodies is a key characteristic of Parkinson's disease. To define the nature of the species giving rise to neuronal damage, we have investigated the mechanism of action of the main α S populations that have been observed to form progressively during fibril growth. The α S fibrils release soluble prefibrillar oligomeric species with cross- β structure and solvent-exposed hydrophobic clusters. α S prefibrillar oligomers are efficient in crossing and permeabilize neuronal membranes, causing cellular insults. Short fibrils are more neurotoxic than long fibrils due to the higher proportion of fibrillar ends, resulting in a rapid release of oligomers. The kinetics of released α S oligomers match the observed kinetics of toxicity in cellular systems. In addition to previous evidence that α S fibrils can spread in different brain areas, our *in vitro* results reveal that α S fibrils can also release oligomeric species responsible for an immediate dysfunction of the neurons in the vicinity of these species.

¹Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, Section of Biochemistry, University of Florence, Florence, Italy. ²Department of Life Science, Imperial College London, London, UK. ³Centre for Misfolding Diseases, Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK. ⁴Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Joint Unit BIFI-Institute of Physical Chemistry "Rocasolano" (CSIC), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain. ✉email: ncc@unizar.es; cristina.cecchi@unifi.it

Intracellular fibrillar inclusions of the protein α -synuclein (α S), called Lewy bodies, are characteristic of a range of neurodegenerative disorders, collectively referred to as synucleinopathies¹. Most of the experimental evidence indicates that protein aggregation is a gain-of-toxic-function process that plays a central role in the pathogenesis^{2,3}. A variety of *in vitro* studies is indicative of a nucleated conformational conversion model of α S, in which the intermediate oligomeric species are inherently transient, heterogeneous, and only populated at low levels during aggregation^{4–7}.

Growing experimental evidence suggests that specific oligomeric species are the most cytotoxic forms of α S and play a key role in disease^{1,4,6,8–11}. A detailed characterization of two structural types of stable α S oligomers that were trapped using different strategies was recently reported^{4,8}. One type is largely disordered in terms of secondary structure and the other type contains a β -sheet rich core; we refer to these species as type-A* oligomers (OA*) and type-B* prefibrillar oligomers (OB*), respectively⁸. Interestingly, we found that while OA* are able to interact with the membrane surface, although in an unspecific manner and with no apparent membrane insertion and perturbation, prefibrillar OB* were found not only to establish strong interactions with the bilayer through its unstructured N-terminal segment (residues 1–26), but also to insert its β -sheet core in the interior of the bilayer, causing major membrane disruption^{4,8,12,13}. This causes only OB* to be toxic, whereas OA* are biologically inert^{8,12}.

On the other hand, α S fibrils have also been reported to be toxic and their toxicity has been associated with membrane perturbation^{14–16}. Evidence is also accumulating that certain α S species transmit and induce seeding in neighboring cells in a spreading process in which different areas of the brain are slowly and inexorably affected^{17–21}. Uptake of small α S fibrillar species by neuronal cells has indeed been observed^{22,23} and particularly small α S fibrils are indeed used to induce Parkinson's disease (PD)-like phenotypes when injected in mice brains^{18,23,24}. In order to have a thorough and exhaustive understanding of pathogenesis in PD and other synucleinopathies, the effect of fibril spreading, fibril toxicity, and oligomer toxicity have to be considered.

Here we have established the mechanisms of membrane perturbation and dysfunction to neuronal cells of highly stable and well-defined α S aggregates, such as type-B* prefibrillar oligomers (OB*), short fibrils (SF), and long fibrils (LF) under physiological conditions and endogenous levels of α S expression. In addition to the well-established contribution of α S fibrils to the diffusion of the pathology by a spreading mechanism, our results show that the fibrillar species can have an immediate toxic effect due to the release of toxic oligomeric species in human iPSC-derived dopaminergic neurons, rat primary cortical neurons, and human SH-SY5Y neuroblastoma cells. These findings reveal that the α S species detected in neurons and SH-SY5Y cells by confocal and stimulated emission depletion (STED) microscopy using different probes arise from exogenous human α S derived from SF/LF, rather than endogenous rat α S converted in oligomeric form by a seeding process.

Results

α S fibrils interact weakly with the surface of the lipid bilayer of synthetic membranes. All species studied in this work (OB*, SF, LF) were first characterized for morphological, structural, and tinctorial properties with atomic force microscopy (AFM), far-UV circular dichroism (CD), and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy, X-ray diffraction, and thioflavin T (ThT) and 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS) fluorescence (Table S1, Figures S1, and S2a–e). We also characterized the monomer (M) and OA* as negative controls. This allowed their

identity to be confirmed, relative to previous works, and their properties to be studied. In brief, OA*/OB* are globular-like aggregates with height of 4–5 nm, whereas SF and LF have elongated morphologies with similar height but lengths differing by one and two orders of magnitude with respect to height, respectively. OA*/M show disordered secondary structure. SF/LF possess similarly high degrees of β -sheet conformation, whereas OB* species have an intermediate content. Unlike OA*/M, OB* have a significant but weak ThT binding, whereas SF/LF have a large ThT binding. Unlike M/OA*, OB*/SF/LF also have a strong ANS binding, indicating a high degree of solvent-exposed hydrophobicity.

Using paramagnetic relaxation enhancement (PRE) with magic angle spinning (MAS) solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) spectroscopy, it was recently shown that the prefibrillar OB* species are able to anchor to synthetic synaptic-like small unilamellar vesicles (SUVs), through binding of the exposed N-terminal region of α S, and then to penetrate into the bilayer with its structured β -sheet core, causing substantial perturbations to its structure⁸. In the same study it was shown that M/OA* interact with the membrane surface, but without insertion into the lipid bilayer^{8,25}. In the present work, we extended such studies to the SF and LF fibrillar species. We probed, in particular, the interaction of the rigid cores of the SF and LF (140 μ M monomer equivalents) with SUVs with DOPE:DOPS:DOPC lipid composition (molar ratio of 5:3:2). In these experiments, small quantities of lipid molecules labeled with a paramagnetic center (PC), that induces relaxation in the nucleus of nearby atoms, were incorporated into the bilayers^{8,26}. Unlike prefibrillar OB*, we did not observe any selective quenching of resonances in the ¹³C–¹³C dipolar-assisted rotational resonance (DARR) correlation spectra of either SF or LF, when the PC was located either in the external hydrophilic head groups (Fig. 1a, left panels) or the internal hydrophobic tails of the lipid molecules (Fig. 1a, right panels). This analysis indicates that, in contrast to OB*, the rigid β -sheet cores of neither SF or LF are able to interact significantly with the lipid bilayer. Nor do they appear to interact with the surface of the bilayer, as the core of the OA* species does.

To further study the interaction of the OB*/SF/LF species with the lipid bilayer with a different technique, we then analyzed the abilities of these species (10 μ M monomer equivalents), to interact and bind the same SUVs, using far-UV CD as a spectroscopic probe. In each case, the spectrum of the aggregates without SUVs was subtracted from that acquired in their presence, so that the spectrum of the region of the protein interacting with SUVs could be obtained (Fig. 1b). While the acquisition of α -helical structure by M results in large changes in its CD spectrum upon interaction with lipids²⁵, the observed spectral changes were progressively smaller for OB*, SF, and LF (Figure S2f). The changes in the CD spectra of the fibrils cannot be attributed only to the acquisition of helical structure (as in OB*), but also to the appearance of random coil structure (Fig. 1b). Overall, the far-UV CD data indicate that the OB*, SF, and LF are able to interact with SUVs but with a progressively decreasing affinity, and that the interaction in each case results in the acquisition of some helical structure, likely to be in the unstructured and MAS ssNMR-invisible N-terminal region of the protein²⁵, which is readily accessible in OB* but significantly less accessible in the fibrils.

To analyze whether or not the differences in the interaction of the prefibrillar OB* and the fibrils with lipid vesicles are reflected in differences in their ability to disrupt membrane integrity, we compared their rates and extent of induced calcein release using SUVs composed of POPS lipids containing calcein molecules trapped in their interior. We found that OB* induced a rapid and substantial calcein release, with ca. 30%

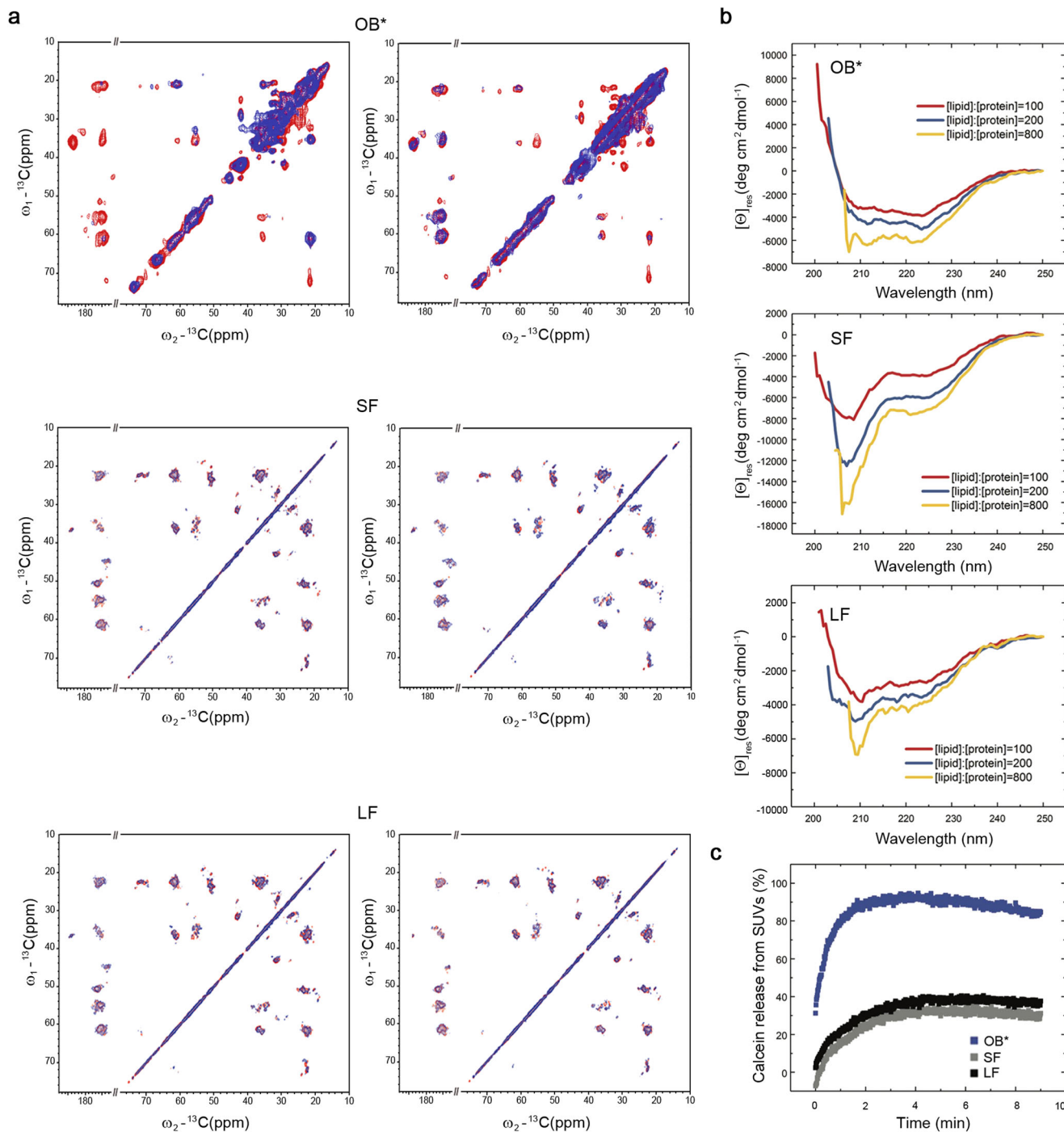


Fig. 1 α S fibrils interact weakly with the surface of the lipid bilayer of synthetic membranes. **a** PRE effects measured using MAS ssNMR for OB*/SF/LF using SUVs with DOPE:DOPS:DOPC lipid composition (molar ratio of 5:3:2) with a paramagnetic center (PC) on the bilayer surface on the hydrophilic head group (left) or in the membrane interior at carbon 16 of the lipid chain (right). ^{13}C - ^{13}C DARR spectra measured in the presence and absence of the PC-labeled lipids are shown in blue and red, respectively. For comparison, the plots of OB* are drawn using OB* data from our previous investigation⁸.

b Changes in the far-UV CD spectrum of 10 μM OB*/SF/LF and increasing concentrations of SUVs: 1 mM (red), 2 mM (blue), and 8 mM (yellow). The spectra in the absence of SUVs was subtracted in each case from that acquired in their presence. **c** Calcein release from SUVs (% of total intravesicular calcein—signal normalized with respect to the treatment with 1% v/v Triton X-100, see Supplementary Information for more details) upon incubation of the vesicles with the indicated α S species.

of maximum release at the first time point of measurement, and reaching the maximum level (ca. 90% of maximum release) after 2 min of incubation at a protein:lipid ratio of 1:100. SF/LF caused, however, a much slower and very significantly reduced calcein release (ca. 30% release after 5 min) under identical conditions (Fig. 1c).

Taken together, these findings indicate that fibrils can interact with the membrane surface likely through the N-terminal region of the protein, but do not cause significant disruption of the lipid bilayers as they cannot insert their β -sheet core, whereas prefibrillar OB* are particularly effective in disrupting membrane integrity by inserting their partially-formed β -sheet core.

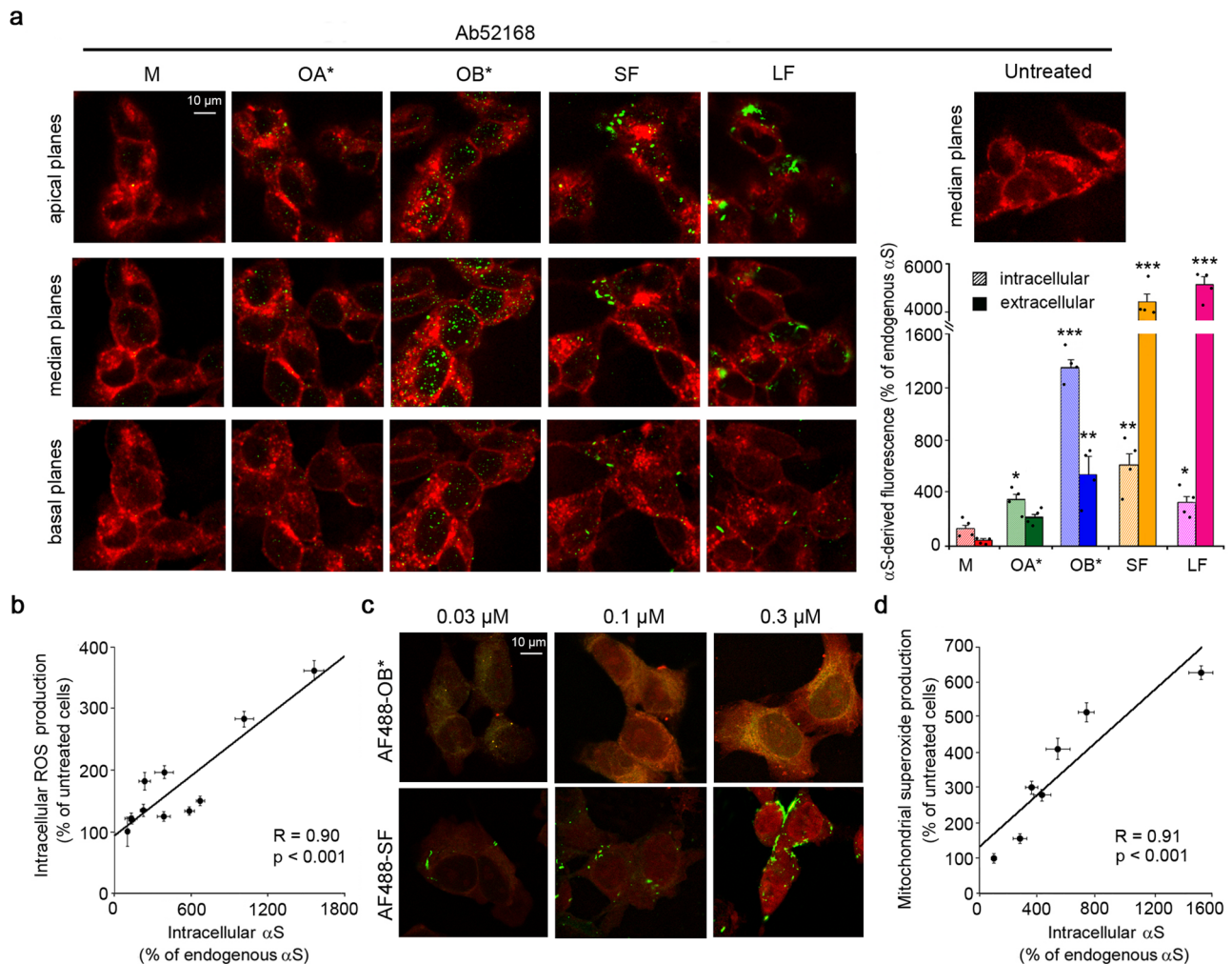


Fig. 2 α S fibrils are largely localized at the surface of the cellular membrane but ROS generation correlates with the intracellular α S pool. **a**

Representative confocal scanning microscope images showing the basal, median, and apical sections of SH-SY5Y cells treated for 1 h with the indicated α S species at 0.3 μ M and the median sections of untreated cells. Red and green fluorescence indicates the cell membranes and the α S species revealed with wheat germ agglutinin (WGA) and polyclonal anti- α S antibodies (Ab52168, Abcam), respectively. The histogram on the right reports a semi-quantitative analysis of the intracellular and extracellular α S-derived fluorescence data expressed as the percentage of endogenous α S fluorescence. **b** Dependence of ROS production on the intracellular α S-derived fluorescences in SH-SY5Y cells treated with α S species. ROS values reported in Fig. S5 were plotted against the α S-derived fluorescence values reported in Fig. S4d of cells treated with OB* and SF at the corresponding concentrations. **c** Representative confocal scanning microscope images showing mitochondrial superoxide production detected with MitoSOX probe in living SH-SY5Y cells. Red and green fluorescence indicates MitoSOX staining and α S labeled with AF488 dye, respectively (six independent experiments with one internal replicate). **d** Dependence of mitochondrial superoxide production on the intracellular AF488-derived fluorescence signal in SH-SY5Y cells treated with α S species. Experimental errors are S.E.M. ($n = 4$ with three internal replicates in panels (a), (b); $n = 6$ in panel (d) with one internal replicate). Samples were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test relative to untreated cells (in panel a, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; in panel b, $P < 0.001$; in panel d, $P < 0.001$). A total of 200–250 cells were analyzed per condition.

α S fibrils are largely localized at the surface of the cellular membrane. To improve our understanding of the molecular mechanisms underlying PD pathogenesis and progression, we have started our experiments on SH-SY5Y neuroblastoma cells because of their human origin and because these cells express tyrosine hydroxylase (TH), dopamine-beta-hydroxylase, and the dopamine transporter, thus recapitulating many characteristics of human dopaminergic neurons. We initially investigated the ability of OB*/SF/LF (0.3 μ M monomer equivalents) to interact with the plasma membrane and penetrate into the cytosol of SH-SY5Y cells, when incubated in the cell medium (CM) for 1 h. The α S species (green channel) were counterstained and analyzed by confocal scanning microscopy at the cellular apical, median, and basal planes of the plasma membrane (red channel) parallel to the

coverslip (Fig. 2a), to make a clearer distinction between intracellular vs extracellular α S pools⁸. M and OA* interacted weakly with the cellular membranes and hardly entered into the cells, whereas OB* and, to a lesser extent SF, were effectively able to cross the cellular membrane (Fig. 2a). Higher intracellular protein levels (median planes) were measured after 1 h of treatment with OB* with respect to SF and LF (1377 \pm 62, 624 \pm 106% and 322 \pm 54%, respectively) relative to the very low signal of endogenous α S in untreated cells, taken as 100% (Fig. 2a). Similar results were obtained from the semi-quantitative analysis of the intracellular number of α S puncta (Figure S3a). Notably, a mild protease treatment with 0.05% trypsin at 4 $^{\circ}$ C, that digested all the protein molecules exposed on the cell membrane, including the surface-bound OB*, drastically reduced the green-fluorescent signal at the

apical planes (Figure S3b), without any significant modification of intracellular α S aggregates at the median planes of SH-SY5Y cells (Figure S3b). These results indicate that the signal observed at median planes arose, indeed, from the internalized OB*. Moreover, inhibition of endocytosis, either by a pharmacological treatment with dynasore or by a temperature-mediated blockage, significantly decreased, but did not cancel, the amount of intracellular aggregates in treated cells (Figure S3b), indicating that the influx of OB* through the membrane bilayer is attributable to a mixture of passive diffusion and endocytosis.

The ratio between the protein signal at the median planes and the total protein signal from all planes revealed that ~71%, 13% and 6% of the OB*, SF, and LF were found to penetrate the cells after 1 h of incubation, respectively (Fig. 2a). Thus, most of the α S-derived signal was localized at the plasma membrane in cells exposed to SF/LF, respectively.

When SH-SY5Y cells were exposed to OB*, SF, and LF for longer time periods (3, 6, and 24 h) a progressive and significant increase in intracellular species at cellular median planes was observed, although in cells treated with SF/LF the intracellular pool remained smaller than the extracellular one, even after 24 h, while for OB* ca. 90% of the protein is intracellular at already 3 h of incubation (Figure S3c).

A dose-dependent analysis revealed that, for both OB* and SF, similar effects were observed at lower α S concentrations with a clear dose-dependence, although at higher α S concentrations, no significant increase in intracellular α S levels was detected (Figure S4a,b,d), likely as a result of the agglutination of aggregated α S species at high concentrations²⁷. Moreover, OB* showed a similar bell-shaped protein concentration dependence for both the intracellular and the total α S-derived fluorescence with the amount of the oligomers inside the cells found to be directly proportional to the mass concentration of oligomers interacting with the plasma membrane (Figure S4d,e). By contrast, the total amount of SF bound to the membrane was much higher than the intracellular fraction at any α S concentration (Figure S4b,d,e). Furthermore, concentrations higher than 0.3 μ M resulted in an increase in the number of fibrils bound to the cell membrane but not in the quantity of intracellular protein (Figure S4b,d,e). These results indicate that the extent to which OB*, though not SF, has been taken up by the cells correlates with the amount of α S interacting with the plasma membrane.

ROS generation correlates with the intracellular α S pool. The generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) is one of the inflammatory sequelae associated with protein aggregate treatment²⁸ and one of the earliest biochemical changes experienced by cells exposed to pathogenic α S aggregates⁶. We have also previously found that OB*, and to a lesser extent SF, induce a significant increase in ROS levels in SH-SY5Y cells, whereas OA* and M were found to cause a non-significant effect⁸. Here we extended the measurements to various α S concentrations of OB*/SF/LF, with the aim to relate a readout of toxicity with that of α S penetration and cell surface binding. ROS production showed again a bell-shaped α S concentration dependence when the different α S species were added for 15 min to the CM of SH-SY5Y cells, with a maximum effect at 0.3 μ M (Figure S5a,b). A plot of the degree of the ROS increase, measured at the different concentrations of OB*/SF, against the intracellular α S levels, using the fluorescent signals obtained for OB*/SF, revealed a very significant positive correlation ($R = 0.90$, $p < 0.001$) (Fig. 2b). By contrast, no significant correlation was found between ROS increase and total α S, i.e., sum of intracellular and extracellular pools ($R = 0.046$, $p > 0.05$; Figure S5c).

We also monitored concomitantly the generation of mitochondrial superoxide ions and intracellular α S levels in living SH-SY5Y cells exposed for 1 h to 0.03, 0.1, and 0.3 μ M of OB*/SF labeled with AF488 dye or to 250 μ M H₂O₂ as a positive control (Fig. 2c and S5d). The increase in intracellular α S levels (green channel) correlated positively with the mitochondrial superoxide production (red channel) in a dose-dependent relationship ($R = 0.91$, $p < 0.001$) (Figs. 2c, d and S5d). These results indicate that the generation of ROS and mitochondrial superoxide is related to the level of intracellular α S.

α S fibrils gradually destabilize membrane integrity resulting in neuronal dysfunction.

In order to confirm the ability of the different α S species to destabilize the membrane permeability of cells, we assessed the release of the fluorescent probe calcein-AM, previously loaded into the cells²⁹. Calcein acetoxyethyl (Calcein-AM) is a substrate that passively crosses the cell membrane and in the cytosol is hydrolyzed by the enzyme esterase to a polar green-fluorescent product (calcein) that is retained into cells with intact membrane. The addition to the CM for 1 h of 0.3 μ M OB* and, to a lesser extent, SF, generated a significant leakage of calcein, such as $73 \pm 2\%$ and $41 \pm 3\%$ in rat primary cortical neurons and $64 \pm 4\%$ and $37 \pm 2\%$ in human SH-SY5Y cells, respectively (Fig. 3a). Calcein leakage suggests a permanent disruption of neuronal bilayers following the aggregates penetration through membranes and their intracellular localization. By contrast, all other α S species, including LF, caused negligible calcein release at this incubation time (Fig. 3a).

Accordingly, a similar pattern of cytosolic Ca²⁺ dyshomeostasis was observed for the different α S species in cortical neurons and SH-SY5Y cells (Fig. 3b), as previously reported^{13,30,31}. In particular, following 15 min treatment at an α S concentration of 0.3 μ M, OB* and, to a lesser extent, SF and even lesser for LF, triggered a significant influx of Ca²⁺ into cortical neurons and SH-SY5Y cells ($551 \pm 31\%$, $356 \pm 50\%$, 261 ± 16 and 380 ± 16 , 230 ± 27 and 124 ± 11 for the three species and two cell types, respectively), whereas all other α S species caused a negligible Ca²⁺ influx (Fig. 3b). No fluorescent signal was apparent when SH-SY5Y cells were cultured in a Ca²⁺-free CM (Figure S6a,b). Lower effects were observed at lower and higher protein concentrations with a clear bell-shaped dose response (Figure S6a,b).

Real-time intracellular calcium measurements in SH-SY5Y living cells showed a steady basal fluorescence in the absence of extracellular aggregates and a rapid increase in the intracellular Ca²⁺ levels following the addition of OB* and, with slower kinetics, of SF up to 30 min (Figure S6c). Notably, we also observed a faster increase of intracellular Ca²⁺ for OB* than SF and LF treatment at longer time periods in SH-SY5Y cells (Fig. 3c).

We further monitored whether the ability of α S aggregates to cause ionic dyshomeostasis resulted in the activation of caspase-3, a well-recognized apoptotic marker³². To this aim, we used a relevant PD model such as human iPSC-derived dopaminergic neurons expressing TH, a typical dopaminergic neuron marker (~75% of total cells), as well as the microtubule-associated protein 2 (MAP-2), a typical mature neuron marker, after 14–18 days of culture (Fig. 3d). A significant caspase-3 activation ($444 \pm 13\%$) was found in iPSC-derived dopaminergic neurons following treatment for 24 h with 0.3 μ M OB* with respect to untreated cells (Fig. 3e, f). Both SF and LF caused a caspase-3 activation of $337 \pm 31\%$ and $265 \pm 9\%$, respectively, in the same neurons after 24 h of treatment (Fig. 3e, f). Accordingly, similar results were observed in SH-SY5Y cells treated with OB*/SF/LF, whereas no apoptosis was apparent in cells treated with 0.3 μ M OA* or M (Fig. 3f).

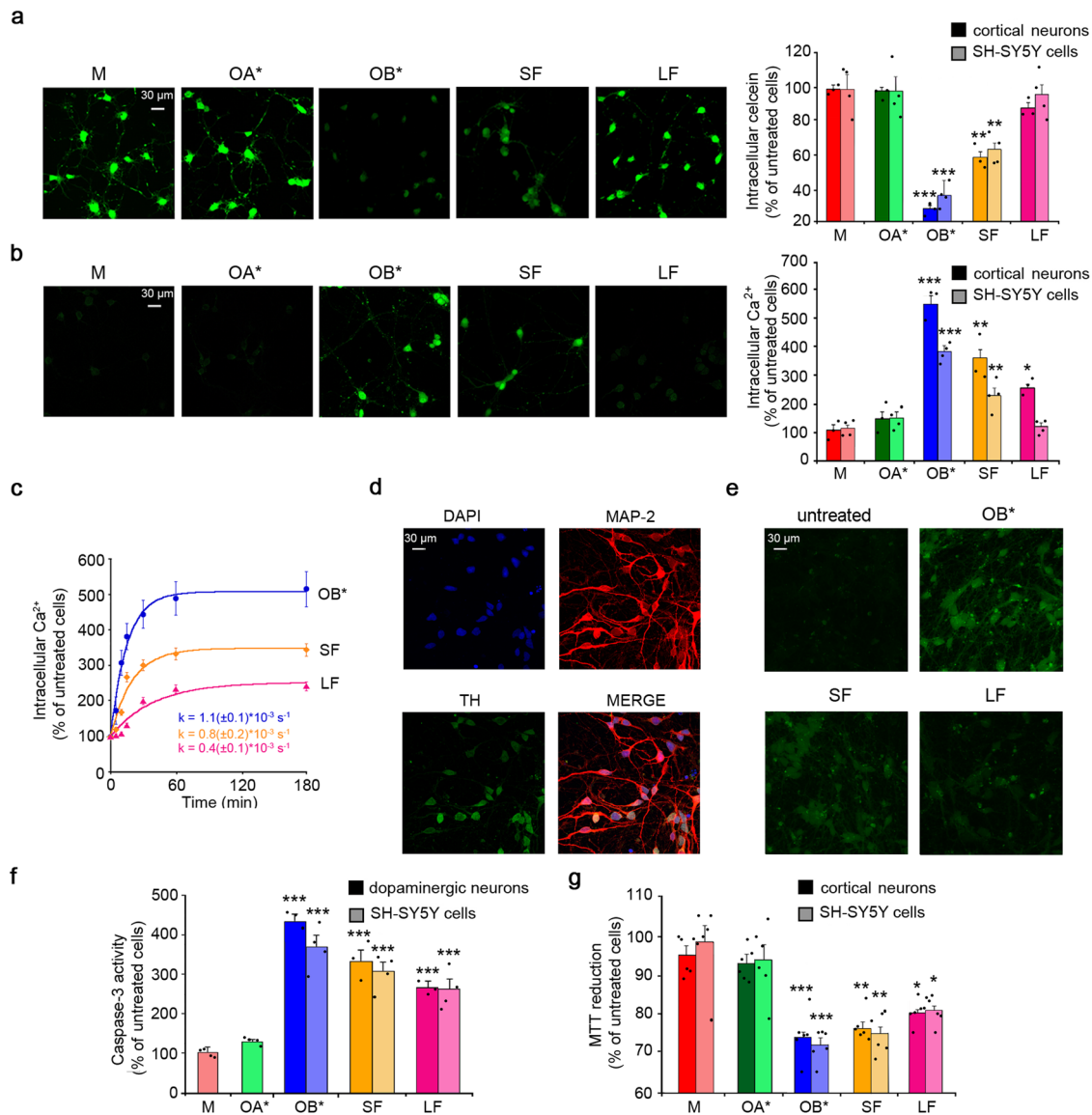


Fig. 3 α S fibrils gradually destabilize membrane integrity resulting in neuronal dysfunction. **a** Representative confocal microscope images showing primary rat cortical neurons loaded with the calcein-AM probe for 10 min and then treated for 1 h with the indicated 0.3 μ M α S species. Semi-quantitative analyses of the calcein-derived fluorescence signal in primary rat cortical neurons and SH-SY5Y cells. **b** Representative confocal microscope images showing the Ca²⁺-derived fluorescence in primary rat cortical neurons treated for 15 min with the indicated 0.3 μ M α S species and then loaded with the Fluo-4 AM probe. Semi-quantitative analysis of the intracellular Ca²⁺-derived fluorescence in primary rat cortical neurons and SH-SY5Y cells. **c** Time-course analysis of the intracellular Ca²⁺-derived fluorescence in SH-SY5Y cells treated for the lengths of time indicated with OB*/SF/LF at 0.3 μ M. **d** Representative confocal microscope images of human iPSC-derived dopaminergic neurons expressing MAP-2 (ab32454, Abcam) and TH (sc-25269, Santa Cruz Biotechnology) markers at 14–18 days of maturation (three independent experiments with one internal replicate). Approximately 75% of the cells are TH positive (estimated by immunostaining). Nuclei were stained with DAPI. **e** Representative confocal microscope images showing caspase-3-derived fluorescence in human iPSC-derived dopaminergic neurons treated for 24 h with the indicated α S species at 0.3 μ M. **f** Semi-quantitative analysis of the caspase-3-derived fluorescence in human iPSC-derived dopaminergic neurons and SH-SY5Y cells treated for 24 h with the indicated α S species at 0.3 μ M. **g** MTT reduction in primary rat cortical neurons and SH-SY5Y cells treated for 24 h with the indicated 0.3 μ M α S species. In all panels data are expressed as the percentage of the value for untreated cells. Experimental errors are S.E.M. ($n = 3$ with two internal replicates and $n = 4$ with three internal replicates for cortical neurons and SH-SY5Y cells, respectively, in panels **(a)**, **(b)**; $n = 4$ in panel **c** with one internal replicate; $n = 3$ with two internal replicates and $n = 4$ with three internal replicates for iPSC-derived dopaminergic neurons and SH-SY5Y cells, respectively, in panel **f**; $n = 6$ with three internal replicates in panel **(g)**). Samples were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test relative to untreated cells (in panels **a**, **b**, **f**, and **g**, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). A total of 200–250 cells (**a–f**) and 150,000–200,000 cells (**g**) were analyzed per condition.

A consistent trend was observed for the mitochondrial dysfunction, as revealed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction inhibition assay³³ carried out on both primary rat cortical neurons and SH-SY5Y cells (Fig. 3g). Since α S is physiologically N-terminally acetylated *in vivo*³⁴, representative experiments were repeated with OB*

formed from the N-acetylated α S. It has been recently reported that no significant differences were observed in the structural properties of α S species following N-terminal acetylation⁸. Consistent results were obtained in the present study, using calcein release and MTT reduction as cell viability readouts (Figure S7a,b). Similar results were also obtained with the ultra-

clean samples, where the recombinant protein was pretreated to remove potential lipopolysaccharides, probing ROS detection and MTT reduction (Figure S7c,d).

Taken together our results indicate that α S SF have lower ability than OB* to cause fast membrane permeabilization, rapid intracellular Ca^{2+} influx and ROS generation in primary neurons and SH-SY5Y cells, with LF being almost inert; however, SF have effects closer to OB* and even LF show some effect when downstream cellular dysfunction, such as metabolic capacity and apoptotic response, was probed at longer time frames.

α S fibrils gradually release oligomers in vitro. We took advantage of the conformation-sensitive A11 antibody to investigate whether the release of toxic oligomers from α S fibrils is responsible for the observed toxicity of SF. The polyclonal A11 antibody, originally raised against prefibrillar A β oligomers, has been shown to recognize toxic oligomers from various proteins, but not monomers or fibrils³⁵. The A11 antibody showed a high affinity for OB*, whereas the absence of any A11-positive cross-reaction of SF/LF rules out the possibility that a significant fraction of OB* species was present in the fresh fibrillar samples at micromolar concentrations (Fig. 4a). Nor did it react with control nontoxic OA*.

We monitored the ability of α S fibrils to release small oligomers over time in the absence of cells. Confocal images of SF samples, incubated in the CM without cells in wells containing a glass coverslip for 0, 1, 3, and 24 h at 37°C, resolved by the conformation-insensitive mouse monoclonal 211 antibody showed similar populations of α S-derived fluorescence dots (Fig. 4b). By contrast, α S-derived fluorescence dots increased in number with incubation time at 37°C in SF using the conformation-sensitive A11 antibody, suggesting a slow and progressive increase in A11 immunoreactivity (Fig. 4b). A slower time-dependent increase in A11-positive signal was also obtained with LF following incubation up to 24 h (Figure S8a). Very similar small dots were apparent in confocal images of OB* sample using both conformation-insensitive 211 and conformation-sensitive A11 antibodies following incubation for 0 and 24 h at 37°C (Fig. 4b and Figure S8a). No fluorescent signal was evident with primary and secondary antibodies in the absence of α S aggregates, ruling out the ability of the antibodies to react with the slides in the absence of α S species (Figure S8a).

To confirm that the A11 reactivity in aged SF/LF originates from the release of small oligomers rather than from a conformational change in SF exposing the A11 epitope, we also analyzed SF upon incubation for 24 h at 37°C using dynamic light scattering (DLS) (Figure S8b). The SF sample at 0 h showed a large peak at ~600 nm, but a small peak at ~20 nm became increasingly apparent with time (Figure S8b). The size distribution in the small peak was consistent with that detected in OB* sample incubated up to 24 h at 37°C (Figure S8b). This indicates that α S fibrils can release A11-positive oligomeric species following incubation at 37°C in vitro.

α S fibrils gradually release oligomers that are ultimately responsible for their toxicity. Then, we investigated whether α S SF can release small oligomers following their interaction with cellular membranes. We probed the nature of the protein species able to penetrate into human iPSC-derived dopaminergic neurons using the A11 antibody in immunofluorescence experiments (Fig. 4c). Confocal images showed a remarkable A11-positive signal in neurons treated for 24 h with OB*, SF, and LF (Fig. 4c) with respect to untreated cells (Figure S8c), indicating the presence of α S oligomeric species similar to OB* inside the cells upon treatment with SF/LF. When SH-SY5Y cells were exposed

to OB* for 3 h, a dramatic increase ($474 \pm 26\%$) in A11-positive intracellular species at median planes was observed with respect to untreated cells (Fig. 4d, e and Figure S8c). In particular, ~62% of the OB* sample was found to penetrate the cells (defined as the ratio between the intracellular fluorescence at the median planes and the total fluorescence at all planes), in good agreement with the fraction of intracellular protein obtained by α S conformation-insensitive antibody (Ab52168) (Fig. 2a). Cells exposed to SF for 3 h and to LF for 6 h also exhibited a significant increase ($258 \pm 6\%$ and $199 \pm 13\%$, respectively) in the intracellular A11-positive signal (Fig. 4d, e), indicating a progressive penetration of α S oligomeric species similar to OB*. Indeed, the majority of the A11-derived fluorescence signal was located in the interior of the cells ($87 \pm 7\%$ and $97 \pm 6\%$ for SF and LF, respectively), suggesting that the A11-positive oligomers had been able to cross the membrane.

To investigate whether the intracellular A11-positive signal could arise from the conversion of endogenous α S into A11-positive species, we first quantified the intracellular and total fluorescences at different OB* doses (Figure S9a-c). A bell-shaped protein concentration dependence was found for both, with the amount of the A11-positive species inside the cells found to be directly proportional to the mass concentration of those species interacting with the plasma membrane (Figure S9a-c), confirming the results obtained with a conformation-insensitive antibody (Figure S4a-e). Second, we quantified the intracellular and total A11-derived fluorescence following 15 min and 24 h of OB* treatment (Figure S9d). Neither the intracellular nor the total A11-derived fluorescence at 24 h exceeded the total A11-derived fluorescence observed early at 15 min, suggesting that the endogenous α S was not recruited into A11-positive species.

When we monitored the intracellular A11-positive signal as a function of time, we found exponential kinetics for OB*, but sigmoidal kinetics for both SF and LF (Fig. 4e). The results obtained with the A11 antibody were also confirmed with another conformation-sensitive antibody such as Syn33, that has been previously shown to specifically recognize α S oligomers³⁶. Here, the Syn33 antibody showed a high affinity for OB* and a very low cross-reaction with SF/LF in the dot-blot assay (Figure S8d). When SH-SY5Y cells were exposed to OB* for 3 h, a dramatic increase ($407 \pm 24\%$) in Syn33-positive intracellular species at median planes was observed with respect to untreated cells (Figure S8e,f), in good agreement with the immunostaining data obtained by A11 antibody (Fig. 4c-e). Cells exposed to SF for 3 h and to LF for 6 h also exhibited a significant increase ($177 \pm 22\%$ and $173 \pm 13\%$, respectively) in the intracellular Syn33-positive signal (Figure S8e,f). These results are in agreement with the idea that a lag time is required for oligomer release from SF/LF before cell penetration.

To have equivalent molar concentrations of fibril particles (numbers/volume) rather than monomer equivalents, we have estimated the same fibril number concentrations for SF/LF (corresponding to a higher mass concentration for LF, see “Methods”). We have thus chosen two different mass concentrations where the fibril particle concentrations are similar ($0.03 \mu\text{M}$ SF and $0.3 \mu\text{M}$ LF, both monomer equivalents), finding similar toxic effects using ROS and Ca^{2+} probes (Figure S8g).

As α S toxicity depends on the time of cellular exposure to the deleterious α S species, we monitored MTT reduction following incubation of SH-SY5Y cells for different lengths of time with $0.3 \mu\text{M}$ OB*/SF/LF. We observed a similar order of rates for the three species, with the OB* being the most rapid and the LF being the slowest in causing a decrease of MTT reduction (Fig. 4f). Moreover, a plot of the degree of MTT reduction against the intracellular A11-positive α S levels, using the data obtained at all time points and for OB*/SF/LF, revealed a very significant

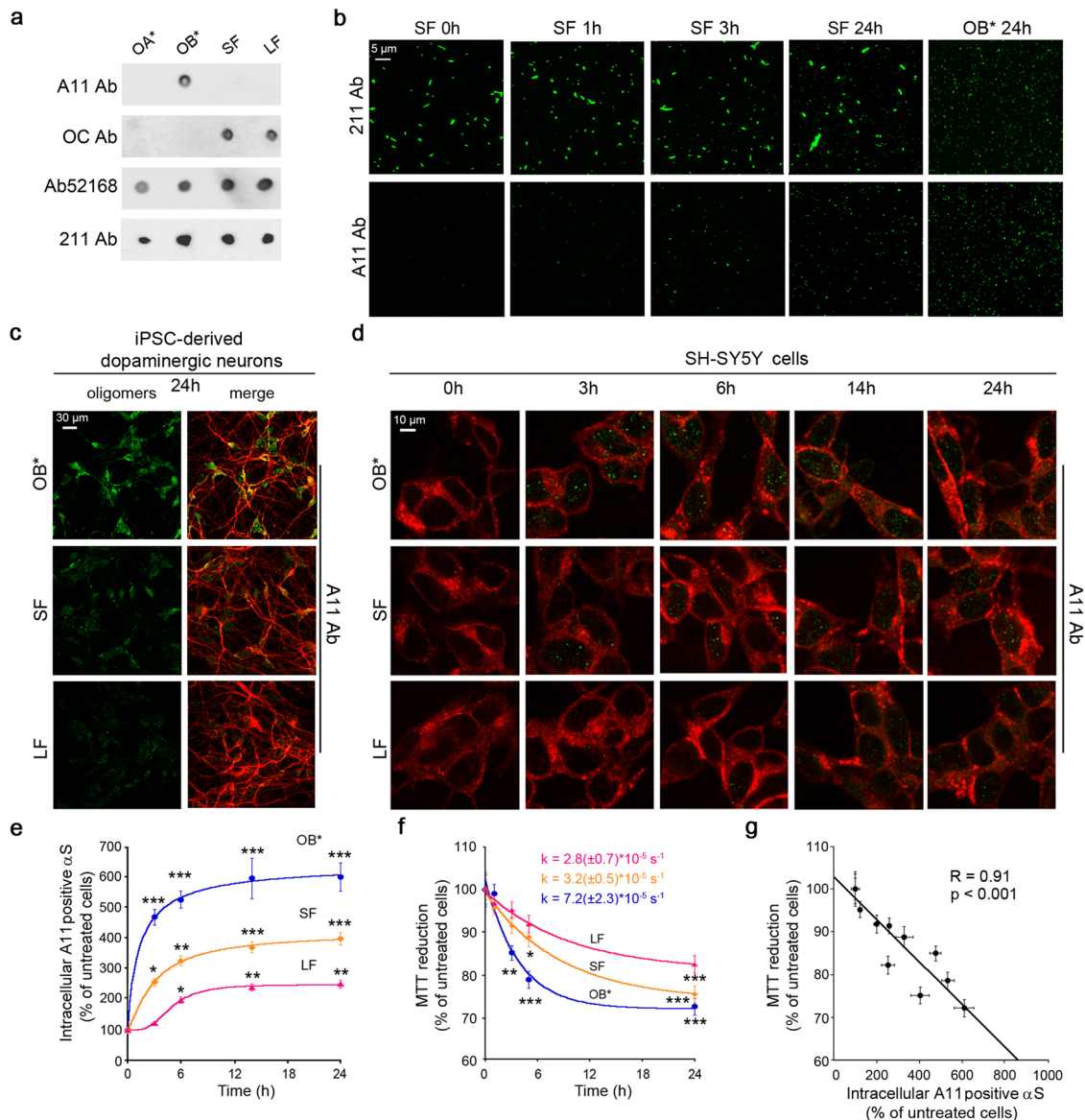


Fig. 4 α S fibrils gradually release oligomers that are ultimately responsible for their toxicity. **a** Dot-blot analysis of α S species probed with conformational specific antibody A11 (AHB0052, Thermo Fisher Scientific), OC (AB2286, Sigma-Aldrich), conformation-insensitive polyclonal anti- α S antibody (ab52168, Abcam) and conformation-insensitive monoclonal 211 antibody specific for human α S (sc12767, Santa Cruz Biotechnology). **b** Representative confocal microscope images showing SF (at 0.3 μ M) incubated in CM without cells in wells containing a glass coverslip for 0–24 h at 37 $^{\circ}$ C. Representative images of OB* incubated for 24 h were also shown as positive control. The green-fluorescent signals derive from the staining with mouse monoclonal 211 anti- α S antibodies and rabbit anti-oligomer A11 polyclonal antibodies, in the first and second rows, respectively, and then Alexa-Fluor 514-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (three independent experiments with one internal replicate). **c** Representative confocal scanning microscope images showing human iPSC-derived dopaminergic neurons treated for 24 h with OB*/SF/LF at 0.3 μ M. Red and green fluorescence indicates mouse anti-MAP-2 antibodies (ab11267, Abcam) and the A11-positive prefibrillar oligomers, respectively. **d** Representative confocal scanning microscope images showing the median sections of SH-SY5Y cells treated for the lengths of time indicated with OB*/SF/LF at 0.3 μ M. Red and green fluorescence indicates the cell membranes labeled with WGA and the A11-positive prefibrillar oligomers, respectively (three independent experiments with four internal replicates). **e** Kinetic plots reporting A11-intracellular fluorescence following the addition of 0.3 μ M of the indicated α S species to SH-SY5Y cells. The continuous lines through the data represent the best fits to exponential and sigmoidal functions (see “Methods”), for OB*, SF, and LF, respectively. **f** Kinetic plots reporting the MTT reduction versus time elapsed following addition of 0.3 μ M of the indicated α S species to SH-SY5Y cells. **g** Dependence of MTT reduction on the penetration of A11-positive α S in SH-SY5Y cells treated with α S species. MTT reduction values reported in (**f**) plotted against the α S-derived intracellular fluorescence values reported in (**e**) of cells treated with OB*/SF/LF at the corresponding times. Experimental errors are S.E.M. ($n = 3$ with four internal replicates in panel (**e**); $n = 4$ with three internal replicates in panel (**f**); $n = 3$ with four internal replicates and $n = 4$ with three internal replicates for MTT reduction and intracellular A11-positive α S, respectively, in panel (**g**). Samples were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison test relative to untreated cells (in panels **e** and **f**, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; in panel **g**, $P < 0.001$). A total of 200–250 cells (**e**) and 150,000–200,000 cells (**f**) were analyzed per condition.

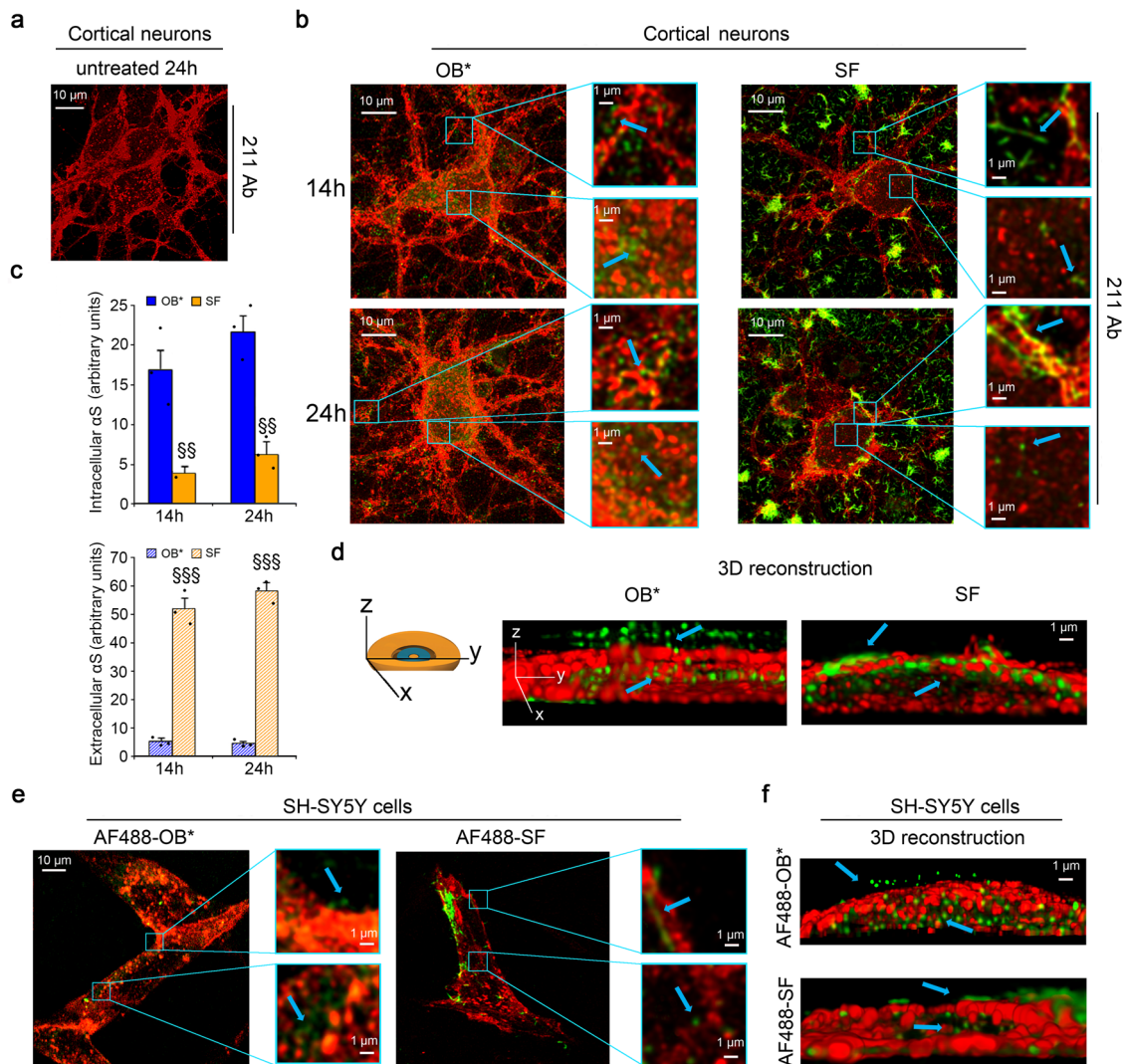


Fig. 5 Visualization of α S fibrils outside and oligomers inside cells at high resolution. **a, b** Representative STED images of primary rat cortical neurons that were untreated (**a**) or treated (**b**) with OB* (left) and SF (right) for 14 and 24 h. Red and green fluorescence indicates the cell membranes and the α S species revealed by WGA and the conformation-insensitive and human α S-specific 211 antibodies (sc12767, Santa Cruz Biotechnology), respectively. Higher magnifications of the α S species are shown in the boxed areas (three independent experiments with two internal replicates). **c** Semi-quantitative analysis of the intracellular and extracellular 211-derived fluorescence data referring to panel (**b**). Experimental errors are S.E.M. ($n = 3$ with two internal replicates). Samples were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test relative to cells treated with OB* for 14 and 24 h (in panel **c**, §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$). **d** 3D reconstruction of the z-stack analysis (5- μ m-thick slices) of the specimens shown in panel (**b**). A primary neuron was virtually dissected on the zy plane to show more clearly the extracellular (top) and intracellular (middle) α S species. A total of 40–60 cells were analyzed per condition (three independent experiments with four internal replicates). **e** Representative STED images of SH-SY5Y cells that were treated with AF488-OB* (left) and AF488-SF (right) for 24 h. Red and green fluorescence indicates the cell membranes labeled with WGA and α S labeled with AF488 dye, respectively. Higher magnifications of the α S species are shown in the boxed areas (three independent experiments with one internal replicate). **f** 3D reconstruction of the z-stack analysis (5- μ m-thick slices) of the specimens shown in panel (**e**). Other details as in panel **d** (three independent experiments with one internal replicate). In all panels blue arrows indicate either fibrillar or oligomeric α S species.

negative correlation ($R = 0.91$, $p < 0.001$, Fig. 4g), indicating that the amount and kinetics of released oligomers match the observed levels and kinetics of toxicity in cellular systems.

Visualization of α S fibrils outside and oligomers inside cells at high resolution. To evaluate further the nature of the α S species that were found inside the cells, we used the super-resolution STED microscopy³⁷ on rat primary cortical neurons and the mouse monoclonal 211 anti- α S antibody (Fig. 5a–d). This conformation-insensitive antibody was raised against residues 121–125 of human α S (sequence DNEAY), so is unable to interact

with endogenous rat α S (sequence SSEAY). Accordingly, rat cortical neurons treated with the antibody in the absence of exogenous human α S did not reveal any green fluorescence arising from endogenous α S (Fig. 5a). By contrast, neurons exposed to human α S-derived OB* for 14 and 24 h exhibited green-fluorescent punctae, which appeared to be small and globular at the very high magnifications allowed by STED microscopy (Fig. 5b, arrows in the left image magnification). Neurons treated with SF for 14 and 24 h, however, showed α S aggregates outside the cells or attached to the membrane that, at high magnification, appeared fibrillar in morphology with a length distribution of the same order of magnitude as that

determined by AFM (Fig. 5b, arrow in the top right image magnification). The same images also showed a number of small and globular intracellular α S species, with a morphology that resembled the intracellular OB* (Fig. 5b, arrow in the bottom right image magnification). These can only include exogenous human α S given the specificity of the 211 antibody. The 211-derived green-fluorescent signals of cortical neurons treated with OB* and SF for 14 and 24 h were consistent with the results obtained with Ab52168 and A11 antibodies (Fig. 5c), although the reliability of STED quantification is limited by the selective photobleaching of fluorophores coupled with super-resolution microscopy.

When z-stack analysis was used to perform the 3D reconstruction of the primary neurons treated with OB*, small oligomeric species attached to the outer leaflet of the plasma membrane (small green punctae on the top) and penetrated into the cytosol (small green punctae in the middle) were evident (arrows in Fig. 5d). By contrast, neurons treated with SF showed fibrillar species attached to the extracellular side of the cell membrane along with intracellular globular species similar to OB* (arrows in Fig. 5d). STED imaging was repeated on human SH-SY5Y cells treated with OB* and SF labeled with the fluorescent AF488 dye, clearly showing small oligomers with globular morphology on the membrane surface and inside the cells and only inside the cells, respectively (Fig. 5e, f). We performed this experiment with a low ratio of AF488 labeled OB* and SF (generated by mixing 90 and 10% of unlabeled and labeled α S monomers), thus ensuring the absence of significant modifications to the properties of OB* and SF as previously reported^{6,8}.

These findings reveal that the α S species detected in neurons and SH-SY5Y cells by confocal microscopy and STED using different probes arise from exogenous human α S derived from SF/LF, rather than endogenous rat α S converted in oligomeric form by a seeding process. Moreover, to assess whether the toxicity induced by fibrils could originate from a released M that could progressively convert into oligomers by a process of secondary nucleation²⁷, we exposed the SH-SY5Y cells to SF (0.03 μ M) for 15 or 180 min in the absence or presence of a 10-fold excess of M (0.3 μ M). We have chosen a time of 180 min, as the toxicity observed with cells exposed to SF/LF was already evident within 180 min (Fig. 3c). The results did not show any significant difference in the degree of Ca^{2+} influx between the different conditions (Figure S10), indicating that the oligomers observed are directly generated by the disaggregation or fragmentation of fibrils under the conditions of study.

Inhibition of oligomer release from fibrils prevents their toxicity. To provide further evidence that the fibrils release toxic oligomers and that these are the major species responsible for the α S toxicity, we performed an additional set of competitive experiments. SH-SY5Y cells were exposed to OB*/SF/LF (0.3 μ M) and a 2.5-fold excess of the A11 antibody was added to the CM for 24 h. Without antibodies, cells treated for 24 h with OB* and, to a lesser extent SF/LF, showed intracellular small green dots, as revealed by the Ab52168 antibody (Fig. 6a, b). Addition of A11 antibody to the CM containing α S species significantly reduced the OB* penetration by ~68% (Fig. 6a, b) and abolished completely the OB* cytotoxicity (Fig. 6c). The reduction of small green dots in the cytosol of A11-treated cells exposed to SF and LF (by ~80% and ~77%, respectively) also resulted in a complete recovery of cell viability (Fig. 6a–c). This data suggest that A11 antibody binds oligomeric species that are released from SF/LF, thus preventing their cellular uptake and their downstream effects. We repeated the experiments using the conformation-sensitive OC antibody, raised against fibrillar species³⁸, found

here to react with SF/LF, but not OB* (Fig. 4a). The addition of OC antibody to the CM containing SF/LF reduced significantly the intracellular α S-specific antibody signal (by ~75% and ~63%, respectively) and their cytotoxicity, without affecting the intracellular fluorescence (reduced only by ~7%) and the toxicity (reduced only by ~3%) when added to the CM containing OB* (Fig. 6a–c).

Moreover, a plot of the degree of MTT reduction against the intracellular α S levels using the data obtained for OB*/SF/LF with or without A11/OC antibodies, revealed a very significant negative correlation ($R = 0.88$, $p < 0.001$) (Fig. 6d), confirming that the most inherently toxic α S species are β -sheet containing oligomers, which can either be formed during the self-assembly of the protein into amyloid fibrils or released from fibrillar species once they are formed.

Discussion

In this work, NMR and CD data show that the β -sheet core of the α S fibrils is unable to establish persistent interactions with either the surface or the internal regions of the lipid bilayers, with the interactions restricted to the binding of the disordered N-terminal region of α S onto the surfaces of the lipid bilayers. Accordingly, following their addition to the CM, the SF and LF forms of α S appear to be largely localized at the surface of the plasma membrane on the timescale of the experiments studied here, at which toxicity is observed. The total quantity of SF/LF bound to the cell membrane was not found to correlate with the degree of cell dysfunction or α S penetration. Therefore, the association between SF or LF and cellular membranes is not sufficient to account for the toxicity of these species. On the contrary, most of the prefibrillar OB* species that interact with the neuronal membrane appear to penetrate into the cytosol, and the amount of intracellular OB* was found to be directly proportional to the mass concentration of the species that interact with the plasma membrane and the resulting toxicity.

The biological analyses revealed that prefibrillar OB* species induce a rapid dysregulation of calcium and redox status homeostasis, in agreement with our previous results^{6,8,12,13,39}. Although the fate of α S aggregates once they enter the cells needs further investigation, the influx of OB* through the membrane bilayer is partially mediated by endocytosis. The uptake of OB* was found to result in further membrane disruption (as indicated by calcein release), mitochondrial dysfunction, and apoptosis. Importantly, the same cascade of events was observed for the fibrillar samples, although with remarkably different kinetics. Our results, therefore, indicate that α S aggregates with a β -sheet core and solvent-exposed hydrophobic surfaces appear to be able to induce cellular damage, although the time scales and levels of observed toxicity depend on the nature (oligomeric vs fibrillar) and size of the aggregates.

Thus, the question remains as to how fibrillar species exert their toxicity. According to our results, the toxic effects of the fibrils appear to correlate directly with the quantity of α S that penetrate into the cells after interacting with the cellular membranes and cause calcium uptake, ROS formation, membrane permeabilization to calcein, caspase-3 activation, and mitochondrial dysfunction. The dissociation of α S fibrils into soluble α S species, likely to include a low proportion of monomers in addition to oligomers, have also been observed in recent studies to occur under conditions close to physiological^{6,40}. Using confocal microscopy and the A11 and Syn33 antibodies, which are specific for 'soluble prefibrillar oligomers'^{35,36}, we found that the species that can penetrate into the cells were A11- and Syn33-positive in all cases, not only when the cells were treated with OB*, but also with SF and LF species that are A11- and

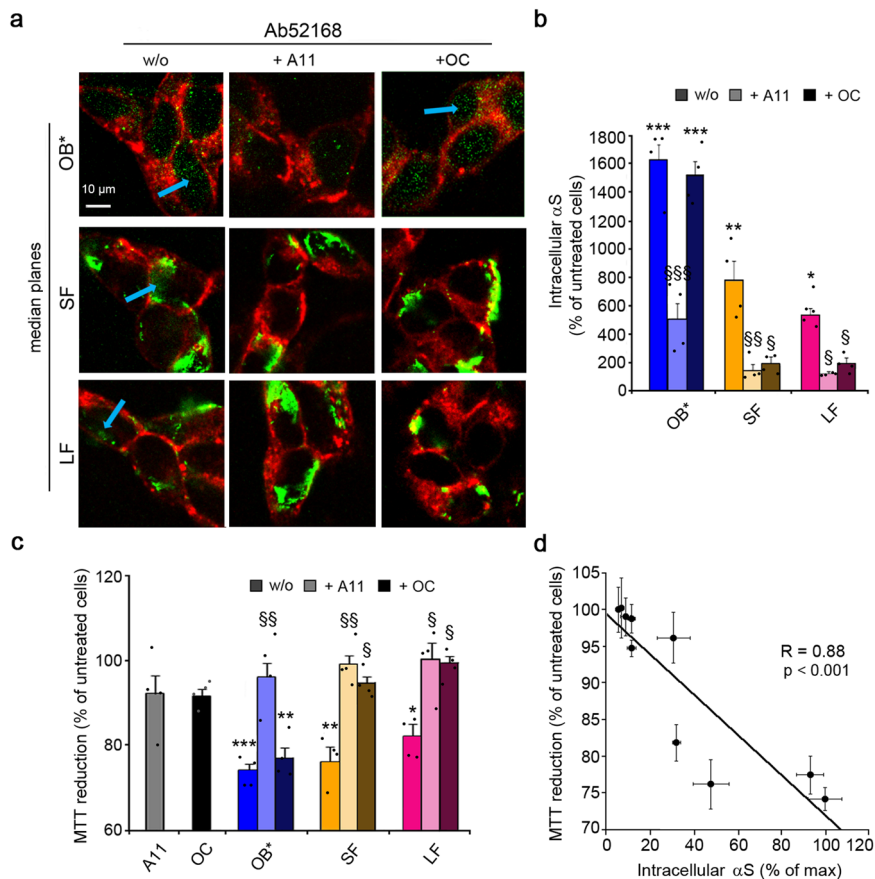


Fig. 6 Inhibition of oligomer release from fibrils prevents their toxicity. **a** Representative confocal scanning microscope images showing the median sections of SH-SY5Y cells treated for 24 h with the indicated α S species at 0.3 μ M, in the absence or presence of A11 (AHB0052, Thermo Fisher Scientific) and OC (AB2286, Sigma-Aldrich) antibodies at 1:2.5 molar ratio. Red and green fluorescence indicates the cell membranes and the α S species revealed with WGA and polyclonal anti- α S antibodies (ab52168, Abcam), respectively. The arrows in the images show the intracellular green-fluorescent punctae. **b** Semi-quantitative analysis of the green fluorescence signal referring to panel (a) and derived from intracellular α S species expressed as the percentage of untreated cells. **c** MTT reduction in SH-SY5Y cells treated for 24 h with the indicated α S species at 0.3 μ M in the absence or presence of A11 and OC antibodies (1:2.5 molar ratio). **d** Dependence of MTT reduction (values reported in panel c) on the α S-derived fluorescence values in cells treated with OB*/SF/LF (values from panel b) in the absence or presence of A11 and OC antibodies (1:2.5 molar ratio). In all panels, experimental errors are S.E.M. ($n = 4$ with three internal replicates). Samples were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison test relative to untreated cells (in panels b and c, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) and cells treated with the α S species (in panels b and c, $\$P < 0.05$, $\$\$P < 0.01$, $\$\$\$P < 0.001$). In panel d, $P < 0.001$. A total of 200–250 cells (a, b), and 150,000–200,000 cells (c) were analyzed per condition.

Syn33-negative per se. In a cell-free context, SF/LF were found to slowly release A11-positive species and DLS indicated a slow release of small-sized species. The appearance of A11-positive aggregates from the fibrillar species was relatively slow, with rates and overall kinetic traces that closely match the time course of toxicity for SF/LF. This also explains why fibrils caused a minor and slower calcein release from SUVs. Finally, using STED super-resolution microscopy in rat primary cortical neurons coupled with 3D analysis and the monoclonal 211 antibody that recognizes only the exogenous human α S, we provide further evidence for the oligomeric, rather than fibrillar, morphology of the α S species released from exogenous α S fibrils upon interaction with the cell membrane and later entering the cytosol. When z -stack analysis was used to perform the 3D reconstruction, the release of oligomeric species from SF was also evident inside the cells exposed to the fluorescently labeled AF488-SF in the absence of any antibody.

Our finding that LF are less toxic than SF can be attributed to their lower proportion of fibrillar ends at the same mass concentration. As oligomer release occurs from fibril ends, this feature will result in a slower release of oligomers. Moreover, LF

showed a lower diffusion capacity in the CM, and a reduced ability to interact with the cells, than SF. These conclusions are in line with previous reports obtained with the amyloid-beta ($A\beta$) peptide associated with Alzheimer’s disease that have revealed the lipid-mediated depolymerization of nontoxic fibrils of $A\beta$ into toxic A11-positive oligomers, which were also shown to resemble the oligomers formed de novo during fibril assembly⁴¹. They are also in agreement with the general proposition that any fibrillar species that accumulate in tissue can represent a source of soluble toxic oligomers^{6,42}, and with the halos of soluble oligomers observed to surround amyloid plaques of $A\beta$ in mouse brains⁴³.

In a recent study, we have found that SF species analyzed in the present paper are able to induce PD-like pathology by a spreading process when injected into the brains of healthy mice, whereas the OB* species were only able to induce local toxicity in the region of brain injection, without signs of seeding and spreading, as it was expected, given their kinetically trapped nature²⁴. It is possible, however, that the OB-like species that we have observed to be released from fibrils in the present study, in addition to contributing to the induction of toxicity, could also enhance the generation of new aggregates, as they might have elongation

capabilities similar to those of their fibrillar precursors, unlike OB* species⁴.

In conclusion, our results suggest that α S fibrils, particularly the small ones, have a doubly deleterious effect. The first has been explored previously and results from a transfer from neuron-to-neuron contributing to the slow but progressive diffusion of Lewy body pathology in different brain areas. Indeed, some α S fibril polymorphs have been observed to be internalized by cells^{22,23} and possibly contribute to pathology spreading^{17–21,24}. The second effect stems from the release of prefibrillar oligomeric species causing an immediate dysfunction of the neurons in the vicinity of these species. Such oligomeric species could also contribute to pathogenesis via neuron-to-neuron spreading by their direct cell-to-cell transfer or by generating new fibrils, following their neuronal uptake.

Thus, molecules able to prevent the formation of toxic oligomers of α S during the aggregation process, such as aminosterols^{44–46}, or to interact directly with such species, for example the A11 antibody, or to prevent their release from the fibrillar species, such as the OC antibody, are able to suppress α S toxic behavior. Indeed, these three mechanisms have been shown to be used by different molecular chaperones to protect cells from amyloid aggregation, some inhibiting oligomer formation, other binding to and neutralizing the effects of preformed oligomers, and other binding preferentially to fibril ends^{47–51}. These features are of considerable interest in the design of therapeutic approaches targeting α -synucleinopathies and other systems in which protein aggregation is linked to neurodegeneration.

Methods

Purification of α S monomers and formation of α S OA* and OB*, SF and LF.

The recombinant human α S was over-expressed in *E. coli* BL21 cells (Agilent, UK) and purified as a monomeric fraction⁴. OA* were generated by incubating ca. 200 μ M of α S in PBS pH 7.4 with ten molar equivalents of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Merck, Darmstadt, Germany) for 48 h at 37 °C. After the incubation, excess of compound and monomeric protein was removed by six consecutive cycles of filtration through 100 kDa centrifuge filters (Merck). For the isolation of OB*, purified α S was dialyzed against milliQ water and lyophilized for 48 h in aliquots of 6 mg. The aliquots were resuspended in 500 μ L of PBS pH 7.4 to a final concentration of 800 μ M, filtered through a 0.22 μ m filters and incubated at 37 °C without agitation for 20–24 h. Resulting fibrils formed during the incubation were removed by ultracentrifugation at 288,000 \times g. Monomeric protein and small oligomers were removed by four consecutive cycles of filtration through 100 kDa centrifuge filters (Merck)^{4,8}. Final oligomer concentration was determined measuring the absorbance at 280 nm and using the extinction coefficient 5960 M⁻¹ cm⁻¹ for the OB*, or by BCA analysis for OA* oligomers (in this later case, the yield of production was consistently ca. 100%). Both oligomeric samples were kept at room temperature and were used within 3 days after their production^{4,8}. Long fibrillar samples (f0) were prepared by incubating monomeric α S at 70 μ M (1 mg/ml) in PBS buffer pH 7.4 (0.1 M ionic strength) containing 0.01% NaN₃ at 37 °C, under constant agitation (New Brunswick Scientific Innova 43, 200 rpm) for 4–6 days. After this time, each sample was centrifuged (15 min at 16,100 \times g) and the fibrillar pellet washed twice with PBS before being resuspended into the appropriate volume of PBS. As clumping of fibrils was observed⁵² a second generation of long fibrils (f1) was prepared by incubating 100 μ M monomeric α S with 10 μ M of f0 sonicated for 1 min (Bandelin, Sonopuls HD 2070, cycles of 0.3 s of active sonication followed by 0.7 s of passive interval, 10% maximum power) in 500 μ L PBS at 37 °C under quiescent conditions for 13–15 h and then centrifuged as described above for f0. Samples of short f1 fibrils were generated by sonicating long f1 fibrils for 20 s using the same apparatus and settings. The concentration of fibrils was estimated by measuring the absorbance at 275 nm using $\epsilon_{275} = 5600$ M⁻¹ cm⁻¹ after disaggregating an aliquot by the addition of guanidinium chloride to a final concentration of 4 M.

N-terminally acetylated α S was obtained by coexpression of a plasmid carrying the components of the NatB complex (Addgene) with the pT7-7 plasmid encoding for human WT α S. The purification protocol of N-terminally acetylated protein was identical to the non-modified variant and the yield of acetylation was assessed by mass spectrometry and resulted to be essentially complete.

In a set of experiments, LPS (lipopolysaccharide) ultra-clean, also referred to as LPS-free, OB* samples were used to study the possible effect of LPS residual concentrations present in the OB* samples generated from the recombinant protein. For this, a set of commercial kits to remove the LPS endotoxin and quantify its content in the different protein samples (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used.

Fluorescently labeled α S molecules carrying the AF488 dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were obtained by using the N122C mutational variant⁶. The labeled protein was then purified from the excess of free dye by a P10 desalting column with a Sephadex G25 matrix (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and concentrated using Amicon Ultra Centricons (Merck, Darmstadt, Germany). Fluorescent OB* and SF were generated by mixing 90 and 10% of unlabeled and labeled α S, respectively. The fluorophore at a position near to 122 was reported to be efficient in following amyloid aggregation and oligomer and fibril stability without affecting much these properties⁶. But in any case, the low ratio of labeled to unlabeled monomers and the C-terminal position of Cys122⁸, ensured the absence of significant modifications to the properties of OB* and SF.

ssNMR. PRE data were acquired by performing DARR experiments in ssNMR to probe the membrane interactions of the rigid region of the oligomers and fibrils⁸.

All lipids were acquired from Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA. SUVs of the relevant lipid compositions were prepared by drying chloroform solutions of the lipids under a stream of nitrogen gas followed by desiccation under vacuum. The resulting dried lipid film was then rehydrated in buffer, subjected to 3–5 freeze-thaw cycles, and sonicated until the solution becomes clear. SUVs composed of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) at a ratio 5:3:2 w/w, respectively, were prepared (this lipid composition has been previously proposed to be a good model that mimics the physiological lipid membrane composition⁵³). Two percent of paramagnetic lipid with an unpaired electron located at the hydrophilic head group (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-DTPA gadolinium salt), or at carbon 16 of the lipid tail (1-palmitoyl-2-stearoyl-[16-doxy]-*sn*-glycero-3-phosphocholine) were added to the lipid mixture, to probe the interaction of the protein with the surface of the membrane or the interior of the membrane, respectively. The protein sample was incubated with SUVs for 1 h before pelleting down using a TLA-120.2 Beckman rotor (Beckman Coulter UK Ltd., High Wycombe, UK, 30 min, 300,000 \times g). The resulting pellet was transferred into 3.2 mm Zirconia XC thin-walled MAS rotors for ssNMR experiments.

Interaction of α S species with SUVs using far-UV CD. To investigate the interaction of α S in the different aggregated states with lipid membranes, we monitored the change in the mean residue ellipticity of α S at 222 nm at increasing lipid: α S molar ratios using SUVs of 5:3:2 of DOPE:DOPS:DOPC. The different α S species (10 μ M mass concentration) were incubated with SUVs at varying concentrations for at least 1 h at room temperature prior to measurement, and membrane binding affinity was estimated according to the binding equation derived by assuming a fixed but unknown number of lipid molecules interacting with one molecule of protein with identical affinity⁵⁴.

Calcein release in SUVs. The kinetics of lipid membrane permeabilisation induced by the different α S species was obtained by monitoring the increase in fluorescence due to the leakage of entrapped calcein within SUVs (5:3:2 of DOPE:DOPS:DOPC) over time⁴. The different protein species (0.05 μ M) were added to SUVs (5 μ M) and the fluorescence measurements were obtained using a Varian Cary Eclipse fluorimeter (Palo Alto) at 20 °C in a 2 mm \times 10 mm path length cuvette using excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. The percentage of calcein release was defined as:

$$\%_{\text{release}} = \left[\frac{(F - F_{\text{control}})}{(F_{\text{tot}} - F_{\text{control}})} \right] \times 100$$

where F is the fluorescence measured in the presence of the different α S species, F_{control} is the fluorescence measured of the SUVs alone, and F_{tot} is the total fluorescence obtained after complete disruption of SUVs using Triton X-100 (1% v/v).

AFM. All images were acquired at room temperature in air typically using intermittent contact mode on a Nanowizard II atomic force microscope (JPK Instruments, Berlin, Germany) except for the analysis of OA* and OB* samples, which were acquired using tapping mode in a Multimode 8 atomic force microscope (Bruker, Massachusetts, USA). The different α S species (0.1–1 μ M, 10 μ L) were applied onto a layer of freshly cleaved mica and allowed to air-dry. The samples were washed with water to remove any salts and dried again before imaging. Images were processed and analyzed with Gwyddion open source software (version 2.48) (<http://www.gwyddion.net>).

Far-UV CD. Far-UV CD spectra of the different α S species were acquired in PBS at 20 °C between 200 and 250 nm, using a scan speed of 50 nm min⁻¹ and a bandwidth of 1 nm. Ten accumulations were recorded for each sample, using a 1-mm path length cuvette and a J-810 Jasco spectropolarimeter (Tokyo, Japan), equipped with a thermostated cell holder.

FT-IR. FT-IR spectra of the different α S species (100–400 μ M) were acquired in PBS and analyzed in a Bruker BioATRCell II using a Bruker Equinox 55 FT-IR spectrophotometer (Bruker Optics Limited, UK) equipped with a liquid-nitrogen-cooled mercury cadmium telluride (MCT) detector and a silicon internal reflection element (IRE). For each spectrum, 256 interferograms were recorded at 2 cm^{-1} resolution. Data processing of the amide I region ($1720\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) was performed with the Opus software package (Bruker Optics Limited, UK) and consisted of a background subtraction of the buffer spectra, atmospheric compensation, and baseline subtraction. All absorbance spectra were normalized for comparison.

X-ray diffraction. Protein stalks were prepared by air drying $10\ \mu\text{L}$ of $\sim 800\ \mu\text{M}$ (mass concentration) of the different α S species between two wax-filled capillary ends mounted in a Petri dish⁵⁵. X-rays were generated using MICROSTAR microfocussing rotating anode X-ray generator and the diffraction data were collected on a X8 Proteum system (Bruker AXS). The data were subsequently analyzed on PROTEUM 2 software suite.

ThT and ANS fluorescence. Fluorescence measurements were performed in a $2\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ path length cuvette, using a Varian Cary Eclipse fluorimeter (Palo Alto, CA, USA) in a temperature-controlled cell holder. ThT fluorescence was monitored by exciting the sample at 446 nm and recording the emission fluorescence spectrum between 460 and 600 nm (5-nm slitwidths). Each protein species ($10\ \mu\text{M}$) was incubated with ThT ($50\ \mu\text{M}$, $\epsilon_{416\text{nm}} = 26,620\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) in PBS for 30 min before performing the measurement. ANS binding was monitored by exciting the sample at 350 nm and recording the emission spectrum between 400 and 650 nm (5-nm slitwidths). Each protein species ($5\ \mu\text{M}$) was incubated with ANS ($250\ \mu\text{M}$, $\epsilon_{350\text{nm}} = 5000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) in PBS for 30 min before recording the spectra.

Cell cultures. Authenticated human neuroblastoma SH-SY5Y cells were purchased from A.T.C.C. (Manassas, VA, USA). SH-SY5Y cells were tested negative for mycoplasma contaminations, and were maintained in a 5% CO_2 humidified atmosphere at $37\text{ }^\circ\text{C}$ and grown until 80% confluence for a maximum of 20 passages^{12,37}.

Primary cortical neurons were obtained from embryonic day (ED)-17 Sprague-Dawley rats (Harlan)⁵⁶, maintained in neuronal basal medium (NBM) at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in a 5.0% CO_2 -humidified atmosphere and analyzed 14 days after plating^{8,12}. Experiments and animal use procedures were in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1996). The experimental protocols were approved by the “Commissione per l’Etica della ricerca” of the University of Florence, in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS no. 123) and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The authors further attest that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Human iPSC-derived dopaminergic neurons were purchased from Axol Bioscience (Cambridge, UK), which obtains human cell resources from cell repositories who guarantee all human cell collections are performed at certified facilities under the highest ethical standards. Discrete legal consent form was obtained and the donors’ or clinics’ rights to hold research uses, for any purpose, or further commercialization use were waived. All human cells were collected under protocols that are in compliance with the Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996 (HIPAA). Human iPSC-derived dopaminergic neuron progenitors were plated and led to maturation according to manufacturer’s instructions. In detail, they were plated on 12-well plates containing glass coverslips coated with poly-D-lysine plus surebond-XF solution. Then the maturation to dopaminergic neurons was achieved starting from day 1, by growing the cells in differentiation medium at $37\text{ }^\circ\text{C}$ with 5% CO_2 . On day 5 post-plating, the differentiation medium was replaced with the maintenance medium, which was changed every 2 days. The resulting iPSC-derived dopaminergic neurons were characterized and analyzed between day 14 and day 18 of culturing. The cells were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde at room temperature and blocked with fetal bovine serum in 0.1% Triton X-100 for 30 min . Coverslips were incubated with $1:300$ diluted rabbit anti-MAP-2 antibodies (ab32454, Abcam) and $1:200$ diluted mouse anti-TH antibodies (sc-25269, Santa Cruz Biotechnology) in blocking solution overnight at $4\text{ }^\circ\text{C}$. After washing with PBS, the cells were incubated with $1:500$ diluted Alexa-Fluor-568-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) and $1:500$ diluted Alexa-Fluor-514-conjugated anti-mouse secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) for 90 min at room temperature. Finally, coverslips were incubated in PBS containing DAPI for 15 min at room temperature. Fluorescence emission was detected after double excitation at 568 and 514 nm by a TCS SP8 scanning confocal microscopy system (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

Confocal microscopy analysis for the penetration of α S species. α S species were added to the cell CM of SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips typically for 1 h at $0.3\ \mu\text{M}$. In a set of experiments, OB*, SF, or LF were added to the cell CM of SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips for different lengths of time ($0, 1, 3, 6,$ and

24 h). In another set of experiments, SH-SY5Y cells were treated for 6 h at $37\text{ }^\circ\text{C}$ and then with or without 0.05% trypsin for 15 min at $4\text{ }^\circ\text{C}$. In an additional experiment, SH-SY5Y cells were treated for 6 h at $37\text{ }^\circ\text{C}$ with or without $5\ \mu\text{M}$ dynamin inhibitor I, dynasore (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or for 6 h at $4\text{ }^\circ\text{C}$. Following membrane permeabilization, α S was detected with $1:250$ diluted rabbit polyclonal anti- α S antibodies (ab52168 Abcam, Cambridge, UK) and with $1:1000$ diluted Alexa-Fluor-488-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific). In another set of experiments, OB* and SF were added to the CM of SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips for 1 h at increasing concentrations ($0.03, 0.1, 0.3, 1.0,$ and $3.0\ \mu\text{M}$) and the immunostaining analysis was performed as described below.

In a set of experiments, OB*, SF, and LF at $0.3\ \mu\text{M}$ were added to the CM of iPSC-derived dopaminergic neurons for 24 h . The cells were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde at room temperature and blocked with fetal bovine serum in 0.1% Triton X-100 for 30 min . Coverslips were incubated with $1:400$ diluted mouse anti-MAP-2 antibodies (ab11267, Abcam) and $1:250$ diluted rabbit anti-oligomer A11 polyclonal antibodies (AHB0052 Thermo Fisher Scientific) in blocking solution overnight at $4\text{ }^\circ\text{C}$. After washing with PBS, the cells were incubated with $1:500$ diluted Alexa-Fluor-568-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) and $1:500$ diluted Alexa-Fluor-514-conjugated anti-mouse secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) for 90 min at room temperature.

In another set of experiments, OB*, SF, and LF at $0.3\ \mu\text{M}$ were added to the CM of SH-SY5Y cells for different lengths of time ($0, 3, 6, 14,$ and 24 h). Following membrane permeabilization, α S was detected with $1:250$ diluted rabbit anti-oligomer A11 polyclonal antibodies (AHB0052 Thermo Fisher Scientific), and with $1:1000$ diluted Alexa-Fluor-488-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (A-11034 Thermo Fisher Scientific). In another set of experiments, OB* and SF were added to the CM of SH-SY5Y cells at $0.3\ \mu\text{M}$ for different lengths of time ($0, 3, 6, 14,$ and 24 h). Following membrane permeabilization, α S was detected with $1:300$ diluted rabbit oligomer-specific Syn33 polyclonal antibodies (ABN2265M, Sigma-Aldrich) and then with $1:1000$ diluted Alexa-Fluor-488-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (A-11034 Thermo Fisher Scientific).

In another set of experiments, OB* were added to the CM of SH-SY5Y cells at different concentrations ($0.03, 0.1, 0.3, 1,$ and $3\ \mu\text{M}$) for 1 h . α S was detected with $1:250$ diluted rabbit anti-oligomer A11 polyclonal antibodies (AHB0052 Thermo Fisher Scientific), and with $1:1000$ diluted Alexa-Fluor-488-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (A-11034 Thermo Fisher Scientific). In another set of experiments, OB*, SF, and LF at $0.3\ \mu\text{M}$ were added to the CM for 30 min and then polyclonal A11 (AHB0052 Thermo Fisher Scientific) or OC (AB2286 Sigma-Aldrich) conformation-sensitive antibodies were added for 24 h to the extracellular medium (in a molar ratio of $1:2.5$). The cells were then counterstained with $5.0\ \mu\text{g/ml}$ Alexa-Fluor 633-conjugated WGA (W21404 Thermo Fisher Scientific)⁵⁷ fixed with 2% (v/v) paraformaldehyde, permeabilized and α S was detected with $1:250$ diluted rabbit polyclonal anti- α S antibodies (ab52168 Abcam) and with $1:1000$ diluted Alexa-Fluor-488-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (A-11034 Thermo Fisher Scientific). Fluorescence emission was detected after double excitation at 633 and 488 nm by the TCS SP8 scanning confocal microscopy system (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an argon laser source. A series of $1.0\text{-}\mu\text{m}$ -thick optical sections (1024×1024 pixels) was taken through the cell depth for each sample using a Leica Plan Apo $\times 63$ oil immersion objective and projected as a single composite image by superimposition. In some experiments, four optical sections near the coverslip were merged to a single composite image, which we referred to as basal planes, four optical sections more distant from the coverslip were merged and referred to as median planes and four higher top optical sections were merged and referred to as apical planes. The confocal microscope was set at optimal acquisition conditions, e.g., pinhole diameters, detector gain, and laser powers. Settings were maintained constant for each analysis.

Measurement of intracellular ROS and mitochondrial superoxide ions. α S species were added to the CM of SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips for 15 min at various concentrations ($0.03, 0.1, 0.3, 1.0,$ and $3.0\ \mu\text{M}$). In a set of experiments, $0.3\ \mu\text{M}$ OB* were added to the CM for different lengths of time ($0, 5, 10, 15, 30,$ and 60 min). In a set of experiments, LPS-free α S species (M, OB*, and LF) were compared to normal samples, by adding them to the CM of SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips for 15 min at $0.3\ \mu\text{M}$. We used this time the CM- H_2DCFDA probe to detect and quantify intracellular levels of hydrogen peroxide as a ROS marker, although we reported similar results for the OB* when the intracellular accumulation of ROS was followed by Hyper-3 (probe for hydrogen peroxide) and dihydroethidium (probe for superoxide radical) in primary neuronal cells³⁹. In order to quantify hydrogen peroxide, then, cells were loaded with $5\ \mu\text{M}$ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate for 10 min (CM- H_2DCFDA , Thermo Fisher Scientific)^{8,45}. The emitted fluorescence was detected at 488 nm excitation line by the confocal scanning system described above.

Mitochondrial superoxide ion production was detected with a static time-point measurement in living SH-SY5Y cells with MitoSOX probe (Thermo Fisher Scientific). Fluorescently labeled AF488-OB* and AF488-SF were added to the CM of SH-SY5Y cells for 1 h at $0.03, 0.1,$ and $0.3\ \mu\text{M}$, and the red and green emitted fluorescences were detected at 550 and 488 nm excitation lines, respectively, by the

confocal scanning system described above. As a positive control, cells were also treated with 250 μM H_2O_2 and the analysis was performed as described above.

Alteration of membrane permeability. The membrane integrity disruption was assessed in SH-SY5Y cells and primary rat cortical neurons seeded on glass coverslips³⁷. Briefly, cells were loaded with 1.0 μM calcein-AM (Thermo Fisher Scientific) for 10 min at 37 °C and then treated for 1 h with αS species at 0.3 μM . In another set of experiments, 0.3 μM OB* were added to the CM of SH-SY5Y cells for different lengths of time (0, 5, 10, 15, 30, and 60 min). The membrane integrity disruption was also assessed in SH-SY5Y cells treated for 1 h with αS species (M, OA*, and OB*) derived from N-acetylated αS protein at 0.3 μM . The emitted fluorescence was detected at 488 nm excitation line by the confocal scanning system described above.

Measurement of intracellular Ca^{2+} . αS species were added to the CM of SH-SY5Y cells and primary rat cortical neurons seeded on glass coverslips for 15 min at various concentrations (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, and 3.0 μM). In a set of experiments, 0.3 μM OB* were added to the CM of SH-SY5Y cells for 0, 5, 10, 15, 30, 60, and 180 min and to primary rat cortical neurons for 0, 5, 15, 60, and 180 min. Cells were also treated with 0.3 μM OB* in CM without Ca^{2+} . In a set of experiments, cells were treated for 15 or 180 min with 0.3 μM M in the absence or presence of 0.03 μM SF (monomers equivalents, corresponding to 10% of monomers). Then the cells were loaded with 10 μM Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific) and the analysis was performed by confocal microscopy (excitation at 488 nm)^{37,57}.

In a set of experiments, the Ca^{2+} influx was analyzed in real-time in living SH-SY5Y cells loaded with the Fluo-4 AM probe for 10 min. The intracellular Ca^{2+} basal level in living cells was measured for 10 min and then Ca^{2+} currents were analyzed following the addition of OB* or SF up to 30 min. The emitted fluorescence was detected at 488 nm excitation line over time by the confocal scanning system described above.

Measurement of caspase-3 activity. OB*/SF/LF were added to the CM of iPSC-derived dopaminergic neurons seeded on glass coverslips for 24 h at 0.3 μM . In another set of experiments, SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips were treated with M/OA/OB*/SF/LF for 24 h at 0.3 μM or for different lengths of time (0, 1, 3, 5, and 24 h). After incubation, the CM was removed and replaced for 1 h with the FAM-FLICA Caspase-3/7 solution (Immunochemistry Technologies, LLC, Bloomington, MN). The FLICA reagent FAM-DEVD-FMK enters each cell and binds irreversibly and covalently to active caspase-3. The reagent bound covalently to the active enzymes is retained in the cell, while the unbound reagent diffuses outside and is washed away. The emitted fluorescence was then detected at 488-nm excitation by the confocal scanning system described above.

MTT reduction assay. The cytotoxicity of αS species was assessed on SH-SY5Y cells and primary rat cortical neurons seeded in 96-well plates, 24 h after their addition to the CM at various concentrations (0.03, 0.3, and 3.0 μM), by the MTT assay^{37,58}. SH-SY5Y cells were treated for 24 h with αS species (M, OA*, and OB*) derived from N-acetylated αS protein at 0.3 μM . In a set of experiments, LPS-free αS species (M, OB*, and LF) were compared to normal samples, by adding them to the CM of SH-SY5Y cells seeded on glass coverslips for 24 h at 0.3 μM . In a set of experiments, αS species were added to the CM of SH-SY5Y cells at 0.3 μM for different lengths of time (0, 1, 3, 5, and 24 h) and the MTT assay was assessed. In another set of experiments, OB*, SF, and LF at 0.3 μM were added to the CM of SH-SY5Y cells and, following 30 min of treatment, A11 or OC antibodies (in a molar ratio of 1:2.5) (AHB0052 Thermo Fisher Scientific and AB2286 Sigma-Aldrich, respectively), were added to the extracellular medium for 24 h and the MTT assay was assessed. A11 and OC antibodies alone were also analyzed as control. After treatment, the CM was removed, cells were washed with PBS and the MTT solution was added to the cells for 4 h. The formazan product was solubilized with cell lysis buffer (20% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50% N, N-dimethylformamide, pH 4.7) for 1 h. The absorbance values of blue formazan were determined at 590 nm. MTT tests were achieved using Microplate Manager® Software (Biorad, CA, USA). Cell viability was expressed as the percentage of MTT reduction in treated cells as compared to those untreated.

Dot-blot analysis. Dot-blot analyses of αS species (OA, OB*, SF, and LF) were performed by spotting 2.0 μl (0.36 mg/ml) of each conformer onto a 0.2 μm nitrocellulose membrane. After blocking (1.0% bovine serum albumin in TBS/TWEEN 0.1%) the blots were probed with 1:200 diluted rabbit anti-oligomer A11 polyclonal antibodies (AHB0052, Thermo Fisher Scientific), or with 1:1000 rabbit anti-amyloid fibrils OC (AB2286, Sigma-Aldrich) or with 1:1250 diluted conformation-insensitive rabbit polyclonal anti- αS antibodies (ab52168 Abcam) or with 1:250 diluted conformation-insensitive mouse monoclonal 211 anti- αS antibodies (sc12767, Santa Cruz Biotechnology). In a set of experiments, αS species (OB*, SF, and LF) spotted onto the nitrocellulose membrane were detected with 1:3000 diluted rabbit oligomer-specific Syn33 antibody (ABN2265M, Sigma-Aldrich). Then, the blots were incubated with 1:3000 diluted HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (AB6721 and AB6728, Abcam). The immunolabeled bands were detected using a

SuperSignalWest Dura (Pierce, Rockford, IL, USA) and ImageQuant™ TL software (GE Healthcare UK Limited version 8.2).

Confocal microscopy analysis of αS species in the absence of cells in vitro. SF and LF at 0.3 μM were incubated in CM without cells in wells containing a glass coverslip for 0, 1, 3, and 24 h at 37 °C. Following the incubation, the coverslips were fixed with 2% (v/v) paraformaldehyde, incubated with BSA 0.5% to avoid unspecific adherence of antibodies to the glass coverslip, and finally incubated for 30 min at 37 °C with 1:2000 diluted mouse monoclonal 211 anti- αS IgG1 antibodies (sc12767, Santa Cruz Biotechnology) or with 1:2500 diluted rabbit anti-oligomer A11 polyclonal antibodies (Thermo Fisher Scientific), and then for 30 min with 1:2000 Alexa-Fluor 514-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific). The emitted fluorescence was detected at 514-nm excitation line by the confocal scanning system described above. The analysis was also performed with OB* at 0 and 24 h as positive control, and with primary and secondary antibodies without αS , to exclude any cross-reaction of the antibodies.

DLS. Size distribution analysis was performed with a Malvern ZetasizerNano S DLS device (Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom) using SF at 1 μM in PBS following incubation at 37 °C for different lengths of time (0, 3, 14, and 24 h). OB* were also analyzed at 1 μM in PBS following incubation at 37 °C for 0 and 24 h. Each sample was analyzed considering the refraction index and viscosity of its dispersant. A 45-mm reduced volume plastic cell was used.

Analysis of the kinetics of toxicity using the different cellular readouts. The different intracellular fluorescence intensities associated with Ca^{2+} influx and MTT reduction were plotted versus the time elapsed after αS addition to the CM. A variable number of cells were analyzed for every probe and time point and the resulting kinetic plots were analyzed with a procedure of best-fitting using a single exponential function of the form:

$$F(t) = F(\text{eq}) + A \exp(-kt) \quad (1)$$

where $F(t)$ is the intracellular fluorescence at time t as a percentage of that observed in untreated cells, $F(\text{eq})$ is the same fluorescence at the apparent equilibrium (time ∞), A is the amplitude of the exponential fluorescence change as a percentage of that observed in untreated cells, and k is the apparent rate constant in s^{-1} .

The intracellular fluorescence intensities associated with the intracellular αS species recognized by A11 antibody were plotted versus the time elapsed after αS addition to the CM and the resulting kinetic plots were analyzed with a procedure of best-fitting using a sigmoidal function of the form

$$F(t) = F(\text{eq}) + \frac{F(0) - F(\text{eq})}{1 + \left(\frac{kt}{A}\right)^B}$$

where $F(t)$ is the intracellular fluorescence at time t as a percentage of that observed in untreated cells, $F(0)$ is the same fluorescence at time zero, $F(\text{eq})$ is the same fluorescence at the apparent equilibrium (time ∞), A is the amplitude of the fluorescence change as a percentage of that observed in untreated cells, k is the apparent rate constant in s^{-1} , and B is the slope of the sigmoidal function at time t .

STED microscopy. STED xyz images (i.e., z-stacks acquired along three directions: x , y , and z axes) of rat cortical neurons treated with OB* and SF at 0.3 μM for 14 and 24 h were acquired by using an SP8 STED 3X confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany)³⁷. Primary rat cortical neurons were counterstained with 0.01 mg/ml WGA, Tetramethylrhodamine Conjugate (W849, Thermo Fisher Scientific). αS was detected with 1:125 diluted conformation-insensitive mouse monoclonal 211 anti- αS IgG1 antibodies (sc12767, Santa Cruz Biotechnology) that recognize only the human protein, and 1:500 Alexa-Fluor 514-goat anti-mouse IgG1 secondary antibody (A-31555, Thermo Fisher Scientific). Fluoromount-G™ (00-4958-02, Fisher Scientific) was used as mounting medium. Fluorescence emission was detected after double excitation at 550 and 514 nm. STED xyz images were acquired in bidirectional mode with the Leica SP8 STED 3X confocal microscope. Tetramethylrhodamine fluorophore was excited with a 550-nm-tuned white light laser (WLL) and emission collected from 564 to 599 nm, Alexa-Fluor 514 was excited with a 510-nm-tuned WLL and emission collected from 532 to 551 nm. Frame sequential acquisition was applied to avoid fluorescence overlap. It was applied a gating between 0.3 and 6 ns to avoid collection of reflection and autofluorescence. Six-hundred-and-fifty-nanometer pulsed-depletion laser was used for Alexa-Fluor 514 excitation. Images were acquired with Leica HC PL APO CS2 100x/1.40 oil STED White objective. Gated pulsed-STED were applied to Alexa-Fluor 514 fluorophore. Collected images were de-convolved with Huygens Professional software (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, The Netherlands; version 18.04) and analyzed with Leica Application Suite X (LAS X) software (Leica) to generate 3D reconstructions. Z-series stacks were obtained from 5 μm neuron slices. Images were collected at 0.1- μm intervals.

In another experiment, SH-SY5Y cells were treated with fluorescently labeled AF488-OB* and AF488-SF for 24 h and STED xyz images were acquired as described above after double excitation at 550 and 488 nm.

Measurements of the fluorescence intensities. To quantify the intensity of the fluorescent signal arising from each probe, cells were analyzed by using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD; version 1.52t). The fluorescence intensities were measured in regions of interest, centered on single cells, whose dimensions remained constant for all the analyzed images, and were then expressed as the ratio ($\Delta F/F$) of the change in fluorescence (ΔF) with respect to the resting baseline fluorescence in untreated cells (F)^{57,59}.

In immunofluorescence experiments, intracellular αS fluorescence intensity was assessed in median planes by selecting multiple ROIs per cell in the cytoplasmic compartment, excluding the cellular membrane, after background subtraction. Similarly, the extracellular fluorescence was measured in basal, median, and apical planes by selecting multiple ROIs per cell in the membrane compartment excluding the cytoplasmic one, in order to include only the signals arising from the species interacting with the outer leaflet of cell membranes. The fluorescence intensities were then expressed as fractional changes above the resting baseline for untreated cells ($\Delta F/F$). In a set of experiments, the intracellular fluorescence was analyzed by counting the number of puncta inside the cells, by using the ImageJ software. In STED microscopy analyses, the fluorescence intensity arising from intracellular and extracellular αS was expressed in arbitrary units, after background subtraction.

Comparison of the concentration of the fibrils. We estimated the same fibril number concentrations for SF and LF (corresponding to a higher mass concentration for LF). For OB*, we took the average number of monomers per oligomer from AUC analysis⁴. This was ca. 30 monomers. For the fibrils we can estimate the number of monomers per fibril using the following equation:

$$N = \frac{\rho V N_A}{MW} = \frac{\rho \pi \left(\frac{h}{2}\right)^2 l N_A}{MW}$$

where N is the number of monomers per aggregate, N_A is the Avogadro's constant, MW is the molecular weight of the monomeric components, ρ is the density of the aggregate (1.35 g/cm³), V is the volume of the fibril, and h and l are the height and length of the fibril, respectively (derived from AFM). The numbers obtained are ca. 60 monomers for SFs and ca. 500 monomers for LFs.

Thus, 0.3 μM concentration (monomer equivalents) of SF and 3 μM concentration (monomer equivalents) of LF give rise to ca. 0.005 μM particle concentration in both samples.

Statistical analysis. All data were expressed as means \pm standard error of mean (S.E.M.). Comparisons between the different groups were performed by ANOVA followed by Bonferroni's post comparison test, by using GraphPad Prism 7.0 software.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All data supporting the findings of this study are provided within the paper and its supplementary information. A source data file is provided with this paper. All additional information will be made available upon reasonable request to the authors. The data reported in Fig. 1a are deposited at the placeholder DOI link: <https://doi.org/10.17863/CAM.59871>. Source data are provided with this paper.

Received: 30 January 2020; Accepted: 16 February 2021;

Published online: 22 March 2021

References

- Ibáñez, P. et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* **364**, 1169–1171 (2004).
- Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.* **20**, 27–68 (2017).
- Roberts, R. F., Wade-Martins, R. & Alegre-Abarrategui, J. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. *Brain* **138**, 1642–1657 (2015).
- Chen, S. W. et al. Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during alpha-synuclein fibril formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, E1994–E2003 (2015).
- Cremades, N. & Dobson, C. M. The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiol. Dis.* **109**, 178–190 (2018).
- Cremades, N. et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* **149**, 1048–1059 (2012).
- Iljina, M. et al. Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, E1206–E1215 (2016).
- Fusco, G. et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science* **358**, 1440–1443 (2017).
- Baldwin, A. J. et al. Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14160–14163 (2011).
- Mor, D. E. et al. Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nat. Neurosci.* **20**, 1560–1568 (2017).
- Tokuda, T. et al. Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* **75**, 1766–1770 (2010).
- Cascella, R. et al. Probing the origin of the toxicity of oligomeric aggregates of α -Synuclein with antibodies. *ACS Chem. Biol.* **14**, 1352–1362 (2019).
- Angelova, P. R. et al. Ca^{2+} is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. *J. Cell. Sci.* **129**, 1792–1801 (2016).
- Gath, J. et al. Unlike twins: an NMR comparison of two α -synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLoS ONE* **9**, e90659 (2014).
- Moncellier, E., Bousset, L. & Melki, R. α -Synuclein and huntingtin exon 1 amyloid fibrils bind laterally to the cellular membrane. *Sci. Rep.* **6**, 19180 (2016).
- Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L. & Melki, R. Fibrillar α -synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. *Biophys. J.* **102**, 2894–2905 (2012).
- Desplats, P. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 13010–13015 (2009).
- Luk, K. C. et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949–953 (2012).
- Masuda-Suzukake, M. et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* **136**, 1128–1138 (2013).
- Peelaerts, W. et al. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* **522**, 340–344 (2015).
- Prusiner, S. B. et al. Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, E5308–E5317 (2015).
- Brahic, M. et al. Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 42 peptide and HTTexon 1. *Acta Neuropathol.* **131**, 539–548 (2016).
- Volpicelli-Daley, L. A. et al. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* **72**, 57–71 (2011).
- Froula, J. M. et al. Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J. Biol. Chem.* **294**, 10392–10406 (2019).
- Fusco, G. et al. Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat. Commun.* **29**, 3827 (2014).
- Fusco, G. et al. Structural ensembles of membrane-bound α -synuclein reveal the molecular determinants of synaptic vesicle affinity. *Sci. Rep.* **6**, 27125 (2016).
- Buell, A. K. et al. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 7671–7676 (2014).
- Currais, A., Fischer, W., Maher, P. & Schubert, D. Intraneuronal protein aggregation as a trigger for inflammation and neurodegeneration in the aging brain. *FASEB J.* **31**, 5–10 (2017).
- Papadopoulos, N. G. et al. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* **177**, 101–111 (1994).
- Danzer, K. M. et al. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* **27**, 9220–9232 (2007).
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **4**, 552–565 (2003).
- Thornberry, N. A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 17907–17911 (1997).
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55–63 (1983).
- Anderson, J. P. et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J. Biol. Chem.* **281**, 29739–29752 (2006).
- Kayed, R. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486–489 (2003).
- Sengupta, U. et al. Pathological interface between oligomeric alpha-synuclein and tau in synucleinopathies. *Biol. Psychiatry* **78**, 672–683 (2015).
- Bigi, A., Loffredo, C., Cascella, R. & Cecchi, C. Targeting pathological amyloid aggregates with conformation-sensitive antibodies. *Curr. Alzh. Res.* **17**, 722–734 (2020).
- Kayed, R. et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener.* **26**, 2–18 (2007).

39. Deas, E. et al. Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 376–391 (2016).
40. Skamris, T., Marasini, C., Madsen, K. L., Foderà, V. & Vestergaard, B. Early stage alpha-synuclein amyloid fibrils are reservoirs of membrane-binding species. *Sci. Rep.* **9**, 1733 (2019).
41. Martins, I. C. et al. Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* **27**, 224–233 (2008).
42. Tipping, K. W. et al. pH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 5691–5696 (2015).
43. Koffie, R. M. et al. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 4012–4017 (2009).
44. Limbocker, R. et al. Trodusquemine displaces protein misfolded oligomers from cell membranes and abrogates their cytotoxicity through a generic mechanism. *Commun. Biol.* **3**, 435 (2020).
45. Perni, M. et al. A natural product inhibits the initiation of α -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E2543 (2017).
46. Perni, M. et al. Multistep inhibition of α -synuclein aggregation and toxicity in vitro and in vivo by trodusquemine. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2308–2319 (2018).
47. Mannini, B. et al. Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 12479–12484 (2012).
48. Shammass, S. L. et al. Binding of the molecular chaperone ab-crystallin to A β amyloid fibrils inhibits fibril elongation. *Biophys. J.* **101**, 1681–1689 (2011).
49. Månsson, C. et al. Interaction of the molecular chaperone DNAJB6 with growing amyloid-beta 42 (A β 42) aggregates leads to sub-stoichiometric inhibition of amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **289**, 31066–31076 (2014).
50. Aprile, F. A. et al. Inhibition of α -Synuclein fibril elongation by Hsp70 is governed by a kinetic binding competition between α -Synuclein species. *Biochemistry* **56**, 1177–1180 (2017).
51. Cascella, R. et al. Extracellular chaperones prevent A β 42-induced toxicity in rat brains. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* **1832**, 1217–1226 (2013).
52. Chen, S. W. & Cremades, N. Preparation of alpha-synuclein amyloid assemblies for toxicity experiments. *Methods Mol. Biol.* **1779**, 45–60 (2018).
53. Bodner, C. R., Dobson, C. M. & Bax, A. Multiple tight phospholipid-binding modes of alpha-synuclein revealed by solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **390**, 775–790 (2009).
54. Galvagnion, C. et al. Lipid vesicles trigger alpha-synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 229–234 (2015).
55. Morris, K. L. & Serpell, L. C. X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils. *Methods Mol. Biol.* **849**, 121–136 (2012).
56. Bongers, G. et al. The Akt/GSK-3beta axis as a new signaling pathway of the histamine H(3) receptor. *J. Neurochem.* **103**, 248–258 (2007).
57. Evangelisti, E. et al. Binding affinity of amyloid oligomers to cellular membranes is a generic indicator of cellular dysfunction in protein misfolding diseases. *Sci. Rep.* **6**, 32721 (2016).
58. Evangelisti, E. et al. Lipid rafts mediate amyloid-induced calcium dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **10**, 143–153 (2013).
59. Evangelisti, E. et al. Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers. *J. Cell. Sci.* **125**, 2416–2427 (2012).

Acknowledgements

We thank Maria Lucia Angelotti, Tommaso Staderini, Emilio Ermini, Janet Kumita, and Alfonso De Simone for their technical support and scientific insight. This research was supported by the University of Florence (Fondi Ateneo to F.C. and C.C.), the Ministry of Education, Universities and Research of Italy (Progetto Dipartimento di Eccellenza "Gender Medicine" to C.C.), Parkinson's UK (G-1508 to S.W.C. and C.M.D.), the Center for Misfolding Diseases of the University of Cambridge (S.W.C. and C.M.D.), the UK Medical Research Council (MR/N000676/1 to C.M.D.), the Agency of Science, Technology and Research of Singapore (to S.W.C.), and the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (MINECO RYC-2012-12068 and MINECO/FEDER EU BFU2015-64119-P to N.C.).

Author contributions

R.C. and A.B. performed the cellular experiments and R.C. carried out the associated data analysis. S.W.C. and J.D.C. performed the AFM measurements and data analysis. S.W.C. and C.X. performed the remaining in vitro experiments and the associated data analysis. R.C., F.C., N.C., and C.C. were principally involved in the design of the study. R.C., N.C., C.M.D., F.C., and C.C. wrote the paper, all authors were involved in the analysis of the data and editing of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21937-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.C. or C.C.

Peer review information *Nature Communications* thanks Donato Di Monte and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021