

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**JOSÉ RAPHAEL MONTEIRO NETO**

PAPEL DAS MUTAÇÕES DA ALFA-SINUCLÉINA ASSOCIADAS À DOENÇA  
DE PARKINSON SOBRE A ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DAS  
FIBRAS AMILÓIDES

RIO DE JANEIRO

2016

José Raphael Monteiro Neto

PAPEL DAS MUTAÇÕES DA ALFA-SINUCLEÍNA ASSOCIADAS À DOENÇA  
DE PARKINSON SOBRE A ESTABILIDADE TERMODINÂMICA DAS  
FIBRAS AMILÓIDES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Follmer

Rio de Janeiro  
2016

## **Agradecimentos**

À minha família por todo suporte emocional e financeiro, sempre ajudando a me manter focado apenas nos estudos. Com certeza todas as minhas conquistas são e sempre serão também de vocês.

À minha namorada e amigos que me acompanharam nesta jornada da graduação, dentro e fora da Universidade, por todas as lembranças que compartilhamos juntos.

Aos meus companheiros de laboratório pela união, aprendizado e convivência harmoniosa que fizeram os momentos de trabalho mais felizes.

Ao meu orientador, Cristian Follmer, pela disposição e paciência em sempre ensinar tudo que precisei sobre o projeto, mesmo com o curto espaço de tempo.

## Resumo

**Título:** Papel das mutações da alfa-sinucleína associadas à doença de Parkinson sobre a estabilidade termodinâmica das fibras amilóides.

**Aluno:** José Raphael Monteiro Neto

**Orientador:** Prof. Dr. Cristian Follmer

A doença de Parkinson (PD) é uma desordem neurodegenerativa que afeta principalmente indivíduos acima dos 65 anos. A doença causa, principalmente, a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na substância nigra e é caracterizada pela presença de agregados fibrilares da proteína alfa-sinucleína (aS). A presença destes agregados fibrilares no cérebro de indivíduos com PD indica que eles podem ser importantes para a evolução da doença ou até mesmo para proteger a pessoa dos sintomas. Nos últimos 20 anos, tem sido descobertas diversas mutações no gene codificador da aS que estão envolvidos em casos de PD familiar e que diferem no processo de agregação em relação a proteína selvagem. Pesquisas mais recentes vêm estudando o efeito do uso de sementes na agregação da aS, principalmente a agregação aS selvagem (WT) com sementes da aS mutante. Os resultados da literatura mostram que a mutante A30P transfere informações estruturais para a aS-WT. O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade termodinâmica das fibras de aS bem como o efeito das sementes geradas a partir das mutantes da proteína ligadas à PD. Os resultados obtidos indicaram uma maior estabilidade da fibra da mutante A30P, a qual apresentou um  $\Delta\Delta G_0 = \Delta G_0 A30P - \Delta G_0 WT = -3,8$  kJ/mol, confirmando a maior estabilidade desta mutante. Além disso, fibra de aS-WT semeada com aS-A30P apresentou um aumento na sua estabilidade em relação à fibra homogênea da aS-WT, sugerindo que a A30P transfere propriedades de suas sementes para as fibras da proteína selvagem. No conjunto, nossos resultados fornecem novas informações sobre a estabilidade das fibras amilóides de aS bem como o papel das mutações da proteína associadas à PD.

## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

AD	Doença de Alzheimer
aS	$\alpha$ -sinucleína
CPF	Córtex pré-frontal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GB	Gânglia Basal
Gdn-HCl	Cloreto de guanidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IPTG	$\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Corpos de Lewy
LTB	Lobo temporal médio
LMW	Padrão de baixos pesos moleculares
MCI	Comprometimento cognitivo leve
NaPB	Fosfato de sódio monobásico
NAC	Componente não $\beta$ -amilóide
NFT	Emaranhados neurofibrilares
PD	Doença de Parkinson
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfanila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida / dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
ThT	Tioflavina-T
WT	Proteína Selvagem

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	8
Doenças neurodegenerativas	8
A agregação da $\alpha$ -Sinucleína na PD	11
Mutantes associadas à PD	14
Estudo da estabilidade de fibras amilóides	15
<b>OBJETIVOS</b>	17
Objetivo Geral	17
Objetivos Específicos	17
<b>EXPERIMENTAL</b>	18
Materiais	18
Expressão e purificação da aS WT, A30P, A53T e E46K	18
Monitoramento da fibrilação por fluorescência de Tioflavina-T	19
Produção de sementes de aS	19
Formação de fibras	20
Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC)	20
Dissociação de fibras de aS por cloreto de guanidina (Gdn-HCl)	21
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	23
<b>CONCLUSÃO</b>	36
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	36
<b>REFERÊNCIAS</b>	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Distribuição de placas amilóides e NFTs e perda neuronal no cérebro de diferentes indivíduos.

**Figura 2.** Proteínas associadas a diferentes doenças neurodegenerativas.

**Figura 3.** Domínios da aS.

**Figura 4.** Vias de agregação da aS.

**Figura 5.** Caracterização da aS purificada.

**Figura 6.** Caracterização das proteínas purificadas por SDS-PAGE.

**Figura 7.** Fluorescência da ThT de fibras geradas a partir de diferentes variantes da aS.

**Figura 8.** Desnaturação de fibras homogêneas de aS por Gdn-HCl medida através da fluorescência da ThT.

**Figura 9.** Efeito da concentração de Gdn-HCl sobre a intensidade da fluorescência da ThT de fibras homogêneas de aS-WT e mutantes.

**Figura 10.** Desnaturação de fibras homogêneas de aS por Gdn-HCl.

**Figura 11.** Cinética de desnaturação de fibras heterogêneas de aS para 1.0M de Gdn-HCl.

**Figura 12.** Efeito da concentração de Gdn-HCl sobre a intensidade da fluorescência da ThT de fibras heterogêneas e homogêneas e mutantes.

**Figura 13.** Desnaturação por Gdn-HCl de fibras de aS-WT, A30P e WT/A30P.

**Figura 14.** Desnaturação por Gdn-HCl de fibras de aS-WT, A53T, WT/A53T, E46K e WT/E46K.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação de fibras homogêneas de aS por Gdn-HCl.

**Tabela 2.** Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação de fibras homogêneas e heterogêneas de aS por Gdn-HCl.

## INTRODUÇÃO

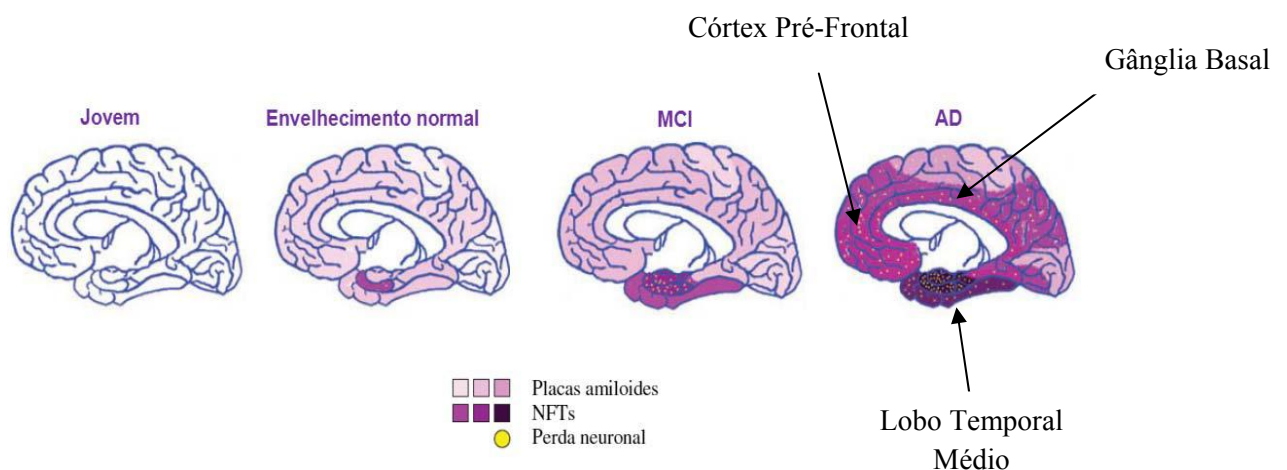
### *Doenças neurodegenerativas*

O envelhecimento é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (PD) e a doença de Alzheimer (AD). As regiões do córtex pré-frontal (CPF) e do gânglio basal (GB) são as mais afetadas pelo envelhecimento (RESNICK *et al*, 2003). Estas regiões são importantes na movimentação voluntária e são ricas em inervações dopaminérgicas; é no sistema dopaminérgico que se encontram as principais alterações causadas pelo envelhecimento devido à redução de receptores e transportadores de dopamina (DA) (ERIXON-LINDROTH *et al*, 2005). Outra região afetada é o lobo temporal médio (LTB), localizado no hipocampo. Apesar de sua estrutura ser pouco alterada, indivíduos idosos apresentam uma diminuição maior na sua ativação comparado com indivíduos mais jovens, afetando, principalmente a memória recente (DASELAAR, 2003; GUTCHESS; WELSH; HEDDEN, 2005). Mesmo sofrendo esta inevitável degeneração em algumas regiões do cérebro, de execução de movimentos (CPF e GB) e memória (LTB), pessoas com envelhecimento saudável muitas vezes não apresentam sintoma de comprometimento da função cognitiva. Isso se deve a uma atividade compensatória exercida pelo nosso cérebro (MANDZIA *et al*, 2004).

Em 1907, Alois Alzheimer estudou cérebros de pacientes *post-mortem* com problemas cognitivos graves e verificou a presença de placas de depósitos proteicos (erroneamente denominadas de placas amiloides) e emaranhados neurofibrilares (NFT) nas regiões do hipocampo, LTB e neocórtex, como mostra a **Figura 1**. Este distúrbio passou a ser chamado de doença de Alzheimer (AD). De forma semelhante, em 1912, Frederic Lewy descobriu inclusões citoplasmáticas, posteriormente denominadas corpos de Lewy (LB), na *substantia nigra* de cérebros de pacientes com problemas motores. Estas inclusões eram análogas às descritas em 1817 por James Parkinson. Atualmente, sabe-se que esta é uma característica

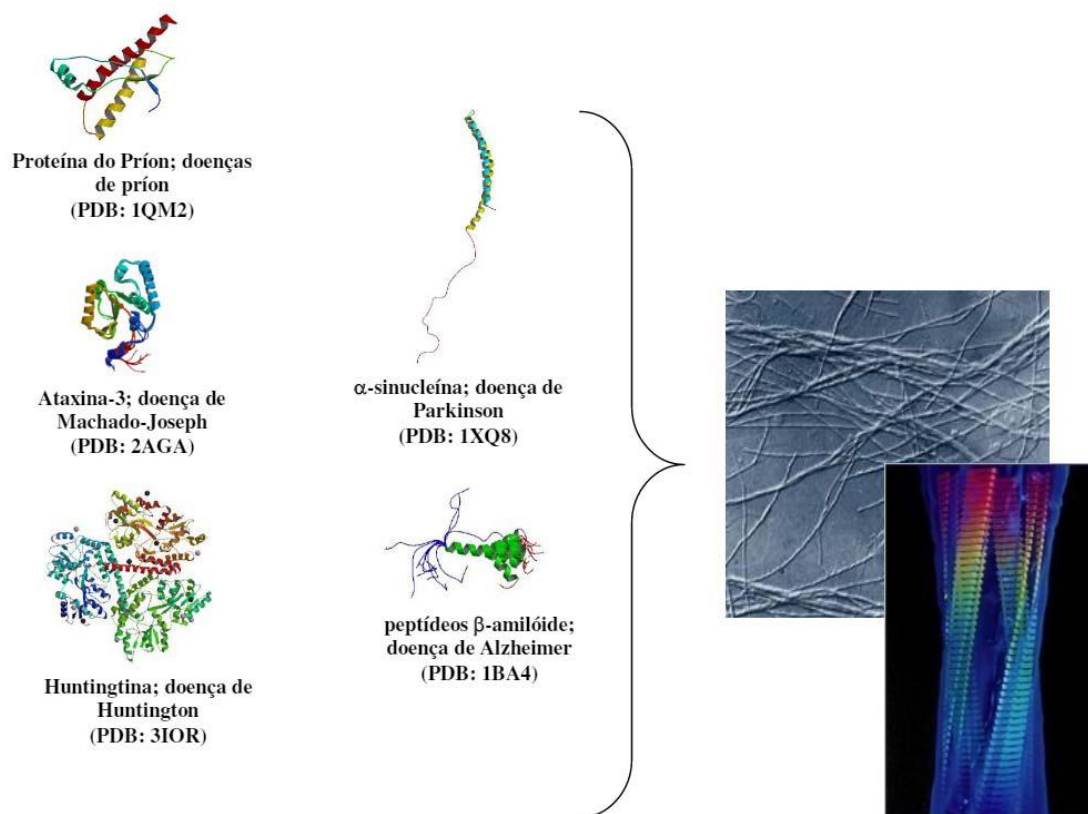


marcante da PD. A formação destas estruturas proteicas é um fator importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento. Estas estruturas são compostas por agregados fibrilares de diferentes proteínas: NFTs são compostos da proteína tau hiperfosforilada; placas amilóides se constituem do peptídeo  $\beta$ -amilóide; e LBs possuem em sua composição a proteína  $\alpha$ -sinucleína (aS). Outras doenças neurodegenerativas, como as doenças do príon, de Huntington e de Machado-Joseph também estão relacionadas à formação de agregados proteicos no cérebro de pacientes (LEE, 2000; DOBSON, 2003). Estes fatores sugerem uma importante relação entre o mau-enovelamento e agregação de proteínas e neurodegeneração.



**Figura 2. Distribuição de placas amilóides e NFTs e perda neuronal no cérebro de diferentes indivíduos.** Indivíduos jovens; envelhecidos de forma saudável; com comprometimento cognitivo leve (MCI), que é um pré-estágio da AD e outras formas de demência; e com AD. Nota-se que, em MCI, há um aumento considerável de NFTs e perda neuronal no córtex entorrinal, assim como um aumento geral de placas amilóides. Em AD, há um grande aumento de perda neuronal, placas amilóides e NFTs em todo cérebro, em especial no córtex entorrinal e no hipocampo. Figura adaptada de (YANKNER; LU; LOERCH, 2008).

É importante notar que as proteínas envolvidas em todas estas doenças não apresentam qualquer similaridade funcional ou estrutural, conforme é mostrado na **Figura 2**, porém são capazes de sofrer alterações conformacionais, sob certas condições, que resultam na formação de agregados estruturalmente similares. Isto sustenta a hipótese de que, apesar das diferenças entre as fibras e do local onde estas se encontram, elas apresentam mecanismos patológicos similares que são a base de todas estas doenças (TROJANOWSKI, 1998). Contudo, o mecanismo causador de cada uma destas doenças permanece em debate, devido a sua extrema complexidade, caracterizada por fatores genéticos e ambientais. Por isto, é essencial que sejam realizados estudos sobre o papel do mau-enovelamento/ agregação de proteínas na origem ou progressão da neurodegeneração.



**Figura 3. Proteínas associadas a diferentes doenças neurodegenerativas.** Proteínas com tamanhos e estruturas (secundária e terciária) totalmente distintas são capazes de sofrer alterações conformacionais, em determinadas condições, gerando fibras com estruturas similares, as quais estão relacionadas a diferentes doenças neurodegenerativas.

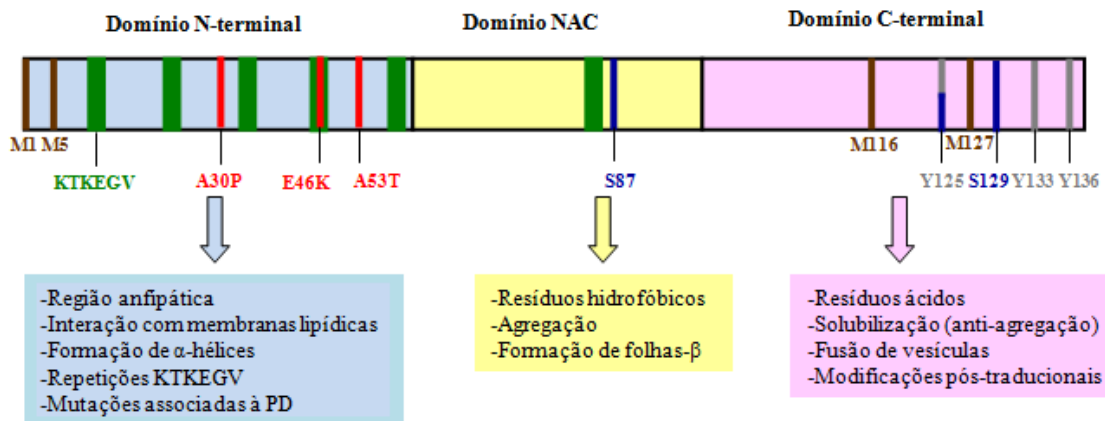
### ***A agregação da $\alpha$ -Sinucleína na PD***

A PD é um distúrbio neurodegenerativo que causa deficiências no sistema motor, apresentando como sintomas bradi e hipocinesia, tremores de repouso, rigidez, marcha desordenada e prejuízo no reflexo postural (MARSDEN, 1994). Entre 90% e 95% dos casos de PD são idiopáticos, ou seja, sem histórico familiar (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Contudo, uma pequena parcela dos casos é familiar e herdado de modo autossômico dominante. Assim, cinco mutações distintas foram identificadas no gene da proteína aS, em pacientes com PD familiar: A30P, A53T, E46K, H50Q e G51D que estão ligados a casos de PD em grupos de indivíduos mais jovens (POLYMEROPOULOS *et al*, 1997; CONWAY *et al*, 2000; CRESSWELL *et al*, 2013; KIELY *et al*, 2013). Além da PD, a aS é o componente majoritário de depósitos proteicos observados em outras doenças neurológicas, conhecidas também como sinucleinopatias, incluindo a Atrofia Múltipla, doença de Hallervorden-Spatz e Demência com Corpos de Lewy.

A aS é uma proteína de 14 kDa, encontrada de forma abundante em neurônios, principalmente nos terminais pré-sinápticos (GIASSON *et al*, 2000). Embora sua função não seja totalmente elucidada, alguns estudos indicam que a aS é capaz de interagir com membranas lipídicas, alterando a viscosidade e composição de ácidos graxos da mesma, o que pode ser importante na plasticidade neuronal (UVERSKY, 2007). Também foi demonstrado que ela auxilia na formação do complexo SNARE (*soluble N-ethyl maleimide sensitive fusion attachment protein receptor*) através de interações com a proteína sinaptobrevina-2 (BONINI; GIASSON, 2005; BURRÉ *et al*, 2010). Desta maneira, a aS desempenharia uma função na formação e fusão de vesículas pré-sinápticas, regulando a liberação de neurotransmissores, como DA (COOPER *et al*, 2006). A aS também apresentaria atividade antioxidante via inibição da peroxidação lipídica através da oxidação de suas próprias metioninas ao invés dos lipídios que compõem a membrana ligada a aS (MALTSEV *et al*, 2013). Mesmo não sendo

essencial para a vida, estudos indicam que a expressão de aS é fundamental para o desenvolvimento cognitivo normal de camundongos, especialmente em relação ao aprendizado e memória (KOKHAN; AFANASYEVA; VAN’KIN, 2012).

A estrutura primária da aS pode ser dividida em três principais regiões (RECCHIA, 2004). A primeira delas é a região N-terminal (resíduos de 1-65), que é anfipática e capaz de adquirir estruturas em  $\alpha$ -hélice ao interagir com membranas lipídicas. Nesta região se encontram: cinco de seis repetições imperfeitas da sequência de resíduos de aminoácidos KTKEGV; mutações relacionadas à PD (A30P, E46K, A53T, H50Q e G51D); e dois dos quatro resíduos de metioninas (M1 e M5), que são importantes sítios de oxidação (GLASER *et al*, 2005). A segunda região é o domínio NAC (componente não  $\beta$ -amilóide) (resíduos 66-95), o qual é altamente propenso a sofrer auto-associação via formação de estrutura secundária do tipo folhas- $\beta$  (IWAI *et al.*, 1995). Esta tendência é explicada pela composição desta região, que é rica em resíduos hidrofóbicos, que interagem entre si para evitar o contato com a água, favorecendo o processo de agregação. A terceira região é o domínio C-terminal (resíduos 96-140), enriquecido em resíduos ácidos e prolinas, sendo essencial na formação do complexo SNARE (BURRE *et al*, 2010). Esta região é altamente carregada negativamente (ponto isoelétrico da aS de 4,7), o que desfavorece sua agregação via repulsão eletrostática (PERIQUET *et al*, 2007). Neste domínio se encontram os sítios das principais modificações pós-traducionais da aS, como fosforilação (S129 e Y125), nitração (Y125, Y133 e Y136) e oxidação (M116 e M127) (ELLIS *et al.*, 2001; FUJIWARA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2000; GLASER *et al*, 2005). As informações sobre a estrutura primária da aS encontram-se resumidas na **Figura 3**.

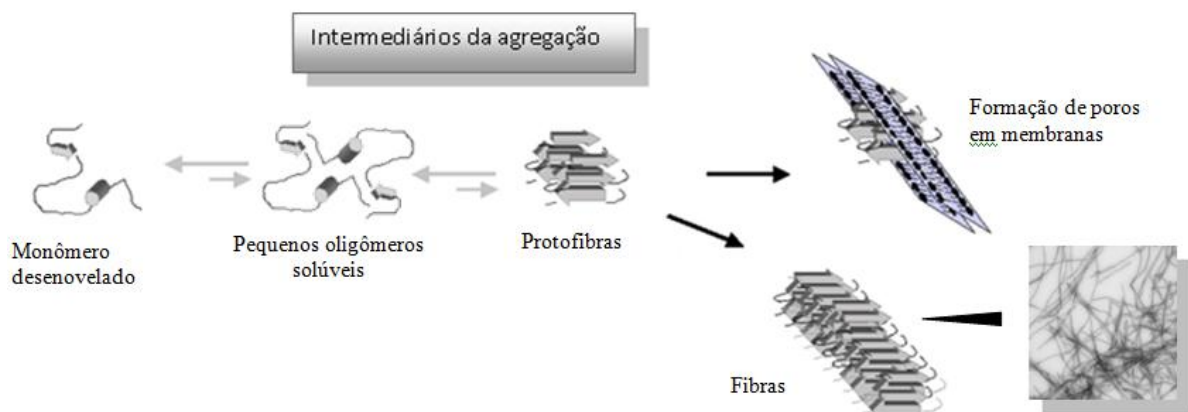


**Figura 4. Domínios da aS.** Os três domínios da aS e suas respectivas características estruturais e funcionais: domínio N-terminal (azul claro); domínio NAC (amarelo); domínio C-terminal (rosa); repetições imperfeitas KTKEGV (verde); mutações associadas a PD – A30P; E46K e A53T (vermelho); sítios de fosforilação – S87, Y125 e S129 (azul escuro); sítios de nitração – Y125, Y133 e Y136 (cinza); metioninas – M1, M5, M116 e M129 (marrom).

A estrutura nativa da aS também permanece sobre debate, existindo duas principais hipóteses: i) aS é um monômero desenovelado capaz de formar fibras *in vivo* e *in vitro* sob certas condições (WEINREB *et al*, 1996); essa visão é compartilhada pela grande maioria dos estudiosos sobre a proteína; ii) aS é um tetrâmero enovelado em  $\alpha$ -hélices incapaz de agregar (BARTELS; CHOI; SELKOE, 2011), sendo necessária a sua conversão para monômero desenovelado para que ocorra a agregação. Neste contexto, um trabalho do nosso grupo propôs que, fisiologicamente, aS comporta-se como um monômero intrinsecamente desenovelado em equilíbrio dinâmico com certos estados oligoméricos como dímeros e tetrâmeros (COELHO-CERQUEIRA *et al*, 2013).

A aS pode formar diferentes tipos de agregados *in vitro*, desde pequenos agregados pré-fibrilares (protofibras), até estruturas fibrilares estáveis do tipo fibras amilóides (VOLLES; LANSBURY, 2003), como mostrado no esquema da **Figura 4**. Sob o ponto de vista estrutural, as protofibras são oligômeros de aS com conformação de folha- $\beta$  (VOLLES;

LANSBURY, 2003), apresentando uma heterogênea mistura de morfologia, sendo que apenas algumas destas seriam capazes de formar fibras (CONWAY; HARPER; LANSBURY, 2000; ROCHET *et al.*, 2004). Embora a aS na sua forma fibrilar seja a maior componente nos LBs (CONWAY; HARPER; LANSBURY, 2000), alguns dados sugerem que estas estruturas podem ser inertes ou até mesmo protetoras na PD (ROCHET *et al.*, 2004), enquanto que as protofibras seriam as espécies realmente tóxicas. Contudo, outros estudos indicam uma maior toxicidade da aS fibrilar (PIERI *et al.*, 2016). Devido a esta indefinição sobre qual forma da aS é a mais tóxica, pesquisas sobre novas drogas que possam contribuir para a terapia da doença ficam prejudicadas.



**Figura 5. Vias de agregação da aS.** Monômeros de aS interagem entre si, formando oligômeros solúveis (protofibras) que evoluem para fibras amilóides altamente ordenadas, estáveis e ricas em folhas- $\beta$ . Protofibras também podem formar poros em membranas, caracterizando seu efeito tóxico.

### ***As mutantes da aS associadas à PD***

Mutação A53T, onde um resíduo de alanina é substituído por treonina na posição 53, foi detectada em pelo menos 12 famílias de origens suecas, coreanas e gregas (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997; KI *et al.*, 2007; PUSCHMANN *et al.*, 2009). Diferentes estudos indicam que esta mutação favorece a formação mais rápida de estruturas fibrilares e

também acelera o crescimento das fibras em comparação com o tipo WT (CONWAY *et al.* 1998, 2000b; GREENBAUM *et al.* 2005; LI *et al.* 2001, 2002). Quando esta mutante é usada como semente para a agregação de monômeros de WT, a selvagem agrega bem mais lentamente, o mesmo acontece com o uso de sementes de WT para a fibrilação da A53T (SIDHU; SEGERS-NOLTEN; SUBRAMANIAN, 2016).

Apesar de ser conhecida há muito tempo, a mutação A30P (um resíduo de alanina é substituído por prolina na posição 30), de origem alemã, (KRUGER *et al.*, 1998), os seus efeitos sobre a fibrilação da aS são menos claros quando comparada a A53T. Geralmente, esta mutante causa uma fase exponencial na cinética de agregação (crescimento das fibras) mais rápida em comparação com a aS-WT (CONWAY *et al.* 1998; LI *et al.* 2002; NARHI *et al.* 1999), porém com fase lag mais lenta (CONWAY *et al.* 2000b; LI *et al.* 2001). Segundo alguns estudos, esta mutante é capaz de transferir sua estrutura para a proteína selvagem, quando esta agrega com sementes de A30P (SIDHU; SEGERS-NOLTEN; SUBRAMANIAN, 2016).

Encontrada em famílias espanholas, mutação E46K, onde um resíduo de ácido glutâmico é substituído por lisina na posição 46, apresenta propriedades de agregação similares com a A53T, pois forma estruturas fibrilares mais rapidamente, além de suas fibras terem uma taxa de crescimento maior que a aS-WT (GREENBAUM *et al.* 2005). A proteína selvagem, na presença de sementes desta mutante, apresentou formação de fibras grandes, contudo a mutante E46K não transferiu sua estrutura para a aS-WT (YONETANI *et al.*, 2009).

### ***Estudo da estabilidade de fibras amilóides***

Diversos agentes físicos e químicos tem sido utilizados para a desestruturação da aS: temperatura (IKENOUE *et al.*, 2014), pressão (FOGUEL *et al.*, 2003), hidrocloreto de

guanidina (Gdn-HCl) e uréia (MONERA; KAY; HODGES, 1994). O uso de baixas temperaturas como desnaturante foi mostrado ser dependente das condições de solvatação e da concentração de aS, além de apresentar reversibilidade parcial quando reaquecida a 37°C. O mesmo estudo também mostrou que a aS sofre desnaturação em altas temperaturas, enquanto fibras de insulina,  $\beta$ 2-microglobulina e três tipos de  $\beta$ -amilóide apresentaram apenas desnaturação quando aquecidas (IKENOUE *et al.*, 2014).

Apesar de existirem muitos estudos na literatura sobre a cinética de agregação da aS e outras fibras amilóides, são poucos os estudos sobre a estabilidade termodinâmica destas estruturas e sua função na PD. Neste trabalho, buscamos responder algumas perguntas sobre as fibras de aS WT, A30P, A53T e E46K: A sua estabilidade é alterada com as mutações? De que maneira? Fibras de aS WT produzidas, usando como sementes fibras das mutantes, apresentarão propriedades parecidas com suas progenitoras? Como estes resultados podem ajudar a compreender melhor o mecanismo da PD?



## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo geral:**

Entender o papel das mutantes da aS associadas à PD sobre a estabilidade termodinâmica das fibras amilóides.

### **Objetivos específicos:**

- Comparar a estabilidade termodinâmica de fibras de aS geradas a partir da forma selvagem da proteína (WT) e das mutantes relacionadas à PD (A30P, A53T e E46K);
- Avaliar a estabilidade de fibras da aS-WT geradas na presença de sementes das mutantes A30P, A53T e E46K.

## EXPERIMENTAL

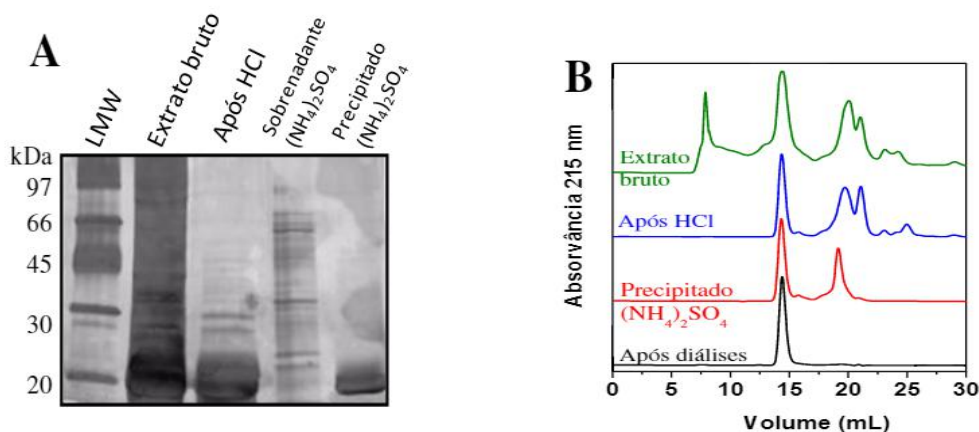
### *Materials*

Os reagentes isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), fluoreto de fenilmetilsulfanila (PMSF), ácido clorídrico, sulfato de amônia, azida de sódio, acrilamida, cloreto de guanidina, dodecil sulfato de sódio (SDS), tioflavina-T (ThT), Comassie Brilliant Blue-G e os sais e agentes tamponantes em geral foram comprados na Sigma-Aldrich. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi comprado na USB Corporation (Cleveland, USA).

### *Expressão e Purificação da aS WT, A30P, A53T e E46K*

*Escherichia coli* BL21 (DE3-pLysS) transformada para as diferentes variantes da aS A aS recombinante (WT, A30P, A53T e E46K) foi expressa e purificada por um método desenvolvido pelo nosso grupo (COELHO-CERQUEIRA *et al*, 2013) (**Figura 5**), que é descrito a seguir: *E. coli* BL21 (DE3) foi inoculada em 50 mL de LB líquido contendo os antibióticos ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL), sendo incubado até a absorvância a 600 nm ( $A_{600}$ ) atingir 1.0. Este pré-inóculo foi transferido para 400 mL de LB líquido e incubado a 37 °C até  $A_{600}=0.7$ . Em seguida, foi feita a indução com IPTG 500  $\mu$ M a 30 °C por 12 horas. Após a indução, a cultura foi centrifugada a 4800 rpm (4150 x g) e o precipitado ressuspenso em tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM). suspensão foi sonicada em gelo com 25 pulsos de 20 s, alternados por 10 s sem pulso, em potência de 30% (sonicador modelo Vibracell-Sonics) e centrifugada a 13000 rpm (18000 x g). No sobrenadante foi realizada a precipitação ácida das proteínas presentes pela adição de HCl 9% até pH 3,5. A aS permanece em solução após esta etapa. A amostra foi centrifugada a 18000 x g e o pH do sobrenadante ajustado para 7,5. Depois, realizou-se a precipitação da aS com sulfato de amônio (50 % de saturação) em banho de gelo. A solução foi centrifugada a 18000 x g e o precipitado foi dissolvido em Tris-HCl 20 mM, EDTA 1mM,

pH 8,0 e dialisado uma vez contra este mesmo tampão e duas vezes contra água Milli-Q. Finalmente, a aS obtida foi congelada, liofilizada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior caracterização e uso.



**Figura 5. Caracterização da aS purificada.** (A) Etapas de purificação analisadas por 15% SDS-PAGE, revelado com  $\text{AgNO}_3$ . (B) Etapas de purificação analisadas por SEC.

### ***Monitoramento da fibrilação por fluorescência da Tioflavina-T***

A molécula Tioflavina-T (ThT) se torna fluorescente em presença de agregados fibrilares ricos em estruturas secundárias do tipo folhas- $\beta$ ; assim, ThT é utilizada como uma sonda fluorescente para o monitoramento do processo de fibrilação de diversas proteínas amiloidogênicas. A fluorescência da ThT foi monitorada em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent, EUA) acoplado com um leitor de microplacas, utilizando-se como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, 446 e 485nm.

### ***Produção de sementes de aS***

A reação de fibrilação foi realizada em microplacas de 96 poços e com volume final de 200  $\mu\text{L}$  por poço, consistindo de 200  $\mu\text{M}$  de aS monomérica em tampão 10 mM de NaPB, pH 7,5, 0.01% azida, 100 mM NaCl, 5 $\mu\text{M}$  de ThT,. A mistura foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  e 400 rpm. Em

cada poço contendo aS foi adicionada uma pérola de vidro. A formação de fibras foi acompanhada por ThT até o máximo de fluorescência. Após esta etapa, as amostras foram transferidas para tubos de 1.5 mL, diluídas para 100  $\mu$ M com o mesmo tampão acima e sonicadas por 1 minuto com potência de 50 % (sonicador modelo Vibracell-Sonics) para gerar a fragmentação das fibras maduras.

Subsequentemente, novas fibras foram formadas misturando-se 180 $\mu$ L de aS monomérica (200  $\mu$ M) e 20  $\mu$ L da solução anterior contendo sementes da proteína e o procedimento para geração de novas sementes realizados conforme descrito anteriormente. Para a formação da terceira, e última, geração de sementes foi seguido o mesmo procedimento, porém usando as sementes de segunda geração. Como este procedimento pode-se obter sementes homogêneas das diferentes variantes da aS que foram utilizadas para a geração de fibras maduras.

### ***Formação de fibras***

Para a formação de fibras homogêneas, ou seja, utilizando-se a mesma variante da proteína tanto na forma monomérica quanto de sementes, incubou-se 200 $\mu$ M de aS monomérica na presença de sementes de fibras da proteína (relação molar de 40:1) a 37°C e 500rpm até ser alcançado um máximo de fluorescência para a ThT. Para a geração de fibras heterogêneas, aS-WT monomérica foi incubada na presença de sementes formadas a partir das variantes A30P, A53T e E46K da aS.

### ***Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC-HPLC)***

100 $\mu$ L de cada amostra com diferentes concentrações de Gdn-HCl e para as diferentes variantes de aS foram injetados na coluna de Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL para separação por tamanho. As corridas foram feitas com fluxo de 0,5 mL/min, usando tampão 20 mM NaPB,

150 mM NaCl, pH 7,5. Para a detecção foi utilizada lâmpada de Ultravioleta de 215 nm. A integração dos picos foi realizada automaticamente pelo programa Unicorn 5.0.

### ***Dissociação de fibras de aS por cloreto de guanidina (Gdn-HCl)***

35µM de fibras de aS geradas segundo o procedimento acima (concentração em relação ao monômero) em 10 mM de NaPB, pH 7.5, 0.01% azida, 100 mM NaCl, 5 µM de ThT, foram incubadas na presença de Gdn-HCl (0 a 4 M), sem agitação a 25 °C por 72 horas. A fluorescência da ThT da mistura foi monitorada por 60 minutos, com intervalos de leitura de 2 minutos, e após 72 horas de incubação. Após este período, as amostras foram analisadas por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e a fração monomérica determinada a partir da área do pico do monômero, em comparação com a área do monômero da amostra não agregada.

Para se determinar os parâmetros termodinâmicos relacionados a estabilidade de cada fibra foi usado o modelo de polimerização linear proposto por OOSAWA & KASAI para a reação:



sendo a constante de equilíbrio dada por:

$$K = [F_i] / [F_{i-1}] \cdot [M]$$

onde [M] e [F<sub>i</sub>] são, respectivamente, a concentração do monômero e das fibras de tamanho *i* (OOSAWA; KASAI, 1962). Baseado neste modelo, a constante de equilíbrio (K) da reação acima foi determinada através da medida da fração de monomérica utilizando-se a equação (PORCARI *et al.*, 2015):

$$\frac{[M]}{[M_T]} = \frac{[M_T]K + 1/2 - \sqrt{[M_T]K + 1/4}}{[M_T]^2 K^2}$$

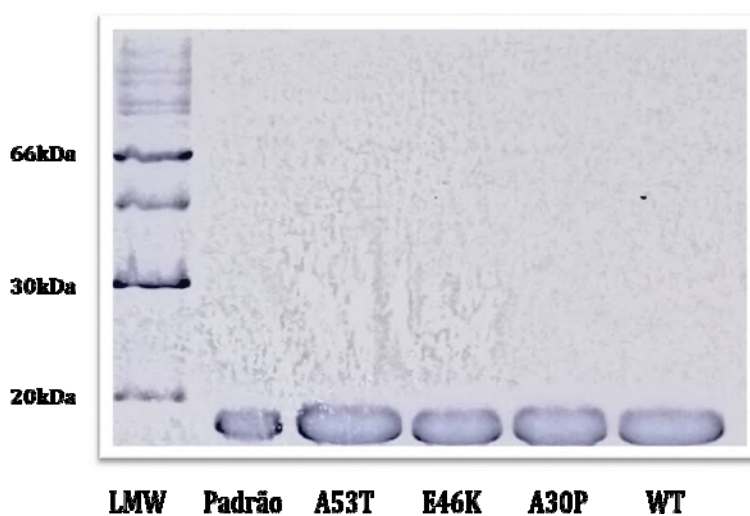
Onde  $M_T$  é a concentração total de proteína em molar ( $35 \cdot 10^{-6}$  M). A solução da equação acima foi obtida através do A energia livre de crescimento da fibra ( $\Delta G_e$ ) foi determinado pela relação  $K = \exp(-\Delta G/RT)$  e a energia livre na ausência de desnaturante ( $\Delta G^0$ ) obtida por extrapolação linear:

$$\Delta G = m[D] + \Delta G^0$$

onde  $m$  fornece o chamado coeficiente de cooperatividade, ou seja, o grau de dependência da desnaturação em relação a concentração de Gdn-HCl. Além do  $\Delta G^0$ , utilizou-se também, para efeitos de comparação,  $\Delta G$  determinado a uma concentração de Gdn-HCl de 1M ( $\Delta G_{1M}$ ). Analisou-se ainda os parâmetros  $m$  e  $[D]_{50\%}$ , sendo este último a concentração de desnaturante que leva a formação de 50% de monômero.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

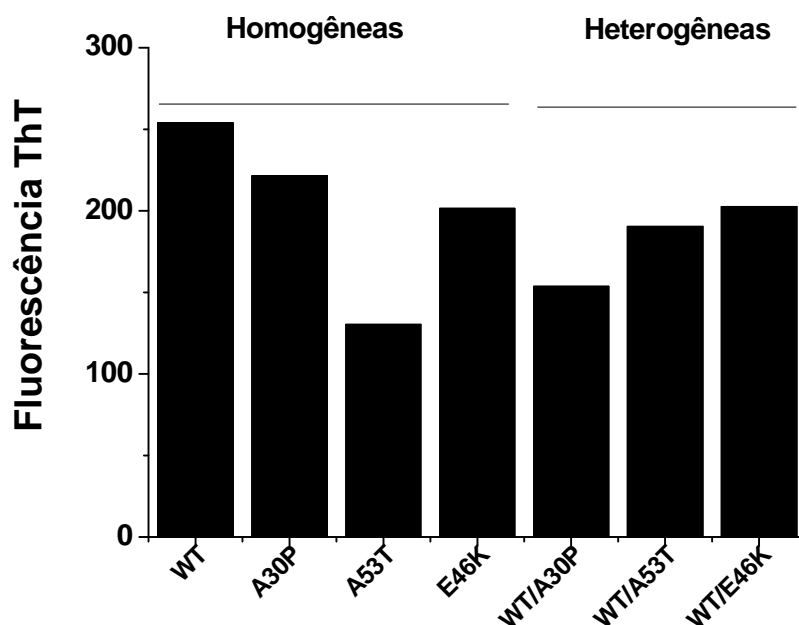
As proteínas purificadas foram caracterizadas quanto à massa molar e o grau de pureza por SDS-PAGE (15 %), como mostrado na **Figura 6**. aS, devido a alta densidade de cargas negativas na região C-terminal, aparece no gel como uma proteína de 18 kDa ao invés de 14 kDa (WEINREB *et al.*, 1996). Pode-se observar que todas as proteínas apresentaram um alto grau de pureza e uma massa molecular compatível para o monômero.



**Figura 6.** Caracterização das proteínas purificadas por SDS-PAGE. 30 $\mu$ L de cada aS e de LMW foram aplicados em SDS-PAGE 13%, sendo em seguida revelado com Comassie Blue.

A formação de fibras da aS selvagem e mutantes foi monitorada pela fluorescência da ThT como descrito na seção *Experimental*. Pode-se observar na **Fig. 7** que, no equilíbrio, a intensidade da fluorescência da ThT varia entre as diferentes variantes da proteína. Como a extensão da reação de agregação é bastante similar entre as aS, pode-se esperar que estas diferenças na fluorescência da ThT estejam relacionadas a particularidades da estrutura das fibras formadas. Além disso, os dados indicam que todas as formas mutantes estudadas apresentaram uma fluorescência da ThT menor que a WT; o mesmo é observado quando

compara-se fibras homogêneas da aS-WT (isto é, semeadas com a forma WT) com aquelas semeadas pelas formas mutantes da proteína, i.e. A30P, A53T ou E46K.

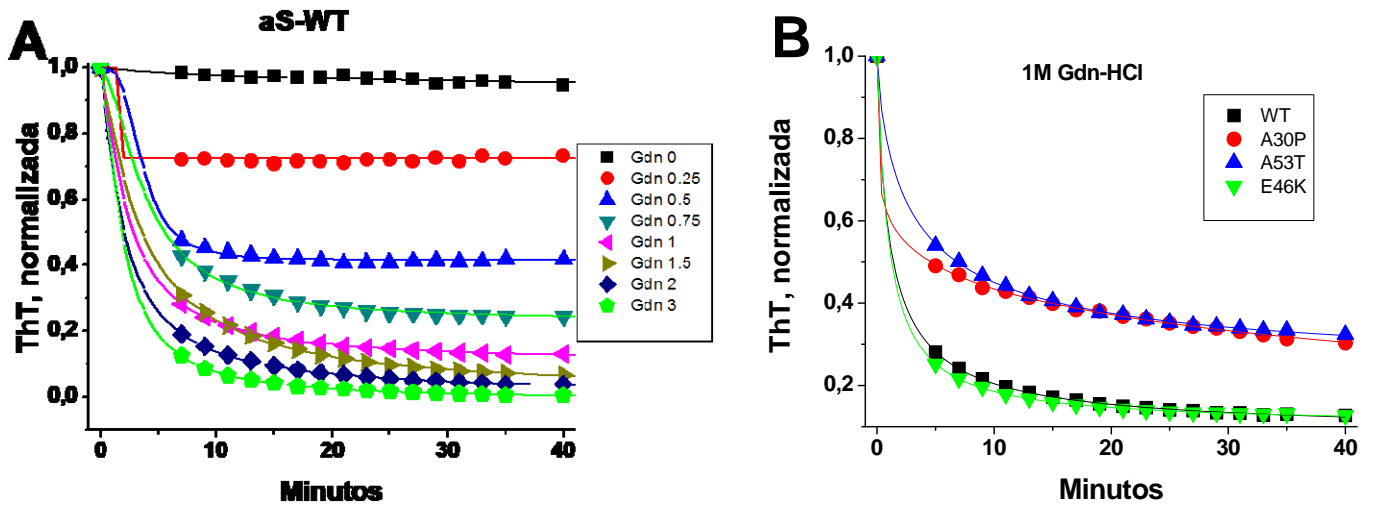


**Figura 7.** Fluorescência da ThT de fibras geradas a partir de diferentes variantes da aS. A fluorescência foi medida ao final da agregação.

A **Fig. 8A** mostra a variação, em função do tempo, da intensidade de fluorescência da ThT de fibras da aS-WT em presença de diferentes concentrações do agente desnaturante Gdn-HCl. Nestes experimentos, a intensidade da ThT foi normalizada pelo valor inicial. Em menos de 10 minutos após a adição do Gdn-HCl foi observada uma queda acentuada da fluorescência de forma dependente da concentração do desnaturante, o que indica a desestruturação/desagregação da fibra. Quando comparamos a intensidade da ThT frente ao agente desnaturante, numa concentração de 1.0 M, entre as diferentes variantes da aS, podemos observar que tanto a forma WT como E46K apresentam uma queda mais acentuada quando comparadas a A30P e A53T (**Fig. 8B**). Este resultado é corroborado pelo **Fig. 9** que



mostra a variação da intensidade da fluorescência da ThT em função da concentração de Gdn-HCl.



**Figura 8. Desnaturação de fibras homogêneas de aS por Gdn-HCl.** A medida foi feita por fluorescência da ThT. (A) Fibras de aS-WT foram incubadas na presença de diferentes concentrações de Gdn-HCl (0 - 3.5M) e a intensidade da fluorescência da ThT monitorada em função do tempo. A seta indica concentrações crescentes de Gdn-HCl. (B) Efeito de 1.0 M de Gdn-HCl sobre a fluorescência da ThT, em função do tempo, para fibras geradas a partir da aS-WT ou mutantes A30P, A53T e E46K.

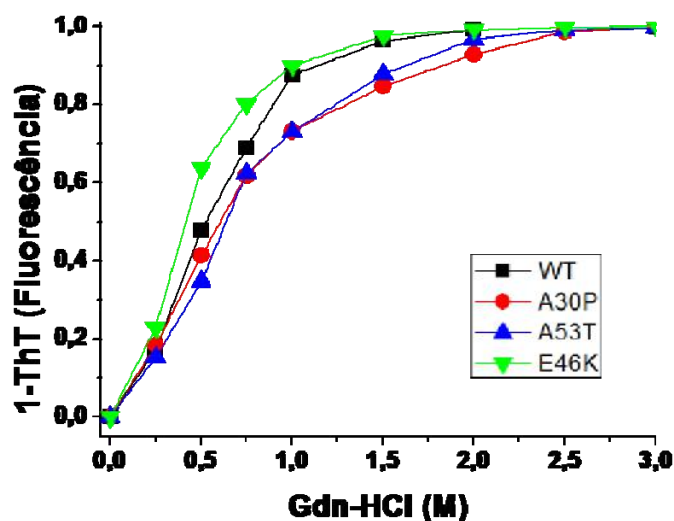
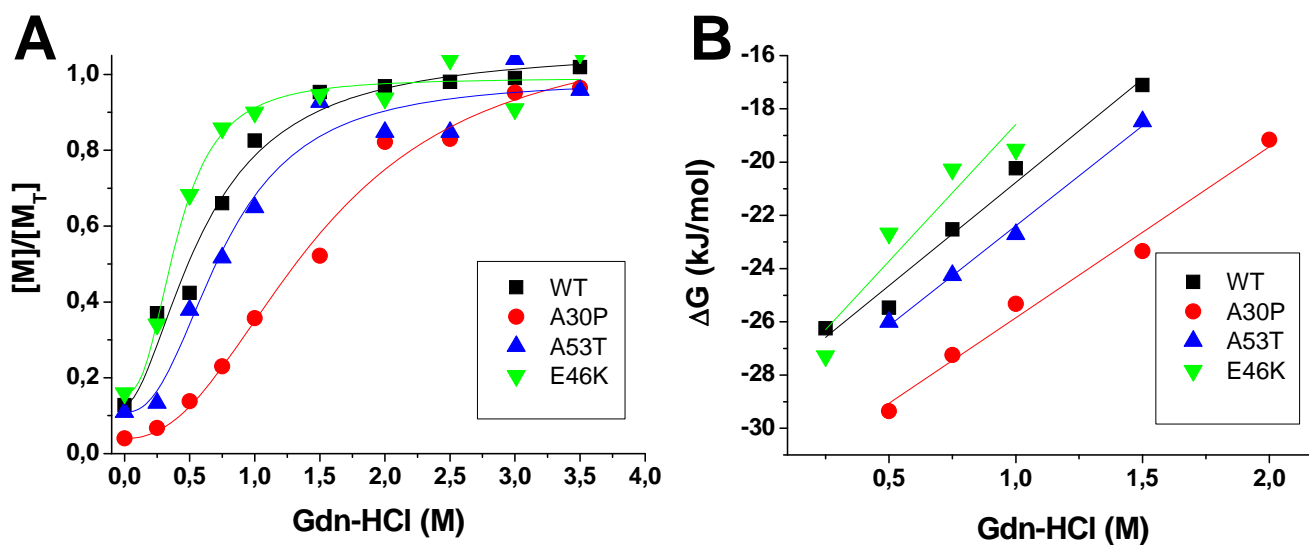


Figura 9. Efeito da concentração de Gdn-HCl sobre a intensidade da fluorescência da ThT de fibras homogêneas de aS-WT e mutantes. Medida realizada após 72h de reação com Gdn-HCl.

O efeito da concentração do Gdn-HCl sobre a fluorescência da ThT indica uma perturbação da estrutura fibrilar que resulta numa queda no conteúdo da ThT ligada à proteína. Para uma melhor compreensão acerca da estabilidade das fibras geradas pelas diferentes variantes da aS, a concentração de monômero presente nas amostras incubadas com Gdn-HCl foi avaliada por SEC-HPLC. Assim, pode-se determinar a fração monomérica da aS em função da concentração do agente desnaturante, o que permite o cálculo da estabilidade termodinâmica da fibra. Para isso, foi utilizado o modelo de polimerização linear proposto por OOSAWA; KASAI, 1962.

A **Fig. 10A** mostra que fibras geradas a partir aS-A30P apresentam um estabilidade maior que a WT ou mesmo para as outras mutantes A53T e E46K; além disso, a aS-E46K foi a variante mais instável apresentando um  $[D]_{50\%}$  de 0.35 M, enquanto que a A30P, A53T e WT apresentaram valores de 1.32, 0.68 e 0.6 M, respectivamente (**Tabela 1**). A partir destes dados, calculou-se o  $\Delta G$  de crescimento da fibra para cada concentração de Gdn-HCl e determinou-se, por extrapolação, o  $\Delta G^0$  na ausência de agente desnaturante (**Fig. 10B**). A

forma A30P apresentou um estabilidade de 3.8 kJ/mol maior que a aS-WT, enquanto que as demais mutantes apresentam estabilidade semelhantes, com valores de  $\Delta G^0$  de -28.5, -29.9 e 28.8 kJ/mol para a WT, A53T e E46K respectivamente (**Tabela 1**). A aS-E46K apresentou um grau de cooperatividade na desnaturação, medido pelo valor de  $m$ , maior de as demais variantes. É importante ressaltar que o cálculo do  $\Delta G^0$  assume um comportamento linear do  $\Delta G$  em função da concentração de desnaturante, o que pode acarretar em erros na extrapolação. Neste contexto, comparamos também os valores de  $\Delta G$  obtidos numa concentração fixa de Gdn-HCl ( $\Delta G_{1M}$ ). Pode-se observar uma diferença maior na estabilidade das diferentes fibras quando comparamos os valores de  $\Delta G_{1M}$  ao invés de  $\Delta G^0$ . Neste caso, a aS-A30P apresentou uma estabilidade maior que a WT em 5.1 kJ/mol.



#

**Figura 10. Desnaturação de fibras homogêneas de aS por Gdn-HCl.** (A) Efeito concentração de Gdn-HCl sobre a fração monomérica de aS. (B) variação da energia livre de crescimento da fibra em diferentes concentrações de Gdn-HCl.

**Tabela 1.** Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação de fibras homogêneas de aS por Gdn-HCl.

aS	$\Delta G^0$ (kJ/mol)	$m$ (kJ/mol.M)	$[D]_{50\%}$ (M)	$\Delta G_{1M}$ (kJ/mol)
<b>WT</b>	-28.5	7.8	0.60	-20.2
<b>A30P</b>	-32.3	6.4	1.32	-25.3
<b>A53T</b>	-29.9	7.5	0.68	-22.7
<b>E46K</b>	-28.8	10.3	0.35	-19.5
#				

Um estudo utilizando pressão hidrostática para a avaliação da estabilidade das fibras de aS-WT, A30P e A53T mostrou uma maior estabilidade da proteína selvagem em relação as mutantes, obtendo-se a seguinte sequencia de estabilidade: A30P < A53T < WT (Foguel *et al.*, 2003). No entanto é importante ressaltar a grande heterogeneidade das fibras geradas quando não é utilizado um protocolo de preparação de semente com alto grau de homogeneidade, como realizado em nossos estudos. O processo de fibrilação da aS pode ser acelerado através da adição de fragmentos de fibras que funcionam como sementes ou núcleos, diminuindo a duração do processo de nucleação (“seeding”), o qual consiste na etapa lenta da fibrilação (fase lag) (WOOD *et al.*, 1999). A utilização deste procedimento, além de acelerar a fibrilação, pode auxiliar na formação de fibras mais homogêneas, pois estas pequenas fibras transmitem a sua estrutura durante o crescimento das fibras maduras (PETKOVA *et al.*, 2005). Nos experimentos sobre a estabilidade de fibras de aS através do uso de pressão esse tipo de protocolo não foi utilizado, o que poderia explicar a grande discrepância dos resultados em comparação com os nossos.

Os resultados apresentados acima foram obtidos utilizando-se fibras homogêneas, ou seja, apenas uma das formas da aS está presente durante o processo de agregação. Na maioria dos casos, onde mutações na aS estão associadas à PD, ocorre uma coexistência da forma WT

e da mutante. Diante disso, diversos trabalhos tem investigado o efeito da semeadura cruzada (*cross-seeding*) entre estas proteínas, onde pequenos agregados (sementes) de uma variante podem funcionar como núcleos para a agregação do monômero de outra variante da aS, dando origem a fibras heterogêneas. Nestas fibras é esperado que ocorra a co-fibrilação da WT e a mutante. Em nossos estudos, utilizou-se sementes geradas a partir das formas mutantes A30P, A53T e E46K da aS para induzir a agregação da aS-WT e, então determinou-se a estabilidade destas fibras heterogêneas.

A **Fig. 11** mostra o efeito de 1.0 M de Gdn-HCl sobre a fluorescência da ThT, em função do tempo, de fibras geradas a partir da aS-WT semeadas com aS-WT (fibra homogênea), A30P (WT/A30P), A53T (WT/A53T) ou E46K (WT/E46K). Pode-se observar que a natureza das sementes tem um significativo impacto sobre as propriedades da fibra madura, onde as sementes de A30P e A46K foram as que apresentaram maior efeito. Quando comparamos a queda da fluorescência da ThT em função da concentração de Gdn-HCl, podemos observar que a fibra WT/A30P apresenta um perfil similar ao obtido para as fibras homogêneas de A30P (**Fig. 12A**). É importante destacar que a concentração das sementes (em relação a quantidade do monômero) equivale a 1/40 da concentração do monômero da aS-WT, o que sugere que, quando a aS-WT é semeada com aS-A30P, a fibra resultante comporta-se similarmente a forma mutante. Este resultado contrasta com aqueles observados utilizando-se sementes das outras mutantes, A53T e E46K. Neste caso, as fibras heterogêneas geradas apresentaram um perfil semelhante a fibra-WT homogênea.

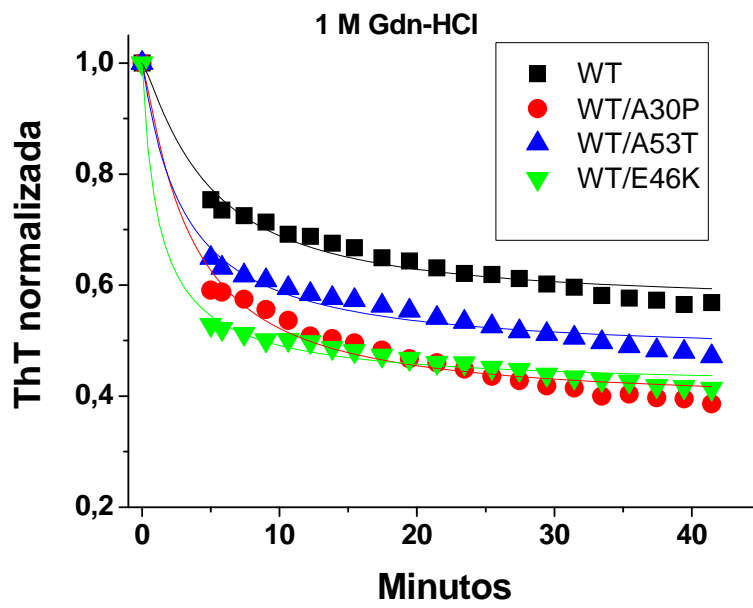


Figura 11. Cinética de desnaturação de fibras heterogêneas de aS para 1.0M de Gdn-HCl medida através da fluorescência da ThT. Para efeito de comparação, foi incluída fibras homogêneas de aS-WT.

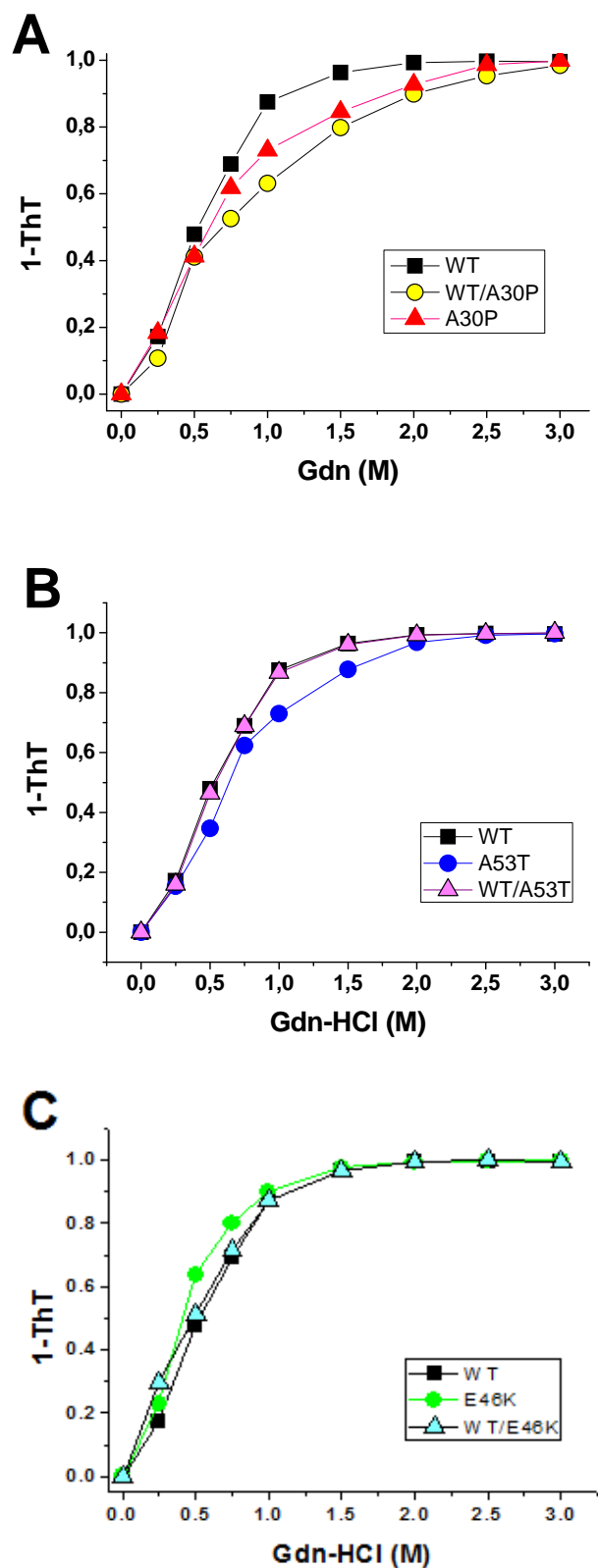


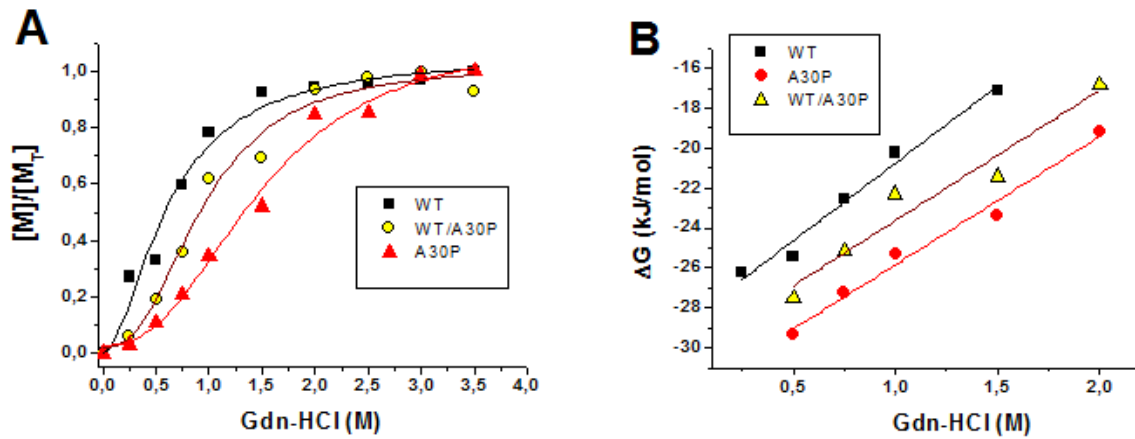
Figura 12. Efeito da concentração de Gdn-HCl sobre a intensidade da fluorescência da ThT de fibras heterogêneas e homogêneas e mutantes. Os gráficos comparam em (A) WT, A30P e WT/A30P, (B) WT, A53T e WT/A53T e (C) WT, E46K, WT/E46K.

O efeito das sementes da aS mutantes sobre a estabilidade termodinâmica das fibras geradas a partir do monômero da aS-WT foi investigado. Similarmente ao apresentado na **Fig. 10**, determinou-se a fração de monômero que é gerado pela incubação da fibra madura com diferentes concentrações de Gdn-HCl. Em concordância ao observado na **Fig. 12A**, pode-se verificar que a fibra WT/A30P apresentou uma estabilidade intermediária quando comparada as fibras-WT e A30P homogêneas (**Fig. 13A**). Através da extrapolação na ausência de Gdn-HCl obteve-se valores de  $\Delta G^0$  de -28.5, -30.2 e -32.3 kJ/mol para aS-WT, WT/A30P e A30P, respectivamente. Estes valores estão em concordância com os parâmetros  $m$ ,  $[D]_{50\%}$  e  $\Delta G_{1M}$  (**Tabela 2**). Por outro lado, as sementes obtidas a partir da aS-A53T e aS-E46K não produziram significantes efeitos sobre na estabilidade da fibra da proteína WT como podemos observar na **Fig. 14** e **Tabela 2**. No conjunto, estes dados sugerem que a mutação A30P parece ter um efeito particular sobre a estabilidade de fibra, tanto homogênea, quando comparada a forma selvagem da proteína, como quando envolvida na formação de fibras heterogêneas.

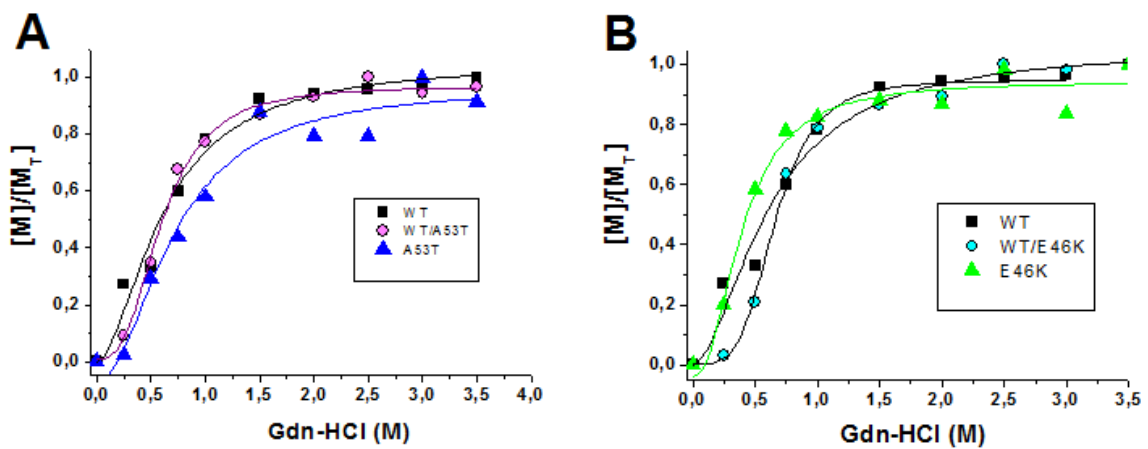
As mutações na aS relacionadas a PD conhecidas até hoje são herdadas de um modo autossômico dominante, ou seja, com apenas uma cópia do gene mutado o indivíduo portador pode apresentar sintomas da doença (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997; KRUGER *et al.*, 1998; CONWAY *et al.*, 2000; CRESSWELL *et al.*, 2013; KIELY *et al.*, 2013). Isto pode estar fortemente ligado ao processo de agregação heterogênea da aS (*cross-seeding*), devido a possível propagação de estrutura das sementes para as estruturas fibrilares da proteína, o que levaria a aS-WT a formar agregados similares as suas mutantes (SIDHU; SEGERS-NOLTEN; SUBRAMANIAN, 2016; YONETANI *et al.*, 2009). Contudo, foi mostrado que algumas variantes da aS não realizam este processo. A forma estrutural das proteínas envolvidas no *cross-seeding* devem apresentar uma alta compatibilidade conformacional para que isto ocorra (O'NUALLAIN *et al.*, 2004).



#



**Figura 13. Desnaturação por Gdn-HCl de fibras de aS-WT, A30P e WT/A30P.** (A) Efeito concentração de Gdn-HCl sobre a fração monomérica de aS. (B) variação da energia livre de crescimento da fibra em diferentes concentrações de Gdn-HCl.



**Figura 14. Desnaturação por Gdn-HCl de fibras de aS-WT, A53T, WT/A53T, E46K e WT/E46K.** (A) Efeito concentração de Gdn-HCl sobre a fração monomérica de aS-WT, A53T e WT/A53T. (B) Efeito concentração de Gdn-HCl sobre a fração monomérica de aS-WT, E46K e WT/E46K.

**Tabela 2.** Parâmetros termodinâmicos para a desnaturação de fibras homogêneas e heterogêneas de aS por Gdn-HCl.

	aS	$\Delta G^0$ (kJ/mol)	$m$	$[D]_{50\%}$ (M)	$\Delta G_{IM}$ (kJ/mol)
#	<b>WT</b>	-28.5	7.8	0.60	-20.2
	<b>WT/A30P</b>	-30.2	6.5	0.92	-22.3
	<b>A30P</b>	-32.3	6.4	1.32	-25.3
	<b>WT/A53T</b>	-	-	0.60	-20.4
	<b>A53T</b>	-29.9	7.5	0.68	-22.7
	<b>WT/E46K</b>	-	-	0.67	-20.1
	<b>E46K</b>	-28.8	10.3	0.35	-19.5

Estudos recentes compararam a agregação homogênea da aS selvagem com a sua agregação heterogênea em presença de sementes das mutantes A30P, A53T e E46K. A mutante A30P promoveu a fibrilação dos monômeros de WT de maneira mais rápida que as sementes da própria proteína selvagem, porém com formação de fibras menores, o que não ocorreu com a WT, A53T e E46K. Foi mostrado que estas pequenas fibras, quando isoladas também servem de sementes para a fibrilação da aS-WT, além de apresentaram grande similaridade estrutural entre as fibras de A30P e de WT formadas com sementes de A30P (YONETANI *et al.*, 2009), em concordância com os resultados obtidos em nossos estudos. Já monômeros das mutantes A30P e A53T não mostraram agregação na presença de sementes de A53T e A30P, respectivamente, porém ambas sobre fibrilação estimulada por sementes da proteína selvagem (SIDHU; SEGERS-NOLTEN; SUBRAMANIAN, 2016).

Dados similares aos obtidos em nosso trabalho foram verificados para a variante H50Q, uma nova mutante relacionada à PD. Utilizando-se Gdn-HCl como agente desnaturante, comparou-se a estabilidade de fibras formadas por aS-WT e H50Q, além de misturas das duas formas. Uma maior estabilidade da mutante foi observada, além das

misturas apresentarem um crescimento na estabilidade de acordo com o aumento da concentração de H50Q. Além disso, também foi demonstrada uma diferença estrutural nas fibras, onde aquelas formadas por monômeros da mutante foram mais homogêneas estruturalmente quando comparadas as fibras da aS-WT (PORCARI *et al.*, 2015).

No conjunto, os dados obtidos no presente trabalho indicam que uma única mutação na aS é capaz de ter importantes implicações na estabilidade da fibras madura. Assim, embora a arquitetura geral das fibras geradas a partir de diferentes proteínas seja a mesma, a sequência primária parece desempenhar importante função na estabilidade destas estruturas. As implicações de um aumento (verificado para a A30P) ou diminuição (E46K) na estabilidade das fibras, conferida pelas mutações, na neuropatogênese da PD ainda permanece uma questão a ser investigada.

## **CONCLUSÕES**

Mutantes da aS associadas à PD parecem ter uma influência não apenas na cinética de formação das fibras, como previamente descrito por outros grupos, mas também na estabilidade termodinâmica das fibras geradas.

Fibras da mutante A30P apresentaram uma maior estabilidade entre as variantes estudadas, observando-se a seguinte ordem de estabilidade: A30P > A53T ~WT > E46K.

Sementes de A30P parecem transmitir informações estruturais para as fibras geradas a partir do monômero da aS-WT; estas propriedades não foram observadas utilizando-se sementes das mutantes A53T e E46K.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Confirmar os resultados obtidos, usando mais pontos com baixa [Gdn-HCl] para um melhor resultado de  $\Delta G^0$  para as mutantes A53T e E46K.

Testar o efeito de outras duas mutações de aS na estabilidade das fibras (H50Q e G51D).

Realizar experimentos de Microscopia para saber mais sobre a estrutura de todas as fibras testadas.

Testar a estabilidade da proteína aS-WT acetilada.

## REFERENCIAS

BARTELS, T.; CHOI, J. G.; SELKOE, D. J.;  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. **Nature**, v. 477, no. 7362, p. 107-110, 2011.

BONINI, N. M.; GIASSON, B. I.; Snaring the function of alpha-synuclein. **Cell**, v. 123, no. 3, p. 359-361, 2005.

BURRÈ J.; SHARMA M.; TSETSENIS T.; BUCHMAN V.; ETHERTON M. R.; SÜDHOF T. C.; Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. **Science**, v. 329, no. 5999, p. 1663–1667, 2010.

COELHO-CERQUEIRA, E.; CARMO-GONÇALVES, P.; PINHEIRO, A. S.; CORTINES, J.; FOLLMER, C.; Alpha-Synuclein as an intrinsically disordered monomer: fact or artifact? **FEBS J.**, v. 280, no. 19, p. 4915-4927, 2013.

CONLEY, K. E.; MARCINEK, D. J.; VILLARIN, J.; Mitochondrial dysfunction and age. **Curr. Opin. Clin. Metab. Care**, v. 10, no. 6, p. 688-692, 2007.

CONWAY, K. A; HARPER, J. D.; LANSBURY, P. T.; Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset parkinson disease. **Nat. Med.**, v. 8, no. 11, p. 1318-1320, 1998.

CONWAY, K. A; HARPER, J. D.; LANSBURY, P. T.; Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. **Biochemistry**, v.39, p.2552–2563, 2000.

CONWAY, K. A.; LEE, S. J.; ROCHET, J. C.; DING T. T.; WILLIAMSON R. E.; LANSBURY, P. T.; 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**, v. 97, p. 571-576, 2000.

COOPER A. A.; GITLER A. D.; CASHIKAR A.; HAYNES C. M.; HILL K. J.; BHULLAR B.; LIU K.; XU K.; STRATHEARN K. E.; LIU F.; CAO S.; CALDWELL K. A.; CALDWELL G. A.; MARSISCHKY G.; KOLODNER R. D.; LABAER J.; ROCHET J. C.; BONINI N. M.; LINDQUIST S.; Alpha-synuclein blocks ER-golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. **Science**, v. 313, no. 5785, p. 324–328, 2006.

DASELAAR, S. M.; VELTMAN, D. J.; ROMBOUTS, S. A.; RAAIJMAKERS, J. G.; JONKER, C.; Deep processing activates the medial temporal lobe in young but not in old adults . **Neurobiol. Aging**, v. 24, no. 7, p. 1005-1011, 2003.

DAUER W., PRZEDBORSKI S.; Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, no. 6, p. 889-909, 2003.

DOBSON, C.M.; Protein folding and misfolding. **Nature**, v. 426, p. 884-890, 2003.

ELLIS C. E.; SCHWARTZBERG P. L.; GRIDER T. L.; FINK D. W.; NUSSBAUM R. L.; Alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 276, no. 6, p. 3879-3884, 2001.

ERIXON-LINDROTH, N.; FARDE, L.; WAHLIN, T. B.; SOVAGO, J.; HALLDIN, C.; BACKMAN, L.; The role of the striatal dopamine transporter in cognitive aging. **Psychiatry Res.**, v. 138, no. 1, p. 1-12, 2005.

FERRÃO-GONZALES, A. D., SOUTO, S. O., SILVA, J. L. & FOGUEL, D.; The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 6445-6450, 2000.

FOGUEL, D; SUAREZ, M. C.; FERRAO-GONZALES, A. D.; PORTO, T. C. R.; PALMIERI, L.; EINSIEDLER, C.M; ANDRADE, L. R.; LASHUEL, H. A.; LANSBURY, P. T.; KELLY, J. W.; SILVA, J. L.; Dissociation of amyloid fibrils of  $\alpha$ -synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities. **PNAS**, v. 100, no. 17, p. 9831-9836, 2003.

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.**, v. 4, no. 2, p. 160-164, 2002.

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.**, v. 75, p. 333-336, 2006.

GLASER, C. C.; YAMIN, G.; UVERSKY, V. N.; FINK, A. L.; Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1703, no. 2, p.157-169, 2005.

GREENBAUM, E.A.; GRAVES, C.L.; MISHIZEN-EBERZ, A.J.; LUPOLI, M.A.; LYNCH, D.R.; ENGLANDER, S.W.; AXELSEN, P.H.; GIASSON, B.I.; The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, no. 9, p. 7800-7807, 2005.

GUTCHESS, A. H.; WELSH, R. C.; HEDDEN, T. *et al.*; Aging and the neural correlates of successful picture encoding: frontal activations compensate for decreased medial-temporal activity. **J. Cogn. Neurosci.**, v. 17, no.1, p. 84 – 96, 2005.

HEDDEN, T.; GABRIELI, J. D.; Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. **Nat. Ver. Neurosci.**, v. 5, no. 2, p. 87 – 96, 2000.

IKENOUE T.; LEE Y.H.; KARDOS J.; SAIKI M.; YAGI H.; KAWATA Y.; GOTO Y.; Cold denaturation of amyloid fibrils. **Angew. Chem.**, v. 53, p. 7799-7804, 2014.

IWAI, A.; MASLIAH, E.; YOSHIMOTO, M.; GE, N.; FLANAGAN, L.; DA SILVA, H. A.; KITTEL, A.; SAITOH, T.; The precursor protein of non-Ab component of Alzheimer's disease amyloid (NACP) is a presynaptic protein of the central nervous system. **Neuron**, v. 14, p. 467–475, 1995.

Ki, C.S.; STAVROU, E.F.; DAVANOS, N.; LEE, W.Y.; CHUNG, E.J.; KIM, J.Y.; ATHANASSIADOU, A.; The Ala53Thr mutation in the alpha-synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease. **Clin. Genet.**, v. 71, no. 5, p. 471-473, 2007.

KELLY, K. M; NADON, N. L; MORRISON, J. H.; THIBAUT. O; BARNES, C. A.; BLALOCK, E. M.; The neurobiology of aging. **EpilepsyRes.**, v. 68, no. 1, p. S5 – S20, 2006.

KOKHAN, V. S.; AFANASYEVA, M. A.; VAN’KIN, G. I.;  $\alpha$ -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. **Behav. Brain Res.**, v. 231, no. 1, p.226-230, 2012.

KRÜGER, R. *et al.*; Ala30Pro mutation in the gene encoding -synuclein in Parkinson's disease. **Nat Genet**, v.18, pp. 106–108, 1998.

LEE, V.M.; TROJANOWSKY, J.Q.; BUEE, L.; CHRISTEN, Y.; Fatal attractions: protein aggregates in neurodegenerative Disorders. **Research and Perspective in Alzheimer's Disease**, Springer, New York, 2000.

LI, J.; UVERSKY, V.N.; FINK, A.L.; Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. **Biochemistry**, v. 40, no. 38, p. 11604-11613, 2001.

LI, J.; UVERSKY, V.N.; FINK, A.L.; Conformational behavior of human alpha-synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T. **Neurotoxicology**, v. 23, no. 4-5, p. 553-567, 2002.

MALTSEV, A. S.; CHEN, J.; LEVINE, R. L.; BAX, A.; Site-specific interaction between  $\alpha$ -synuclein and membranes probed by NMR-observed methionine oxidation rates. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 135, no. 8, p. 2943-2946, 2013.

MANDZIA, J. L.; BLACK, S. E.; MCANDREWS, M. P.; GRADY, C.; GRAHAM, S.; fMRI differences in encoding and retrieval of pictures due to encoding strategy in the elderly. **Hum. Brain. Mapp.**,v. 21, no. 1, p. 1 – 14, 2004.



MARSDEN, C. D.; Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.57, p. 672–681, 1994.

MAYO, S.L.; BALDWIN, R.L.; Guanidinium chloride induction of partial unfolding in amide proton exchange in RNase A. **Science**, v. 262, no. 5135, 1993.

MEERSMAN, F., SMELLER, L. & HEREMANS, K.; Comparative Fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin. **Biophys. J.**, v. 82, p. 2635–2644, 2002.

MONERA, O. D.; KAY, C. M.; HODGES, R. S.; Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. **Protein Sci.**, v. 3, no. 11, p. 1984-1991, 1994.

O'NUALLAIN, B; WILLIAMS, A.D.; WESTERMARK, P.; WETZEL, R.; Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. **J. Bio. Chem.**, v. 279, p. 17490-17499, 2004.

OOSAWA, F.; KASAI, M.; A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. **J. Mol. Biol.**, v. 4, p. 10-21, 1962.

PERIQUET, M.; FULGA, T.; MYLLTKANGAS, L.; SCHLOSSMACHER, M. G.; FEANY, M. B.; Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. **J. Neurosci.**, v. 27, no. 12, p. 3338-3346, 2007.

PETKOVA, A.T.; LEAPMAN, R.D.; GUO, Z.; YAU, W.M.; MATTSON, M.P.; TYCKO, R.; Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. **Science**, v. 307, no. 5707, p. 262-265, 2005.

PIERI, L.; MADIONA, K.; MELKI, R.; Structural and functional properties of prefibrillar alpha-synuclein oligomers. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24526, 2016.

POLYMEROPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S. E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E. S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W. G.; LAZZARINI, A. M.; DUVOISIN, R. C.; DI IORIO, G.; GOLBE, L. I.; NUSSBAUM, R. L.; Mutation in the alpha-synuclein gene identified in Parkinson's disease. **Science**, v. 276, p. 2045–2047, 1997.

PORCARI, R. *et al.*; The H50Q Mutation Induces a 10-fold Decrease in the Solubility of  $\alpha$ -Synuclein. **J. Biol. Chem.**, v. 290, no. 4, p. 2395-2404, 2015.

PUSCHMANN, A.; ROSS, O.A.; VILARIÑO-GUELL, C.; LINCOLN, S.J.; KACHERGUS, J.M.; COBB, S.A.; LINDQUIST, S.G.; NIELSEN, J.E.; WSZOLEK, Z.K.; FARRER, M.; WIDNER, H.; VAN WESTEN, D.; HAGRESTROM, ; MARKOPOULOU, K.; CHASE, B.A.; NILSSON, K.; REIMER, J.; NILSSON, C.; A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early cortical dysfunction. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 15, no. 9, p. 627-632, 2009.

RECCHIA A.; DEBETTO P.; NEGRO A.; GUIDOLIN D.; SKAPER S. D.; GIUSTI P.; Alpha-synuclein and Parkinson's disease. **FASEB J.**, v. 18, no. 6, p. 617-626, 2004.

RESNICK, S. M.; PHAM, D. L.; KRAUT, M. A.; ZONDERMAN, A.B.; DAVATZIKOS, C.; Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. **J. Neurosci.**, v. 23, no. 8, p. 3295 –3301, 2003.

ROCHET J. C.; OUTEIRO T. F.; CONWAY K. A.; DING T. T.; VOLLES M. J.; LASHUEL H. A.; BIEGANSKI R. M.; LINDQUIST S. L.; LANSBURY P. T.; Interactions among alpha-synuclein, dopamine, and biomembranes: some clues for understanding neurodegeneration in Parkinson's disease. **J. Mol. Neurosci.**, v. 23, no. 1-2, p. 23-34, 2004.

ROSEMAN, M.; JENCKS, W.P.; Interactions of urea and other polar compounds in water. **J. American Chem. Soc.**, v. 96, no. 3, p. 631-640, 1975.

SIDHU A.; SEGERS-NOLTEN I.; SUBRAMANIAN V.; Conformational compatibility is essential for heterologous aggregations of alpha-synuclein. **Chem. Neurosci.**, v. 7, p. 719-727, 2016.

SILVA, J. L., FOGUEL, D. & ROYER, C. A.; Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p. 612– 618, 2001.

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.**, v. 275, no. 24, p. 18344-18349, 2000.

TROJANOWSKI, J.Q. *et al.*; Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. **Cell Death & Differentiation**, v.5, p. 832- 837, 1998.

UVERSKY, V. N.; Neuropathology, biochemistry and biophysics of alpha-synuclein aggregation. **J. Neurochem.**, v. 103, no. 1, p. 17-37, 2007.

VOLLES M. J.; LANSBURY P. T.; Zeroing in on the Pathogenic Form of  $\alpha$ -synuclein and its Mechanism of Neurotoxicity in Parkinson's Disease. **Biochemistry**, v. 42, p. 7871-7878, 2003.

WEINREB, P. P.; ZHEN, W.; POON, A. W.; CONWAY, K. A.; LANSBURY, P. T. Jr.; NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. **Biochemistry**, v. 35, no. 43, p. 43, 1996.

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.**, v. 274, no. 28, p. 19509-19512, 1999.

YANKNER, B. A.; LU, T.; LOERCH, P.; The aging brain. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 3, p. 41–66, 2008.

YONETANI M.; NONAKA T.; MASUSA M.; INUKAI Y.; OIKAWA T.; HISANAGA S.; HASEGAWA M.; Conversion of Wild-type  $\alpha$ -Synuclein into Mutant-type Fibrils and Its Propagation in the Presence of A30P Mutant. **J. Biol. Chem.**, vol. 282, no. 12, p. 7940-7950, 2009.