

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

INSTITUTIONEN FÖR BIOLOGI OCH BIOTEKNIK, AVDELNING KEMISK BIOLOGI

RAPPORT

KANDIDATARBETE BBTX01-17-04

Aggregation av Parkinsonproteinet α -synuklein (vildtyp och sjukdomsvarianterna A30P och A53T) samt interaktion med liposomer

Författare:

LORENTZON Emma
OLSSON Anna
SUNDEVALL Nathalie
TINGVALL GUSTAFSSON Johanna
TORELL BJÖRKMAN Agnes
VÅNDER Frida

Handledare:

BOSAEUS Niklas
ESBJÖRNER WINTERS Elin
HORVATH Istvan
KUMAR Ranjeet
ROCHA Sandra
WITTUNG-STAFSHEDE Pernilla

Examinator:

ALBERS Eva



CHALMERS

GÖTEBORG 12 maj 2017

Abstract

Parkinson's disease is a common neurodegenerative age-related disease, that causes both motor and cognitive problems. The disease is characterized by abnormal accumulation of protein aggregates called Lewy bodies that contains amyloid fibers. These fibers consist of the protein α -synuclein, which under normal conditions is primarily found in the presynaptic nerve terminals where it interacts with phospholipids and other molecules.

The aim of this project is to study how three variants of α -synuclein, the wild type and two pathogenic mutations A30P and A53T, aggregate and interact with liposomes. The liposomes consist of DOPC, DOPS, DOPE and cholesterol to mimic synaptic vesicles in the brain. The protein structure and the aggregation kinetics in presence of liposomes, were determined by circular dichroism and fluorescence spectroscopy.

The study shows that all α -synuclein variants interact with liposomes. The wild type and the A53T mutant exhibit a similar increase of α -helix structure in the presence of liposomes, while the A30P mutant exhibits a lower degree of structural change. The aggregation kinetics for all protein variants were inhibited by the liposomes, which is monitored by the Thioflavin T fluorescence. Samples with protein only, aggregate faster than when liposomes are present.

In conclusion, all variants of α -synuclein interact with the model membrane, and this interaction induces a change in secondary structure. Aggregation for all the protein variants are inhibited by the presence of the model membranes.

Sammanfattning

Parkinsons sjukdom är en vanlig åldersrelaterad neurodegenerativ sjukdom, som leder till både motoriska och kognitiva problem. Sjukdomen karaktäriseras av abnormal ansamling av proteinaggregat, kallade Lewykroppar, innehållande amyloida fibrer. Dessa fibrer består till stor del av proteinet α -synuklein, som främst återfinns i de presynaptiska nervterminalerna, där det interagerar med bland annat fosfolipider och andra molekyler.

Syftet med projektet är att studera hur tre varianter av α -synuklein, vildtyp samt två sjukdomsalstrande mutationer, A30P och A53T, aggregerar samt interagerar med liposomer. Liposomerna består av DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol för att efterlikna synaptiska vesiklar i hjärnan. Proteinstruktur samt aggregationskinetik i närvaro av liposomer undersöktes m.h.a. cirkulär dikroism och fluorescensspektroskopi.

Studien visar att samtliga α -synukleinvarianter interagerar med liposomerna. Vildtypen och A53T-mutanten uppvisar en likartad strukturell förändring, i form av en ökning av α -helixstruktur, i närvaro av liposomer, medan A30P-mutanten uppvisade lägre grad av struktureförändring. Aggregationskinetiken för samtliga proteinvarianter inhiberas av de syntetiska liposomerna, vilket observeras m.h.a. tioflavin T fluorescens. Prov innehållande enbart protein aggregerar snabbare än i närvaro av liposomer.

Slutsatsen är att samtliga varianter av α -synuklein interagerar med membranmodellen, som inducerar en förändring av deras sekundärstruktur. Aggregationen för samtliga proteinvarianter inhiberas i närvaro av membranmodellen.

Innehållsförteckning

1	Inledning	1
1.1	Syfte	1
1.2	Frågeställningar	2
1.3	Avgränsningar	2
2	Teori	3
2.1	Parkinsons sjukdom och α -synuklein	3
2.2	α -synukleins interaktioner med lipidvesiklar	5
2.3	Analysmetoder	10
2.3.1	Jonbyteskromatografi	10
2.3.2	Gelfiltreringskromatografi	11
2.3.3	Sonikering	11
2.3.4	Dynamisk ljusspridning	11
2.3.5	Absorptionsspektroskopi	11
2.3.6	Cirkulär dikroism	12
2.3.7	Fluorescensspektroskopi	13
3	Metod	15
3.1	Uttryck och rening av vildtyp och muterat α -synuklein i <i>Escherichia coli</i>	15
3.1.1	Uttryck av α -synuklein	15
3.1.2	Rening av α -synuklein	15
3.2	Framställning och storlekskontroll av liposomer	17
3.2.1	Tillverkning av liposomer	17
3.2.2	Dynamisk ljusspridning för storleksbestämning av liposomer	17
3.3	Karaktärisering av membraninteraktioner och proteinstruktur med cirkulär dikroism	18
3.3.1	Cirkulär dikroism för analys av sekundärstruktur	18
3.3.2	Behandling av data från cirkulär dikroism	19
3.4	Fluorescensspektroskopi för mätning av aggregationskinetik	19
3.4.1	Aggregation av α -synuklein	19
3.4.2	Behandling av data från fluorescensspektroskopi	20
4	Resultat	21
4.1	Sekundärstrukturbestämning	21
4.2	Aggregation av α -synuklein	23

5	Diskussion	26
5.1	Förändringar i sekundärstruktur	26
5.2	Aggregation av α -synuklein	27
5.3	Metodreflektion	29
6	Slutsats	31
	Bilagor	37
A	Uttryck och rening av α -synuklein	37
B	Storleksbestämning av liposomer	41
C	Proteinstocklösningar, lipid:proteinförhållanden samt grafer från cir- kulär dikroism	42
D	Laddning av 96-hålsplatta för fluorescensspektroskopi	47
E	Aggregationskinetik för vildtyp α -synuklein utan glaspärlor	48

1 Inledning

Parkinsons sjukdom (PD¹) är den näst vanligaste neurodegenerativa sjukdomen efter Alzheimers sjukdom, och saknar i dagsläget botemedel. Sjukdomen drabbar främst äldre individer, och ca 1 % av befolkningen i Sverige över 60 år är diagnostiserade med PD [1]. De främsta kännetecknen på PD är motoriska symptom som skakningar och stelhet. Dessa symptom orsakas av degeneration av dopaminproducerande nervceller i hjärnan. Även andra symptom, däribland kognitiva, förekommer [2].

Patologiskt karaktäriseras PD av intracellulära proteinaggregat i hjärnan, s.k. Lewykroppar, vilka främst består av proteinet α -synuklein (α S) [3]. Det finns ett flertal punktmutationer i proteinet som ger upphov till en tidig eller en mer aggressiv form av PD [4]. Funktionen av α S är ännu inte känd men det finns indikationer på att proteinet interagerar med synaptiska vesiklar [5]. Sammansättningen av dessa vesiklar förändras med åldern, vilket skulle kunna påverka interaktion med och aggregation av α S [6]. Det är därför av intresse att undersöka proteinet i närvaro av en modell för biologiska membran, här i form av liposomer.

I denna rapport behandlas proteinet α S och dess interaktion med en membranmodell i form av liposomer i syfte att efterlikna synaptiska vesiklar. Fokus ligger på att undersöka proteinets aggregationskinetik vid interaktion med denna membranmodell.

1.1 Syfte

Syftet med projektet är att genom laborativt arbete studera aggregationskinetik samt strukturskillnader till följd av de sjukdomsframkallande mutationerna A30P och A53T, i jämförelse med vildtyp (WT²) av α S.

Vidare studeras även struktur och aggregation i närvaro av liposomer bestående av DOPS³ (1,2-Di-(9Z-oktadecenoyl)-sn-glycero-3-fosfo-L-serin), DOPE⁴ (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-fosfoetanolamin), DOPC⁵ (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-fosfokolin) och kolesterol. Liposomerna används som en modell för att efterlikna synaptiska vesiklar *in vivo*. Syftet med projektet är att ge ökad förståelse för interaktioner

¹PD är förkortat från engelskans *Parkinson's disease*

²WT är förkortat från engelskans *wild type*

³DOPS är förkortat från engelskans *1,2-Di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-L-serine*

⁴DOPE är förkortat från engelskans *1,2-Dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamine*

⁵DOPC är förkortat från engelskans *1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

mellan sjukdomsframkallande mutationer och WT av α S och lipidvesiklar, samt undersöka om dessa interaktioner påverkar proteinets aggregationsförmåga.

Målsättningen är att resultaten från det laborativa arbetet ska leda till nya vetenskapliga slutsatser, som kan bidra till ökad förståelse för de molekylära mekanismerna i PD.

1.2 Frågeställningar

- Hur interagerar α S^{WT} ⁶ och valda mutanter med liposomer?
- Hur skiljer sig aggregationskinetiken för α S^{WT} från α S^{A53T} och α S^{A30P}?

1.3 Avgränsningar

De varianter av α S som behandlas i denna studie begränsas till WT samt två kända sjukdomsalstrande mutationer, A30P och A53T.

Projektet fokuserar på hur α S aggregerar i närvaro av liposomer, avsedda att efterlikna kompositionen av synaptiska vesiklar i hjärnan. Molära lipid:proteinförhållande 40:1 samt 60:1 studerades vid undersökning av aggregationskinetik för de olika α S-varianterna. Studien utförs *in vitro* med renade proteiner och syntetiska liposomer, för att kunna studera aggregation och interaktioner i isolation och under påverkan av ett begränsat antal faktorer. Denna avgränsning är nödvändig för att kunna dra slutsatser på molekylär nivå.

I detta projekt används liposommodeller innehållande lipiderna DOPC, DOPS och DOPE samt kolesterol med förhållandet 30:20:25:25.

⁶ α S viltyp förkortas α S^{WT}. På samma sätt kommer förkortningen göras för de två mutanterna.

2 Teori

I detta avsnitt ges en bakgrund till PD med fokus på α S. Tidigare forskning kring hur α S^{WT} och de två sjukdomsalstrande mutanterna α S^{A53T} och α S^{A30P} interagerar med membran sammanfattas, och teori för de biofysikaliska analysmetoder som använts i projektet presenteras.

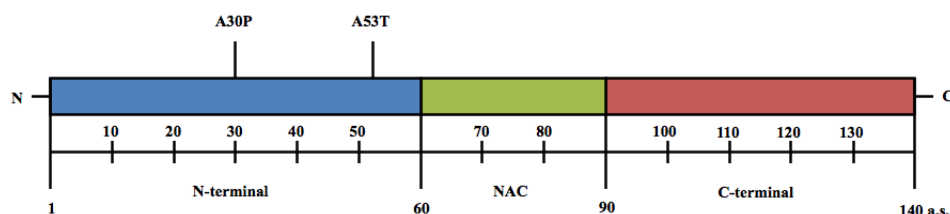
2.1 Parkinsons sjukdom och α -synuklein

PD är en neurodegenerativ sjukdom som karaktäriseras av intracellulära proteinnaggregat, s.k. Lewykroppar i den del av hjärnan som kallas substantia nigra [3]. Substantia nigra är en del av mitthjärnan och är delaktig i den icke viljestyrda regleringen av skelettmusklernas aktivitet [7]. Nervcellerna i substantia nigra syntetiserar dopamin, och hos personer med PD återfinns defekt utsöndring av dopamin [8].

Proteinet α S är främsta beståndsdelen i Lewykroppar. Det är ett 140 aminosyror långt protein med en molekylmassa på 14 kDa [9; 10]. α S uttrycks bl.a. i nervceller och är lokaliserat i presynaptiska nervterminaler där det finns både lösligt samt membranbundet. α S kan interagera med både proteiner och lipider [9]. I lösning har α S ingen väldefinierad sekundär- eller tertiärstruktur [11]. I närvaro av negativt laddade lipider, såsom fosfolipider i membran, sker en interaktion mellan lipiderna och den positivt laddade N-terminalen av α S. Interaktionen resulterar i att proteinet antar en sekundärstruktur innehållande α -helixar [11; 12].

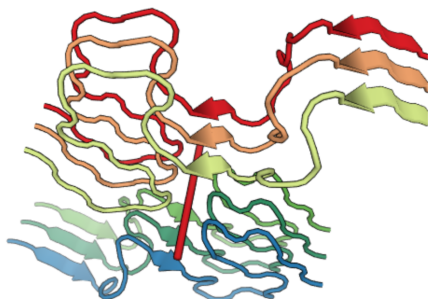
α S egenskaper kan beskrivas av en primärstruktur uppdelad i tre regioner, se figur 1. De första två regionerna (kallade N-terminalen och icke-amyloid- β komponent (NAC⁷)) utgör den membranbindande domänen av proteinet. C-terminalen tros vara ansvarig för bl.a. interaktion med andra proteiner [9]. α S:s fysiologiska funktion är okänd, men studier har föreslagit flera möjliga roller; exempelvis transport av synaptiska vesiklar, bindande av fettsyror samt reglering av vissa enzymer. Bevis för att α S har betydelse för neuronal dysfunktion har hittats vid studier på möss, där de gener som kodar för alla kända typer av synukleiner (α , β , och γ) inaktiverats. Studien indikerar att proteinet kan ha en viktig funktion för att långsiktigt upprätthålla normal aktivitet i nervsystemet [5].

⁷NAC är förkortat från engelskans *non-amyloid- β component*

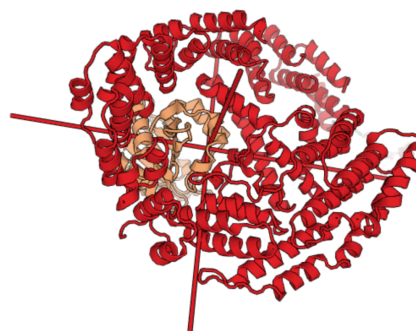


Figur 1: Schematisk representation av olika regioner i α S. De två punktmutationerna som studeras kan lokaliseras till N-terminalen av proteinet som är ansvarig för interaktionen med liposomer. Den centrala delen av proteinet utgörs av en NAC-region som ansvarar för bildandet av β -flak. C-terminalen ansvarar bl.a. för interaktion med protein.

α S kan aggregera och bilda s.k. amyloida fibriller, dvs. proteinaggregat rika på β -flak (Figur 2) och som utgör grundstrukturen i Lewykroppar i hjärnan. Det är främst den centrala och mycket hydrofoba delen av proteinet, s.k. NAC som är ansvarig för den strukturella förändringen till β -flak. Aggregationsprocessen för α S kan påverkas av olika faktorer, såsom punktmutationer eller interaktioner med andra molekyler [9]. Ett flertal posttranslationella modifieringar som påverkar aggregationsprocessen har identifierats, däribland fosforyleringar [13]. Vid bildandet av fibriller förekommer även intermediära aggregat i form av lösliga oligomerer [12]. Dessa oligomerer kan vara av varierande form; både definierade strukturer innehållande α -helixar (Figur 3) eller β -flak, samt mer ostrukturerade oligomerer har observerats. Det är ännu inte känt om det är α S-oligomerer eller de större fibrillära aggregaten som främst bidrar till neurotoxicitet i PD [9].



Figur 2: Exempel på sekundärstrukturen β -flak hos 2NAO (sjukdomsrelaterad A β (1-42) amyloidfibrill) ritad i PV, ett WebGL baserat 3D-program hos RSCB Protein Data Bank.

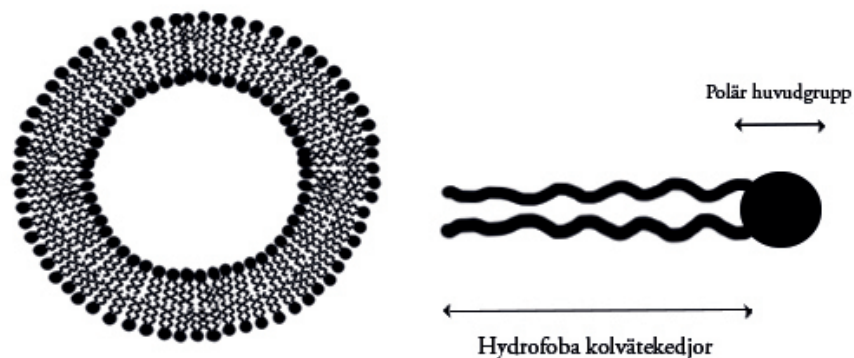


Figur 3: Exempel på sekundärstrukturen α -helix hos 5K18 (NatBacetyltransferas komplex bundet till bi-substratinhibitor) ritad i PV, ett WebGL baserat 3D-program hos RSCB Protein Data Bank.

Ett flertal olika mutationer i proteinet α S är associerade med tidiga eller aggressiva former av PD, bl.a. A30P samt A53T [14]. A53T innebär utbyte av alanin (A) vid position 53 mot treonin (T). För mutation A30P är istället alanin vid position 30 utbytt mot prolin (P). Båda mutationerna är lokaliserade i den membraninteragerande N-terminalen av α S. Lázaro m.fl. har m.h.a. bimolekylär fluorescens-komplementering konstaterat att båda dessa mutationer resulterar i ökad ackumulering av oligomerer *in vivo*, särskilt för α S^{A53T} [15]. Även aggregation och bildandet av Lewykroppar påverkas av dessa punktmutationer. Mutation A30P resulterade i en minskning av antalet celler med Lewykroppar jämfört med WT i samma studie gjord på cellinjer av gliomaceller [15]. Skillnaden mellan α S^{WT} och α S^{A30P} skulle kunna förklaras genom att punktmutationen i N-terminalen leder till ökad interaktion mellan N- och C-terminalen i proteinet. Interaktionen skulle i sin tur kunna resultera i skärmning av NAC-domänen och därmed inhibera proteinets aggregationsförmåga. En möjlig förklaring till den sjukdomsalstraltande egenskapen hos α S^{A30P} är att en minskad aggregation resulterar i ökad mängd skadliga oligomerer. För α S^{A53T} har en tydlig förändring av aggregationen inte konstaterats [15]. Både α S^{A30P} och α S^{A53T} har precis som α S^{WT} en ostrukturerad form i lösning [16].

2.2 α -synukleins interaktioner med lipidvesiklar

Biologiska membran med olika lipid- och proteinsammansättning existerar i alla levande celler. Membranegenskaperna avgörs till stor del av lipidsammansättningen, kompositionen av de polära huvuddelarna samt längden och mätnadsgraden på kolvätekedjorna. För schematisk bild av lipidvesikel, se figur 4. Som tidigare nämnts, förändras membransammansättningen i hjärnan med åldern. Exempelvis kan ackumulering av kolesterol och andra, ibland skadliga, produkter från oxidativ metabolism förekomma. Denna ackumulation gör membranen stelare och membranprocesser går därmed långsammare. En förändrad membransammansättning kan också bidra till förändring i inbindningen av andra biomolekyler till membran [17; 18]. Det är därför viktigt att studera hur olika lipidsammansättningar påverkar inbindningen av α S till membran och eventuellt initiera skadliga processer, såsom bildandet av oligomerer eller proteinaggregat [19].



Figur 4: Till vänster ses en schematisk bild av en liposom. De opolära kolvätekolvätekedjorna är vända inåt och de polära huvudgrupperna är vända utåt. Till höger ses en enskild lipid med kolvätekedjor och huvudgrupp markerade.

När α S binder till negativt laddade vesiklar *in vitro* har sekundärstrukturförändringar i proteinet observerats, från ostrukturerad form till en mer ordnad form med ökat α -helixinnehåll. Interaktion mellan α S och membran i hjärnan är en central del i teorin kring varför aggregatbildning av proteinet uppstår, då det har iakttagits att förhållandet mellan membranmodeller och α S påverkar aggregationskinetiken för proteinet. Initiering av aggregatbildning har observeras till följd av lipidinteraktioner, men det är ännu oklart vad som avgör aggregationskinetiken [19].

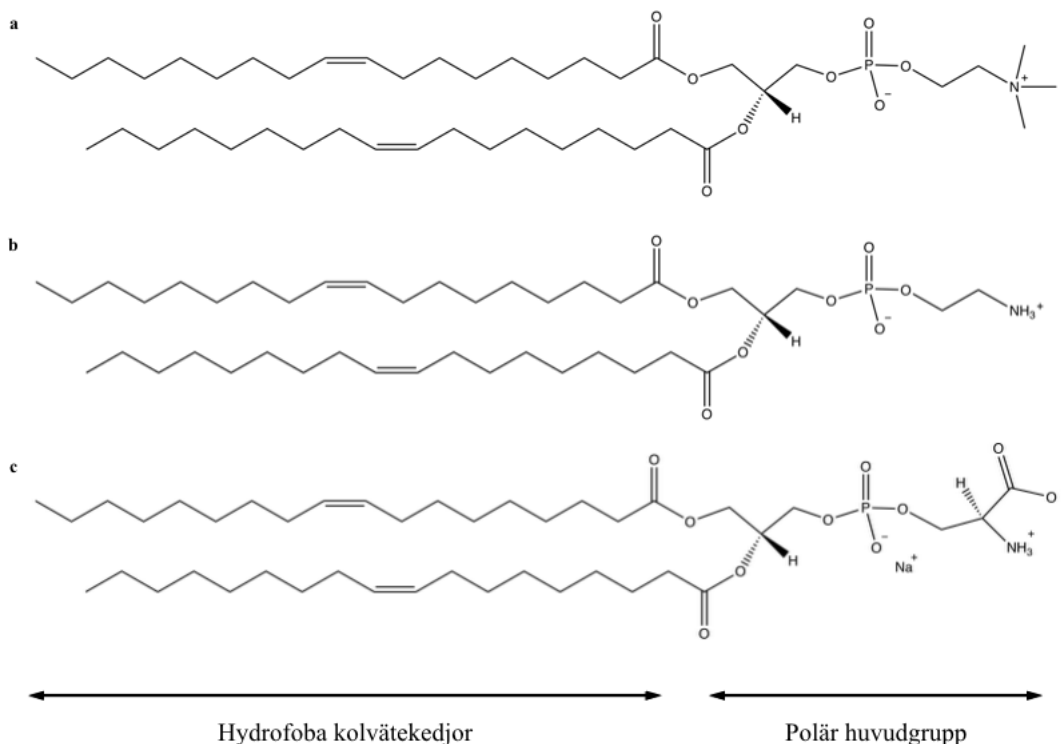
α S har rapporterats att särskilt binda till synaptiska vesiklar [20]. Dessa vesiklar är centrala för nervcellernas kommunikation och kan variera i storlek och sammansättning, men har vanligtvis en diameter på ca 40 nm [19; 21]. DOPS, DOPE och DOPC som används i den här studien motsvarar sammansättning i synaptiska vesiklar [19]. För fosfolipidernas kemiska struktur, se figur 5. Takamori m.fl. har undersökt sammansättningen av synaptiska vesiklar och funnit att ca 36 % av fosfolipiderna i synaptiska membranet består av fosfatidylkolin (PC⁸), 23 % av fosfatidyletanolamin (PE⁹) samt 12 % av fosfatidylserin (PS¹⁰) [22]. Förutom fosfolipider består de synaptiska vesiklarna till ca 30 % av kolesterol [23]. PE är zwitterjonisk, dvs. har en huvudgrupp med både negativ och positiv laddning. Formens på PE är inverskonisk vilket betyder att den hydrofoba svansen upptar en större volym än huvudgruppen. PE-lipider påträffas därför oftast på lipiddubbellag-

⁸PC är förkortat från engelskans *phosphatidylcholine*

⁹PE är förkortat från engelskans *phosphatidylethanolamine*

¹⁰PS är förkortat från engelskans *phosphatidylserine*

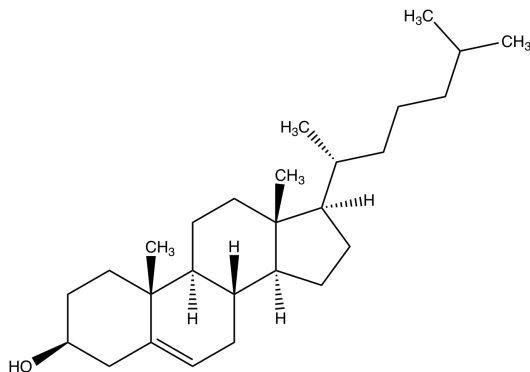
rets insida i hjärnans plasmamembran, där formen passar med membranets kurvatur och inte stör packningen av membranet [24]. Även PS återfinns vanligtvis i det inre plasmamembranlagret. PS är negativt laddad vid pH 6,5 och har en bulkigare huvudgrupp än t.ex. PE, vilket gör den cylindrisk till formen [25]. PC finns i riklig mängd i kroppen och står för över en tredjedel av sammansättningen av kroppens membran. PC befinner sig huvudsakligen på den yttre sidan av lipiddubbellagret i plasmamembran och kontrollerar struktur samt fluiditet av dessa membran. Lipiden är cylindrisk och zwitterjonisk [24]. Munishkina m.fl. har studera hur bindningen av α S till liposomer påverkas av den kemiska strukturen hos lipidernas huvudgrupp. α S binder enligt studien starkast till negativt laddade lipider, såsom PS. Även interaktion med liposomer av zwitterjoniska lipider kunde observeras, med en starkare bindning till PE än PC [26].



Figur 5: Strukturformler av fosfolipiderna (a) DOPC, (b) DOPE och (c) DOPS ritade i *ChemDraw*.

Kolesterol är också en vanligt förekommande komponent i synaptiska membran [19]. Ungefär 20-25 % av kroppens kolesterol finns i hjärnan, där det stabiliserar synaptiska plasmamembran genom att minska permeabiliteten [27]. Kolesterol har visats vara viktig för utvecklingen av hjärnan. Störd reglering av kolesterol i äldre personers

hjärnor har associerats med neurologiska sjukdomar som t.ex. Alzheimers sjukdom [24]. I figur 6 illustreras strukturen av kolesterol.



Figur 6: Strukturformel av kolesterol ritad i *ChemDraw*.

Enligt Kiskis m.fl. är det lipiders huvudgrupp som påverkar α S:s interaktion med vesiklar, samt bildandet av amyloida fibrer [28]. Kiskis m.fl. studerade hur liposomer bestående av DOPS eller DOPG¹¹ (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-fosfo-(1-rac-glycerol)), påverkade α S förmåga att bilda α -helixstrukturer från en inledningsvis oregelbunden struktur i lösning. Med hjälp av cirkulär dikroism (CD) och α -helixstrukturens karaktäristiska minima vid 208 respektive 222 nm, observerades en nästintill linjär ökning av α -helixstrukturer vid ökande tillsats av liposomer [28]. Ökningen av α -helixstrukturer pågick tills koncentrationen av liposomer var så hög att allt α S bundit till liposomerna. Resultatet kunde anpassas till en enstegsbindningsmodell, dvs. α S binder till liposomerna i ett steg och bildar α -helixar [28]. Det teoretiska värdet för minsta möjliga lipid:protein för mättnad är 60:1. Däremot påverkas detta värde beroende på lipidsammansättning. För negativt laddade lipider, såsom PS, är detta värde generellt sett lägre än för zwitterjonsika lipider, som PC och PE [26].

Kiskis m.fl. analyserade även aggregationskinetiken för α S m.h.a. fluorescens av tioflavin T (ThT¹²). Koncentrationen av α S hölls konstant, med en ökande lipidkoncentration. På så sätt skapades förutsättningar att analysera aggregationskinetiken av α S både fritt i lösning samt bundet till lipidvesiklar. Resultaten visade att enbart α S i lösning (70 μ M, inkuberat vid 37°C under 100 tim) inte gav någon ökning i ThT-fluorescens, vilket indikerar att det inte existerade några amyloida fibriller som ThT bundit till. Resultatet bekräftades med atom-

¹¹DOPG är förkortat från engelskans (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho- (1-rac-glycerol)

¹²ThT är förkortat från engelskans Thioflavin T

kraftsmikroskopi (AFM¹³), där inga fibriller detekterades. Tillsats av DOPG vid lipid:proteinförhållandena 2:1, 4:2 samt 11:2 resulterade i bildning av amyloida fibriller. Vid högre lipid:proteinförhållanden ($\geq 22:4$) där allt αS var bundet till lipidvesiklar (mättad lösning), kunde ingen ökning i ThT-fluorescens observeras. Tillsats av DOPS ökade också formationen av amyloida fibriller, men då istället vid lipid:proteinförhållande 10:5. Högre DOPS: αS -förhållanden ökade inte aggregationen av αS [28].

Både A30P och A53T är mutationer i N-terminalen av αS . N-terminalen interagerar med lipidmembran där membranbindning främst involverar sidokedjorna 26-97 [29]. Flagmeier m.fl. har konstaterat att för såväl αS^{WT} som för αS^{A53T} och αS^{A30P} erhöles en struktur innehållande α -helixar vid interaktion med lipidvesiklar. Det har föreslagits att lipid-medierad aggregation av αS sker genom att tillväxt-kompetenta ”kärnor” (jämför engelskans *nuclei*) bildas på membranets yta, och att fibrilltillväxt därefter sker från dessa membranbundna kärnor. Flagmeier m.fl. har konstaterat att hastigheten för denna lipidinducerade aggregation, är förhöjd med två storleksordningar för αS^{A53T} medan endast en liten ökning kunde konstateras för αS^{A30P} , jämfört med αS^{WT} . Dessa experiment genomfördes i närvaro av liposomer bestående av negativt laddade lipider DMPS (2,3-dimercapto-1-propansulfonsyra). Vid visualisering med AFM kunde liknande fibrillstrukturer konstateras för WT och de två mutanterna [29].

Galvagnion m.fl. föreslår att aggregation av αS till fibriller triggas i närvaro av membran bestående av lipider med korta mättade kolvätekedjor. Membranmodellens laddningsdensitet påverkar även aggregationen av αS i närvaro av lipider. Galvagnion m.fl. analyserade en lipidmodell bestående av DOPE, DOPS och DOPC med förhållande 50:30:20 för att efterlikna membrankompositionen i synaptiska vesiklar. Ingen amyloid formation av αS kunde observeras under dessa förhållanden. Samma lipidmodell undersöktes även med en ökande andel av kolesterol (10-40 %). Resultatet visade ingen formation av amyloida fibriller, vilket indikerar att kolesterol i sig inte bidrar till aggregation av αS [19].

Jo m.fl. undersökte hur sekundärstrukturen hos αS^{A53T} och αS^{WT} förändrades med ökande lipidkoncentration. Membranmodellerna bestod av varierande förhållande av POPC¹⁴ (1-Palmitoyl-2-oleoyl fosfatidylkolin) och POPS¹⁵ (1-palmitoyl-2-oleoyl

¹³AFM är förkortat från engelskans *Atomic-force microscopy*

¹⁴POPC är förkortat från engelskan *1-Palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine*

¹⁵POPS är förkortat från engelskans *1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylserine*

fosfatidylserin). Resultaten visade en tydlig övergång till α -helixstruktur vid ökande lipidkoncentration, men ingen signifikant skillnad kunde konstanteras mellan WT och A53T i något utav förhållandena [30].

Även inbindningen av αS^{WT} och αS^{A53T} till plana lipida dubbellager, med kompositionen POPC:POPS (1:1), studerades av Jo m.fl. [30]. En skillnad i inbindningshastighet mellan αS^{WT} och αS^{A53T} kunde konstateras, vilket indikerar att αS^{A53T} kan vara mindre effektiv med avseende på inbindning till membran, jämfört med αS^{WT} . Enligt Jo m.fl. kan en förklaring till detta vara att alanin, på plats 53 i αS , verkar som en stark α -helixbildare i proteinet. Då alanin på plats 53 i αS byts ut mot ett treonin kan denna egenskap försvagas. Eftersom αS^{A53T} inte binder lika effektivt till membran kan det innebära en relativt hög koncentration protein i cytosolen. Jo m.fl. diskuterar möjligheten att den höga cytosolkoncentrationen kan vara en bidragande faktor till aggregation av proteinet [30].

2.3 Analyismetoder

I detta avsnitt presenteras teorin för de biofysikaliska analysmetoder som använts för att studera αS :s aggregationskinetik, interaktionen mellan αS och membranmodeller, samt för att verifiera storleken på de liposomer som använts som membranmodeller.

2.3.1 Jonbyteskromatografi

Jonbyteskromatografi är en separationsmetod som bygger på att molekyler med olika nettoladdning separeras från varandra. Negativt laddade molekyler kan separeras genom att de attraheras till ett positivt laddat fast material [31].

Den isoelektriska punkten (pI) för ett protein definieras av det pH-värde där nettoladdningen för proteinet är noll. Det är den primära aminosyrasekvensen på ett protein som bestämmer pI. Vid ett givet pH-värde kommer proteiner att ha olika nettoladdning beroende på dess pI. Separation av proteiner kan ske med en förändring av pH eller saltgradient. För separation baserad på saltgradient ökas salthalten i vätskefasen kontinuerligt. Proteiner med få laddade grupper kommer att elueras vid låg salthalt, medan proteiner med många laddade grupper kräver högre saltkoncentration för eluering, eftersom dessa proteiner binder starkast till det fasta materialet [32].

2.3.2 Gelfiltreringskromatografi

Gelfiltreringskromatografi är en metod som kan användas för att separera proteiner baserat på storlek. Proteinlösningen laddas på en kolonn innehållande porösa kulor. Proteinerna transporteras genom materialet m.h.a. en mobil vätskefas. Tiden det tar för ett protein att passera kolonnen avgörs av dess diameter, vilket möjliggör storleksseparation av proteinerna [33]. Eftersom stora molekyler inte kan penetrera porerna kommer de att elueras först. Mindre molekyler kommer istället att passera genom porerna vilket resulterar i att de spenderar en längre tid i kolonnen [34].

2.3.3 Sonikering

Sonikering är en metod där högfrekventa ljudvågor används för att excitera molekyler i en lösning. Ett vanligt användningsområde är lysering av bakterieceller. Ljudenergin öppnar upp cellväggen och möjliggör extraktion av bl.a. proteiner. Sonikering kan också användas för att minska storleken på liposomer vars membran påverkas på ett liknande sätt av ljudvågorna. Detta möjliggör tillverkning av små liposomer med diameter runt 15-50 nm som kan vara svåra att tillverka med andra metoder [35].

2.3.4 Dynamisk ljusspridning

Dynamisk ljusspridning (DLS) är en metod som kan användas för att storleksbestämma partiklar på nano- till mikrometernivå. Diffusionen av partiklar i ett prov mäts genom att detektera fluktuationer av ljus som färdats genom provet [36]. Diffusionshastigheten kan översättas till partikelstorlek (radie) m.h.a. Stokes-Einsteins ekvation, ett matematisk samband som gäller under antagandet att partiklarna är sfäriska [37]. Eftersom detta antagande stämmer bra för liposomer är DLS ett användbart verktyg för att bestämma storleksfördelningen i liposomprover. DLS kan även användas för att säkerställa att ett prov endast innehåller en önskad storlek. Flera mätningar kan utföras per prov för att beräkna ett medelvärde och en normalfördelning [36]. Erhålls en samlad och icke-spridd normalfördelning innebär det att provet innehåller partiklar med liknande storlek.

2.3.5 Absorptionsspektroskopi

Absorptionsspektroskopi utnyttjar att molekyler absorberar ljus. Genom att låta ljus av specifik våglängd passera genom ett prov molekyler kan absorptionsen korreleras till koncentrationen genom Lambert Beers lag, se ekvation 1 [38],

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (1)$$

där A är absorbansen, ϵ är den molära absorbtiviteten vid vald våglängd ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l är sträckan ljuset färdas genom provet (cm) och c är koncentrationen (M). I α S, som andra proteiner, absorberar de aromatiska aminosyrorna ljus med våglängder runt 280 nm [38].

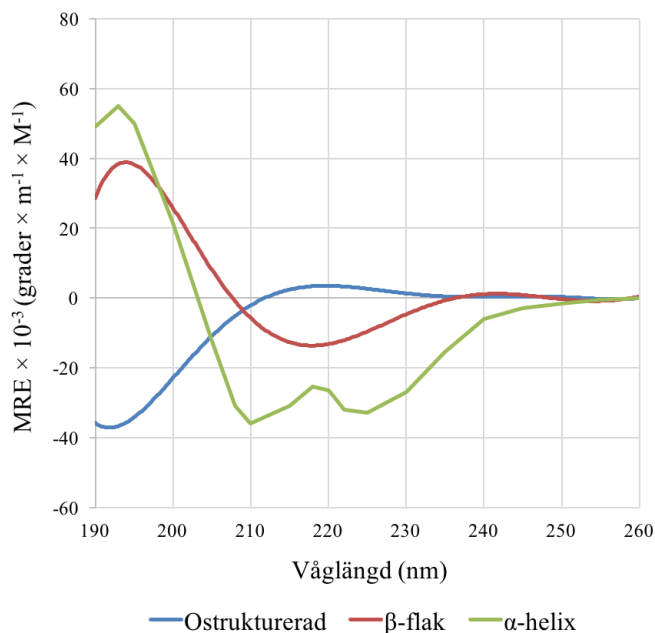
2.3.6 Cirkulär dikroism

CD är en metod som används för att bestämma proteiners sekundärstruktur där absorbansskillnaden mellan höger- och vänstervridet cirkulärpolariserat ljus mäts. Endast kirala och optiskt aktiva (absorberande) molekyler uppvisar CD, t.ex. peptidbindningar. Olika sekundärstrukturer ger upphov till specifika och karaktäristiska CD-spektrum [39]. Utifrån förändringar i CD kan mutationers inverkan på ett proteins sekundärstruktur undersökas och konformationsförändringar kan detekteras [40]. För att jämföra resultat från olika mätningar kan datan omvandlas till molär ellipticitet, $[\theta]_{MRE}$ ¹⁶, m.h.a. ekvation 2 [41],

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta_{obs}}{10 \times c \times N \times l} \quad (2)$$

där θ_{obs} är den observerade signalen (milligrader), c är koncentration av protein (M), N är antal peptidbindningar och l är kyvettlängden (cm). Då den molära ellipticiteten avsätts mot våglängden, erhålls proteinets CD-spektrum. Utseendet på spektrumet används för att dra slutsatser om sekundärstruktur. Ett protein utan definierad struktur ger upphov till ett minimum vid 195 nm och en mycket liten ellipticitet över 210 nm. För proteiner rika på β -flak fås istället ett maximum vid 195 nm samt ett minimum vid 213-218 nm. α -helixstruktur karaktäriseras av ett maximum vid 193 nm samt två minimum vid respektive 208 och 222 nm [40]. För en schematisk bild av de karaktäristiska CD-spektrumen för respektive sekundärstruktur, se figur 7.

¹⁶MRE är förkortat från engelskans *mean residue ellipticity*



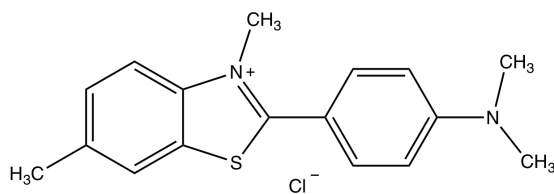
Figur 7: Karaktäristiska CD-spektrum för olika sekundärstrukturer. Ostrukturerad form (blå kurva) uppvisar en minimum vid 195 nm och låg ellipticitet över 210 nm. Proteiner rika på β -flak (röd kurva) uppvisar istället ett maximum vid 195 nm och ett minimum vid 218 nm. α -helixstruktur (grön kurva) kännetecknas av ett maximum vid 193 nm samt två minimum vid respektive 208 och 222 nm.

Grafens utseende kan även användas för information om övergången från ostrukturerad form till en α -helixrik sekundärstruktur, t.ex. under en titrering av liposomer till ett protein eller vice versa. Om det i en serie av spektrum förekommer en isosbestisk punkt, dvs. en våglängd där CD-signalen förblir konstant trots strukturell förändring, sker övergången mellan två tillstånd i endast ett steg [42]. För att undersöka hur α -helixinnehållet förändras vid tillsats av lipider, kan den molära ellipticiteten vid 222 nm avsättas som funktion mot ökande lipidkoncentration.

2.3.7 Fluorescensspektroskopi

Fluorescensspektroskopi mäter emitterat ljus från molekyler i ett prov. Metoden bygger på användningen av en ljuskälla som exciterar elektronerna i den molekyl som studeras. När elektronerna exciteras kommer molekylen, om den är fluorescent, att emittera ljus med en längre våglängd än vad den belystes med för att återvända till grundtillståndet [43]. I fallet med det amyloidbindande färgämnet ThT, se figur 8, så är molekylen icke-fluorescent i lösning, men hög-fluorescent då den är bunden till fibriller. Denna ökande fluorescens beror på att ThT antar en mer dynamisk form då

den är fri i lösning, vilket ger möjlighet för energin från den exciterade molekylen att delvis försvinna i form av värme. Då ThT är bundet till de amyloida fibrillerna, antas en konfiguration (utan rotationsmöjligheter runt interna bindningar) och molekylen avger excitationenergin i form av emitterat ljus. En ökad fluorescenssignal indikerar därmed förekomst av amyloida fibriller. Däremot finns det inget känt samband mellan mängd emitterat ljus från ThT och mängd proteinaggregat. Därför kan endast en förändring i ökad fluorescens kopplas till en ökad aggregation och inte mängd aggregat [44]. ThT ger endast fluorescenssignal då större aggregat förekommer i lösning, inte för oligomerer [45].



Figur 8: Sturkturformel av färgämnet ThT ritad i programmet *ChemDraw*.

3 Metod

Genen för α S uttrycktes i bakterietypen *Escherichia coli* (*E. coli*) och proteinet renades för att få fram startmaterial fritt från andra proteiner och biomolekyler. Därefter framställdes liposomer och interaktionerna mellan α S och liposomerna studerades med CD. Slutligen utfördes aggregationsexperiment m.h.a. fluorescensspektroskopi.

3.1 Uttryck och rening av vildtyp och muterat α -synuklein i *Escherichia coli*

α S uttrycks genom transformation av plasmider, innehållande proteinkodande gener under kontroll av T7-lacsystemet, till *E. coli*. Reningen av α S sker stegvis. Först förstörs cellväggen och cellmembranet genom sonikering. Separation av α S från oönskade proteiner, membraner och DNA sker med en kombination av upphettning för denaturering, jonbyteskromatografi för separation med avseende på laddning, samt gelfiltrering för separation med avseende på storlek.

3.1.1 Uttryck av α -synuklein

Uttryck av α S^{WT}, α S^{A30P} och α S^{A53T} utfördes med *E. coli*-stammen *BL21*, där plasmider innehållande gener för uttryck av α S samt antibiotikaresistens mot karbencillin, tidigare transformerats in. För varje variant av α S förbereddes 1 L bakteriekultur. Lyckade transformationer i *E. coli* selekterades m.h.a. antibiotikaresistens.

För att vänja *E. coli* vid antibiotikan inkuberades de i frys (-20°C) över natt i LB-medium där karbencillin tillsattes. Dag två inkuberades kulturerna i 37°C, 220 rpm i LB-medium innehållande karbencillin, tills en optisk densitet (OD) på ca 0,5 uppnåddes. Här tas prov för SDS-PAGE analys. Laktosanalogen Isopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG) tillsattes för uttryck av α S och inkubering skedde under 5 tim vid 37°C och 220 rpm. Målproteinets uttryck kontrolleras av T7-lacsystemet, där transkriptionen aktiveras i närvaro av IPTG. Tillsatts av IPTG medför att α S uttrycks av de framgångsrikt transformerade bakterierna. Cellerna extraherades från lösning genom centrifugering och placerades i frys, -20°C.

3.1.2 Rening av α -synuklein

α S renades i flera steg. Först löstes cellerna i Tris-HCl buffert med pH 8,0 där proteasinhinhibitorblandning tillsattes för att motverka proteinnedbrytning, samt

enzymet DNaseI för att påskynda degradering av DNA. Cellerna lyserades m.h.a. sonikering i *Sonics Vibra-cellTM CV18* under 10 min (amplitud 70 %, pulslängd 5 s och pulsfrekvens var 15:e s). Sonikeringen förstörde cellmembranen och möjliggjorde extraheringen av α S.

För att rena α S från resterande cellinnehåll hettades de lyserade cellerna upp till 90°C under 10 min i ett vattenbad för att denaturera värmekänsliga proteiner och DNA. Proteiner separerades från övrigt cellinnehåll genom centrifugering vid 16000 g under 20 min. Supernatanten innehållande önskat protein filtrerades genom ett filter med 0,22 μ m porstorlek för att avlägsna eventuella kvarvarande större celldelar. En jonbyteskromatografi (se avsnitt 2.3.1) utfördes på proteinlösningen för proteinseparation med avseende på pI. Supernatanten laddades på en *Q-sepharose*-kolonn, som binder negativt laddade proteiner. Kolonnen tvättades med 20 mM Tris-HCl pH 8,0 (buffert A) och därefter eluerades inbundet protein mot en saltgradient, som åstadkoms genom att blanda buffert A med buffert B innehållande ökande mängd salt (20 mM Tris-HCl pH 8,0 med 1 M NaCl). Proteiner med olika pI sköljdes då ut vid olika salthalt. Eluatet, totalt 5 mL, samlades i olika provrör m.h.a. en fraktionsuppsamlare kopplad till kromatografisystemet. Absorbansmätning av eluatet utfördes kontinuerligt, för att kunna urskilja vilka provrör som troligast innehöll α S. Utvalda prov från jonbyteskromatografien utvärderades m.h.a. SDS-PAGE *NuPAGETM 4-12 % Bis-Tris* gel (1,0 mm x 12 brunnar). Gelen färgades med *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Provrören innehållande α S identifierades genom analys av gelen. Rent monomert α S ger upphov till ett band motsvarande en molekylvikt på ca 15 kDa. Provrören som bedömdes ha högst α S-innehåll poolades och centrifugerades under 10 min genom ett *Amicon[®] Ultra-15* centrifugeringsfilter, där partiklar och proteiner med en massa lägre än 10 kDa passerar filtret. α S passerar därmed inte filtret. Lösningen som inte passerat filtret (retentatet) pipetterades till eppendorfrör inför gelfiltreringskromatografi.

Gelfiltreringskromatografi utfördes för att skilja α S från kvarvarande proteiner genom storleksseparering. Proteinlösningen injicerades på en *S75 Superdex*-gelfiltreringskolonn, kopplad till en *ÄKTApurifierTM*, tillsammans med buffert A (se ovan). Absorbansen på eluatet från kolonnen mättes kontinuerligt och 3 mL portionerades successivt ut i olika provrör. Från absorbansmätningen av eluatet valdes rör ut innehållande målproteinet. SDS-PAGE utfördes som kontroll, och prov valdes ut innehållande α S.

Proven koncentrerades igen m.h.a. centrifugering genom *Amicon[®] Ultra - 15*

centrifugeringsfilter tills en α S-koncentration på minst 2 mg/mL uppnåts, motsvarande en absorbans på ca 0,8 vid 280 nm. Absorbansen kontrollerades i *NanoDrop*, en absorptionsspektrofotometer. Rent α S portionerades ut i cryorör för förvaring i -80°C .

3.2 Framställning och storlekskontroll av liposomer

Lipidförhållandet baserades på litteraturstudier, och låg till grund för liposomframställning. Lipiderna som valdes var DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol. Genom förångning i rotationsindunstare, vakuumtorkning, dehydrering och sonikering framställdes liposomer som användes i projektet.

3.2.1 Tillverkning av liposomer

Liposomer innehållande DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol med det molära förhållandet 30:20:25:25 tillverkades. En lipidblandning med total lipidkoncentration på 12 mM förbereddes, utifrån stocklösningar på 5 mg/ml för DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol, löst i kloroform. En lipidfilm tillverkades genom förångning av klorofomen i en rotationsindunstare. Filmen torkades sedan i vakuum över natt.

En 20 mM fosfatbuffert tillverkades genom att lösa $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ och $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i pulverform i Milli-Q vatten. pH justerades till 6,53 genom tillsats av 2 M HCl, och filtrerades med $0,2\ \mu\text{m}$ vakuumfilter, *ThermoScientific*TM *Nalgene*TM *Rapid – Flow*TM *90 mm Bottle Top Filter-1000 mL*. 1 mL filtrerad fosfatbuffert tillsattes till lipidfilmen, och liposomer tillverkades genom omrörning med vortex i 10 min. För att erhålla önskad storlek på liposomerna (30-50 nm) användes *Sonics Vibra-cell*TM *CV18* för sonikering med en amplitud på 40 % och en pulslängd på 10 s följt av 40 s paus. Den totala aktiva tiden var 3 min och 20 s med tre upprepningar.

3.2.2 Dynamisk ljusspridning för storleksbestämning av liposomer

Verifiering av önskad liposomstorlek utfördes m.h.a. DLS av typen *ZetaSizer*. För att noggrant kunna bestämma storleken på liposomerna utfördes tre mätningar vid 37°C . Viskositeten för lösningsmedlet antogs vara samma som vatten.

3.3 Karaktärisering av membraninteraktioner och proteinstruktur med cirkulär dikroism

CD används för att karaktärisera proteinvarianternas interaktion med membranmodellen. CD-spektrumet mättes i en *Jasco-810* eller en *Chirascan* spektropolarimeter vid 37°C. Koncentrationen av liposomer ökades successivt för varje mätning. Referensmätningar med enbart liposomer och buffert användes för bakgrundssubtraktion vid behandling av data. Mätningarna pågick under kort tid (1-2 tim, samt utan skakning), och därför gjordes antagandet att ingen aggregering skett under mätning av CD-spektrum.

3.3.1 Cirkulär dikroism för analys av sekundärstruktur

Sekundärstrukturen av αS^{WT} , αS^{A30P} och αS^{A53T} i relation till koncentration av liposomer undersöktes. För CD-mätning av de tre αS -varianterna användes protein från reningen, (1 mL av respektive αS^{WT} , αS^{A30P} och αS^{A53T}). Tris-bufferten i proverna byttes mot fosfatbuffert (20 mM, pH 6,53) genom centrifugering av 1 mL proteinlösning och 9 mL fosfatbuffert i ett 10 kDa *Amicon*[®] *Ultra* – 15 centrifugeringsfilter i 4°C och 5000 g i ca 30 min, tills ca 1 mL återstod av det ofiltrerade provet. Centrifugeringen upprepades tre gånger. Den ofiltrerade lösningen filtrerades med ett 0,2 μ m-sprutfilter och absorbans mättes med spektrofotometern *Agilent Cary 50 Bio* vid 280 nm. Från absorbansen beräknades proteinkoncentrationen m.h.a. ekvation 1. För αS antas den molära absorbtiviteten vara 5960¹⁷ M⁻¹cm⁻¹ vid 280 nm, då αS innehåller tre aromatiska tyrosiner.

Utifrån de beräknade stocklösningskoncentrationerna av respektive proteinvariant (Tabell 1 i bilaga C) och stocklösningen av liposomer, beräknades spädningsserier inför CD med lipid:proteinförhållanden mellan 0:1 och 300:1, se tabell 2 och tabell 3 i bilaga C.

Varje proteinvariant testades tre gånger, med små modifikationer mellan gångerna, se tabell 1 i bilaga C. Vid de första mätningarna ökades lipid:proteinförhållandet successivt medan proteinkoncentrationen hölls konstant, se tabell 2 i bilaga C. Förhållandet mellan lipider och protein ökades även genom titrering av liposomer till provet under resterande mätningar, vilket medför en liten förändring i proteinkoncentrationen, se tabell 3 i bilaga C. För varje mätning kördes även kontrollprover där protein ersattes av buffert.

¹⁷Den molära absorbtiviteten har beräknats i *ExPASy - ProtParam* vid 280 nm.

3.3.2 Behandling av data från cirkulär dikroism

Ett medelvärde för de tre CD-mätningarna beräknades för varje mätpunkt. För att möjliggöra jämförelse av experimenten korrigerades datan, genom subtraktion av kontroller med motsvarande lipidkoncentration. För prover utan motsvarande kontroll beräknades bakgrund utifrån närliggande koncentrationer. Datat omvandlades från milligrader m.h.a. ekvation 2 och angavs i genomsnittlig molär ellipticitet per sidokedja. Bakgrundskorrigerade CD-spektrum analyseras m.h.a. de karaktäristiska spektrumerna för olika sekundärstrukturer som visas i figur 7. För att jämföra α S-varianterna plottades den normaliserade datan vid utvalda lipid:proteinförhållanden, samt alla förhållanden vid 222 nm. Standardavvikelse beräknades utifrån de tre oberoende mätningarna för respektive proteinvariant.

3.4 Fluorescensspektroskopi för mätning av aggregationskinetik

För att karaktärisera α S:s aggregationsprocesser användes fluorescensspektroskopi och det amyloidbindande färgämnet ThT. Mätningen utförs med en 96-hålsplatta och fluorescenssignalen läses med plattläsare av typen *FLOUstart*[®] *Omega*, med inställningar 37°C, excitationfilter 440-10, emissionsfilter 490-10, cykeltid 10 min (varav 5 min skakning, 220 rpm), 800 cykler och sju olika förstärkningar (detektorn förstärker den emitterade fotonsignalen vid sju olika förstärkningar).

3.4.1 Aggregation av α -synuklein

Till aggregationen användes proteinerna i fosfatbuffert som förebereddes inför CD-mätningar. Beroende av proteinkoncentrationen i dessa prover, tillsattes sedan liposomer med sammansättningen DOPC:DOPS:DOPE:kolestrol (30:20:25:25) till varje prov, samt filtrerad 20 mM fosfatbuffert för att erhålla en proteinkoncentration på 50 μ M. ThT tillsattes till respektive prov för en slutkoncentration på 20 μ M. Lösningarna laddades på en 96-hålsplatta, med 50 μ L av varje prov i brunnarna och fem upprepningar för respektive prov, se bilaga D figur 20. Två prov med 50 μ L av ThT-lösning laddades också. För att påskynda aggregationen tillsattes en glaspärla, med en diameter på 2 mm, till varje aggregationsbrunn. Aggregationen startades i fluorescensspektrometern *FLOUstart*[®] *Omega*. Aggregationskinetiken studerades med enbart protein, fosfatbuffert och ThT samt vid olika lipid:proteinförhållanden (40:1 och 60:1) där slutkoncentration protein var 50 μ M. Lipid:proteinförhållande vid aggregationen valdes utifrån ett teoretiskt mättnadsvärde på 60:1 (se kapitel 2.2).

3.4.2 Behandling av data från fluorescensspektrokopi

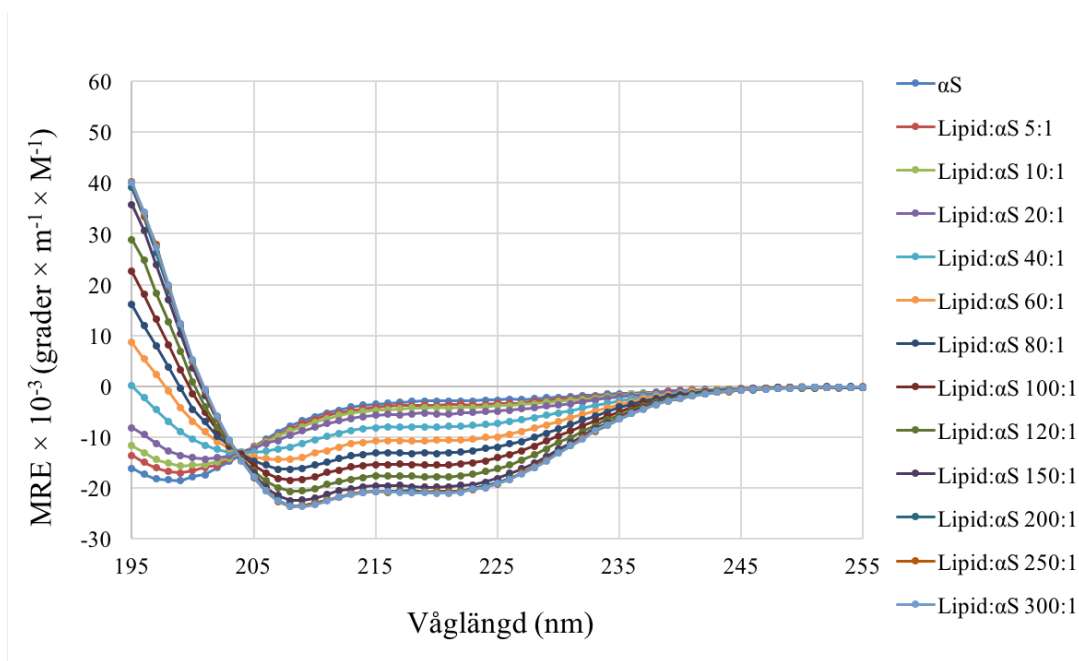
Utifrån datan som erhållits från *FLOUstart*[®] *Omega*, valdes den mest passande förstärkningen ut, dvs. den förstärkningen där de flesta replikaten för respektive proteinvariant ligger inom de dynamiska området. Med hjälp av förstärkningen beräknades ett medelvärde för brunnarna med endast liposomer och buffert (kontroll). Kontrollprovets medelvärden subtraherades från respektive proteinvariants fluorescenssignal från replikaten i de fem brunnarna. Medelvärde för respektive proteinvariant kunde sedan beräknas och avsättas mot tiden. Medelvärden för kontrollerna normaliserades genom att subtrahera det minsta värdet från varje datapunkt och dela med största värdet. De normaliserade medelvärdena för varje proteinvariant avsattes därefter mot tiden i en och samma graf. För varje proteinvariant gjordes ett stapeldiagram för aggregationen där de olika lipid:proteinförhållandena visas i procent för jämförelse mot den egna referensen, samt standardfel beräknades och infogades i form av felstaplar.

4 Resultat

I detta avsnitt ligger fokus på CD- och fluorescensresultat för α S. Efter inducerat uttryck av α S med IPTG i *E. coli* bekräftas att α S-genen uttrycks framgångsrikt, se figur 13 i bilaga A. Efter jonbyteskromatografi och gelfiltreringskromatografi, erhöles rent α S-protein (≥ 95 % rent enligt SDS-PAGE) för samtliga proteinvarianter (Figur 14 i bilaga A). Liposomstorlek bestämdes till på ca 35 nm m.h.a. DLS, se figur 17 i bilaga B.

4.1 Sekundärstrukturbestämning

Figur 9 visar bakgrundssubtraherade CD-spektrum för α S^{WT} i lösning och efter tillsats av ökande koncentration av liposomer, där förändring i sekundärstruktur kan observeras. Motsvarande data för α S^{A30P} och α S^{A53T} finns i bilaga C, se figur 18 och figur 19. Efter tillsats av av liposomer förändras CD-spektrumen för respektive protein och visar att proteinet går från en ostrukturerad form till en α -helixrik form, jämför med referensspektrum i figur 7.



Figur 9: CD-spektrum för α S^{WT} (5 μ M monomert protein i fosfatbuffert) med olika lipid:proteinförhållanden, angivet i molär ellipticitet. Liposomerna som används har en sammansättning av DOPC:DOPS:DOPE:kolesterol på 30:20:25:25.

I figur 9 syns en isosbestisk punkt för αS^{WT} vid ca 204 nm där ellipticiteten är densamma för alla lipid:proteinförhållanden. Denna isosbestiska punkt kunde också observeras för αS^{A30P} och αS^{A53T} , se figur 18 och figur 19 i bilaga C.

Figur 10 visar en jämförelse av de olika proteinvarianternas CD-spektrum, både i lösning utan liposomer (Figur 10a) och vid två olika lipid:proteinförhållanden (Figur 10b och c). Figur 10a visar att αS^{WT} såväl som αS^{A53T} och αS^{A30P} har ett tydligt minimum runt 195 nm samt låg ellipticitet över 210 nm som är karaktäristiskt för ostrukturerad form.

För ett lipid:proteinförhållande på 40:1 syns en förändring av kurvornas utseende för alla proteinvarianter (Figur 10b). Det är möjligt att se antydning till två minimum vid 208 och 222 nm vilket tyder på en förändring av sekundärstrukturen vid ökad koncentration av liposomer. αS^{A30P} uppvisade en mindre förändring jämfört med de andra proteinvarianterna. Däremot är det inte möjligt att se några skillnader mellan αS^{WT} och αS^{A53T} vid detta lipid:proteinförhållande. Då förhållandet mellan lipid och protein ökades till 200:1 kunde en avsevärd förändring av kurvans utseende konstateras jämfört med lägre förhållanden, se figur 10c. För alla tre proteinvarianter förekommer det ett maximum runt 193 nm samt två minimum vid 208 och 222 nm. Denna form motsvarar CD-spektrumet för ett α -helixinnehållande protein. Det är också möjligt att se skillnader mellan de olika proteinvarianterna. αS^{WT} visar den största strukturella förändringen följt av αS^{A53T} . Precis som vid lägre lipid:proteinförhållande är det αS^{A30P} som har minst förändring av molära ellipticiteten vid de karaktäristiska våglängderna för α -helixstruktur, jämfört med den ostrukturerade formen.

För att åskådliggöra hur sekundärstrukturen påverkas av liposomerna, avsettes den molära ellipticiteten vid 222 nm mot lipid:proteinförhållandet, se figur 10d. Det är tydligt att α -helixinnehållet ökar i de tre fallen. Den största förändringen av ellipticiteten erhöles av αS^{WT} . Båda mutationerna uppvisar mindre strukturförändringar vid tillsats av liposomer jämfört med αS^{WT} . För alla tre proteinvarianter är kurvorna linjära vid lipid:proteinförhållanden upp till 150:1, varefter utplaning sker. De olika varianterna skiljer sig åt med avseende på vid vilket lipid:proteinförhållande som utplaning sker, αS^{A30P} kräver ett högre lipid:proteinförhållande än αS^{WT} . Däremot förekommer inga tydliga skillnader mellan αS^{A53T} och αS^{WT} .

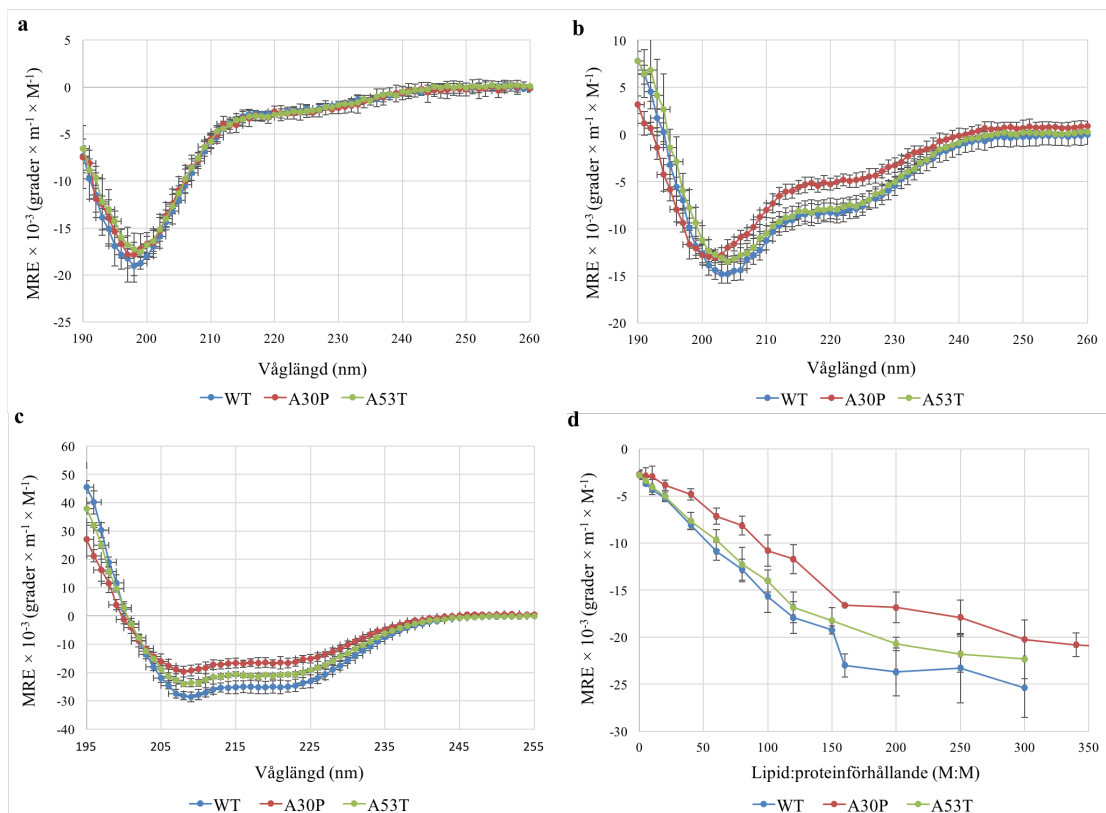


Figure 10: Grafer från CD-mätningar för de olika proteinvarianterna av α S (5 μ M monomert protein i fosfatbuffert) angivet i molär ellipticitet (y-axel). För varje mätvärde är standardavvikelse angivet i form av felstaplar baserade på replikat från tre oberoende mätningar. (a) CD-spektrum av endast protein. (b & c) CD-spektrum av prover med lipid:proteinförhållande på 40:1 respektive 200:1. (d) Graf över molär ellipticitet för olika lipid:proteinförhållanden vid 222 nm. Liposomerna som används är DOPC:DOPS:DOPE:kolesterol (30:20:25:25).

4.2 Aggregation av α -synuklein

Aggregation av proteinvarianterna genomfördes först endast i närvaro av liposomer, utan glaspärlor, se figur 21 i bilaga E. Till skillnad från Kiskis m.fl. [28] erhålls ingen fluorescensökning vid dessa förhållanden, och kommande mätningar utfördes därför med tillsatts av en glaspärla till varje brunn. I figur 11 visas graferna för referensprov med enbart protein, samt de tre utförda aggregationsförsöken för α S^{WT}, α S^{A30P} och α S^{A53T}. De normaliserade referensproven för respektive proteinvariant visas i figur 11a. I figur 11b-d visas resultat för α S^{WT}, α S^{A30P} och α S^{A53T} med lipid:proteinförhållande 40:1 och 60:1. Enligt resultatet från CD-mätningarna är dessa lipid:proteinförhållanden inom det linjära området (upp till 150:1), vilket indikerar att α S förekommer både i bunden och fri form.

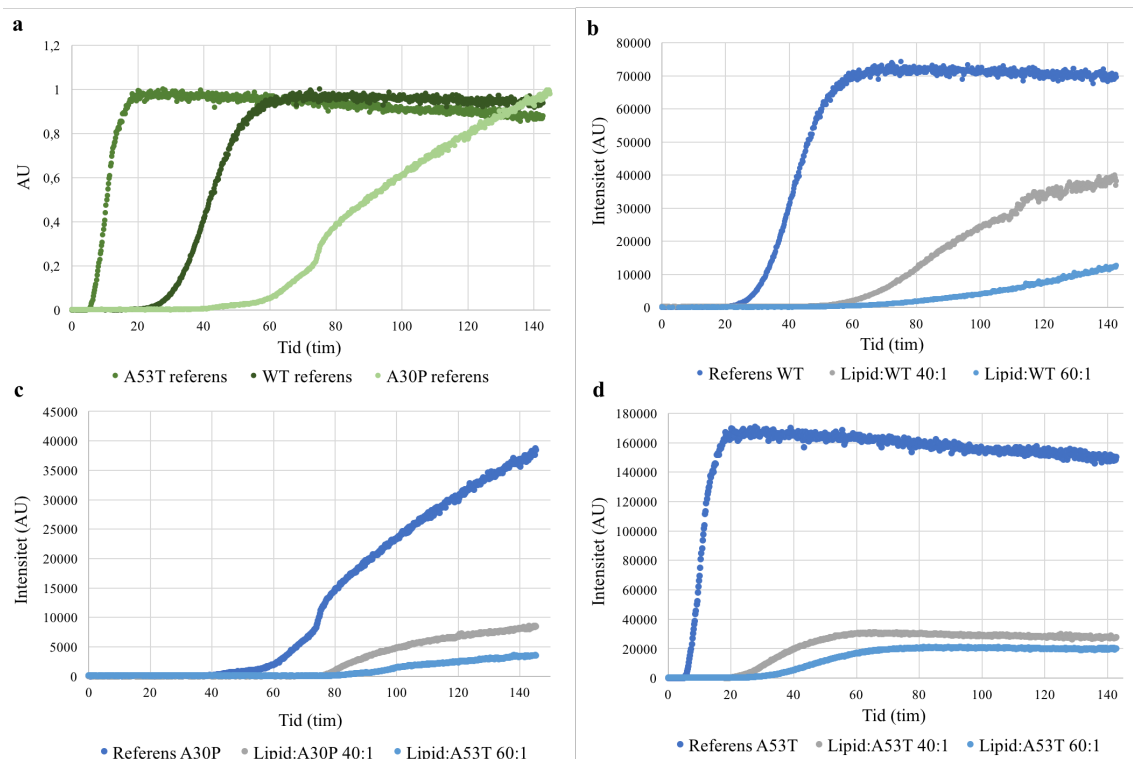


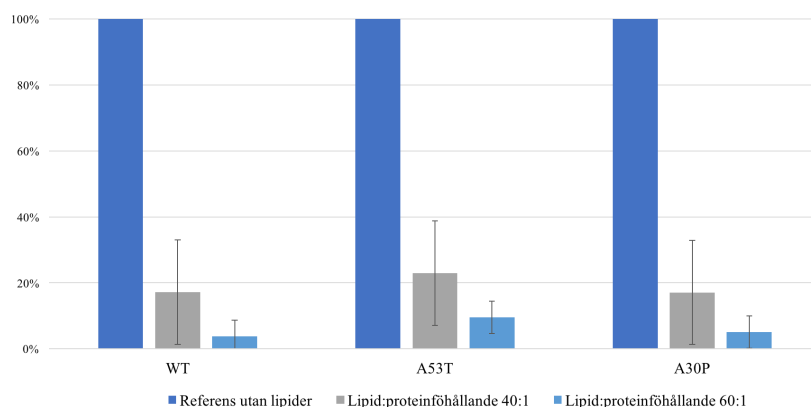
Figure 11: (a) Normaliserad data från referensprov (protein, fosfatbuffert och ThT) för respektive protein (αS^{WT} , αS^{A30P} och αS^{A53T}). Icke-normaliserad data med lipid:proteinförhållande för 40:1 och 60:1 samt referensprov för (b) αS^{WT} , (c) αS^{A30P} och (d) αS^{A53T} . Alla prover innehåller ThT, fosfatbuffert samt glaspärla.

I figur 11a med enbart de normaliserade proteinreferenserna, kan en aggregations-skillnad urskiljas. αS^{A53T} påbörjar aggregation tidigast, efter ca 5 tim, samt har snabbast logfas (5-20 tim). αS^{A53T} uppnår också stationärfas tidigast, efter ungefär 20 tim. αS^{WT} påbörjar aggregation efter ca 25 tim och kurvans logfas (25-60 tim) antar en något mindre brant lutning än αS^{A53T} . αS^{WT} uppnår stationärfas vid ca 60 tim. αS^{A30P} har den längsta lagfasen (0-50 tim), där logfasen börjar efter ca 50 tim och har en betydligt mindre lutning. Efter 140 timmars mätning har fortfarande inte stationärfas infunnit sig för αS^{A30P} .

Figur 11b-d, visar hur aggregationen för varje proteinvariant påverkas i närvaro av liposomer, jämfört med respektive proteinvariants referens. Varje graf visar aggregationskurvorna för referensen, lipid:proteinförhållande 40:1 och lipid:proteinförhållande 60:1. Alla tre grafer påvisar en inhiberad aggregation vid tillsatts av liposomer i jämförelse med respektive referens, där lipid:proteinförhållandet 60:1 inhiberar aggregationen mer än lipid:proteinförhållandet 40:1. Referensen för

αS^{WT} och de två αS -mutanterna antar lag-, log-, och stationärfas vid samma tidpunkter som tidigare nämnda normaliserade kurvor i figur 11a. För alla tre grafer uppvisas förlängd lagfas och mindre brant lutning under logfasen. För αS^{A53T} i figur 11d kan även stationärfasen vid närvaro av liposomer konstateras vara lägre än för referensen. För både αS^{A30P} och αS^{WT} har inte stationärfas uppnåtts efter 140 tim.

I figur 12 visas den procentuella aggregationen, baserat på ThT-signalens intensitet, för varje proteinvariant efter 90 timmars aggregation, där respektive referens motsvarar 100 %. Staplarna representerar ett medelvärde av referensernas replikat vid 90 tim. Figur 12 visar en tydlig minskning i aggregation jämfört med referenserna för samtliga proteinvarianter.



Figur 12: Procentuell emissionsintensitet från aggregatbundet ThT för αS^{WT} , αS^{A53T} och αS^{A30P} efter 90 timmars aggregation och vid tillsats av liposomer. De mörkblå staplarna visar respektive referensprov som bestämts till 100 %. Grå staplar visar den procentuella emissionen från ThT, bundet till proteinaggregat, i förhållande till respektive proteinvariants referensprov vid lipid:proteinförhållande 40:1. De ljusblå staplarna visar den procentuella emissionen från ThT, bundet till proteinaggregat, i förhållande till respektive proteinvariants referensprov vid 60:1. För lipid:proteinförhållandena 40:1 samt 60:1 har standardfelet beräknats och visualiseras i form av felstaplar.

5 Diskussion

Samtliga varianter av α S interagerar med membranmodellen. Vid interaktion med liposomer sker en förändring i proteinernas sekundärstruktur; från en ostrukturerad till α -helixrik form. Dessutom begränsar liposomerna proteinvarianternas aggregation.

5.1 Förändringar i sekundärstruktur

Strukturella förändringar för α S^{WT}, α S^{A30P} och α S^{A53T} observeras med CD vid ökat lipid:proteinförhållande, se figur 10. Genom att jämföra kurvornas utseende med de olika sekundärstrukturernas karaktäristiska CD-spektrum (Figur 7) konstateras att alla proteinvarianterna övergår från en ostrukturerad form till en α -helixrik form. Detta resultat är förenligt med tidigare studier av interaktioner mellan α S och liposomer. Bland annat har Flagmeier m.fl. visat att α S^{WT} såväl som α S^{A30P} och α S^{A53T} genomgår en liknande strukturförändring i närvaro av membranmodell bestående av de negativt laddade lipiderna DMPS [29].

För alla proteinvarianter kan även en isosbestisk punkt observeras vid en våglängd på ca 204 nm, se figur 9 samt figur 18 och figur 19 i bilaga C. Förekomsten av denna punkt indikerar att övergången från ostrukturerad till α -helixrik form sker i ett steg, vilket motiverar att antagandet om enstegsbindning vid CD-mätningarna är korrekt.

Vid mätningar med endast protein, motsvarar CD-spektrumet (Figur 10a) det karaktäristiska spektrumet för en ostrukturerad form, vilket gäller för alla tre proteinvarianter. Denna ostrukturerade form har i tidigare studier konstaterats för alla proteinvarianter, bl.a. av Li m.fl. [16]. Utan närvaro av liposomer kan inga sekundärstrukturella skillnader mellan α S^{WT}, α S^{A53T} och α S^{A30P} observeras i detta projekt.

Alla proteinvarianter uppvisar en viss strukturell förändring vid det lägre lipid:proteinförhållandet 40:1, från ostrukturerad till α -helixstruktur, se figur 10b. Vid detta förhållande kan en viss skillnad i sekundärstruktur mellan α S^{A30P} och de övriga proteinvarianterna konstateras. α S^{A30P} har ett CD-spektrum mer likt det karaktäristiska spektrumet för ostrukturerad form, se figur 7, jämfört med α S^{WT} och α S^{A53T}, vilket indikerar att α -helixinnehållet är lägre för α S^{A30P}. Eftersom denna mutation är lokaliserad till N-terminalen, vilken är ansvarig för interaktion

med lipidvesiklar, är det möjligt att utbytet av alanin till prolin vid position 30 påverkar proteinets förmåga att interagera med lipider. En annan möjlig förklaring är att punktmutationen istället påverkar bildning av α -helixstrukturer vid liposominteraktion. Mellan αS^{WT} och αS^{A53T} kan ingen tydlig skillnad i sekundärstruktur observeras, vilket även har konstaterats av Jo m.fl. [30] men då istället vid interaktion med membranmodeller bestående av POPC och POPS.

Vid ett lipid:proteinförhållande på 200:1 kan differens i sekundärstruktur observeras för alla proteinvarianter, se figur 10c. αS^{WT} visade det högsta α -helixinnehållet vid lipid:proteinförhållandet 200:1, följt av αS^{A53T} och sedan αS^{A30P} en minst förändring av sekundärstruktur. Detta resultat indikerar att båda mutationerna leder till lägre α -helixinnehåll än αS^{WT} vid en hög halt av lipider. För att avgöra om skillnaden av α -helixinnehåll orsakas av minskad interaktion med liposomer eller strukturella skillnader av proteinet vid liposominteraktion, krävs ytterligare studier där bindning och strukturändring kan separeras.

I figur 10d där den molära ellipticiteten vid 222 nm plottades, kan ett linjärt samband urskiljas mellan α -helixstruktur och låga lipid:proteinförhållanden (upp till 150:1). Vid högre lipid:proteinförhållanden planar graferna ut, vilket indikerar att lösningen är mättad, dvs. att ingen ytterligare inbindning av protein till liposomer sker. Mättnaden sker vid något olika förhållanden för de olika proteinvarianterna, men för alla varianter ligger mättnadsförhållandet mellan 150:1 och 300:1. Värdet är precis som förväntat högre än det teoretiska mättnadsförhållandet på 60:1, eftersom liposomerna innehåller zwitterjoniska lipider vilket ökar detta förhållande, vilket nämns i kapitel 2.2. För αS^{A30P} krävs en högre halt liposomer innan lösningen mättats jämfört med αS^{WT} . Denna mättnadsförskjutning kan indikera att det minskade α -helixinnehållet är en konsekvens av försämrad interaktion med lipidvesiklar orsakad av mutationen. Mellan αS^{A53T} och αS^{WT} kan ingen tydlig skillnad av mättnadsförhållande urskiljas. Däremot kan en skillnad observeras i α -helixinnehåll mellan αS^{WT} och αS^{A53T} . En möjlig förklaring till denna observation, är en försvagning av proteinets förmåga att forma α -helixstruktur vid utbyte av den starka α -helixbildaren alanin vid position 53 mot treonin. Denna förklaring har även föreslagits av Jo m.fl [30].

5.2 Aggregation av α -synuklein

Aggregationsresultatet visar att liposomerna bestående av DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol med förhållandet 30:20:25:25, inhibererar aggregation av samtliga

varianter α S. För att jämföra de olika proteinvarianterna med varandra, måste en normalisering av aggregationskurvorna göras, vilket kräver att kurvorna når stationärfas. Aggregationssmätningarna för samtliga varianter pågick under 140 tim utan att de nådde stationärfas, därefter är det svårt att fortsätta med fluorescensmätningarna då många av proven börjat evaporera. Resultaten från fluorescensmätningarna kan därför inte användas för att jämföra aggregationsinhibering mellan proteinvarianterna. Vi valde istället att jämföra varje proteinvariant mot respektive referensprov.

För α S^{A53T} sker aggregationen betydligt snabbare än för både α S^{WT} och α S^{A30P} vid jämförelse av protein utan närvaro av liposomer. α S^{A30P} uppvisar en längre lagfas och en lägre aggregationshastighet än α S^{WT} och α S^{A53T}. En minskad aggregation för α S^{A30P} har även Lázaro m.fl. [15] visat på *in vivo*. En möjlig förklaring är skärmningen av NAC-domänen till följd av ökad interaktion mellan N- och C-terminalen i proteinet p.g.a punktmutationen. Som tidigare nämnts har α S^{A30P} en mindre alfa-helixrik struktur i närvaro av liposomer, jämfört med övriga proteinvarianter vilket kan bero på en minskad interaktion med liposomer. Om denna minskning har ett samband med den lägre aggregationshastigheten är inte möjligt att fastställa i detta projekt.

En tydlig skillnad av lagfasen för de olika proteinvarianterna kunde observeras, med en förlängning av lagfasen för α S^{A30P} och en kortare lagfas för α S^{A53T} gentemot α S^{WT}. Vid logfasen syns en ökad fluorescenssignal vilket indikerar att större aggregat bildas i denna fas. Det antas att oligomerer bildas i lagfasen, men inte ger upphov till ökad ThT-fluorescens. Lázaro m.fl. har visat på en ökad ackumulering av oligomerer *in vivo* för både α S^{A30P} och α S^{A53T} [15]. Om detta även sker *in vitro* är inte möjligt att konstatera i detta projekt. Däremot är en ökad oligomerisering en möjlig förklaring till skillnaderna i aggregation av α S^{A30P} och α S^{A53T} jämfört med α S^{WT}. För α S^{A53T} är det möjligt att ökad oligomerisering minskar lagfasen, och leder till den snabbare aggregation som observeras i figur 11a. För α S^{A30P} kan istället den mutationsinducerade skärmningen av NAC-domänen orsaka en fördröjning av bildandet av större aggregat även om oligomeriseringen är ökad eller oförändrad jämfört med α S^{WT}. α S^{A53T} visar på en brantare lutning på logfasen vilket indikerar att tillväxten av aggregaten sker snabbare. För α S^{A30P} kunde istället en mindre brant lutning observeras, vilket skulle kunna vara ett resultat av långsammare oligomerisering eller tillväxt.

I likhet med resultaten från studien utförd av Galvagnion m.fl. [19] så verkar

en membranmodell bestående av DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol inte initiera aggregation, utan snarare inhibera denna process, se figur 11b-d. Galvagnion m.fl. [19] föreslår att lösligheten hos lipiderna, som används i sammansättningen av membranmodellen, påverkar aggregationen. I samma studie undersöktes olika typer av liposommodeller däribland DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol, men även liposomer bestående av enbart DMPS. Modellen innehållande DMPS verkade istället främja aggregationen av α S. DMPS är lös i vatten, medan liposomerna som använts i detta projekt inte är vattenlösliga. Liposomernas löslighet skulle därför kunna vara en bakomliggande faktor till varför aggregationen inhiberas i detta fall. En annan möjlig förklaring till liposomernas effekt på inhiberingen är lipidernas laddning, då denna egenskap har visats ha betydelse för interaktion mellan α S och liposomer.

Till skillnad från Flagmeier m.fl. [29] som visar på en liposominducerad initiering av aggregering med DMPS och Kiskis m.fl. [28] som visar ökad aggregering med DOPS och DOPG, så konstaterar vi att liposomer med en sammansättning på DOPC:DOPE:DOPS:kolesterol (30:20:25:25) inhiberar aggregering av alla proteinvarianter, se figur 12. Det går inte att säga huruvida det är någon signifikant differens mellan proteinvarianterna, eller mellan lipid:proteinförhållandena 40:1 och 60:1. Vid de studerade lipid:proteinförhållandena förekommer α S både i fri och liposombunden form eftersom mättnad inte uppnåts. Det innebär att inhibering av fibrilltillväxt inte enbart kan förklaras av fullständig inbindning av proteiner till liposomerna.

Då sammansättningen av synaptiska vesiklar förändras med åldern skulle det vara av intresse att i framtida studier undersöka hur interaktion och aggregation av α S^{WT} samt mutanterna förändras i närvaro av membranmodeller med varierande sammansättning.

5.3 Metodreflektion

I projektet valdes α S att uttryckas i *E. coli* vilket är en enkel organism att arbeta med. Organismen kan producera relativt stor mängd protein, jämfört med t.ex. jäst eller mammalieceller och har en kortare generationstid. *E. coli* är begränsad i sin förmåga att skapa posttranslationella modifieringar och ge proteiner dess korrekta struktur. För α S är den strukturella aspekten inte en särskilt stor begränsning, då proteinet är ostrukturerat i lösning. Däremot har ett antal posttranslationella modifieringar involverade i aggregation, såsom fosforylering, identifierats specifikt för α S. Genom valet av *E. coli* som system för proteinuttryck

är det inte möjligt att studera aggregationen med representativa modifieringar. Det finns även en risk att proteinet aggregerar redan i bakteriecellerna. Dessa aggregat separeras bort vid reningen men kan resultera i minskad mängd erhållet protein som bl.a. begränsar valet av lipid:proteinförhållanden. Två olika typer av kromatografiska metoder, jonbyteskromatografi samt gelfiltreringskromatografi, separerar proteiner både efter isoelektrisk punkt och storlek, vilket resulterar i en renare produkt. Nackdelen med att rena i flera steg är att förlusterna av protein ökar.

Vid tillverkning av liposomer av önskad storlek används sonikering. En nackdel med sonikering är dock att inte alla vesiklar kommer ha exakt samma storlek, vilket hade kunnat åstadkommas genom att tvinga liposomerna genom ett filter med definierad porstorlek (s.k. extrudering). I detta projekt prioriterades tillverkning av liposomer med en storlek motsvarande synaptiska vesiklar framför homogenitet. Mätmetoden DLS rapporterar storleken på liposomerna, via intensitet eller volymprocent, vilket framhäver storleksspridningen på olika sätt. DLS är även känslig för bubblor och eventuella dammpartiklar i provet, vilket kan påverka storleksbestämningen av liposomerna.

CD är en användbar metod för att studera strukturella förändringar av proteiner, från t.ex. ostrukturerad form till α -helixstruktur. Däremot ger inte metoden något exakt mått på antal α -helixar. Det är inte möjligt att fastställa med CD om strukturella skillnader är ett resultat av minskad interaktion med liposomer eller förändrad struktur vid interaktion. Här krävs metoder som ITC och Biacore som mäter bindning direkt.

I fluorescensspektroskopi är det egentligen inte själva aggregationen som mäts utan fluorescens av ThT. ThT fluorescerar mer då det är bundet till amyloida fibrer, vilket medför att det inte är möjligt att studera skillnader i oligomerer mellan de olika proteinvarianterna då dessa finns i lagfasen där fluorescensen är låg. Det finns även en risk att ThT påverkar aggregationen vid interaktionen med amyloida fibrer, och det är inte helt känt hur ThT binder till amyloida fibrer. Om de olika proteinvarianternas aggregat ser olika ut kan de i sin tur påverka inbindningen av ThT och därmed emissionen, vilket kan ge ett missvisande resultat. För att säkerställa att α S bildar β -flakrika aggregat kan CD användas. AFM, som är en metod för att studera tredimensionella strukturer, kan användas för att undersöka morfologi av de olika proteinvarianternas amyloida fibrer. Mängd fibrer som bildats i varje experiment kan kvantifieras m.h.a. centrifugering följt av SDS-PAGE av kvarvarande lösligt protein.

6 Slutsats

Sammanfattningsvis interagerar αS^{WT} samt valda proteinmutanter (αS^{A30P} och αS^{A53T}) med liposomer, och ändrar struktur samt aggregerar i viss omfattning i närvaro av liposomer och glaspärla.

Samtliga proteinvarianter har vid interaktion med syntetiska liposomer observerats övergå från en ostrukturerad form till en α -helixrik form. Ingen skillnad i sekundärstruktur kan urskiljas mellan de tre proteinvarianterna utan närvaro av liposomer. En linjär ökning av α -helixinnehållet kan ses för alla tre proteinvarianter vid låga lipid:proteinförhållanden, upp till 150:1. Vid högre förhållanden sker ingen ytterligare inbindning av protein till liposomer. Vid lipid:proteinförhållandet 40:1 är proteinet i övergången mellan ostrukturerad form och α -helixstruktur. CD-mätningarna visar däremot på en tydlig α -helixrik sekundärstruktur vid förhållande 200:1. αS^{A30P} samt αS^{A53T} har lägre α -helixinnehåll än αS^{WT} vid en högre halt av lipider.

I frånvaro av liposomer aggregerar samtliga proteinvarianter med varierande hastighet, mutationen A53T ökar aggregationshastigheten medan A30P minskar hastigheten jämfört med αS^{WT} . Membranmodellen av DOPC, DOPS, DOPE och kolesterol har i detta projekt visats inhibera snarare än att initiera aggregationsprocessen för samtliga proteinvarianter. Däremot kan ingen skillnad i inhibering mellan de olika proteinvarianterna observeras.

Våra resultat visar på många likheter med tidigare utförda studier. Dessutom har vi kunnat konstatera inhibering av aggregation för samtliga proteinvarianter i närvaro av vår specifika membranmodell, vilket skiljer sig från tidigare studier av aggregationskinetik i närvaro av liposomer/membraner. Eftersom orsaken till bildningen av Lewykroppar och insjuknandet i PD ännu är okänd, är det viktigt att få en bild av biofysikaliska egenskaper hos αS^{WT} och sjukdomsalstrande muterade varianter, samt hur dessa påverkas i närvaro av olika typer av membranmodeller. Resultaten från detta projekt är en bra utgångspunkt för vidare studier där liposomkomposition varieras systematiskt och fler tekniker nyttjas för analys.

Många frågor runt αS :s normala funktion samt hur cellulära komponenter (så som membraner och vesiklar) startar och/eller påverkar aggregering till (farliga) oligomerer och amyloida fibrer av αS är fortfarande obesvarade.

Källförteckning

- [1] Andersson I. 1177 Vårdguiden, Parkinsons sjukdom; 2015. [Online; Hämtad 21 april 2017]. Tillgänglig från: <https://www.1177.se/Vastra-Gotaland/Fakta-och-rad/Sjukdomar/Parkinsons-sjukdom/?ar=True>.
- [2] DeMaagd G, Phillips A. Parkinson's disease and its management, Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. Pharmacy and Therapeutics. 2015;40(8):504–532.
- [3] Spillantini M, Crowther R, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy Bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy Bodies. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 1998;95(11):6469–6473.
- [4] Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. BNature Medicine. 1998;4(11):1318–1320.
- [5] Greten-Harrison B, Polydoro M, Morimoto-Tomita M, Diao L, Williams AM, m fl. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(45):19573–19578.
- [6] Rappley I, Myers DS, Milne SB, Ivanova PT, LaVoie MJ, m fl. Lipidomic Profiling in Mouse Brain Reveals Differences Between Ages and Genders, with Smaller Changes Associated with α -Synuclein Genotype. Journal of neurochemistry. 2009;111(1):15–25.
- [7] Nationalencyklopedin. Hjärna; 2017. [Online; Hämtad 25 april 2017]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/hjärna>.
- [8] Merriam-Webster Inc. Anion Exchange Chromatography; 2017. [Online; Hämtad 25 april 2017]. Tillgänglig från: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/substantia%20nigra>.
- [9] Breydo L, Wu JW, Uversky VN. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2012;1822(2):261–285.

- [10] Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(1):38–48.
- [11] Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo C, Aguayo L. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson’s disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2015;9:59.
- [12] Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson’s Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2011;2(2):a009399.
- [13] Popova B, Kleinknecht A, Braus GH. Posttranslational Modifications and Clearing of α -Synuclein Aggregates in Yeast. *Biomolecules*. 2015;5(2):617–634.
- [14] Oczkowska A, Kozubski W, Lianeri M, Dorszewska J. Mutations in PRKN and SNCA Genes Important for the Progress of Parkinson’s Disease. *Current Genomics*. 2013;14(8):502–517.
- [15] Lázaro DF, Rodrigues EF, Langohr R, Shahpasandzadeh H, Ribeiro T, m fl. Systematic Comparison of the Effects of Alpha-synuclein Mutations on Its Oligomerization and Aggregation. *PLoS Genetics*. 2014;11(10):e100474.
- [16] Li J, Uversky VN, Fink AL. Conformational Behavior of Human α -Synuclein is Modulated by Familial Parkinson’s Disease Point Mutations A30P and A53T. *NeuroToxicology*. 2002;23(4-5):553–567.
- [17] Shinitzky M. Patterns of lipid changes in membranes of the aged brain. *Gerontology*. 1987;33(3-4):149–154.
- [18] Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG. Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival. *Progress in Lipid Research*. 2012;51(1):23–25.
- [19] Galvagnion C, Brown JWP, Ouberaï MM, Flagmeier P, Vendruscolo M, m fl. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 2016;113(26):7065–7070.
- [20] Bellani S, Sousa VL, Ronzitti G, Valtorta F, Meldolesi J, Chieriegatti E. The regulation of synaptic function by α -synuclein. *Communicative Integrative Biology*. 2010;3(2):106–109.

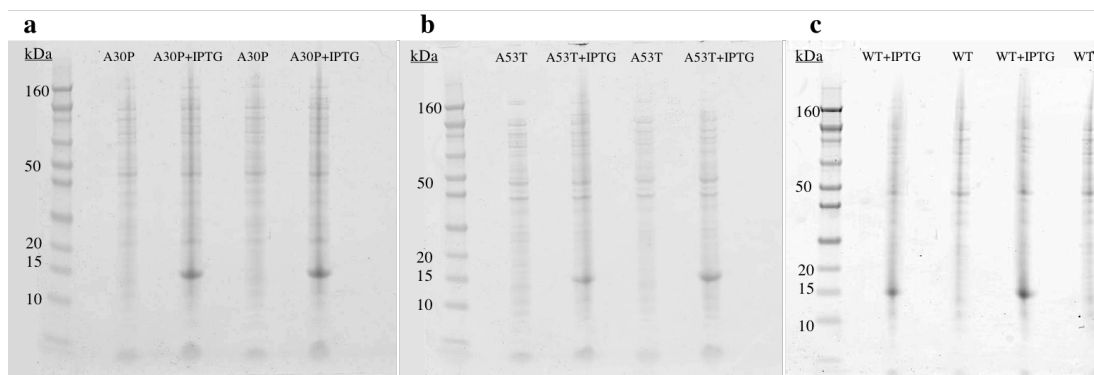
- [21] Südhof TC. Composition of Synaptic Vesicles. I: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Albers WR, Fisher SK, Uhler MD, redaktörer. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6:e uppl. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. s. 175-178.
- [22] Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, m fl. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. Communicative Integrative Biology. 2010;3(4):325–353.
- [23] Rosa P, Fratangeli A. Cholesterol and synaptic vesicle exocytosis. Communicative integrative biology. 2010;3(4):352–3.
- [24] Lim L, Wenk MR. Neuronal Membrane Lipids – Their Role in the Synaptic Vesicle Cycle. I: A. Lajtha, G. Tettamanti, G. Goracci, redaktörer. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Boston, MA: Springer US; 2009. s. 223-238.
- [25] Karnawat R, Kiskis J, Rocha S, Wittung-Stafshede P. Interaction of α -synuclein with membranes: Role of lipid properties. 2016;1.
- [26] Munishkina LA, Fink AL. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2007;1768(8):1862–1885.
- [27] Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. Protein Cell. 2015;6(4):254–264.
- [28] Kiskis J, Horvath I, Wittung-Stafshede P, Rocha S. Unraveling amyloid formation paths of Parkinson’s disease protein α -synuclein triggered by anionic vesicles. Quarterly Reviews of Biophysics. 2017;50:1–9.
- [29] Flagmeier P, Meisla G, Vendruscolo M, Knowles TPJ, Dobson CM, m fl. Mutations associated with familiar Parkinson’s disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 2016;37(113):10328–10333.
- [30] Jo E, McLaurin J, Yip CM, George-Hyslop PS, Fraser PE. α -Synuclein Membrane Interactions and Lipid Specificity. The Journal of Biological Chemistry. 2000;275(44):34328–34334.

- [31] GE Healthcare Life Sciences. Ion Exchange Chromatography; Principles and Methods; 2001. [Online; Hämtad 14 april 2017]. Tillgänglig från: http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Ion%20Exchange%20Chromatography.pdf.
- [32] Bio-Rad Laboratories. Anion Exchange Chromatography; 2017. [Online; Hämtad 27 april 2017]. Tillgänglig från: <http://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/liquid-chromatography-principles/ion-exchange-chromatography>.
- [33] Striegel AM, Yau WW, Kirkland JJ, Bly DD. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography, 2:a uppl. John Wiley Sons Inc; 2009.
- [34] Hunt BJ. Mechanisms of Size Exclusion Chromatography. I: Hunt BJ, Holding SR, redaktörer. Size Exclusion Chromatography. Springer-Science and Business Media, B.V.; 1989. s.9-11.
- [35] Avanti Polar Lipids, Inc. Liposome preparation. Sizing of lipid suspension - Sonication; 2017. [Online; Hämtad 4 april 2017]. Tillgänglig från: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>.
- [36] Instruments L. Dynamic Light Scattering for particle sizing and measurement of particle size distribution; 2017. [Online; Hämtad 4 maj 2017]. Tillgänglig från: www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/.
- [37] Sartor M. Dynamic Light Scattering to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution; 2016. [Online; Hämtad 1 maj 2017]. Tillgänglig från: <https://studylib.net/doc/10904420/dynamic-light-scattering-a-solution>.
- [38] Perkampus HH. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1992. s.2, 12-16.
- [39] Nationalencyklopedin. Optisk aktivitet; 2017. [Online; Hämtad 24 april 2017]. Tillgänglig från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/optisk-aktivitet>.
- [40] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nature protocols. 2006;1(6):3876–2890.

- [41] Delahay R, Balkwill G, Bunting K, Edwards W, Atherton J, Searle M. The Highly Repetitive Region of the *Helicobacter pylori* CagY Protein Comprises Tandem Arrays of an α -Helical Repeat Module. *Journal of Molecular Biology*. 2008;377(3):956–971.
- [42] N Errington AJD T Iqbalsyah. Structure and Stability of the α -Helix. I: Guerois M, López de la Paz M, redaktörer. *Protein Design: Methods and Applications*. Totora, New Jersey: Humana Press Inc; 2006. s.13.
- [43] Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3:e uppl. University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA: Springer US; 2006.
- [44] Biancalana M, Koide S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(7):1405–1412.
- [45] Persichilli C, Hill S, Mast J, Muschol M. Does Thioflavin-T Detect Oligomers Formed During Amyloid Fibril Assembly. *Biophysical Journal*. 2011;100(3):538a.

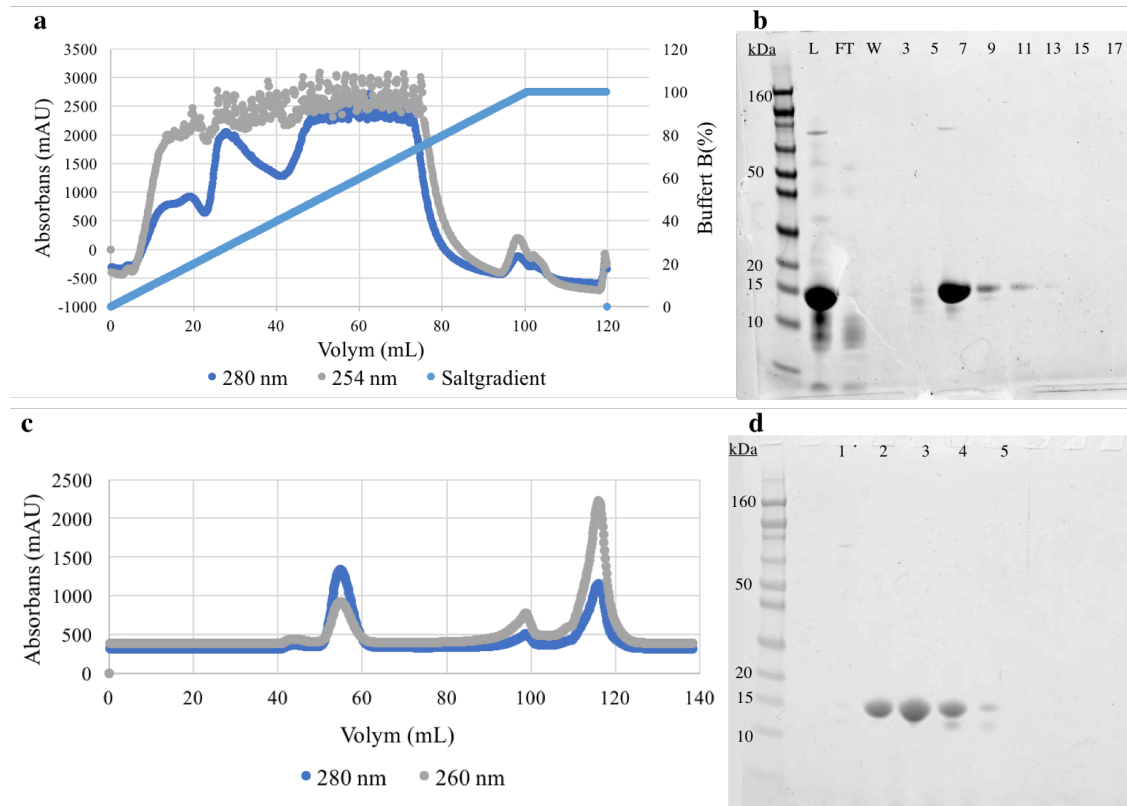
A Uttryck och rening av α -synuklein

Figur 13 visar en Coomassie-infärgad SDS-PAGE efter expression av protein. α S syns vid ca 15 kDa i brunnar med tillsatt IPTG.



Figur 13: SDS-PAGE efter expression men före rening av protein (a) α S^{A30P}, (b) α S^{A53T} och (c) α S^{WT}. Brunnarna innehåller prover från *E. coli*-kulturerna innan tillsats av IPTG (mutationens namn) och efter tillsats (mutationens namn + IPTG). α S finns endast i de brunnar där IPTG har tillsats till kulturerna, vilket kan urskiljas av det breda bandet vid 15 kDa.

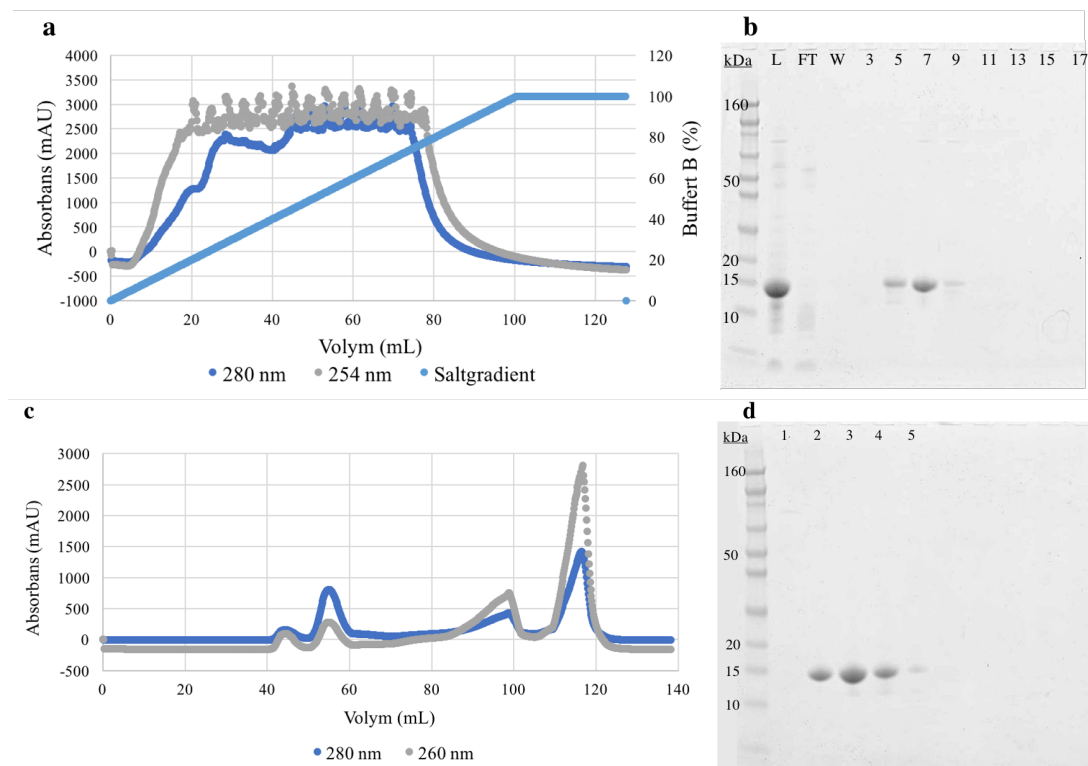
Figur 14 visar resultaten från reningen av α S^{WT}. Figur 14a visar absorbtionsspektrumet från jonbyteskromatografin och figur 14b visar bild på SDS-PAGE efter jonbyteskromatografin (provrör 3, 5, 7, 11, 13, 15 och 17 motsvarande volymer (mL) 15, 25, 35, 55, 65, 75 och 85 som passerat kolonnen). På gelen visas även prover på den filtrerade supernatanten (L), efter laddning till jonbyteskolonnen (FT) samt efter rening av maskinen (W). Från gelen framgår det att α S främst finns i rör 3, 5, 7, 11 och 13. Dessa fem prover valdes för fortsatt rening med gelfiltreringskromatografi, se figur 14c, där α S^{A53T} kan urskiljas i första toppen vid 45-60 mL. En sista kontroll med SDS-PAGE utfördes (Figur 14d) för att säkerställa att α S var isolerat och att provet var renat från oönskade proteiner.



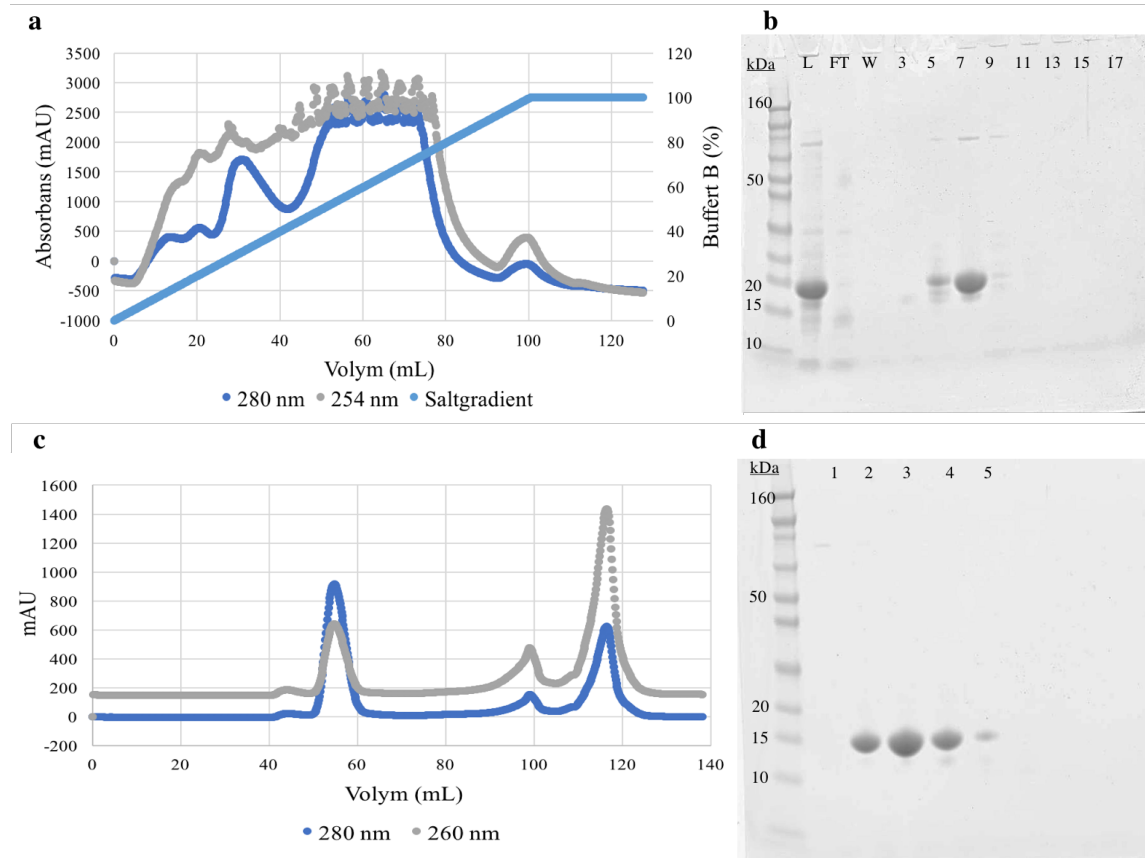
Figur 14: (a) Jonbyteskromatografi för αS^{WT} , där proteinet elueras ut mellan 40-80 mL. På x-axeln visas volymen i mL, på den primära y-axeln visas absorbansen i milliabsorptionsenhet (mAU^{18}) och på den sekundära y-axeln visas den ökande buffert B i procent, där 100 % motsvarar en salthalt på 1 M NaCl. (b) SDS-PAGE för αS^{WT} efter jonbyteskromatografi, där första brunnan från vänster är molekylviktsstegen. De tre följande brunnarna är prov från filterade supernatanten (*L*), prov efter laddning i jonbyteskolonnen (*FT*), samt ett prov från reningen av maskinen (*W*). Resterande brunnar (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 och 17) är de utvalda proverna från jonbyteskromatografen. (c) Gelfiltreringskromatografi för αS^{WT} där proteinet renas ut mellan 45-60 mL. På x-axeln visas volymen i mL och på y-axeln visas absorbansen i mAU. (d) SDS-PAGE för αS^{WT} efter gelfiltreringskromatografi, där första brunnan är molekylviktsstegen och de fem resterande brunnarna är kontroller efter gelfiltreringskromatografen.

Figur 15 och figur 16 visar reningsresultaten från αS -mutanterna, αS^{A53T} samt αS^{A30P} och presenteras på samma sätt som för αS^{WT} ovan.

¹⁸mAU förkortat från engelskans *milli absorption unit*



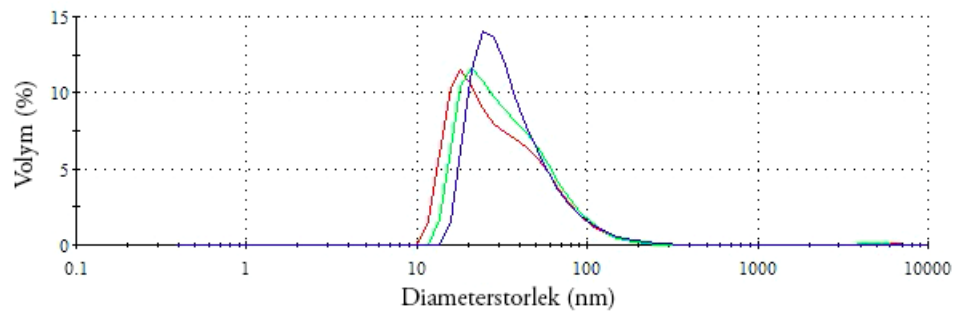
Figur 15: (a) Jonbyteskromatografi för αS^{A53T} , där proteinet ger renas ut mellan 40-80 mL. På x-axeln visas volymen i mL, på den primära y-axeln visas absorbansen i milliabsorptionsenhet (mAU¹⁹) och på den sekundära y-axeln visas den ökande salthalten i procent, där 100 % motsvarar en salt halt på 1 M NaCl. (b) SDS-PAGE för αS^{A53T} efter jonbyteskromatografi, där första brunnen från vänster är molekylviktstegen. De tre följande brunnarna är prov från filtrerade supernatanten (L), efter laddning i jonbyteskolonnen (FT), samt ett prov från reningen av maskinen (W). Resterande brunnar (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 och 17) är de utvalda proverna från jonbyteskromatografen. (c) Gelfiltreringskromatografi för αS^{A53T} där proteinet renas ut mellan 45-60 mL. På x-axeln visas volymen i mL och på y-axeln visas absorbansen i mAU. (d) SDS-PAGE för αS^{A53T} efter gelfiltreringskromatografi, där första brunnen är molekylviktstegen, och de fem resterande brunnar är kontroller efter gelfiltreringskromatografen.



Figur 16: (a) Jonbyteskromatografi för αS^{A30P} , där proteinet ger renas ut mellan 40-80 mL. På x-axeln visas volymen i mL, på den primära y-axeln visas absorbansen i milliabsorptionsenhet (mAU²⁰) och på den sekundära y-axeln visas den ökande salthalten i procent, där 100 % motsvarar en salt halt på 1 M NaCl. (b) SDS-PAGE för αS^{A30P} efter jonbyteskromatografi, där första brunnen från vänster är molekyylviktstegen. De tre följande brunnarna är prov från filtrerade supernatanten (L), efter laddning i jonbyteskolonnen (FT), samt ett prov från reningen av maskinen (W). Resterande brunnar (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 och 17) är de utvalda proverna från jonbyteskromatografen. (c) Gelfiltreringskromatografi för αS^{A30P} där proteinet renas ut mellan 45-60 mL. På x-axeln visas volymen i mL och på y-axeln visas absorbansen i mAU. (d) SDS-PAGE för αS^{A30P} efter gelfiltreringskromatografi, där första brunnen är molekylviktstegen, och de fem resterande brunnar är kontroller efter gelfiltreringskromatografen.

B Storleksbestämning av liposomer

Figur 17 visar storleksdistributionen av liposomdiametern i DLS från tre prover (tre olikfärgade kurvor). Det största antalet liposomer har en diameter runt 30-40 nm.



Figur 17: Storleksbestämning av liposomer med en sammansättning av DOPC:DOPS:DOPE:kolesterol (30:20:25:25) med DLS. Storleksfördelningen av tre upprepningar visas i grafen (röd, grön och blå kurva) med diameterstorlek i nm på x-axeln och volymprocent på y-axeln.

C Proteinstocklösningar, lipid:proteinförhållanden samt grafer från cirkulär dikroism

I tabell 1 visas vilken spädningsserie som använts för de olika CD-experimenten, samt stockkoncentrationen för αS^{WT} och de två mutanterna. Spädningsserie 1 motsvarar en serie där alla prov i mätningen koncentrerats innan mätning och där kontrollmätningar gjorts vid utvalda mätpunkter, se tabell 2. Spädningsserie 2 motsvarar mätningar där koncentrationen av lipider ökas genom titrering, se tabell 3. Kontrollmätningarna gjordes vid samtliga mätpunkter.

Tabell 1: Olika koncentrationer för αS^{WT} , αS^{A30P} och αS^{A53T} som erhöles efter byte av buffert inför varje experiment i CD. Aktuellt datum och aktuell stockkoncentration av protein som erhöles visas.

Datum	Mutation	Stockkoncentration (μL)	Spädningsserie
2017-02-16	WT	126,21	1
2017-02-23	A30P	72,9	1
2017-02-23	A53T	105,9	1
2017-03-03	A30P	103,86	1
2017-03-03	WT	71,53	1
2017-04-04	A30P	123,25	2
2017-04-04	WT	79,46	2
2017-04-10	WT	121,62	2
2017-04-10	A53T	85,07	2
2017-04-10	A53T	213,80	2

I tabell 2 visas vilka koncentrationer som förbereddes i spädningsserie 1, samt vilka mätpunkter kontrollerna gjorts på. Koncentrationen av αS^{WT} , αS^{A30P} och αS^{A53T} för de olika försöken ses i tabell 1 vilka i varje mätning späds till 5 μM .

Tabell 2: Spädningsserie 1 för mätning med CD. Lipidvolymerna markerade utan fetstil har tagits från en stockkoncentration på 600 μM och de lipidvolymerna som markerats med fetstil har tagits från en stockkoncentration på 6000 μM . Kontrollerna motsvarar mätpunkter som gjordes med den aktuella koncentrationen lipider i buffert utan tillsatt protein.

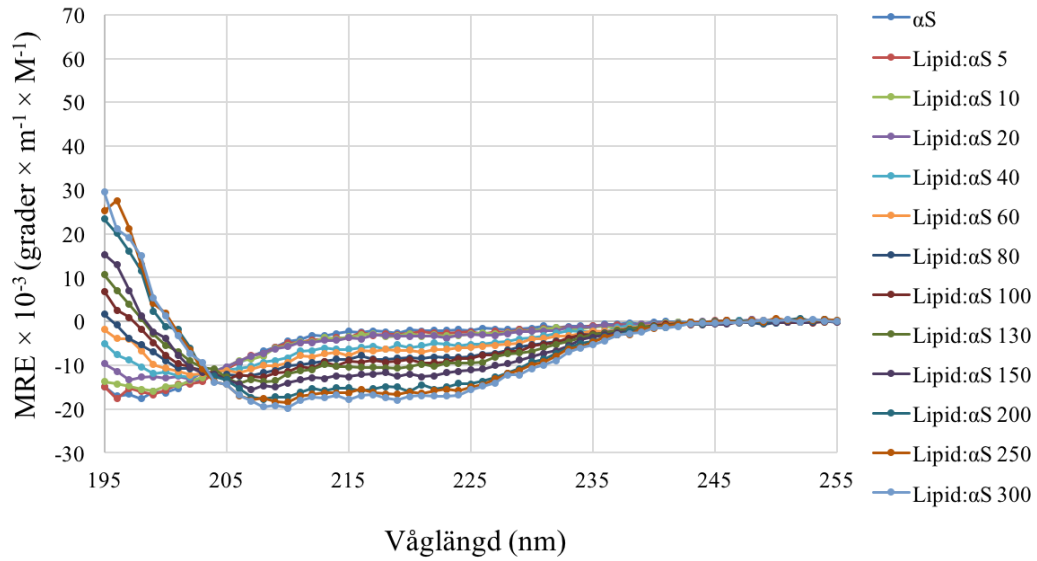
Lipidkoncentration (μM)	Lipidvolym (μL)	Förhållande (μM)	Kontroller
0	0		
25	10,4	5	
50	20,8	10	
75	31,3	15	
100	41,7	20	
200	83,3	40	*
300	12,5	60	
400	16,7	80	
500	20,8	100	*
600	25,0	120	
800	33,3	160	
1000	41,7	200	*
1500	62,5	300	*

Tabell 3 visar spädningserie 2 där lipidkoncentrationen ökats genom titrering. Här visas tillsatt volym liposomer vid varje mätpunkt, den aktuella proteinkoncentrationen samt vilket lipid:proteinförhållande varje mätpunkt motsvarar. Vid användning av spädningsserie 2, görs en identisk mätning utan proteiner som används som kontroll.

Tabell 3: Spädningsserie 2 för mätning med CD. Denna serie utgår från en buffertlösning på 250 μL och en proteinkoncentration på 5 μM . Efter varje mätning tillsattes en viss lipidvolym, kolumn 2 från vänster, för att uppnå ett visst lipid:proteinförhållande, kolumn 4. Den aktuella proteinkoncentrationen vid varje mätpunkt visas i kolumn 3 och den aktuella lipidvolymen visas i kolumn 1. Vid varje försök utfördes en bakgrundskontroll. I dessa bakgrundskontroller utfördes en likadan titrering av liposomer till 250 μL buffert men utan protein.

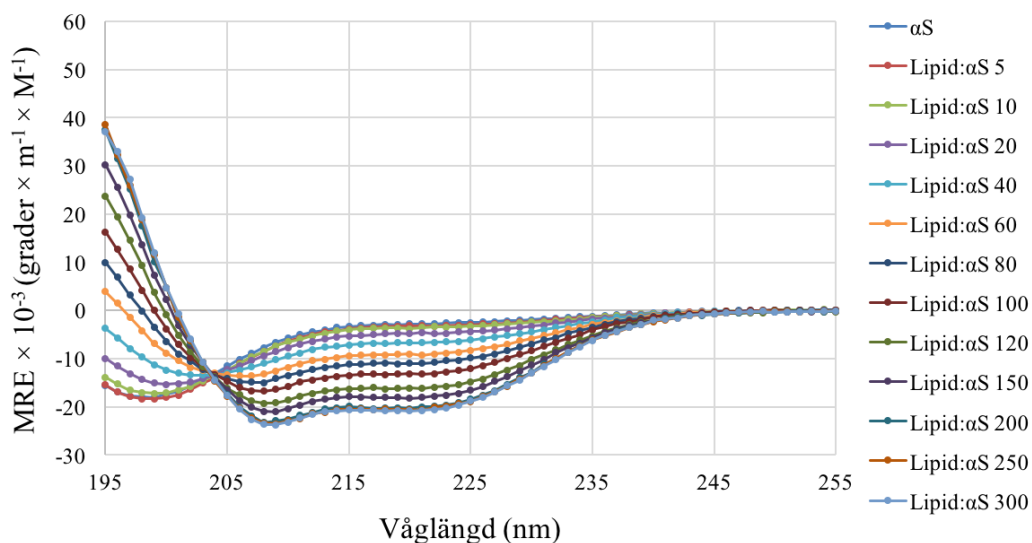
Volym lipider(μL)	Tillsatt lipidvolym(μL)	Aktuell proteinkoncentration(μL)	Förhållande
1,04	1,0	5,0	5
2,08	1,0	5,0	10
4,17	2,1	4,9	20
8,33	4,2	4,8	40
12,50	4,2	4,8	60
16,67	4,2	4,7	80
20,83	4,2	4,6	100
25,0	4,2	4,5	120
31,25	6,3	4,4	150
41,67	10,4	4,3	200
52,08	10,4	4,1	250
62,50	10,4	4,0	300

Figur 18 visar den molära ellipticiteten, vid olika lipid:proteinförhållanden, som funktion av tiden för αS^{A30P} . Figuren visar att proteinet antar en mer α -helixrik form vid högre lipid:proteinförhållanden.



Figur 18: CD-spektrum för αS^{A30P} (5 μ M monomert protein i fosfatbuffer med pH 6,53) med olika lipid:proteinförhållanden, angivet i genomsnittlig molär ellipticitet på y-axeln och våglängd i nm på x-axeln. Liposomerna som används har en sammansättning av DOPC:DOPS:DOPE:kolesterol (30:20:25:25).

Figur 19 visar CD-spektrumet för αS^{A53T} där den molära ellipticiteten som funktion av tiden vid ökande lipid:proteinförhållande plottas. Graferna visar en strukturförändring från en ostrukturerad form till en mer strukturerad α -helixrik form med ökande lipid:proteinförhållande.



Figur 19: CD-spektrum för αS^{A53T} (5 μM monomert protein i fosfatbuffer med pH 6,53) med olika lipid:proteinförhållanden, angivet i genomsnittlig molär ellipticitet på y-axeln och våglängd i nm på x-axeln. Liposomerna som används har en sammansättning av DOPC:DOPS:DOPE:kolesterol (30:20:25:25).

D Laddning av 96-hålsplatta för fluorescensspektroskopi

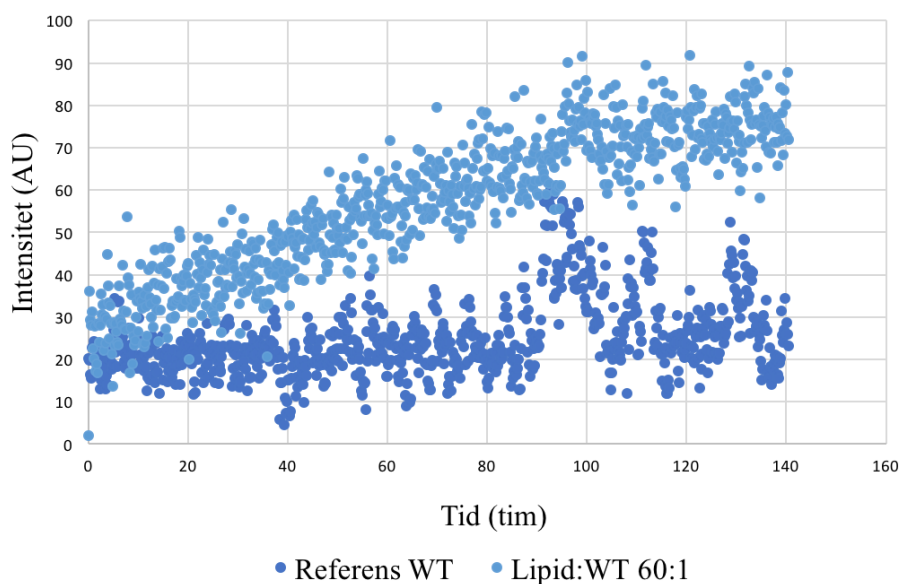
Figur 20 visar ett exempel på hur en 96-hålsplatta laddas inför aggregeringsförsök. 96-hålsplattan används i fluorescensspektrofotometern och körs enligt avsnitt 3.3.1. De yttersta kolumnerna och raderna utesluts för minskad risk för uttorkning. För varje prov gjordes fem replikat förutom för ThT och buffert, som används vid bakgrundssubtraktion, där två replikat utfördes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a												
b		WT 40	WT 40	WT 40	WT 40	WT 40	R WT	R WT	R WT	R WT	R WT	
c		WT 60	WT 60	WT 60	WT 60	WT 60	R A30P	R A30P	R A30P	R A30P	R A30P	
d		A30P 40	A30P 41	A30P 42	A30P 43	A30P 44	R A53T	R A53T	R A53T	R A53T	R A53T	
e		A30P 60	A30P 60	A30P 60	A30P 60	A30P 60	B 40	B 40	B 40	B 40	B 40	
f		A53T 40	A53T 40	A53T 40	A53T 40	A53T 40	B 60	B 60	B 60	B 60	B 60	
g		A53T 60	A53T 60	A53T 60	A53T 60	A53T 60	ThT+ buff	ThT+ buff				
h												

Figur 20: Laddning av 96-hålsplatta för aggregation. WT_40, A30P_40 samt A53T_40 står för att det är lipid:proteinförhållande 40:1, medan WT_60, A30P_60 och A53T_60 står för att det är lipid:proteinförhållande 60:1. R_WT, R_A30P och R_A53T är respektive referens dvs. enbart protein, fosfatbuffert och ThT. B_40 och B_60 är blankprov vid 40:0 respektive 60:0, dvs. enbart lipider, fosfatbuffert och ThT. De gråmarkerade fälten symboliserar tomma brunnar

E Aggregationskinetik för vildtyp α -synuklein utan glaspär- lor

Figur 21 visar aggregationskinetiken för αS^{WT} vid lipid:proteinförhållande 60:1 samt för referens utan liposomer utan närvaro av glaspär-
lor. För både referensen och li-
pid:proteinförhållandet 60:1 kan endast en mycket liten ökning av ThT-fluorencens
detekteras. Detta indikerar att ingen betydande amyloidbildning sker då inga glaspär-
lor finns närvarande.



Figur 21: Icke-normaliserad data för αS^{WT} med lipid:proteinförhållande för 60:1 (ljusblå kurva) samt referensprov (mörkblå kurva). Provet innehåller ThT, fosfatbuffert men saknar glaspär-
lor.