

Amyloidbildning av
Parkinsonproteinet α -synuklein i
cell-liknande miljö, in *vitro*, med
crowding agents dextran och PEG

RAPPORT

KANDIDATARBETE BBTX01-21-02

Författare

Emil Löfgren
David Perhed
Monica Pernsved
Elin Persson
Nikita Rehnberg
Cecilia Svensson

Handledare

Pernilla Wittung-Stafshede
Istvan Horvath
Ranjeet Kumar

Examinator

Nathalie Scheers



CHALMERS

Göteborg 14 Maj 2021

Abstract

All over the world life expectancy is increasing which leads to a higher prevalence of neurodegenerative diseases such as Parkinson's Disease. The disease is chronic and leads to slow degradation of cells in the nervous system of the brain. α -synuclein is a well-studied protein which is likely involved in Parkinson's Disease.

The purpose of this project is to experimentally study the aggregation kinetics of α -synuclein in regard to excluded volume effects. Different sizes and concentrations of two macromolecular crowding agents, dextran and PEG, are used to mimic the crowded cell environment. Crowded conditions and their effect on the formation of α -synuclein amyloids and aggregation kinetics, are studied through a Thioflavin T-aggregation assay. SDS-PAGE, circular dichroism spectroscopy and AFM are used to complement and validate the assay results.

Higher concentrations of crowding agents generates faster aggregation of α -synuclein compared to lower concentrations. However the aggregation does not always increase linearly with crowding. Certain crowding agents promote elongation while others promote alternative mechanisms such as primary or secondary nucleation. Several experiments verify the occurrence of soft interactions between PEG and α -synuclein. The α -synuclein aggregation process is rather complex and dependent on several factors. Crowding promotes faster aggregation and morphology studies suggest the formation of amyloid fibrils. The results verify the effect of excluded volume but further research is required to determine which part of the aggregation process it primarily affects.

Sammanfattning

Ett återkommande mönster i världen är ökande genomsnittsålder vilket också har inneburit en högre prevalens av neurodegenerativa sjukdomar som Parkinsons sjukdom. Sjukdomen är kronisk och leder till att celler i hjärnans nervsystem bryts ned och dör. α -synuklein är ett välbeforskat protein som troligt är kopplat till insjuknande i Parkinsons sjukdom.

Syftet med projektet är att laborativt undersöka hur aggregeringshastigheten av α -synuklein påverkas i en trång cellmiljö där tillgänglig volym är begränsad. Olika storlekar och koncentrationer av makromolekylära *crowding agents*, dextran och PEG, har använts för att efterlikna trång cellmiljö. Tioflavin T-aggregeringsassay används för att studera aggregeringshastigheten. SDS-PAGE, cirkulär dikroism spektroskopi och AFM används som validerande och kompletterande metoder för att förstå vilka proteinaggregat som bildas.

Resultaten visar att högre koncentration av *crowding agents* medför snabbare aggregering av α -synuklein jämfört med lägre koncentration. Förhållandet är däremot inte alltid linjärt med ökande koncentration för alla *crowding agents*. Vissa *crowding agents* främjar *elongation* medan andra istället gynnar alternativa mekanismer såsom primär eller sekundär nukleation. Flera experiment bekräftar därtill förekomsten av *soft interactions* mellan PEG och α -synuklein. Aggregeringsprocessen av α -synuklein är komplex och dess kinetik är beroende av ett flertal olika faktorer. *Crowding agents* medför snabbare aggregering av α -synuklein och ger fibriller med morfologi som överensstämmer med amyloida fibriller. Resultaten bekräftar effekten av *excluded volume* men vidare studier krävs för att belysa vilken del av aggregeringsprocessen som primärt påverkas.

Förord

Det har varit en ynnest att få vara en del av institutionen för biologi och bioteknik, avdelning kemisk biologi som leds utav Professor Pernilla Wittung Stafshede med handledarna och forskarna Istvan Horvath och Ranjeet Kumar. Alla inblandade har tålmodigt, välvilligt och med gedigen kunskap väglett oss genom vårt kandidatarbete. Vi vill rikta ett stort tack till vederbörande.

Innehållsförteckning

1	Inledning	1
1.1	Syfte	1
1.2	Avgränsningar	2
2	Teori	2
2.1	Parkinsons sjukdom	2
2.2	α -synukleinproteinet	3
2.3	Amyloider och aggregeringskinetik	3
2.4	Cellmiljö och makromolekylär trängsel	6
2.5	Analysmetoder	7
2.5.1	Fluorescensspektroskopi	7
2.5.2	Anpassning av kurvor	8
2.5.3	Cirkulär dikroism spektroskopi	8
2.5.4	Atomkraftsmikroskopi	9
2.6	Kontrollmetoder	9
2.6.1	Kromatografi	9
2.6.2	Absorptionsspektroskopi	10
2.6.3	SDS-PAGE	11
3	Material och metod	11
3.1	Tioflavin T-aggregeringsassay	11
3.2	Kontroll- och analysmetoder	12
3.2.1	SDS-PAGE	12
3.2.2	Cirkulär dikroism spektroskopi	12
3.2.3	Atomkraftsmikroskopi	13
3.3	α -synuklein och bulklösningar	13
3.3.1	Bulklösningar	13

3.3.2	α -synuklein	14
4	Resultat	14
4.1	Tioflavin T-aggregeringsassay	14
4.2	SDS-PAGE	17
4.3	Seeds	18
4.4	Cirkulär dikroism spektroskopi	20
4.5	Atomkraftsmikroskopi	22
5	Diskussion	24
5.1	Effekter av koncentration	24
5.2	Effekter av storlek	25
5.3	Effekt på tillväxthastighet	25
5.4	Effekt på fibriller	26
5.5	Jämförelse av dextran och PEG	27
6	Slutsats	27
A	Allmän laborationsdata	1
B	Framställning av α-synuklein	3
C	Tioflavin T-aggregationassay för α-synuklein	4
C.1	Manual för Tioflavin T-aggregationassay	4
C.2	Graf av fluorescens för α -synuklein utan CA	6
C.3	Normaliserade grafer av fluorescensen för α -synuklein med CA som med- förde aggregering	6
C.4	Normaliserade grafer av initial hastighet med ökande koncentration <i>seeds</i>	7
D	AFM	8

E CD

9

1 Inledning

Genomsnittsåldern stiger i världen och som en effekt av det ökar sjukdomar som Parkinsons sjukdom (PD), idag den näst vanligaste neurodegenerativa sjukdomen [1]. Främst äldre människor insjuknar men även personer under 50 år kan drabbas. Genom ökande genomsnittsålder förutspår man även en ökad mängd fall av PD [2]. Andra faktorer som ökar sannolikheten för insjuknande är olika utsläpp av till exempel pesticider, metaller och andra föroreningar [3]. År 2015 hade 6.2 miljoner människor diagnostiserats med Parkinsons sjukdom och det antalet uppskattas kunna öka till 17.5 miljoner människor vid 2040 [2].

Sjukdomen är kronisk och leder till att de dopaminproducerande cellerna i hjärnans nervsystem bryts ned och dör [4]. Bristen på dopamin som uppstår i hjärnan leder till att patienter utvecklar darrningar och svårigheter med motoriken. Sjukdomen utvecklas under en längre tid och i ett tidigt stadie är det svårt att upptäcka cellernas antalsminskning. De flesta insjuknar efter 60-årsåldern, och diagnos fastställs efter ett flertal uppföljande undersökningar av patienten för att se hur denne påverkas av olika behandlingsmetoder samt hur symptomen förändras över tid [4].

Det har länge bedrivits forskning inom området för att hitta vad det är som initierar den skadliga processen och stoppa spridningsförloppet i ett tidigare stadie. Det finns ännu inget botemedel mot Parkinsons sjukdom och stort fokus ligger på att kartlägga de involverade mekanismerna. Det stora mysteriet är ett protein som är involverat i sjukdomen, α -synuklein [5], som uttrycks hos alla människor. Hos patienter som utvecklar Parkinsons sjukdom har dessa protein börjat klumpa ihop sig till så kallade amyloider [6]. Aggregeringen, det vill säga processen när dessa proteiner klumpar ihop sig till amyloider, sker olika fort beroende på den omgivande miljön [7]. Med hjälp av makromolekyler som upptar plats kan man efterlikna intracellulära förhållanden och se hur både veckning och aggregering av proteiner påverkas [6]. I rapporten studeras aggregeringsprocessen av α -synuklein i olika miljöer för att bidra till en ökad förståelse av sjukdomsförloppet.

1.1 Syfte

Syftet med projektet är att laborativt undersöka aggregeringskinetiken av α -synuklein. Främst vill påverkan av makromolekyler på amyloidbildning av α -synuklein undersökas. Makromolekylerna ämnar efterlikna den trängsel som föreligger i celler *in vivo*. Därtill är syftet att undersöka huruvida storlek och koncentration av makromolekylerna dextran och polyetylenglykol (PEG) har betydande effekt på aggregeringen, både för dess kinetik samt morfologi på bildade amyloider. Målsättningen med det laborativa arbetet som genomförs i studien är att bidra till ökad förståelse för makromolekylär trängsel och dess bidrag till PD.

1.2 Avgränsningar

Arbetet begränsas till att studera aggregeringsprocessen av α -synuklein, *in vitro*, i närvaro av dextran med storlekarna 20 kDa respektive 70 kDa samt PEG med storlekarna 8 kDa respektive 35 kDa. Avgränsningen är nödvändig sett till studiens tidsaspekt. Därtill fokuserar projektet huvudsakligen på att studera effekten av makromolekylär trängsel på amyloidbildning, varpå andra eventuella bidrag enbart diskuteras övergripande. Sådan avgränsning är nödvändig för att kunna dra slutsatser om aggregeringskinetiken på molekylär nivå.

Till arbetet studeras enbart renad vildtypsvariant (WT) av α -synuklein, vilket är den vanligast förekommande varianten i friska människor. Mutationer av proteinet hade varit av intresse för vidare undersökningar, men avgränsning till enbart vildtypsvarianten var nödvändig sett till tidsaspekten för arbetet.

2 Teori

Teoriavsnittet innehåller bakgrundsinformation om Parkinsons sjukdom, α -synuklein, amyloider och aggregeringskinetik samt cellmiljö och makromolekylär trängsel. De analysmetoder som använts i studien redovisas även övergripande i den sista delen av avsnittet.

2.1 Parkinsons sjukdom

Patofysiologiskt känneteckas Parkinsons sjukdom av ansamlingar, så kallade Lewykroppar, i intraneuronala inneslutningar [8]. Parkinsonproteinet α -synuklein aggregerar till avlånga strukturer kallade amyloida fibriller vilka tillsammans med ubiquitin och uppen- mot 90 andra proteiner kan bilda dessa skadliga ansamlingar. Bildandet av Lewykroppar från aggregering av α -synuklein kan ske på olika sätt och har en viktig patologisk roll i utvecklingen av Parkinsons sjukdom [9].

Lewykroppar tros leda till att dopamingenererande nervceller i hjärnans *substantia nigra* blir dysfunktionella och på sikt dör [10]. Även i andra delar av hjärnan har lägre halter av dopamin uppmätts hos patienter med PD och detta faktum tros spela en roll i vissa patienters funktionsnedsättning [11]. I närhet av döda nervceller återfinns ofta Lewykroppar, varpå dessa aggregat länge betraktats som bakomliggande faktor till sjukdom [12]. Däremot har vissa nyare studier indikerat att fibriller av α -synuklein kan inneha en cellskyddande mekanism för PD [13]. Sådana studier föreslår bland annat att det snarare är intermediären till fibriller, oligomerer, av α -synuklein som är sjukdomsalstrande [12], då dessa har visat sig ha skadliga effekter på cellmembran, cytoskelett och synaptiska funktioner [10].

2.2 α -synukleinproteinet

α -synuklein, som visas nedan i figur 1, är ett neuronspecifikt protein som är starkt kopplat till Parkinsons sjukdom. Orsaken till kopplingen och den exakta funktionen av α -synuklein är inte helt känd, men flertalet föreslagna funktioner för proteinet finns. Exempel på funktion är delaktighet i frigörelse av vesiklar, fettsyrabindningar eller i fysiologisk regulation av olika enzym [5]. Under vissa förhållanden kan α -synuklein aggregera och bilda dimerer vilka i sin tur bildar oligomerer. Oligomerer kan sedan vidare bilda så kallade amyloida fibriller vilka, som nämnt, ovan är en viktig beståndsdel av Lewykroppar. Amyloida fibriller karaktäriseras av β -flakstrukturer [14].

Proteinet finns i hög koncentration i presynapsiska nervterminaler i hjärnan där det återfinns både i lös form och förankrat till lipidmembran [5]. I sin lösa form förekommer proteinet naturligt som en ej veckad monomer, men då det binder till lipidmembran antar det en α -helixstruktur [16]. Proteinet som består av 140 aminosyror har en molekylvikt av 14 kDa [17] och delas ofta upp i tre regioner. Den första regionen, N-terminalen, består av aminosyror 1-60 och innehåller bland annat den del som gör att proteinet kan binda till lipider [18]. Den andra regionen består av aminosyror 61-95, vilken är hydrofobisk och starkt benägen att associera till amyloider, vilket möjliggör för proteinet att bilda β -flak genom att associera med andra proteinkedjor. Den tredje regionen, C-terminalen som består av aminosyror 96-140 är mycket sur samt negativt laddad [5].

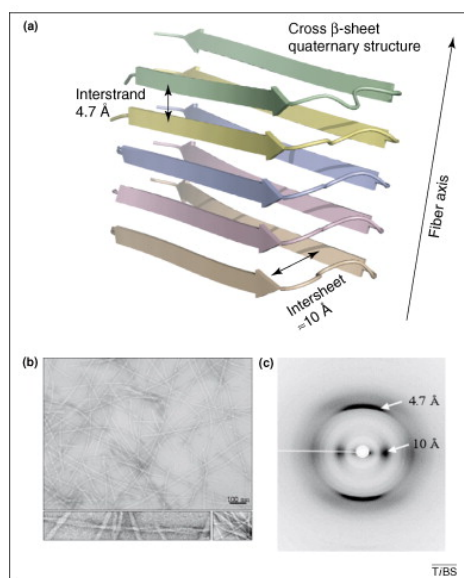


Figur 1: Figuren visar 3D-strukturen av α -synuklein bundet till vesiklar [15]. Återgiven med tillstånd. CC-BY 4.0.

2.3 Amyloider och aggregeringskinetik

Amyloider är proteiner och peptider som aggregerat till olösliga fibriller uppbyggda av typiska *cross*- β -flakstrukturer, se figur 2(a). *Cross*- β -flakstrukturer skiljer sig från de klassiska anti-parallella eller parallella β -flakstrukturerna då β -strängar ordnas parallellt med fibrillens axel vilka sedan staplas på varandra likt en steg vinkelrätt mot fibrillens axel och skapar protofilament, se figur 2(b). Varje β -flak utgör ett steg på stegen med 4.8Å avstånd från varandra [19]. Två eller fler protofilament tvinnas sedan runt varandra likt ett rep för att bilda mogna fibriller [20]. Amyloider från olika amyloidbildande proteiner har ofta liknande kvartiärstruktur bestående av långa ogrenade

fibriller med en diameter mellan 7-13 nm [21]. En amyloid är vidare, av nomenklaturkommittén (NCIUBMB), definierat som ett deponerat aggregat med fibrillstruktur som går att karaktärisera med hjälp av mikroskopi, har utmärkande röntgendiffraktionsspektra och speciellt färgningsmönster till exempel med affinitet för färgen Congo red [22].



Figur 2: (a) Illustration av de karaktäristiska *cross*- β -flaken här från NMR-undersökning av "Alzheimersproteinet" $\alpha\beta$ [23] (b) Fibriller studerade med transmissionselektronmikroskopi. I de undre bilderna med högre upplösning går de tvinnade protofilamenten utskiljas [24] (c) röntgendiffraktionsspektra från $\alpha\beta$ -fibriller [24]. Återgiven med tillstånd.

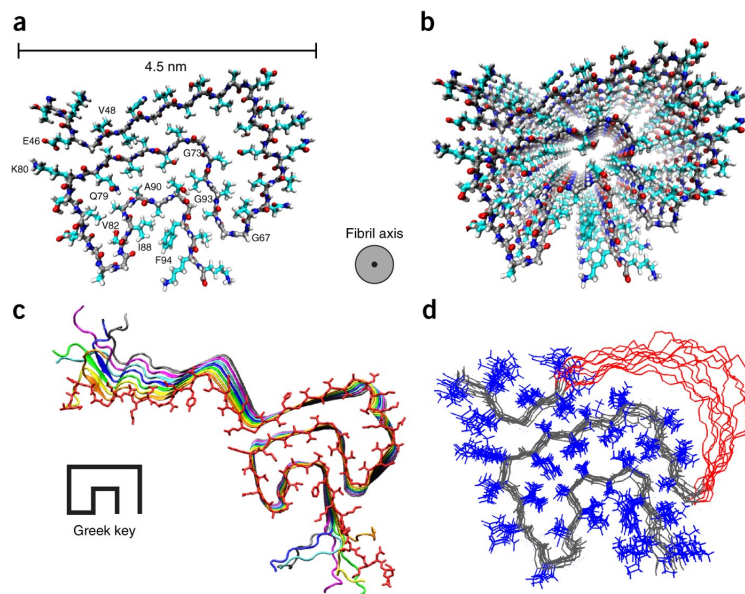
Ur ett historiskt perspektiv har färgen Congo red en viktig koppling till amyloider. Dess unika brytningsmönster gjorde det möjligt för Alois Alzheimer att, år 1901, visualisera amyloider i hjärnan hos sin patient med sjukdomen som skulle komma att kallas Alzheimers sjukdom [20]. Sedan dess har intresset för dessa olösliga aggregat växt eftersom de visat sig vara involverade i en mängd olika sjukdomar såsom Alzheimers sjukdom, amyloidos samt Parkinsons sjukdom. Det finns omkring 30 kända proteiner som bildar amyloider [22], varav α -synuklein är ett av dessa. Idag vet man dock att inte alla amyloider är patogena eller kännetecken för sjukdom. Det finns en klass av amyloider, så kallade funktionella amyloider, som utför viktiga fysiologiska funktioner i framför allt bakterier, silkesmaskar och svamp, men även i däggdjur där bland annat biosyntes av melanin i hudceller har visat sig vara beroende av funktionella amyloider [25].

Amyloider av olika proteiner och peptider delar, som nämnt ovan, den gemensamma kvartärstrukturen som karaktäriseras av *cross*- β -amyloidveckning, medan monomererna som

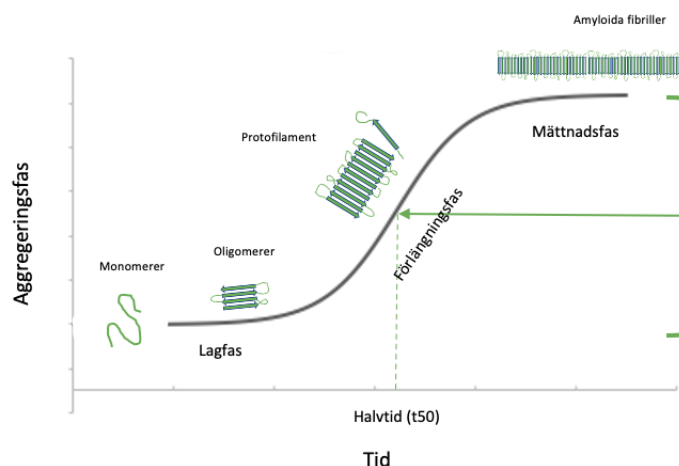
bildar protofilament alla har olika uppbyggnad. Den tredimensionella strukturen hos α -synukleiamyloider har länge varit svår att bestämma bland annat på grund av att proteinet, olikt andra kända amyloidbildande proteiner, är relativt stort. Nyligen har omfattande studier gjorts [26] och en unik struktur med så kallad grekisk nyckel (eng. greek-key) topografi har bestämts, se figur 3. Insikterna i den tredimensionella strukturen möjliggör för en djupare förståelse för interaktioner med andra molekyler och bildandet av amyloida fibriller.

Från studier av aggregeringskinetik har flera olika mekanismer för formationen av amyloider föreslagits. Dessa studier görs ofta på ett sätt så att bildade amyloider kan kvantifieras och en aggregeringskurva likt den i figur 4 kan återfås. Det första steget vid aggregering kallas primär nukleation där monomerer binder till varandra för att skapa

en oligomer och i en aggregeringskurva sker detta steg under den så kallade lagfasen. Halvtiden är den tid då hälften av den maximala intensiteten har uppnåtts. Oligomerer kan sedan reagera vidare till fibriller genom olika mekanismer. Den enklaste formen för bildning av fibriller kallas *elongation* (sv. förlängning) och baseras på att monomerer av proteinet adderar på änden av oligomeren vilket skapar en lång och smal struktur utan förgreningar. Andra mekanismer är fragmentering, där fibriller går sönder och dessa utnyttjas som nya startprodukter, samt sekundära nukleationsmekanismer där monomerer startar nya nukleus längs fibrillen och därifrån bygger nya fibriller [27]. För att analysera tillväxtfasen av aggregaten, där förlängning sker, kan *seeded aggregation* tillämpas. Dessa *seeds* är tidigare aggregerat α -synuklein som vid tillsatts inducerar vidare aggregering varav lagfasen på så sätt kan förbigås. Aggregeringen till amyloida fibriller pågår till dess att monomererna i lösningen tagit slut, vilket resulterar i att aggregeringskurvan planar ut och når en mättnadsfas [28].



Figur 3: Figuren visar föreslagen struktur av α -synukleinfibriller (a) monomer från aminosyror 44-97 sett med fibrillens axel riktad ut ur pappret vilket illustrerar den så kallad grekiska-nyckel-formen (b) monomerer staplade på varann för att illustrera aminosyrornas orientering till varandra (c) åtta monomerer mellan aminosyror 25-105 staplade på varann för att illustrera β -flakens orientering till varann och topologin av den grekiska nyckeln (d) överlappning av de tio strukturerna med lägst energi vilket visar överensstämmelse mellan sidokedjorna i proteinets kärndelar. Aminosyror 51-67 visas utan sidokedjor för klarhet [29]. Återgiven med tillstånd.



Figur 4: Illustration av typisk aggregeringskurva med illustration av halveringstid samt de olika aggregeringstillstånden vid olika faser.

2.4 Cellmiljö och makromolekylär trängsel

Inuti en cell finns åtskilliga biologiska makromolekyler, såsom proteiner och nukleinsyror, med ett stort antal olika funktioner för att hålla cellen funktionsduglig. Den intracellulära miljön är således mycket trång (eng. crowded) [30] med totala koncentrationer av olika makromolekyler mellan 80-400 mg/mL [30]. Då man berör ämnet koncentration av makromolekyler i en cell talar man ofta om att cellen har en trång miljö snarare än att koncentrationen är hög. Trängsel i en cell främjar kompakta veckningar av proteiner, både i form av normal veckning och i form av aggregering. Vilket utfall som fås, beror på proteinets individuella egenskaper [7].

Den komplexa miljön i cellen är mycket svår att efterlikna, men en faktor som relativt nyligen har börjat studeras är makromolekylär trängsel, där de steriska effekterna av den trånga miljön ämnas efterliknas *in vitro* [31]. Detta sker med hjälp av makromolekyler, till exempel polysackarider, som går att hålla i lösning vid mycket höga koncentrationer vilket för de flesta andra makromolekyler inte är möjligt. Idealt ska dessa molekyler vara totalt inerta, alltså inte interagera med proteiner, utan endast uppta plats. Syntetiska makromolekyler som används för att skapa makromolekylär trängsel går under samlingsnamnet *crowding agents* (CA) [7].

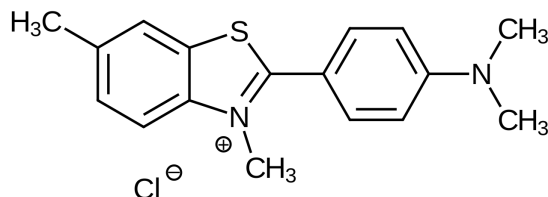
Två lämpliga CA för undersökning av molekulär trängsel är dextran och PEG eftersom dessa anses relativt inerta med minimal proteininteraktion. [7] Ett antal studier har dock visat att PEG uppvisar en attraktiv interaktion med icke-polära sidokedjor hos proteiner [31]. Dextran antas ha en stavliknande form [32] medan PEG-molekylen har en mer kompakt, sfärsisk form vilket gör att förhållandet yta per volym är relativt litet [7]. Både dextran och PEG är hydrofila och lättlösliga i vatten. Studier har visat att närvaro av båda dessa CA ökar aggregeringshastigheten för α -synuklein till fibriller [7].

Effekterna av att tillsätta CA delas ofta upp i två olika delar: *hard interactions* (sve. hårda interaktioner) och *soft interactions* (sve. mjuka interaktioner) [33]. *Hard interactions* innefattar konceptet *excluded volume* (sv. utesluten volym) som bygger på att två molekyler inte kan vara på samma plats samtidigt, det vill säga att en molekyl tar upp plats leder till att den tillgängliga volymen för till exempel proteiner blir mindre. En annan så kallad *hard interaction* är konceptet *confinement* (sve. inneslutning) där trängseln i cellen skapar ett hålrum från vilket proteinet inte kan undkomma. Både *excluded volume*-effekter och *confinement*-effekter ökar proteinstabiliteten genom att gynna kompakt veckade former av proteinet [33]. Det finns dock ytterst få molekyler som kan antas helt inerta i sin omgivning och de allra flesta uppvisar *soft interactions* mellan makromolekyl och protein. Till skillnad från *hard interactions* som bara påverkar steriska effekter påverkar *soft interactions* entalpin. Dessa interaktioner kan således vara både stabiliserande och destabiliserande [33].

2.5 Analysmetoder

2.5.1 Fluorescensspektroskopi

Fluorescensspektroskopi är en metod användbar för att studera fluorescens från en molekyl [34]. Metoden använder sig av ljus för att excitera elektroner hos vissa aminosyror eller molekyler och få dem att emittera ljus. Med hjälp av en detektor kan därefter fluorescens mätas. Tioflavin T (ThT) binder till det aggregerade α -synukleins β -flak och fluorescerar vid 485 nm, till skillnad från obundet ThT [16]. Ämnet har länge använts som indikator för att identifiera fibriller eftersom det binder till fibrillerna på sådant sätt att dess fluorescensemission kraftigt ökar [35]. Data indikerar att ThT i vattenlösning formar miceller och att ThT i högre utsträckning binder till fibriller ovanför dess kritiska micellkoncentration. En förklaring tros vara att den positiva laddningen, vilken syns i figur 5 nedan, har en avgörande roll i bildandet av miceller och således även i bindningen till fibrillerna [36].



Figur 5: Kemisk struktur av Tioflavin T [37], CC0 1.0.

2.5.2 Anpassning av kurvor

En generell beskrivning av fluorescenskurvan vid aggregering, se figur 4 ovan, kan beskrivas med hjälp av en ekvation. För beräkning av halvtiden vid aggregering kan ekvation 1 användas

$$F = \frac{F_i + (F_f + m_f * t)}{(1 + e^{-(t-t_{50})/\tau})} \quad (1)$$

där t_{50} är halvtiden, det vill säga när fluorescensen nått hälften av maxvärdet, och τ är den karaktäristiska tidskonstanten. F står för fluorescens vid varje tidpunkt, F_i för initial fluorescens och F_f för den maximala fluorescensen [38].

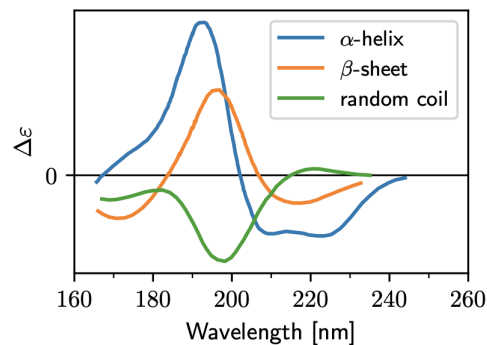
För beräkning av lagfasen kan τ och t_{50} kan tillsammans användas i ekvation 2

$$t_{lag} = t_{50} - 2 * \tau \quad (2)$$

där t_{lag} motsvarar lagfasen, där t_{50} är halvtiden och τ är den karaktäristiska tidskonstanten [38].

2.5.3 Cirkulär dikroism spektroskopi

Cirkulär dikroism (CD) spektroskopi är en metod där strukturen av α -synuklein i monomer- samt amyloidformer studeras för att bestämma proteinets sekundärstruktur [39]. Metoden använder sig av polariserat, höger- och vänstervridet, ljus av särskilda våglängder. Cirkulärt polariserat ljus är en kombination av planpolariserat ljus i två dimensioner. Den differentiella absorbsansen från de olika polariseringarna detekteras och ger en graf som sedan jämförs mot referensgrafer, se figur 6, vilket ger information om förekomsten av α -helix, β -flak och oordnade strukturer. Fritt monomeriskt α -synuklein har oordnad struktur och bundet till lipider antar de α -helixstruktur. Amyloider av α -synuklein har β -flakstruktur, vilket gör att man kan avgöra huruvida α -synukleinet har aggregerat eller är i monomerform med hjälp av CD [39]. Ett karaktäristiskt spektrum för CD med data från Brahms och Brahms [40] visas i figur 6.



Figur 6: CD-spektrum som karakteristiskt beskriver olika sekundära proteinstrukturer. Den blåa kurvan kännetecknas av α -helix struktur med ett maximum vid 194 nm och med två minimum vid 207 respektive och 223 nm. Den orange kurvan visar proteiner som är rika på β -flak som uppvisar ett maximum vid 195 nm och ett minimum vid 218 nm. Den gröna kurvan visar en ostrukturerad form med ett minimum vid 195 nm och låg ellipticitet över 210 nm [39]. Återgiven med tillstånd.

CD-resultatet från olika mätningar kan jämföras och datan kan omvandlas från molär ellipticitet till millidegrees [mdeg eller m°]. Differentiell absorption, ΔA , beräknas enligt

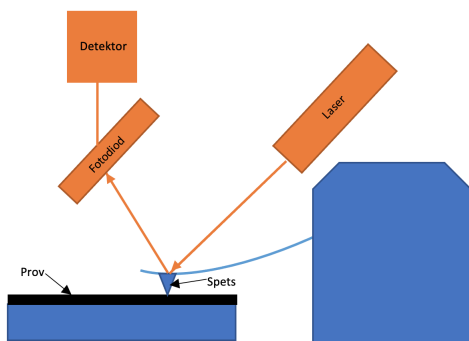
$$\theta = 32.98\Delta A \quad (3)$$

där ΔA är skillnaden i absorbans hos höger- och vänstervridet ljus och 32.98 är omvandlingsfaktorn för absorbans till molär ellipticitet, eftersom detta tar bort beroendet av koncentration och våglängd [41]. För jämförelse med referensspektrum, figur 6, beräknas den molära cirkulära dikroismen $\Delta\epsilon$ enligt

$$\Delta\epsilon = \frac{\theta}{3298} \quad (4)$$

där 3298 är omvandlingfaktorn mellan molär ellipticitet och cirkulär dikroism [mdeg eller m°] [41].

2.5.4 Atomkraftsmikroskopi



Figur 7: Förenklad figur av AFM-instrument.

Atomkraftsmikroskopi (AFM) är en metod som används för att studera nanomaterial och nanopartiklar. Metoden tillåter att studera materialets topografi och bildar 3D-bilder med hög upplösning [42]. En tunn spets av kisel färdas och vibrerar över materialet som undersökts varpå dess rörelser detekteras av en laserstråle. Laserstrålen omvandlas i sin tur till en elektriskt signal som ger användaren tolkningsbara figurer kring materialets höjdskillnader [43]. Spetsen består ofta av kiselmaterial, är mellan 10 och 20 nm i diameter [44] och metoden ger topografiska mönster på nanometer-skalan [43]. En förenklad beskrivning av AFM-instrumentet visas till vänster i figur 7.

2.6 Kontrollmetoder

2.6.1 Kromatografi

Kromatografi är en metod som används i syfte att separera olika protein beroende på olika egenskaper såsom laddning och storlek [14]. Apparaturen består av en kolonn i vilken provet laddas varpå proteiner sedan elueras olika fort beroende på dess egenskaper.

Det finns olika sorters kolonner för olika ändamål. En av dessa är jonbyteskromatografi, vilken separerar protein beroende på dess hydrofobicitet. I kolonnen finns kulor med en positiv eller negativ laddning så att proteinerna separeras beroende på dess ytladdning. En annan sorts kromatografi är gelfiltreringskromatografi, även kallat *size-exclusion chromatography* (SEC), där proteinerna istället separeras beroende på storlek. Kolonnen består av porösa kulor där mindre proteiner fastnar och större proteiner elueras från kolonnen först [14].

2.6.2 Absorptionsspektroskopi

Absorptionsspektroskopi är en metod där mätning av hur mycket ljus en molekyl absorberar görs för att kunna bestämma koncentrationen av exempelvis ett protein i lösning [45]. Metoden bygger på att man låter ljus färdas genom en lösning varpå intensiteten mäts innan och efter provet, och beräkning av absorbansen görs med hjälp av ekvation (5)

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \quad (5)$$

där I är intensiteten efter provet, I_0 är intensiteten före provet och A är den uppmätta absorbansen. Då absorbansen antas vara direkt proportionell mot koncentrationen, går denna att beräkna med hjälp av Lambert-Beers lag [45], se ekvation (6)

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (6)$$

där A står för absorbansen som är enhetslös, c koncentrationen [M], l längden [cm] och ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] beskriver den molära absorptiviteten för den bestämda våglängden.

För specifika proteiner utnyttjas att de aromatiska aminosyror, såsom tryptofan och tyrosin har mycket stark absorptionsförmåga för UV-ljus [46]. Tryptofan, tyrosin, och även cystein till viss del, bidrar till absorbans vid en våglängd på 280 nm. Genom att kvantifiera hur mycket av dessa aminosyror som finns i proteinet, går det bestämma koncentrationen av densamma för provet. För att approximera den molära absorptiviteten vid 280 nm kan ekvation (7) användas

$$\epsilon = (nW \times 5500) + (nY \times 1490) + (nC \times 125) \quad (7)$$

där n är antalet av varje av aminosyror tryptofan (W), tyrosin (Y) samt cystein (C) i den monomeriska formen av proteinet [46].

2.6.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE är en metod där proteinelektrofores och molekylstorlek studeras [47]. Det är ett grundläggande steg i många typer av proteomikanalys, som är standardlaboratorieteknik. Proteinelektrofores studerar hur laddade proteinmolekyler transporteras genom ett lösningsmedel genom ett elektriskt fält. Både proteiner och nukleinsyror kan separeras med elektrofores, vilket är ett enkelt, snabbt och känsligt analytiskt verktyg. SDS-PAGE separerar proteiner huvudsakligen efter massa eftersom de den joniska detergenten SDS denaturerar och binder till proteiner för att göra dem enhetligt negativt laddade [47]. En ström appliceras och alla SDS-bundna proteiner i ett prov kommer att migrera genom gelen mot den positivt laddade elektroden. Proteiner med mindre massa rör sig snabbare genom gelen än de med större massa på grund av gelmatrisens separationseffekt. När de separerats med elektrofores kan proteiner detekteras i en gel med olika band som sedan går att jämföra med en referensstege [47].

3 Material och metod

Den övergripande laborationsmetoden som användes var Tioflavin T-aggregeringsassay. Huvudmomenten i denna laborationsmetod var kromatografi, absorptionsspektroskopi och fluorescensspektroskopi, vilka beskrivs i avsnittet nedan. Som analys- och kontrollmetoder användes SDS-PAGE, CD och AFM. Framställning av α -synuklein samt förberedelse av bulklösningar beskrivs även i kapitlet.

3.1 Tioflavin T-aggregeringsassay

För att undersöka aggregeringstiden för α -synuklein samt för α -synuklein i närvaro av olika CA användes fluorescensspektroskopi. Prover förbereddes med dextran 20, dextran 70, PEG 8 och PEG 35, för att sedan blandas med protein, ThT, etylendiamintetraättiksyra (EDTA) och trisbuffrad saltlösning (TBS). De koncentrationer av CA som användes var för dextran 100, 150, 200 och 250 mg/mL samt för PEG 50, 100, 150 och 200 mg/mL. Varje prov förbereddes utöver CA med 50 μ M α -synuklein, 20 μ M ThT, 2 μ M EDTA samt TBS för att uppnå en slutvolym på 275 μ L. Även prover utan α -synuklein respektive CA förbereddes. Experimenten utfördes med 96-brunns mikrotiterplattor i en Flourostar Omega fluoroscensspektrometer under 2-5 dygn. Hur en platta laddades beskrivs i figur 21 i bilaga C. En aggregeringsassay innehöll generellt sett två CA och fyra olika koncentrationer av respektive CA. Varje förhållande upprepades maximalt fem gånger per assay och varje assay repeterades tre gånger, se tabell 2 i bilaga A. En mer detaljerad beskrivning av tillvägagångssättet för Tioflavin T-aggregeringsassay finns beskrivet i bilaga C.

För separation och framrening av α -synukleinmonomerer användes en gelfiltreringskromatograf från Bio-Rad i vilken 600 μL proteinlösning flödade genom en Enrich70-kolonn. Vid utflödet detekterades absorbansen vid 280 nm med vilken koncentrationen av α -synuklein beräknades. Denna separation genomfördes i början av varje assay för att undvika att experiment startades med protein som redan aggregerat.

De fall när erhållen koncentration av monomerer från kromatografen var för låg centrifugerades lösningarna i tre minuter vid 13.4 RPM. Den nya koncentrationen av monomeriskt α -synuklein efter centrifugering uppmättes med absorptionsspektroskopi vid 280 nm med hjälp av ekvation 6 och den molära absorptionskoefficienten $\epsilon=5960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

För att analysera tillväxtfasen av aggregaten, där förlängning sker, tillämpades *seeded aggregation* vid enskilda försök. En *seeds*-koncentration på 2.5 μM användes och tillsattes till separata prover. Proverna förbereddes på samma sätt som ovan men enbart de två högsta koncentrationerna för respektive CA användes. Även här genomfördes analysen i en 96-brunns mikrotiterplatta i en Fluorostar Omega fluoroscensspektrometer under två till fem dygn. Hur plattan laddades beskrivs i figur 22 i bilaga C.

3.2 Kontroll- och analysmetoder

3.2.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE genomfördes för att studera kvarvarande mängd α -synuklein i monomerform efter proteinaggregering med olika CA. Proverna uppvärmdes till 20 °C i tre minuter. Gelen som användes var SDS-PAGE NuPAGETM 4-12 % Bis-Tris gel (1,0 mm x 12 brunnar). Gelen färgades med Coomassie Brilliant Blue R-250 och innan användning tvättades gelen med vatten. Maskinen sattes upp och MES SDS Running Buffer fylldes på så att gelen täcktes. Proverna från brunnarna pipetterades till en koncentration av 15 μM . Dessa prover samt en kontrollstege med referensstorlekar laddades därefter på gelen. Därefter tilläts proverna vandra genom gelen över en spänning på 200 V i 30 minuter. SDS-PAGE genomfördes inte för *seeded aggregation*.

3.2.2 Cirkulär dikroism spektroskopi

CD användes för att undersöka sekundärstrukturen av α -synuklein i närvaro av CA, med JASCO J-810 Spectropolarimeter. Först studerades ej aggregerat α -synuklein i närvaro av dextran 20, dextran 70, PEG 8 och PEG 35. Proteinkoncentrationen beräknades med hjälp av ekvation 6. En spädningsserie förbereddes så att olika koncentrationer [100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL och 250 mg/mL] av CA erhöles. Till spädningen användes TBS samt α -synuklein utspädd till en koncentration på 5 μM . Även prover enbart innehållandes CA förbereddes och analyserades. Alla mätningar genomfördes tre

gångar och ett medelvärde beräknades. Antalet laborationer för respektive CA beskrivs i tabell 1 i bilaga A.

För att kontrollera resultaten från Tioflavin T-aggregeringsassay studerades aggregerat α -synuklein. Prover genomfördes endast för de högsta koncentrationerna av CA, det vill säga 250 mg/mL för dextran 20 och dextran 70, samt 200 mg/mL för PEG 8 och PEG 35. Proverna spädades ut till 5 μ M med hjälp av tris-buffert. Ett prov med enbart α -synuklein och ett prov med enbart tris-buffert analyserades därtill.

Två typer av rådata erhöles efter mätning. Det var data från spädningsserien innehållande α -synuklein, CA och buffert samt rådata från spädningsserie innehållande endast CA och buffert. För att ta fram jämförbara grafer så subtraherades den sistnämnda rådatan från den tidigare nämnda rådatan.

3.2.3 Atomkraftsmikroskopi

AFM användes för att bestämma morfologin hos aggregaten. Samtliga CA undersöktes i syfte att undersöka om skillnader fanns mellan de bildade fibrillerna. Prover förbereddes från aggregerade prover erhållna från Tioflavin T-aggregeringsassay utan att ta hänsyn till de olika koncentrationerna. De aggregerade proverna samlades och brunnarna tvättades med 100 mL MQ-vatten för att erhålla så mycket av fibrillerna som möjligt. Proverna centrifugerades vid 13.4 RPM i 30 minuter för att erhålla en pellet med fibriller. Pelleten löstes upp i 1.5 mL MQ-vatten varpå prover å 100 μ L pipetterades på nyligen kluven glimmer vilken inkuberades i 15 minuter, tvättades tre gånger med MQ-vatten och torkades under kvävgasflöde. Proverna studerades sedan med AFM och bilder av de bildade fibrillerna erhöles. NTEGRA Prima inställningar (NT-MDT) användes med en guldbelagd spets av monokristallint kisel vid en fjäderkonstant på 5.1 N/m och en resonansfrekvens på 180 Hz. En bildstorlek med 512x512 pixlar erhöles med en scanningshastighet på 0.5 Hz. Bilderna analyserades därefter med programvaran WSxM 5.0 [48]. Antalet laborationer för respektive CA beskrivs i tabell 3 i bilaga A.

3.3 α -synuklein och bulklösningar

3.3.1 Bulklösningar

TBS-buffert bereddes genom att lösa en TBS-tablett [49] i 500 mL MQ vatten. Bulk-lösningar av CA framställdes genom att väga upp pulver av CA och lösa i TBS. För dextran 20 användes 20 g i 30 mL TBS, för dextran 70 användes 19.698 g i 50 mL TBS, för PEG 8 användes 12,5g i 40 mL TBS och för PEG 35 användes 12.501 g i 50 mL TBS. Lösningarna filtrerades och koncentrationerna blev 367.83 mg/mL för dextran 20, 393.99 mg/mL för dextran 70, 312.5 mg/mL för PEG 8 och 250 mg/mL för PEG

35. ThT-lösning förbereddes genom att lösa 14.35mg koncentrerat ThT i 10 mL TBS vilket gav en slutkoncentration på 5.7 mM.

3.3.2 α -synuklein

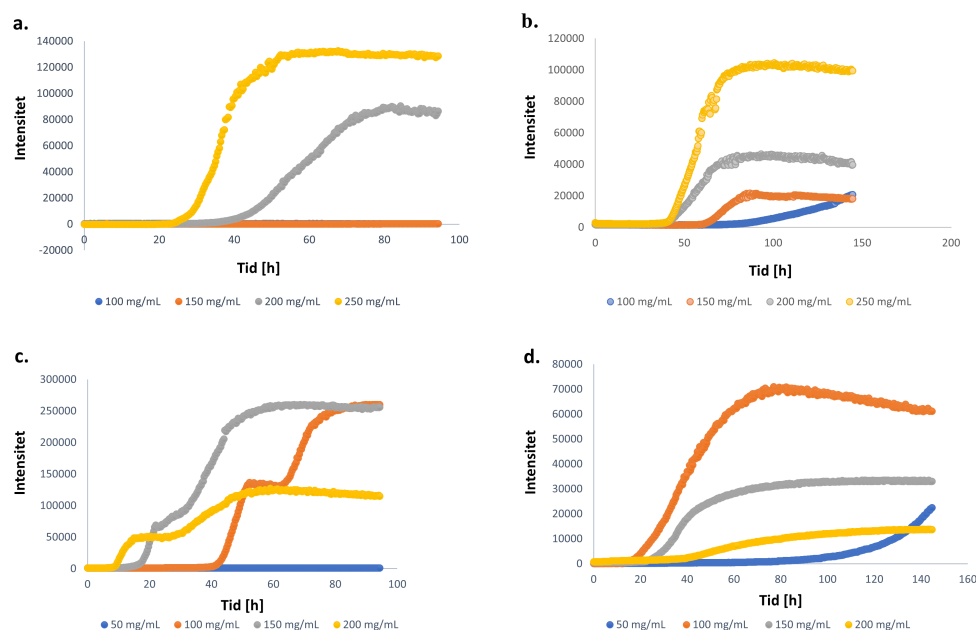
För att genomföra experiment på mänskligt α -synuklein framställdes detta protein genom uttryck i, och rening från, *E-Coli* bakterier. Plasmider innehållande den genetiska koden för α -synuklein transformerades in i *E-Coli* och det uttryckta α -synukleinet renades sedan fram genom att använda jonbyteskromatografi och gelfiltrering. För detaljerad beskrivning av framställningen av α -synuklein se bilaga B.

4 Resultat

4.1 Tioflavin T-aggregeringsassay

Fluorescensen för α -synuklein utan CA studerades i 145 timmar och beskrivs i form av intensitet enligt figur 23 i bilaga C. Den blåa linjen i figuren motsvarar fluorescensen för α -synuklein och går ur figuren att utläsa som nästintill konstant noll.

I figur 8 visas aggregeringskurvor av α -synuklein tillsammans med dextran 20, dextran 70, PEG 8 och PEG 35. Intensiteten för de högre koncentrationerna för respektive CA ökar kraftigt och når alla en plattå. De lägre koncentrationerna uppvisar överlag ingen, eller enbart liten ökad intensitet inom den givna tidsramen för respektive CA, vilken låg mellan 100 och 150 timmar. Graferna i figur 8 visar resultatet från enbart en laboration men liknande resultat uppnåddes för övriga laborationer. PEG 8 uppvisade varierande resultat för alla laborationer och nedan visas således enbart endast ett fall av dessa i figur 8(c). Återkommande mönster för PEG 8 upptäcktes dock när en andra plattå återfinns i mitten av aggregeringskurvorna för majoriteten av experimenten.



Figur 8: Grafer av fluorescensen, i form av intensitet, för α -synuklein över tid tillsammans med (a) dextran 20, (b) dextran 70, (c) PEG 8 och (d) PEG 35. Dextran analyserades för 100, 150, 200 och 250 mg/mL och PEG analyserades för 50, 100, 150 och 200 mg/mL. Koncentrationen av α -synuklein var $[50 \mu\text{M}]$.

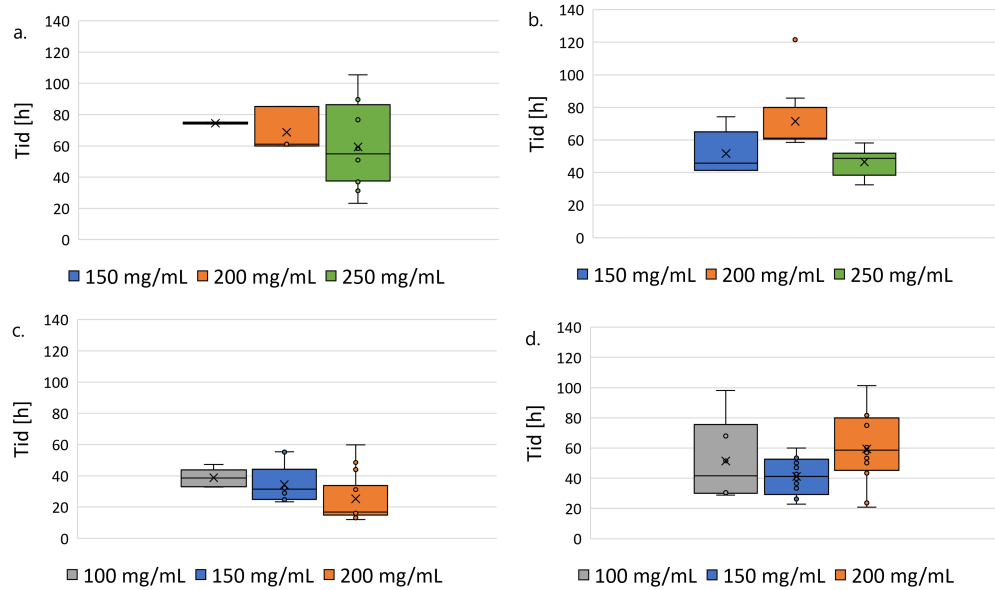
I figur 24 i bilaga C uppvisas normaliserade grafer av figur 8. Koncentrationerna 50 mg/mL för PEG 8 och PEG 35 samt 100 mg/mL för dextran 20 och dextran 70 når ingen plattå i figur 8 och har därför exkluderats i figur 24 i bilaga C. Även 150 mg/mL har exkluderats för dextran 20 eftersom ingen intensitetsökning sker.

Uträkningen av α -synukleins halvtid och lagfas utfördes enligt ekvation 1 samt 2, se avsnitt 2.5.2. Dessa resultat presenteras i figur 9 och figur 10 nedan. Endast de tre högsta koncentrationerna av respektive CA aggregerade till en plattå inom den undersökta tidsramen som varierade mellan 100 och 150 timmar.

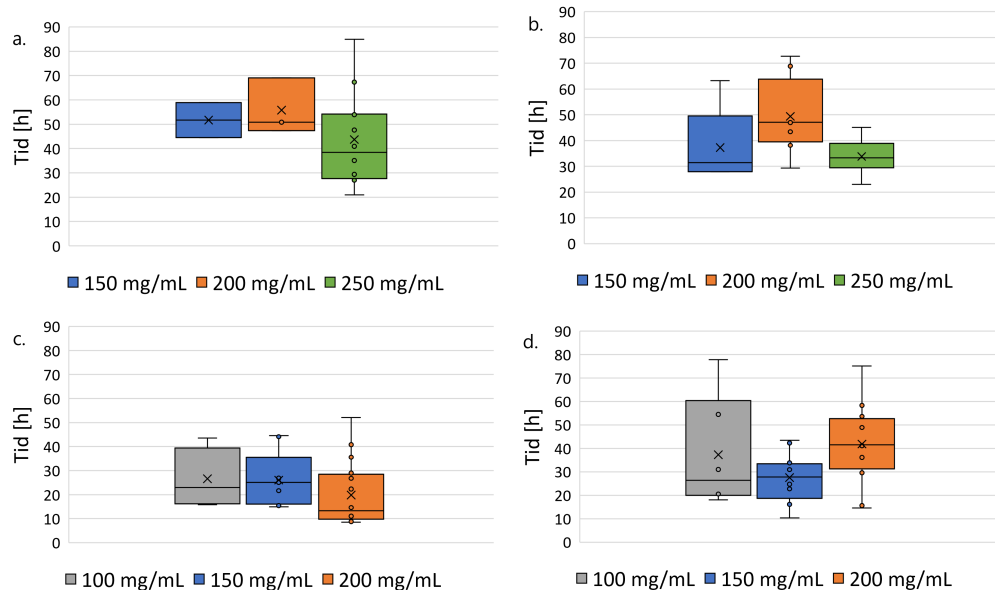
Halvtiderna för dextran 20, dextran 70, PEG 8 och PEG 35 framgår i figur 9. För dextran 20 var 250 mg/mL den koncentration som aggregerade proteinet snabbast med en genomsnittlig halvtid på 59 timmar. För dextran 70, 250 mg/mL, aggregerade proteinet snabbast med en halvtid på 46.5 timmar. För PEG 8 var det 200 mg/mL som var snabbast med en halvtid på 25 timmar medan för PEG 35 var det 150 mg/mL med en halvtid på 40 timmar. Antal datapunkter för aggregering vid de olika CA varierade för de olika koncentrationerna enligt tabell 4 i bilaga A.

Tiderna för lagfaserna visas i figur 10 där det framgår att lagfasernas längd varierar på samma sätt som halvtiderna. För dextran 20, dextran 70 och PEG 8 hade den högsta undersökta koncentrationen kortast lagfas. Alltså uppmättes kortast lagfas för dextran 20 vid 250 mg/mL till 43.7 timmar. Dextran 70 hade kortast lagfas vid 250 mg/mL på

33.8 timmar. För PEG8 var kortast lagfas 200 mg/mL på 19.8 timmar. PEG 35 hade sin kortaste lagfas vid näst högsta koncentrationen 150 mg/mL på 41.2 timmar.



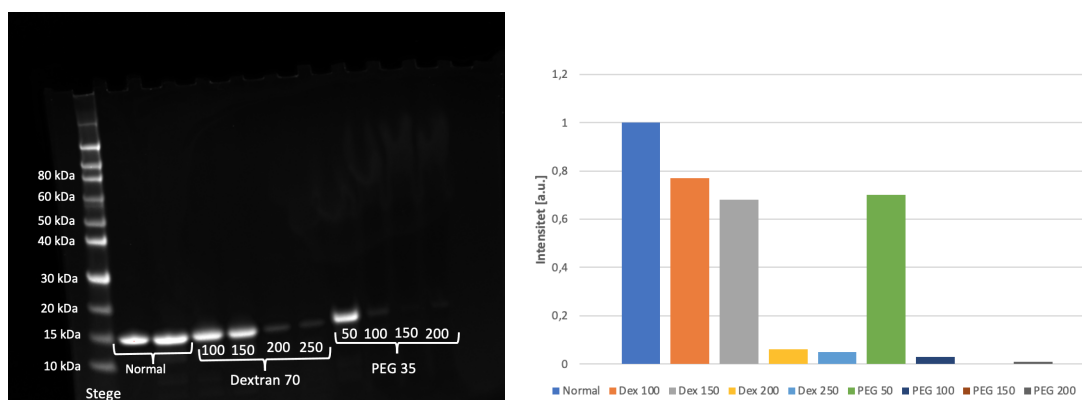
Figur 9: Halvtider för aggregerat α -synuklein med CA (a) dextran 20, (b) dextran 70, (c) PEG 8 och (d) PEG 35 vid de koncentrationer som gav aggregering. Antal datapunkter varierade enligt; dextran 20 (2, 3 och 12), dextran 70 (5, 8 och 10), PEG8 (6, 9 och 16) och PEG35 (6, 12 och 12).



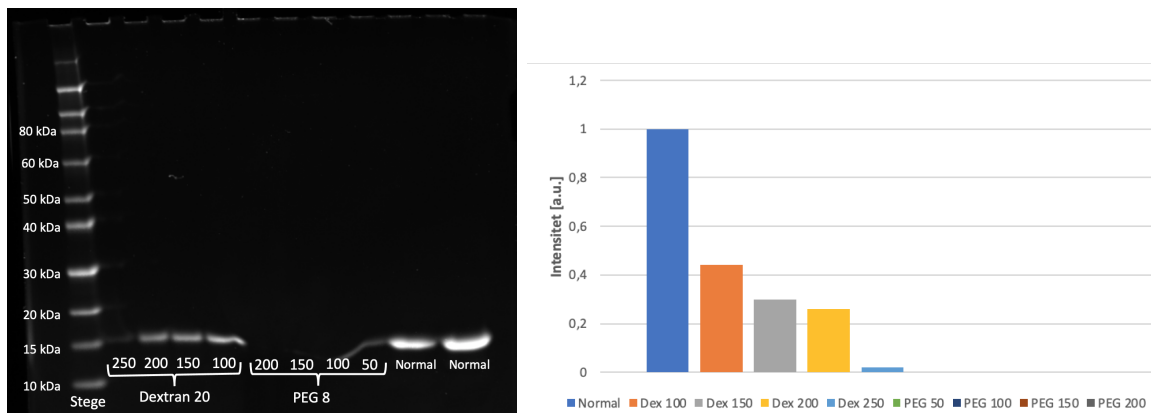
Figur 10: Lagfaser för aggregerat α -synuklein med CA (a) dextran 20, (b) dextran 70, (c) PEG 8 och (d) PEG 35 vid de koncentrationer som gav aggregering. Antal datapunkter varierade enligt; dextran 20 (2, 3 och 12), dextran 70 (5, 8 och 10), PEG8 (6, 9 och 16) och PEG35 (6, 12 och 12).

4.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE för dextran 70 samt PEG 35 visas nedan i figur 11 och för dextran 20 samt PEG 8 i figur 12. Analys av gelen visade att monomeriskt α -synuklein ger upphov till ett band motsvarande en molekylvikt på ca 15 kDa. SDS-PAGE av dextran 20 och dextran 70 uppvisar en minskad intensitet för högre koncentrationer av CA jämfört med lägre koncentrationer, vilket uppvisas i figur 11 och figur 12. Den lägsta undersökta koncentrationen av PEG 35 uppvisar hög intensitet jämfört med övriga koncentrationer för samma CA. Utöver det uppvisade varken PEG 8 eller PEG 35 några trender eller mätbara resultat.



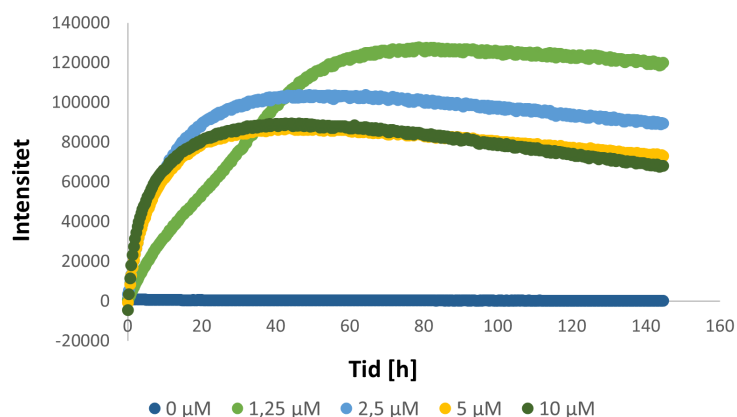
Figur 11: (a) SDS-PAGE för olika koncentrationer av dextran 70 och PEG 35 tillsammans med α -synuklein samt referens med normal av enbart α -synuklein. Även en stege analyserades som referens till andra intensiteter. (b) Förtydligande visualisering av respektive provs intensitet i SDS-gelen för dextran 70 och PEG 35 samt normal av α -synuklein. Intensiteten för proverna jämförs med intensiteten för normalen och graderas därefter mellan noll och ett, där ett innebär lika hög intensitet som normalen och noll innebär ingen intensitet. Alla koncentrationer är uppmätta i mg/mL.



Figur 12: (a) SDS-PAGE för olika koncentrationer av dextran 20 och PEG 8 tillsammans med α -synuklein samt referens med normal av enbart α -synuklein. Även en stege analyserades som referens till andra intensiteter. (b) Förtydligande visualisering av respektive provs intensitet i SDS-gelen för dextran 20 och PEG 8 samt normal av α -synuklein. Alla koncentrationer är uppmätta i mg/mL.

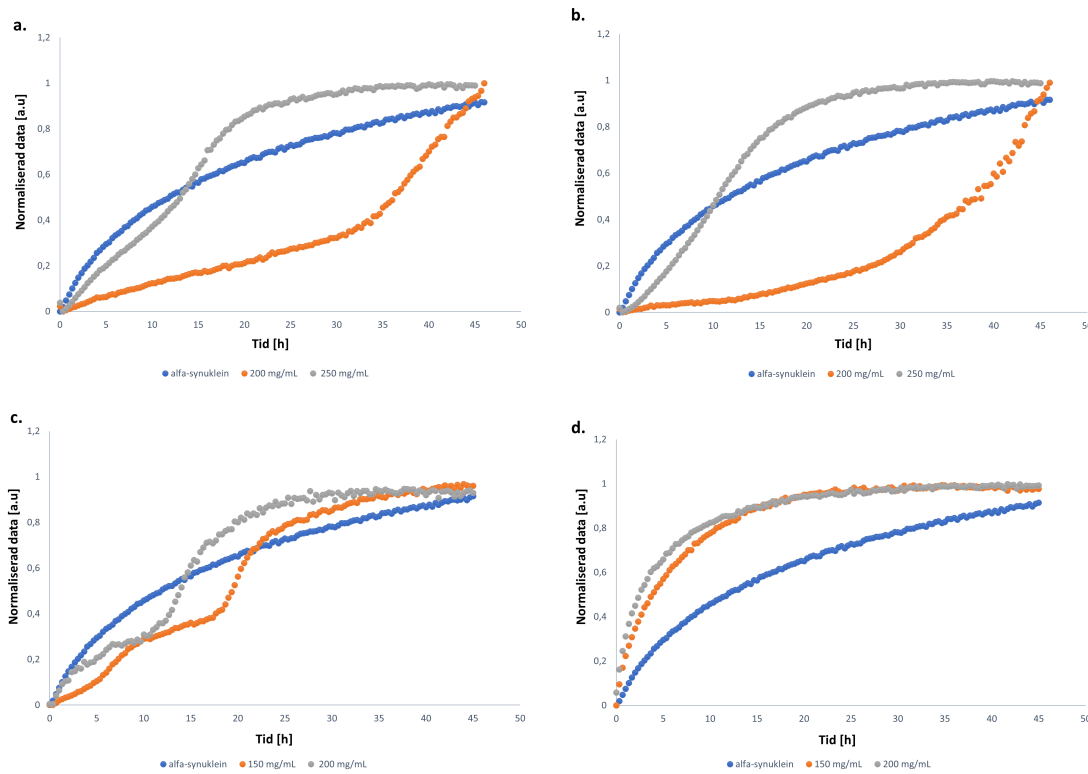
4.3 Seeds

Tillsättning av redan aggregerat α -synuklein i form av *seeds* till provlösningar med monomeriskt α -synuklein visas för olika koncentrationer i figur 13 nedan. Fluorescensen uppvisas i form av intensitet och proverna undersöktes i drygt 145 timmar. Vid 0 μM uppvisades ingen ökad intensitet under experimentets 145 timmar. 2.5 μM gav kortast halvtid runt 7 timmar och nådde en plattå vid ungefär 46 timmar. 5 μM och 10 μM nådde även sin plattå efter ungefär 46 timmar och hade en halvtid på 5 respektive 4 timmar. 1.25 μM hade en halvtid runt 25 timmar och nådde en plattå efter 79 timmar. Den initiala hastigheten för varierande koncentration av *seeds* har studerats experimentets första 1.67 timmar och resultatet presenteras i bilaga C i figur 25.



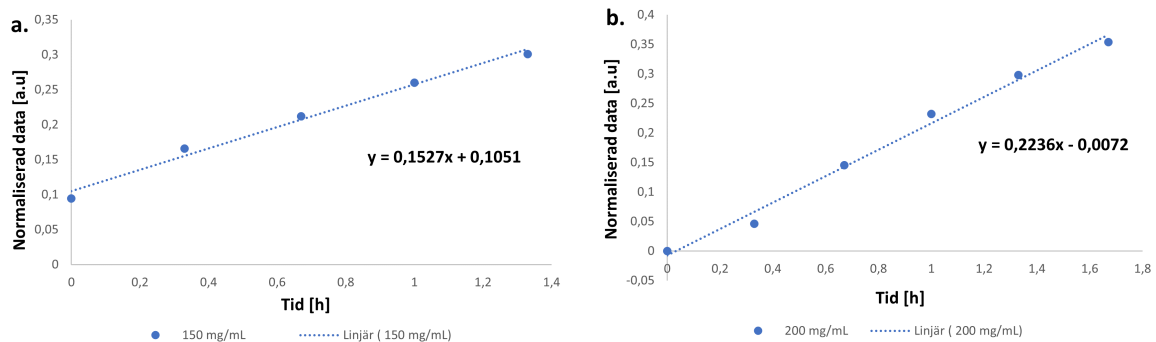
Figur 13: Intensiteten för α -synuklein vid tillsättning av olika koncentrationer av *seeds*. Varje graf har komponerats av fem *replicates* och medelvärdet av dessa *replicates* uppvisas i figuren. Koncentrationen av α -synuklein var 50 μM .

Normalisering av fluorescensen för α -synuklein tillsammans *seeds* samt olika CA visas i figur 14 nedan. PEG 35 är den enda CA vars två undersökta koncentrationer, som syns som gråa samt orangea linjer, genererar en högre lutning på kurvan de första timmarna. Övriga CA har lutningar som är mindre än fluorescenskurvan för enbart α -synuklein och *seeds*, som motsvaras det blåa linjen i alla grafer.



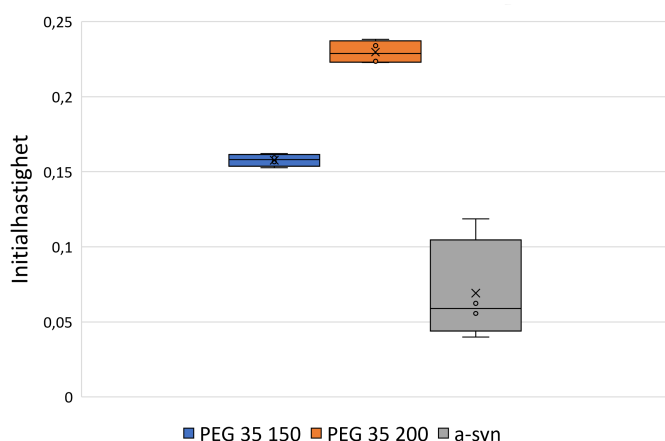
Figur 14: Normaliserade grafer av fluorescensen för α -synuklein [$50 \mu\text{M}$] vid tillsättning av *seeds* [$2,5 \mu\text{M}$] över tid tillsammans med (a) dextran 20, (b) dextran 70, (c) PEG 8 och (d) PEG 35. Dextran analyserades för 200 och 250 mg/mL och PEG analyserades för 150 och 200 mg/mL.

Lutningen på fluorescenskurvan under de första en till två timmarna studerades närmare för PEG 35 vid två olika koncentrationer och för fem *replicates*. En linjär anpassning till de första fem till sex datapunkterna genomfördes enligt figur 15 nedan. Skillnaden i antal datapunkter härrör från behovet att välja bort data som var avvikande.



Figur 15: Normaliserade datapunkterna av fluorescenskurvan för α -synuklein [$50 \mu\text{M}$] vid tillsättning av *seeds* [$2,5 \mu\text{M}$] samt (a) PEG 35 150 mg/mL och (b) PEG 35 200 mg/mL. En trendlinje har anpassats till datan och dess ekvation beskrivs i respektive graf ovan.

I figur 16 nedan visas låddiagram för normaliserade värden på lutningskonstanten, vilket innebär den initiala hastigheten för fluorescenskurvan under de första 1,67 timmarna för alla *replicates* för PEG 35. Resultatet indikerar att den initiala hastigheten för båda undersökta koncentrationer är avsevärt högre för fluorescenskurvan vid tillsättning av PEG 35, än med enbart α -synuklein och *seeds*. PEG 35 200 mg/mL genererar därtill en högre lutningskonstant än PEG 35 150 mg/mL.



Figur 16: Lutning av linjär anpassning för aggregeringskurvan under de första 1,67 timmarna för α -synuklein [$50 \mu\text{M}$] och *seeds* [$2,5 \mu\text{M}$], med PEG 35 150 mg/mL och 200 mg/mL jämfört med referens av enbart α -synuklein [$50 \mu\text{M}$] och *seeds* [$2,5 \mu\text{M}$]. Låddiagrammet är komponerat av värden från fem olika *replicates* för respektive koncentration.

4.4 Cirkulär dikroism spektroskopi

Sekundärstrukturen hos α -synuklein vid närvaro av CA undersöktes med CD. Figur 17 och figur 18 visar resultat från bakgrundssubtraherade CD-spektrum. Graferna i figur 17 visar ett minimum omkring 200 nm och låg ellipticitet över 215 nm, näst intill noll. I figur 18 visas CD-spektrum för sekundärstrukturen av aggregerat α -synuklein med de olika CA uppmätt i deras respektive högsta koncentration. I figur 18(a) uppvisar kurvan med aggregerat α -synuklein utan närvaro av CA ett maximum vid 190 nm och ett minimum vid 215 nm. I figur 18(b) visar kurvan för aggregerat α -synuklein med *seeds*, utan närvaro av CA, ett maximum vid 200 nm och ett minimum vid 220 nm.

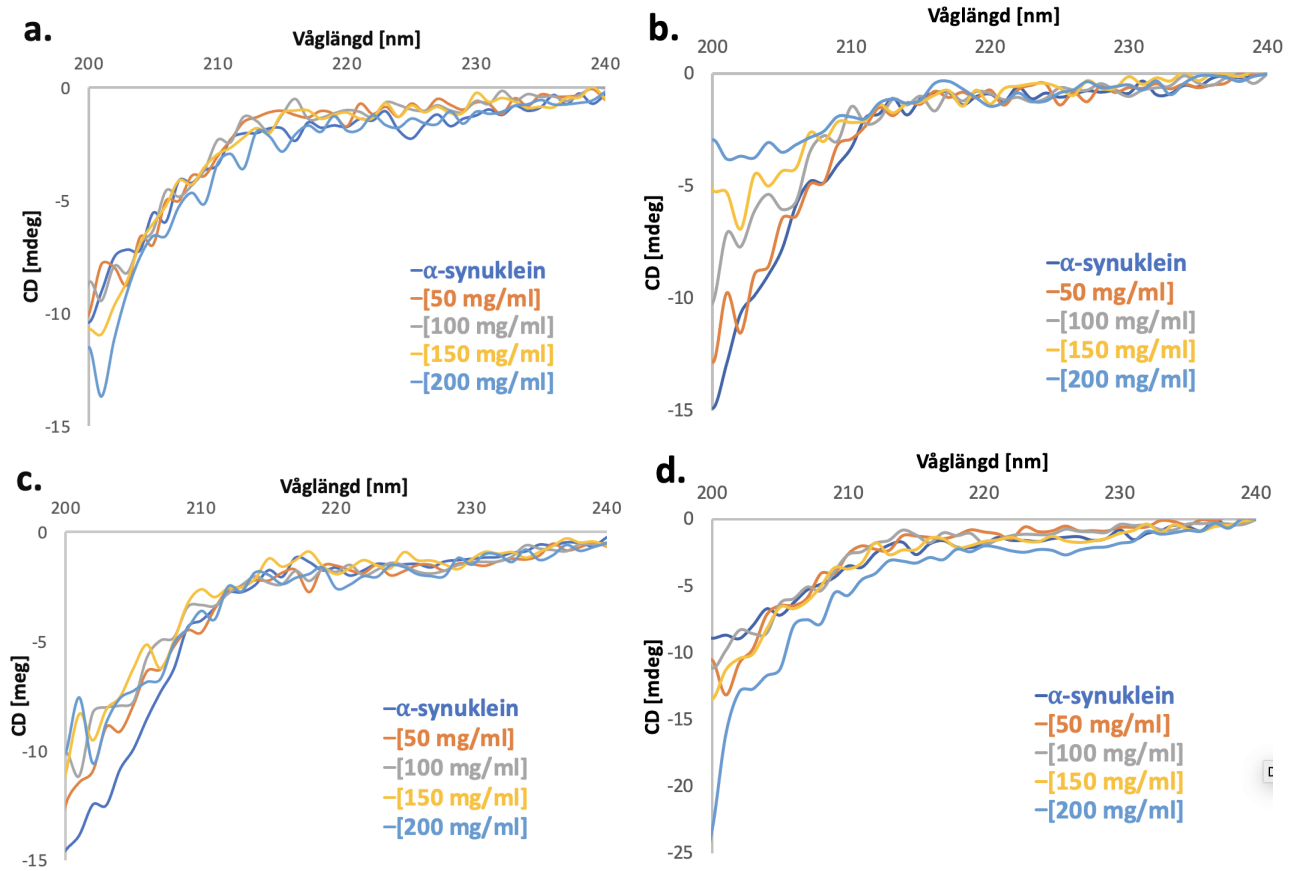


Figure 17: I graferna visas CD spektrum för α -synuklein med olika uppmätta koncentrationer av CA (a) dextran 20 (b) dextran 70 (c) PEG 8 och (d) PEG 35. Y-axeln är angiven i CD och x-axeln är våglängden i nm.

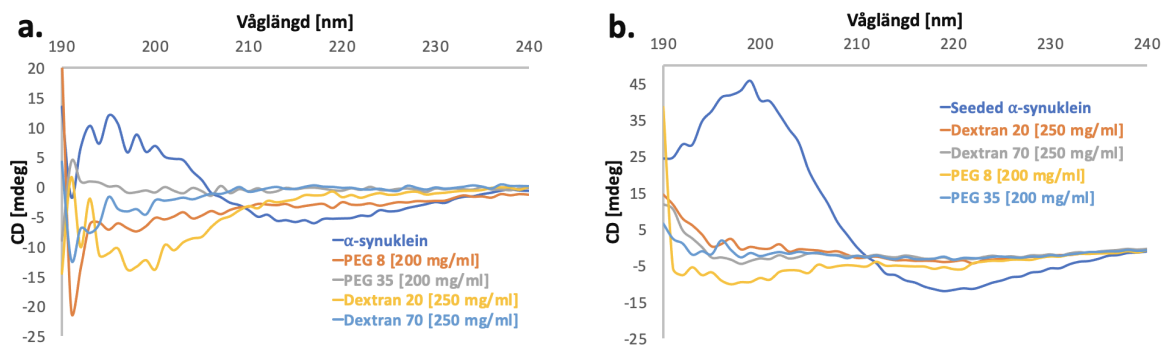
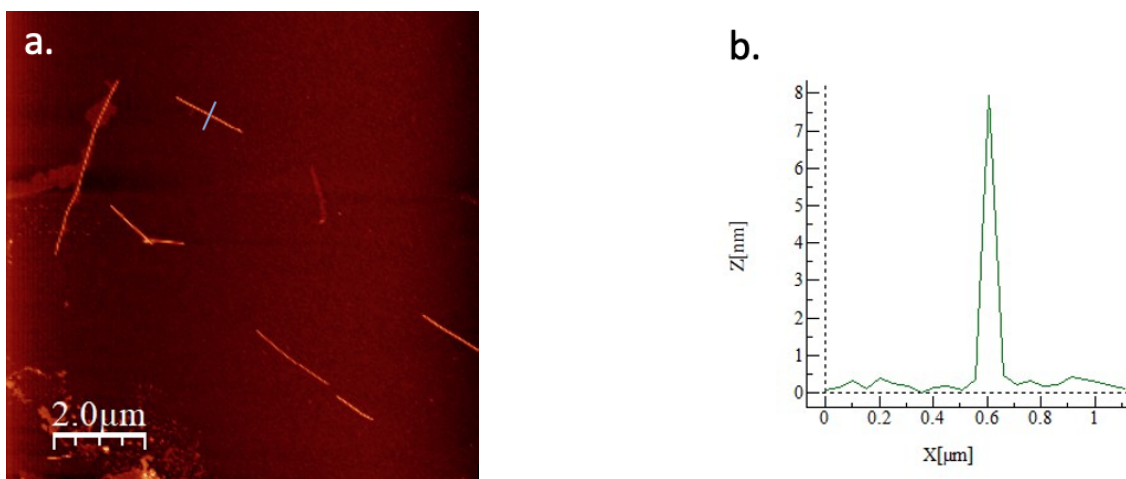


Figure 18: I graferna visas CD spektrum för aggregerat α -synuklein med olika CA för deras respektive högsta koncentrationer. Y-axeln är angiven i CD och x-axeln är våglängd i nm. (a) CD spektrum för aggregerat α -synuklein utan *seeds* och olika CA i deras respektive högsta koncentrationer. Aggregerat α -synuklein utan CA visas som referens. (b) CD spektrum för aggregerat α -synuklein med *seeds* och olika CA i deras respektive högsta koncentrationer. Aggregerat α -synuklein med *seeds*, utan CA, visas som referens.

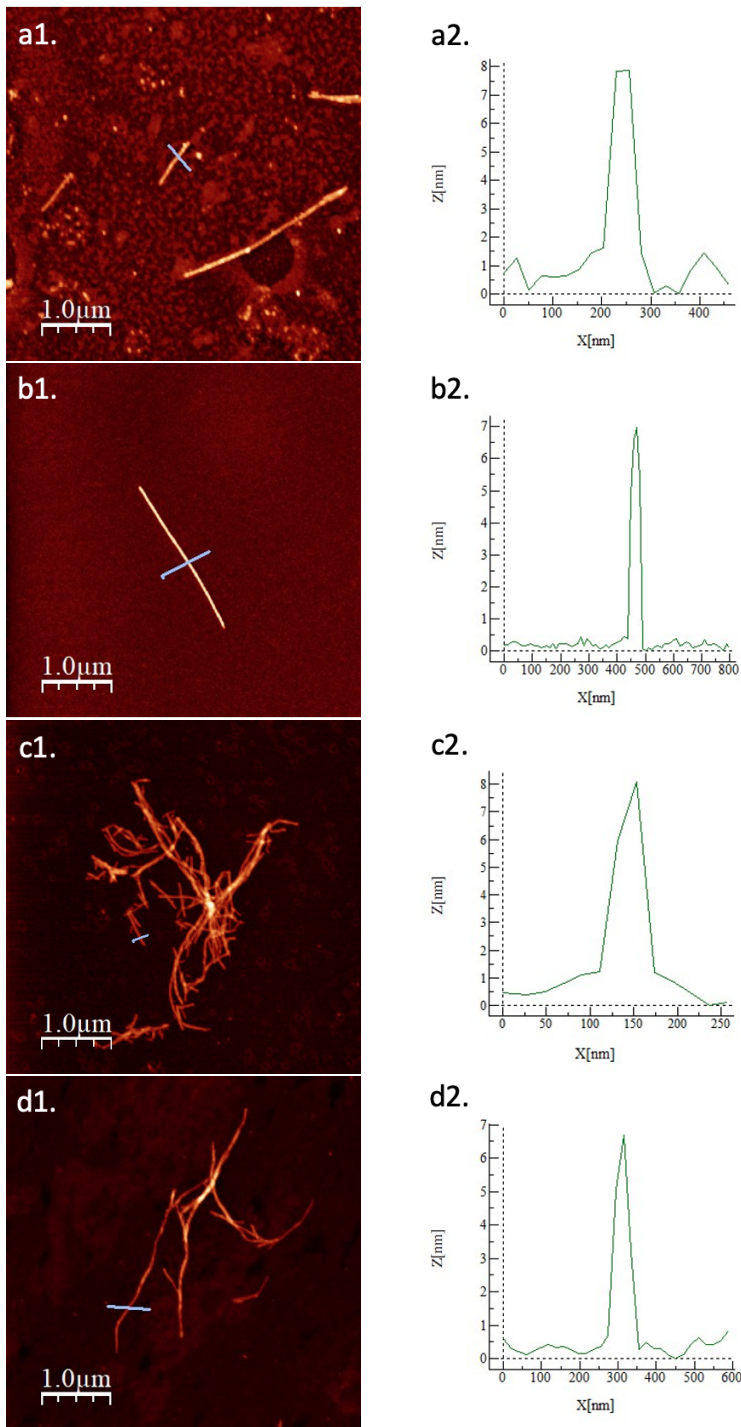
4.5 Atomkraftsmikroskopi

Från analys av aggregerade prover från experiment med seeds utan CA erhöles AFM-bilder med α -synukleinfibriller. Exempel på dessa fibriller visas i figur 19 där långa ogrenade fibriller återfinns. I figur 19(a) kan de tvinnade protofilamenten urskiljas och ur 19(b) kan utläsas att fibrillerna har en diameter på omkring 8 nm.



Figur 19: Fibriller på glimmer erhållna från aggregeringsexperiment med seeds utan CA. I (a) observeras långsmala strukturer utan förgreningar. Även ett visst tvinnande mönster går att urskilja vilket antas vara tvinnade protofilament. (b) visar den karaktäristiska höjden mellan 6-13 nm med höjdprofilen, Z, i nm för motsvarande den blå linjen i figuren.

Dessa jämfördes med fibriller erhållna från aggregering med olika CA, se figur 20. Fibriller återfanns för samtliga prover skapade med de fyra olika CA. För alla CA observerades fibriller vilka verkar vara långa ogrenade fibriller med diametrar mellan 6-10 nm. Vidare observerades för samtliga CA både fibriller vilka verkar vara tvinnade protofilament vilket syns i bilderna både som fibriller med ett återkommande tvinnat mönster, för tydligt exempel se figur 27 i bilaga D, samt ensamma protofilament med en lägre höjdprofil. Inga större skillnader observerades mellan de bildade fibrillerna i fråga om struktur och samtliga antas vara amyloida fibriller. Visst mönster kunde ses i organisationen av fibriller då fibrillerna skapade med PEG uppvisade kluster av fibrer medan dextran verkade i stor mån förekomma ensamma, framför allt för de större CA PEG 35 och dextran 70, se figur 26 i bilaga D.



Figur 20: Fibriller på glim-
mer under förhållanden med
olika CA (a1) dextran 20 (b1)
dextran 70 (c1) PEG 8 (d1)
PEG 35. (a2-d2) visar höjd-
profilerna, Z , i nm för motsva-
rande de blåa linjerna i respek-
tive figur.

5 Diskussion

5.1 Effekter av koncentration

Dextran 20, dextran 70, PEG 8 och PEG 35 ökar alla aggregeringshastigheten hos α -synuklein, se figur 8, där α -synuklein i närvaro av CA aggregerar i olika grad medan α -synuklein utan CA inte aggregerar alls inom det undersökta tidsintervallet, se figur 23. Närvaron av CA bidrar således till aggregering av α -synuklein, *in vitro*. Sett till koncentration observeras att de minsta koncentrationerna för samtliga CA förblir oaggregerade, vilket visar att även koncentration har en betydande roll för aggregeringshastigheten.

För mindre CA, såsom PEG 8 och dextran 20, återfinns en trend där högre koncentration verkar bidra till en snabbare aggregering, som förväntat. Däremot återfinns inget synligt linjärt samband mellan ökande koncentration samt aggregering för dextran 70, genom att endast observera halvtiderna. För dextran 70 observeras mönster som avviker från den förväntade trenden i figur 9, där den högsta koncentrationen (250 mg/mL) har kortast halvtid medan den näst högsta koncentrationen (200 mg/mL) har längre halvtid än den minsta koncentrationen. En möjlig felkälla kan vara att för få datapunkter för den lägsta koncentrationen har använts och att dess halvtid i själva verket är längre. Flera datapunkter har exkluderats från anpassningar på grund av att de ej hunnit nå mättnadsfas, varav resultat för den lägsta koncentrationen eventuellt kan vara missvisande. Vid kontroll med SDS-PAGE av både dextran 20 och dextran 70, se figur 11 samt figur 12, observeras att de högre koncentrationerna av CA medför en lägre monomerkoncentration av α -synuklein, varpå fler aggregat således formats i provet och tidigare resonemang kring att ökad koncentration medför snabbare aggregering stöds. Eftersom ökande koncentration verkar medföra snabbare aggregering för båda storlekarna av dextran samt PEG 8 finns underlag för att trängsel i celler främjar associering av proteiner, vilket leder till att de tar mindre plats i lösningen. Detta stödjer att *excluded volume*-effekter kan vara en bidragande orsak till ökande aggregering.

För PEG 35 tycks snabbast aggregering hittats vid 150 mg/mL. Figur 9 och figur 10 uppvisar att halvtid och lagtfas är kortare för 150 mg/mL än för 100 mg/mL och 200 mg/mL. Detta indikerar att aggregeringshastigheten inte ökar linjärt med ökad makromolekylär trängsel med PEG 35. Vid en viss koncentration av CA verkar α -synuklein övergå från att öka aggregeringshastighet på grund av *excluded volume*-effekter till att inhibera. Inhiberingen kan till exempel bero på *soft interaction* mellan PEG och α -synuklein eller en för hög viskositet. Diffusion blir svårare med ökad viskositet eftersom proteinerna har svårare att påträffa oligomerer att binda till. SDS-gelen för PEG 8 och PEG 35 uppvisar inga eller väldigt få signaler i gelen, vilket syns i figur 11 och figur 12. PEG är således inte lämplig för SDS-geler varav det inte går att dra några slutsatser kring PEG-resultaten.

5.2 Effekter av storlek

Utöver det faktum att koncentrationen av CA har en väsentlig roll vid amyloidbildningen, är det av intresse huruvida storlek också har en betydande inverkan på aggregeringshastigheten. Genom att jämföra halvtiderna för respektive CA i figur 9 kan man se att dextran 70 har kortare halvtider jämfört med dextran 20. Det indikerar att storleken på makromolekylen har betydande effekt på aggregeringshastigheten. Däremot uppvisar PEG ett motsatt beteende, där ökad storlek leder till längre halvtider. Alltså är det gynnsamt för aggregeringshastigheten att makromolekylen är större för dextran men mindre för PEG. Då PEG vid tidigare studier visat bidra med *soft interactions* och det faktum att resultaten skiljer sig mellan de två molekylerna, indikerar att det sannolikt är mer än enbart storlek och koncentration som påverkar aggregeringsprocessen för PEG.

Generellt för alla anpassningar som gjorts har det funnits fler data för de högre koncentrationerna av respektive CA än för de lägre, se avsnitt 4.1. Exempelvis för dextran 20 150 mg/mL fanns endast två värden för halvtid och lagfas av 14 undersökta *replicates* eftersom det endast var två som aggregerat till mättnadsfas vid den undersökta tiden. Även om dessa data kan ge en indikation på hur snabbt α -synuklein aggregerar i närvaro av 150 mg/mL dextran 20 så tros resultaten som presenteras i figur 9 och 10 visa på en snabbare aggregering än den verkliga. Detta gäller för dextran 20 (150 mg/mL och 200 mg/mL) och dextran 70 150 mg/mL, där 150 mg/mL tycks aggregera snabbare än 200 mg/mL men som skulle kunna bero på bristande data. Fler experiment med längre mättid hade gett mer pålitliga resultat.

Aggregeringskurvor med PEG 8 har ett avvikande beteende än det förväntade eftersom tendenser till två plattåer återfinns i de flesta erhållna resultaten. Anpassningar av dessa kurvor har därför gjorts med hänsyn endast till den första plattån, vilket kan ha påverkat de uträknade halveringstiden för PEG 8 drastiskt. I nuläget finns ingen självklar förklaring till detta beteende utan endast spekulationer kan göras angående händelseförloppet. En möjlig förklaring till beteendet är att någon strukturell förändring sker hos fibrillerna vid tidpunkten för plattån så att fler monomerer kan binda, och därmed öka fluorescensen ytterligare. Troligen sker alltså någon konformationsförändring vilket möjliggör ytterligare förlängning av fibrillerna. Eftersom detta beteende avviker starkt från andra studier av *excluded volume*-effekter finns ytterligare anledning att misstänka att PEG även bidrar med andra *soft interactions*.

5.3 Effekt på tillväxthastighet

Det är även intressant att undersöka huruvida det är lagfas eller tillväxtfas som CA påverkar, och i vilken utsträckning de gör det. För undersökning av tillväxtfasen exkluderas den primära nukleationen i lagfasen genom tillsats av *seeds*, varpå intensiteten

ökar direkt, se figur 14. Tillsättningen av *seeds* genererar en snabbare aggregering för alla undersökta koncentrationer av *seeds*, se figur 13. $1.25 \mu\text{M}$ skiljer sig något från $2.5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ och $10 \mu\text{M}$ som alla uppvisar liknande aggregeringskurvor. Efter att koncentrationen av *seeds* blivit tillräckligt hög, verkar inte aggregeringshastigheten påverkas av ytterligare ökning av andelen *seeds*.

Enligt figur 14 syns det att tillsats av PEG 35 till α -synuklein med *seeds* leder till snabbare aggregering och således gynnar *elongation* i tillväxtfasen. Resultatet stämmer väl överens med resonemanget att *excluded volume*-effekter främjar aggregering av α -synuklein då dessa aggregat tar upp mindre plats. För övriga CA, dextran 20, dextran 70 och PEG 8, leder dess tillsats till långsammare aggregering jämfört med α -synuklein och *seeds* i buffert. De CA som ger långsammare aggregering av α -synuklein med *seeds* inhiberar α -synukleins *elongation* och då figur 8 visar att alla CA gynnar aggregering måste en alternativ process aktiveras. Troligt kan vara att det är den primära eller sekundära nukleationen som går snabbare. Vidare analyser krävs för att undersöka dessa reaktionsvägar.

5.4 Effekt på fibriller

För att dra slutsatser från morfologi och struktur hos de bildade aggregaten användes AFM-studier. Fibrillerna som återfanns från proverna skapade utan CA hade liknande diameter som fibriller från andra studier av α -synukleinfibriller och antas därför vara amyloida fibriller. Fibriller som formats i närvaro av CA delar struktur och utseende med de som formats utan CA, och alla antas därav vara amyloida fibriller, vilket stödjer våra resultat från ThT-aggregeringsassays.

Från de prover som analyserats med AFM återfanns även ett visst mönster i hur fibrillerna var arrangerade till varandra på glimmern. Eftersom fibriller från dextran ofta återfanns ensamma medan fibrillerna skapade med PEG observerades vara samlade i kluster, finns ännu en anledning att tro att PEG bidrar med *soft interactions*. Noterbart är att vid studier av AFM undersöks mycket små områden av den tillgängiga glimmerytan. Därav är de fibriller som återfunnits troligtvis en mycket liten del av de befintliga fibrillerna på provet, vilket möjliggör att strukturen hos de fibriller som återfunnits inte reflekterar strukturen hos majoriteten av fibrillerna.

För att ytterligare undersöka morfologin och strukturen hos aggregaten användes även CD. CD-resultaten i figur 6 visar en ostrukturerad form vilket är typiskt för α -synuklein som inte har aggregerat. Det visar också att undersökta CA inte interagerar med α -synuklein direkt. Det återfanns ingen β -flak struktur hos de prover av α -synuklein som aggregerat i närvaron av CA, se figur 18. Däremot återfanns β -flak struktur hos α -synuklein prover som fick aggregera med bara *seeds*. Sett till AFM-studierna stöds tesen att α -synuklein aggregerar eftersom fibriller återfanns för samtliga CA. De fibriller som återfanns hade samma morfologi som de fibriller vilka skapades utan närvaron av

CA. Detta tyder på att framställningen av prover för mätningarna gått fel till då de oaggregerade proverna med CA indikerar att CA inte är ett störningsmoment för mätningarna. ThT-aggregeringsassays, SDS och AFM stödjer alla att aggregering har skett vilket indikerar att CD-mätningarna har någon form av felkälla. Felsökning i metoden för CD-mätningarna borde därför utföras vid upprepning av experimentet. En möjlig felkälla kan vara att fibrillerna blev kvar i provrör vid pippetterssteg och därmed inte återfanns i kyvetten vid mätningen. En annan möjlig felkälla kan vara att fibrillerna fastnade med CA vid centrifugering.

5.5 Jämförelse av dextran och PEG

I jämförelse på samma koncentration, 200 mg/mL, är PEG 8 den CA med kortast lagfas och halvtid. Därefter kommer PEG 35, dextran 70 och sist dextran 20. Detta tyder på att PEG 8 ökar aggregeringshastighet mest av de testade CA. Jämförelsen gjordes vid 200 mg/mL då det för denna koncentration finns flest data. Det är värt att notera att *soft interactions* hos PEG molekyler kan vara anledningen till att de generellt sett är snabbare på att aggregera α -synuklein. Dextranmolekyler är med andra ord mer lämpliga att använda om man endast vill kolla på *excluded volume* effekter. PEGs *soft interactions* utgör ett intressant område att utforska vidare.

6 Slutsats

Aggregeringskinetiken för α -synuklein är beroende av flera faktorer. *Crowding agents* gynnar amyloidbildning genom *excluded volume*-effekter, och olika *crowding agents* gynnar bildningen genom olika mekanismer. För dextran verkar både ökad koncentration och storlek gynna aggregeringshastigheten, medan den verkar hämma *elongation*. PEG beter sig väldigt olika beroende på storlek. PEG 8 följer ett linjärt beteende i ökning av aggregeringshastighet med ökande koncentration, trots avvikande aggregeringskurvor, men samtidigt hämmas *elongation*. För PEG 35 finns inget linjärt samband mellan koncentration och aggregeringshastighet, samtidigt som *elongation* gynnas. Eftersom vissa *crowding agents* inhiberar *elongation* samtidigt som aggregeringshastigheten ökar bör alternativa mekanismer, såsom primär eller sekundär nukleation, främjas. Vidare undersökning kan ge svar om reaktionsvägar för dessa *crowding agents*.

Morfologin hos studerade fibriller skapade med *crowding agents* har alla avlång ogrenad struktur med diameter som överensstämmer med amyloida fibriller av α -synuklein från andra studier. Även tecken på tvinnade protofilament observerades, vilket stödjer att amyloida fibriller skapats med samtliga *crowding agents*.

Rapporten öppnar också upp för nya vinklar att studera *crowding agents*. Dextran visar sig vara mest lämpad för studier av *excluded volume*-effekter medan PEG uppvisar

avvikande beteenden som möjliggör för nya teorier som kräver ytterligare studier för förståelse. Vidare studier krävs även för att kunna dra fler konkreta slutsatser och för att på sikt kunna bidra till förståelsen kring uppkomsten av Parkinsons sjukdom.

Referenser

1. Hassan A, Wu S, Schmidt P m.fl. What are the issues facing Parkinson's disease patients at ten years of disease and beyond? Data from the NPF-QII study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18:S10–4. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2012.06.014.
2. Dorsey E, Sherer T, Okun M och Bloem B. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2018;8(s1):3–8. DOI: 10.3233/JPD-181474.
3. Goldman S. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:141–64. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937.
4. Derrickson B och Tortora J. *Introduction to the Human Body.* 11. utg. John Wiley&Sons; 2019.
5. Breydo L, Wu JW och Uversky VN. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1822(2):261–85. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.002.
6. Lew M. Overview of Parkinson's disease. *Pharmacotherapy.* 2007;27(12 Pt 2):155S–60S. DOI: 10.1592/phco.27.12part2.155S.
7. Breydo L, Reddy KD, Piai A, Felli IC, Pierattelli R och Uversky VN. The crowd you're in with: effects of different types of crowding agents on protein aggregation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844(2):346–57. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.11.004.
8. Widner H och Marktorp C. *Läkemedelsboken* [Internet]. Stockholm; Läkemedelsverket: 2014. [citerad 2021-03-09]. Hämtad från: <https://lakemedelsboken.se>.
9. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R och Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997;388(6645):839–40. DOI: 10.1038/42166.
10. Balestrino R och Schapira A. Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 2020;27(1):27–42. DOI: 10.1111/ene.14108.
11. Scatton B, Rouquier L, Javoy-Agid F och Agid Y. Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology.* 1982;32(9):1039. DOI: 10.1212/wnl.32.9.1039.
12. Wakabayashi K. [Lewy body formation in Parkinson's disease: neurodegeneration or neuroprotection?]. *Rinsho Shinkeigaku.* 2008;48(11):981–3. DOI: 10.5692/clinicalneurol.48.981.
13. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F och Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2013;47(2):495–508. DOI: 10.1007/s12035-012-8280-y.
14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K och Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4. utg. New York: Garland Science; 2015.

15. UniProt. UniProtKB - P37840 (SYUA_HUMAN) [Elektronisk bild]. [citerad 2021-03-09]. Hämtad från: https://www.uniprot.org/uniprot/P3_7840.
16. Munishkina LA, Ahmad A, Fink AL och Uversky VN. Guiding protein aggregation with macromolecular crowding. *Biochemistry*. 2008;47(34):8993–9006. DOI: 10.1021/bi8008399.
17. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A och Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(1):38–48. DOI: 10.1038/nrn3406.
18. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(2):a009399. DOI: 10.1101/cshperspect.a009399.
19. Eisenberg D och Jucker M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* 2012;148(6):1188–203. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.022.
20. Iadanza M, Jackson M, Hewitt E, Ranson N och Radford S. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(12):755–73. DOI: 10.1038/s41580-018-0060-8.
21. Chiti F och Dobson C. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem*. 2017;86:27–68. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
22. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN m. fl. A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*. 2007;14(3):179–83. DOI: 10.1080/13506120701460923.
23. Lührs T, Ritter C., Adrian M m. fl. S3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1–42) fibrils [Elektronisk bild]. 2005 [citerad 21-05-13]. DOI: 10.1073/pnas.0506723102.
24. Stromer T och Serpell L. Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril [Elektronisk bild]. 2005 [citerad 21-05-13]. DOI: 10.1002/jemt.20190.
25. Fowler DM, Koulov AV, Balch WE och Kelly JW. Functional amyloid – from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(5):217–24. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.03.003.
26. Tuttle M, Comellas G, Nieuwkoop A m. fl. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(5):409–15. DOI: 10.1038/nsmb.3194.
27. Meisl G, Kirkegaard J och Arioso Pea. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nat Protoc*. 2016;11(2):252–72. DOI: 10.1038/nprot.2016.010.
28. Cohen S, Vendruscolo M, Dobson C och Knowles TP. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *J Mol Biol*. 2012;421(2-3):160–71. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.02.031.
29. Tuttle M, Comellas G, Nieuwkoop A m. fl. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein [Elektronisk bild]. 2016 [citerad 2021-05-12]. Hämtad från: <https://www.nature.com/articles/nsmb.3194>.

30. Kuznetsova IM, Turoverov KK och Uversky VN. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):23090–140. DOI: 10.1007/s00018-018-2894-9.
31. Zhou HX, Rivas G och Minton AP. Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:375–97. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125817.
32. Christiansen A och Wittung-Stafshede P. Quantification of Excluded Volume Effects on the Folding Landscape of *Pseudomonas aeruginosa* Apoazurin In Vitro. *Biophys J*. 2013;105(7):1689–99. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.08.038.
33. Miklos A, Li C, Sharaf N och Pielak G. Volume Exclusion and Soft Interaction Effects on Protein Stability under Crowded Conditions. *Biochemistry*. 2010;49(33):6984–91. DOI: 10.1021/bi100727y.
34. Lakowicz J. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2. utg. Kluwer Academic/Phenum Publishers; 1999.
35. Biancalana M och Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(7):1405–12. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
36. Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C m. fl. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol*. 2005;151(3):229–38. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.06.006.
37. Nothingserious. File:Thioflavin T.svg [Elektronisk bild]. 2021 [citerad 21-04-15]. Hämtad från: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thioflavin_T.svg. (CC0 1.0).
38. Camino JD, Gracia P, Chen SW m. fl. The extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel β -sheet alpha-synuclein aggregates. *Chem Sci*. 2020;11(43):11902–14. DOI: 10.1039/d0sc05297c.
39. Agrenius Gustafsson T. En kvantkemisk studie av elektronisk cirkulär dikroism hos oligopeptider av alanin [Elektronisk bild]. 2018 [citerad 2021-03-09]. Hämtad från: <http://kth.diva-portal.org/smash/get/diva2:1229878/FULLTEXT01.pdf>.
40. Brahms S och Brahms J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol*. 1980;138(2):149–78. DOI: 10.1016/0022-2836(80)90282-X.
41. Woody R. [4] Circular dichroism. 1995;241:34–71. DOI: 10.1016/0076-6879(95)46006-3.
42. Farré M och Barceló D. Comprehensive Analytical Chemistry. Woodhead Publishing: 2012. Kap. 1;1–32.
43. Wickramasinghe H och Martin Y. Method for imaging sidewalls by atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett*. 1994;64(19):2498–500. DOI: 10.1063/1.111578.

44. Sinha RS. Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites. Woodhead Publishing: 2013. Kap. 4;74–88.
45. Atkins P, Jones L och Laverman L. Chemical Principles: The Quest for Insight. 7. utg. New York: W.H. Freeman och Company; 2016.
46. Pace C N, Vajdos F, Fee L, Grimsley G och Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci. 1995;4(11):2411–23. DOI: 10.1002/pro.5560041120.
47. Scientific TF. Overview of protein Electrophoresis[Internet]. [citerad 2021-04-23]. Hämtad från: <https://www.thermofisher.com/se/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html>.
48. Horcas I, Fernández R, Gómez-Rodríguez J, Colchero J, Gómez-Herrero J och Baro A. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. Rev Sci Instrum. 2007;78:013705. DOI: 10.1063/1.2432410.
49. KGaA M. Tris Buffered Saline[Internet]. Darmstadt: Sigma-Aldrich; [citerad 2021-05-11]. Hämtad från: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/94158?lang=en®ion=SE&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntry-_-prodMerch10-1.

A Allmän laborationsdata

I denna del av bilagan presenteras de olika laborationsdatumen för CD, AFM och Tioflavin T-aggregationassays samt antalet datapunkter för halvtider och lagfaser.

Tabell 1: Datum då de olika CDexperimenten utfördes. Olika koncentrationer studerades utav dextran 20 kDa, dextran 70 kDa, PEG 8 kDa och PEG 35 kDa. Experimenten genomfördes med/utan WT α -synuklein, och med/utan seeds för α -synuklein i både aggregerad och ej aggregerad form. Experimenten utfördes enligt beskrivning i avsnitt 3.2.2

Datum	Dextran20 kDa	Dextran70 kDa	PEG8 kDa	PEG35 kDa	Seeds
2021-02-12				X	
2021-02-16		X			
2021-03-03	X				
2021-03-18			X		
2021-04-13	X	X	X	X	
2021-04-22	X	X	X	X	X

Tabell 2: Datum för Tioflavin T-aggregationassays för mätning av dextran 20 kDa, dextran 70 kDa, PEG 8 kDa PEG 35 kDa med/utan WT α -synuklein, och med/utan seeds. Experimenten utfördes enligt handledarmanual i bilaga C.1 samt beskrivs övergripande i avsnitt 3.1

Datum	Dextran20 kDa	Dextran70 kDa	PEG8 kDa	PEG35 kDa	Seeds
2021-02-10				X	
2021-02-19		X		X	
2021-03-02		X		X	
2021-03-08	X	X			
2021-03-09	X	X			
2021-03-12				X	
2021-03-16	X		X		
2021-03-23		X	X		
2021-03-26			X		
2021-04-13			X		
2021-04-16	X	X	X	X	X
2021-04-20	X	X	X	X	X

Tabell 3: Datum för AFM-experiment. Olika koncentrationer studerades utav dextran 20 kDa, dextran 70 kDa, PEG 8 kDa och PEG 35 kDa. Experimenten genomfördes med/utan WT α -synuklein, och med/utan seeds för α -synuklein i både aggregerad och ej aggregerad form. Experimenten utfördes enligt beskrivning i avsnitt 3.2.3

Datum	Dextran20 kDa	Dextran70 kDa	PEG8 kDa	PEG35 kDa	Seeds
2021-03-10		X		X	
2021-03-30			X	X	X
2021-03-31		X		X	
2021-04-07	X			X	
2021-04-14				X	

Tabell 4: Antal tillgängliga datapunkter och antal använda datapunkter för undersökta koncentrationer av respektive CA.

CA	dextran 20			dextran 70			PEG 8			PEG 35		
Koncentration [mg/mL]	150	200	250	150	200	250	100	150	200	100	150	200
Antal prover	14	14	12	14	14	15	29	29	29	13	12	12
Antal datapunkter	2	3	12	5	8	10	6	9	16	6	12	12

B Framställning av α -synuklein

Uttryck:

Odla cellerna upp till O.D600 på 0,5 inducera det med 0,5 mM IPTG, efter induktion låt cellerna växa under 15-18 timmar vid 20 ° C. Skörda cellerna m.h.a. centrifugering 8000 g i ett falkonrör. Protease inhibitorn är viktig för att när cellerna löses upp, vid sonication, kan proteaset oxideras och börja klyva proteiner.

Rening:

1. Falconröret värmdes upp med händerna och med hjälp av skakningar (Vortex Genie). Eftersom cellerna/bakterierna ändå skall förstöras är det här inte så viktigt att vara försiktig med provet. Därefter genomgick provet en "sonication" där ljudvågor tillsattes med visst intervall (6 sek på/9 sek vila) i 12 minuter. Efter detta var färdigt placerades blandningen i en låda med is i 15 min.

2. Värmebehandling i maskin med vatten som värmts till 90°C. När proven centrifugerats ska man kunna se en pellet lagt vid siden med en mörka delar i.

3. Filtrera supernatanten genom ett 0,22 mikrometer och fortsätt med anjonbyte med Q Sepharose (Buffer A 20 mM Tris-HCl buffert pH 8,0, Buffert B 20 mM Tris-HCl buffert pH 8,0 med 1 M NaCl) Jonbyteskromatografen körs genom att först förbereda en liten kolumn med lösningen från filtreringen. Rätt kolumn väljs ut (kolumn beror på proteinet's egenskaper) och sen körs den först genom med buffert och sedan med lösningen tills allt åkt igenom. Här tas även två prover till SDS, FT och W. Denna kolumn kopplas sedan på till kromatografen tillsammans med en större kolumn. Ett av handledarens förinställda program körs sedan. Kromatografen kördes tills topparna för proteinet syntes och hade helt gått ner igen. Prover, på 15 μ l, togs även här från de olika topparna, prover från fraktion 2, 6, 7, 8, 9, 10, 15 och 16.

4. Kör fraktionerna på 4-12% SDS-PAGE Ta fram utrustningen för gelfiltrering samt gelen från frysen. Montera all utrustning och häll i buffert runtomkring. Hämta sedan ut de olika proven och blanda i 5 mL av färglösning i varje prov. Centrifugera proven under några sekunder för att blanda ihop dessa. Pipettera sedan 15 μ l av varje prov i de olika brunnarna i gelen. Lägg även i lite av färglösningen i en tom brunn. Sätt sedan på "locket" på gelutrustningen och starta med 200 V i 35 minuter.

C Tioflavin T-aggregationassay för α -synuklein

Figur 21 beskriver hur respektive brunn i en 96-brunns mikrotiterplatta laddades. Figur 22 beskriver hur en *seeded aggregation* laddades.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P							
C	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	
D	CA 1 conc 3	CA 1 conc 3	CA 1 conc 3	CA 1 conc 3	CA 1 conc 3	CA 1 conc 4	CA 1 conc 4	CA 1 conc 4	CA 1 conc 4	CA 1 conc 4	CA 1 conc 4	
E	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	
F	CA 2 conc 3	CA 2 conc 3	CA 2 conc 3	CA 2 conc 3	CA 2 conc 3	CA 2 conc 4	CA 2 conc 4	CA 2 conc 4	CA 2 conc 4	CA 2 conc 4	CA 2 conc 4	
G	CA 1 conc 1	CA 1 Conc2	CA 1 conc 3	CA 1 conc 4	THT	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	
H	CA 1 conc 1	CA 1 Conc2	CA 2 conc 3	CA 2 conc 4	THT	Ca 2 conc 2	Ca 2 conc 2	Ca 2 conc 2	Ca 2 conc 2	Ca 2 conc 2	Ca 2 conc 2	

Figur 21: Blank P motsvarar lösningar utan CA. Alla gröna prover, dvs. de mellan rad A och rad F innehöll α -synuklein. Brunnarna på rad G och H innehöll inget α -synuklein utan laddades enligt deras namn i figuren. Alla brunnar innehöll TBS, ThT och EDTA. Fyra olika CA och fyra olika koncentration för respektive CA laddades i form av fem *replicates*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 3 conc 1	CA 3 conc 1	
C	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 3 conc 2	CA 3 conc 2	
D	CA 3 conc 1	CA 3 conc 1	CA 3 conc 1	CA 3 conc 1	CA 3 conc 2	CA 3 conc 2	CA 3 conc 2	CA 3 conc 2	CA 3 conc 2	CA 4 conc 1	CA 4 conc 1	
E	CA 4 conc 1	CA 4 conc 1	CA 4 conc 1	CA 4 conc 1	CA 4 conc 2	CA 4 conc 2	CA 4 conc 2	CA 4 conc 2	CA 4 conc 2	CA 4 conc 2	CA 4 conc 2	
F	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P	Blank P			
G	CA 1 conc 1	CA 1 conc 1	CA 1 conc 2	CA 1 conc 2	CA 2 conc 1	CA 2 conc 1	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2	CA 2 conc 2			
H												

Figur 22: Blank P motsvarar lösningar utan CA. Alla gröna prover, dvs. de mellan rad B och E, samt F1-F5 innehöll α -synuklein. Resterande ifyllda brunnar innehöll inget α -synuklein. Alla brunnar innehöll TBS, ThT och EDTA. Fyra olika CA och de två högsta koncentrationerna för respektive CA laddades i form av fem *replicates*.

C.1 Manual för Tioflavin T-aggregationassay

Material:

500 ml filtrerad TBS-buffert (förberedd från tabletter), WT α -synuklein protein (från -80°C frys), 4 mM tioflavin-T-lösning i MQ-vatten (beredd av pulver, det behöver bara beredas en gång), 200 mM EDTA-lösning, 500 pl spinnfilter 10 kD

Protokoll:

Rening av Asyn-monomerer:

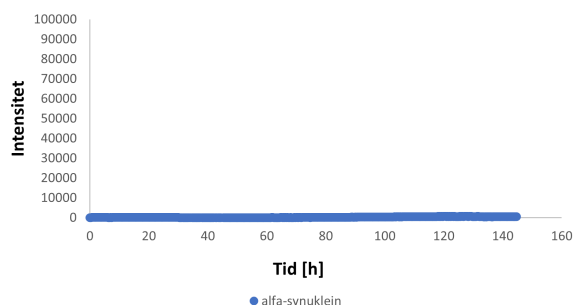
1. Anslut kolumnen Enrich 70 till NGC-kromatografisystemet och se till att 500 μ L provslingan är ansluten
2. Tvätta kolonnen med 30 ml MQ med hjälp av systempumparna

3. Slå på detektorn på NGC-systemet och balansera (tvätta) kolonnen med 30 ml filter TBS-buffert
4. Medan kolonnen är i jämvikt tar du ut den erforderliga mängden protein från -80°C och låter den tina i RT
5. Koncentrera upp proteinlösningen med centrifugeringsfiltret till 600 μ l i bordscentrifugen
6. När kolonnen är jämvikts med TBS och baslinjerna är stabila, injicera proteinlösningen i slingan och starta programmet för storleksuteslutningskromatografi
7. Samla fraktionerna från monomertoppen, beräkna proteinkoncentrationen med NGC-programvaran

Förberedelse av en platta:

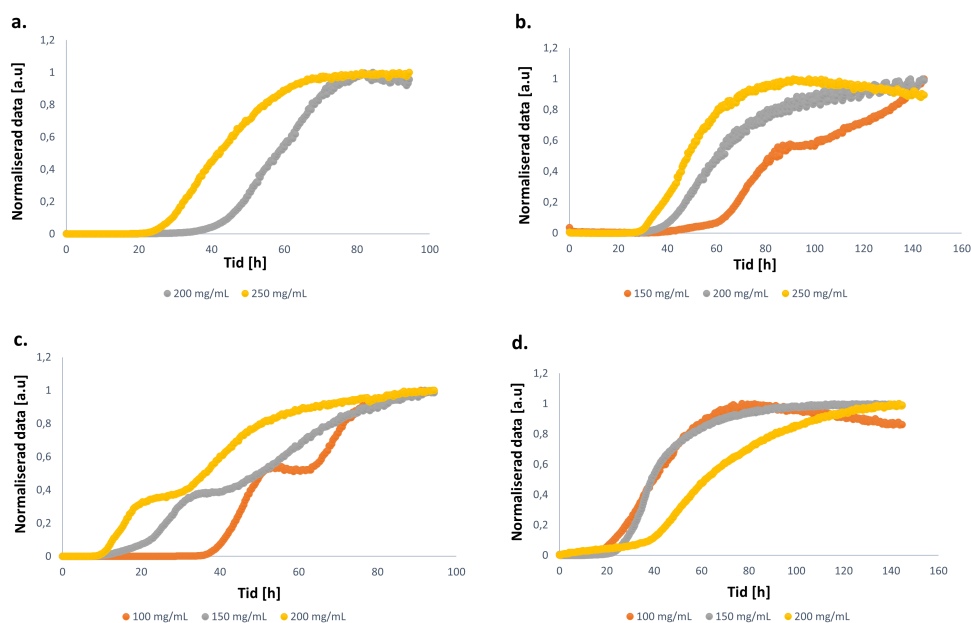
1. Förbered enligt figurerna i början av avsnittet, varje förhållande ska ha minst 4 upprepningar. Undvik att använda brunnar på kanterna. Dubbelkolla så att ditt protein är av tillräckligt hög concentration för alla förhållanden. Protein concentrationen ska i slutet vara 50 μ M.
2. Förbered och mixa varje förhållande i separata provrör: en brunn kräver 50 μ L så för fyra prover krävs 200 μ L (+10% för pippeterings fel, varje förhållande ska ha 20 μ M Thioflavin T och 2 mM EDTA).
3. Fördela proverna på plattan enligt er plan.
4. försegla plattan och lägg in den i plattläsaren, sätt temperaturen till 37 grade Celsius.
5. Markera vilka brunnar era prover ligger i och starta mätningen.

C.2 Graf av fluorescens för α -synuklein utan CA



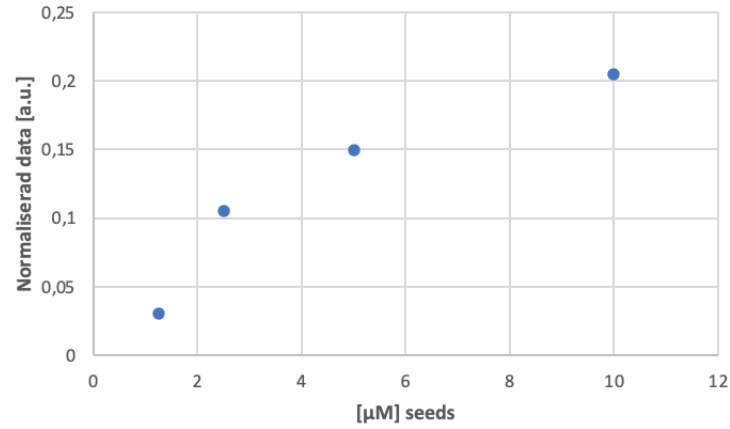
Figur 23: Fluorescensen för α -synuklein utan CA under 145 timmar. Fluorescensen beskrivs som intensitet och tiden i timmar.

C.3 Normaliserade grafer av fluorescensen för α -synuklein med CA som medförde aggregering



Figur 24: Grafer med normaliserad data från en Tioflavin T-aggregeringsassay för (a) dextran 20, (b) dextran 70, (c) PEG 8 och (d) PEG 35. Enbart de koncentrationer som uppnådde en platå i figur 8 normaliserades och visas här.

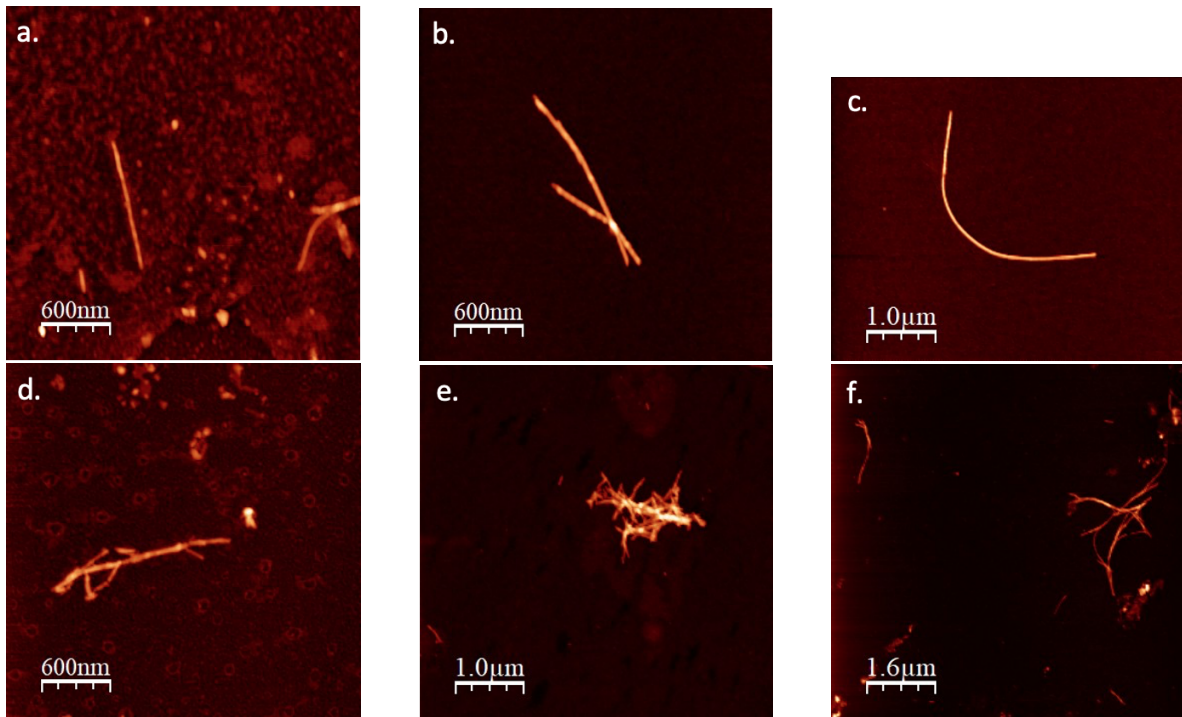
C.4 Normaliserade grafer av initial hastighet med ökande koncentration *seeds*



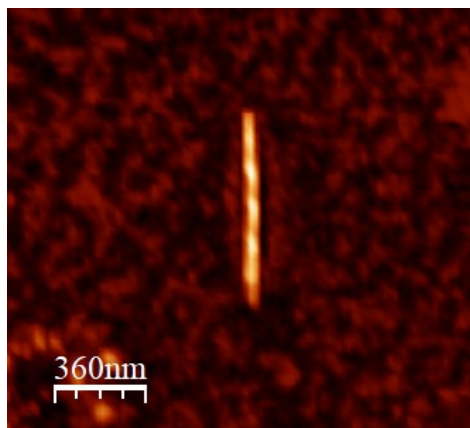
Figur 25: Graf med normaliserad data för initial hastighet de första 1,67 timmarna av aggregeringskurvan för α -synuklein [50μ M] med olika koncentrationer av *seeds*.

D AFM

Ett urval av bilder från AFM-experimenten med olika crowding agents visas i figur 26 och figur 27 nedan.



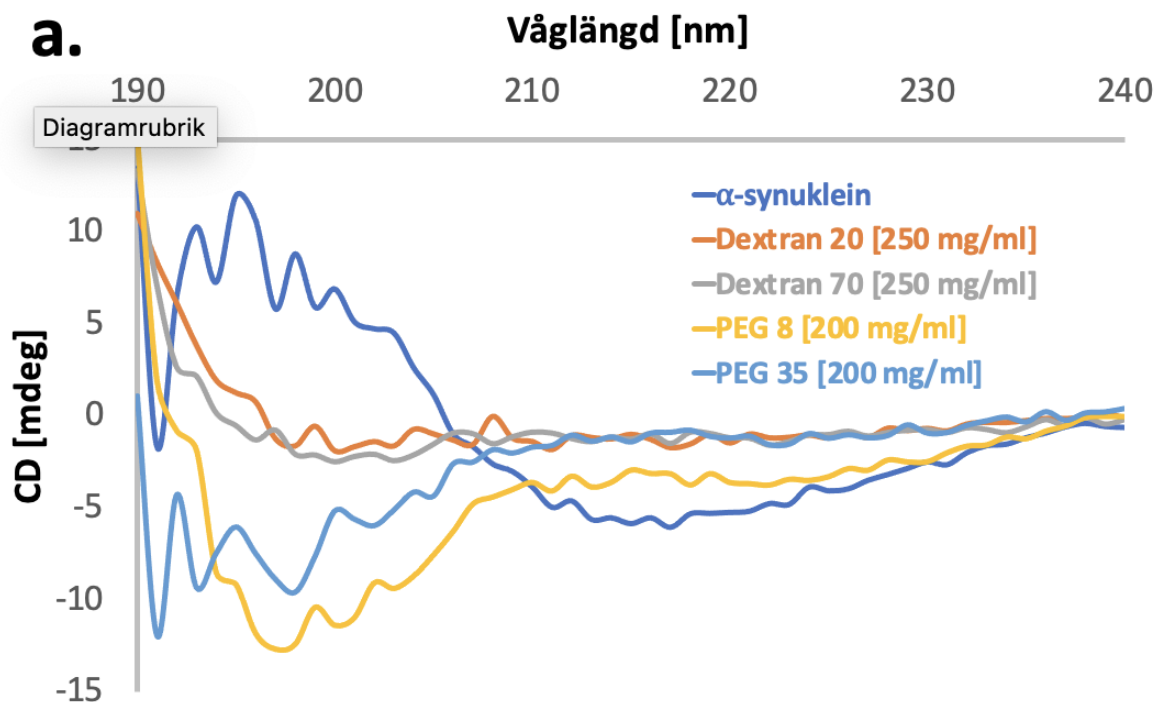
Figur 26: Fibriller på glimmer under förhållanden med CA (a) Dex 20 (b) och (c) Dex 70 (d) PEG 8 (e) och (f) PEG 35, där olika karaktär uppvisas mellan fibrillerna erhållna från förhållanden med dextran respektive PEG med störst skillnad för de större CA. AFM-bilder behandlade med programvaran WSxM 5.0 [48].



Figur 27: Fibrill på glimmer som uppvisar protofibriller med tydligt tvinnat mönster, under förhållanden med CA dextran 20. AFM-bilder behandlade med programvaran WSxM 5.0 [48].

E CD

Figur 28 nedan beskriver resultaten av den laboration som genomfördes som kontroll av 18 (a) då oväntade resultat erhöles.



Figur 28: I figuren visas CD spektrum för aggregerat α -synuklein med de olika CA uppmätt i deras respektive högsta koncentration. Y-axeln är angiven i molär ellipticitet och x-axeln är angiven i våglängd i nm.