

Desenovelamento e agregação de proteínas em biologia e em doença

Sumário Pormenorizado da Lição

Tiago Fleming de Oliveira Outeiro

Faro | 2023

Desenovelamento e agregação de proteínas em biologia e em doença

Sumário Pormenorizado da Lição

Sumário pormenorizado da lição elaborada para as Provas de Agregação no Ramo das Ciências Biomédicas, pela Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas da Universidade do Algarve, de acordo com o Decreto-Lei nº 239/2007 de 19 de Junho, e com o Regulamento de Atribuição do Título Académico de Agregado da Universidade do Algarve, Despacho nº 2251/2020 publicado em Diário da República, 2.ª série, de 17 de Fevereiro de 2020.

Índice

1. Introdução	7
1.1 Estrutura e função de proteínas em biologia e patologia	7
1.2. Priões: um genoma, 'dois' fenótipos	8
1.3. Proteostasia: novelamento e desenovelamento de proteínas no denso ambiente celular	8
1.4. Agregação de proteínas: uma característica comum a várias doenças neurodegenerativas	9
1.5. Etiologia de doenças complexas e inexistência de terapias eficazes	10
1.6. De James Parkinson à definição biológica da doença de Parkinson	11
2. Synucleinopatias e o seu estudo	13
2.1. A agregação de alfa-sinucleína e o seu estudo em modelos celulares	13
2.2. Microscopia de super-resolução para estudar a arquitectura dos agregados de alfa-sinucleína	13
2.3. Modificações pós-tradução: glicação e doença de Parkinson	14
2.4. A glicação como alvo terapêutico em sinucleinopatias	15
2.5. Conclusões	15
3. Perspetivas futuras de investigação	16
4. Referências	17

1. Introdução

1.1. Estrutura e função de proteínas em biologia e patologia

A biologia moderna está assente na compreensão dos mecanismos moleculares que governam a vida, e tem evoluído exponencialmente com o advento das técnicas de “ômica” e com desenvolvimentos em técnicas de imagem que nos permitem observar a biologia em várias escalas: desde o arranjo dos átomos numa proteína até à comunicação entre células e mesmo entre órgãos num organismo.

A revolução genómica tem permitido identificar um número crescente de genes, incluindo genes codificantes e genes não-codificantes de proteínas. Com a informação sobre os primeiros, torna-se trivial converter a informação genética em informação funcional, isto é, em sequências de proteínas. No entanto, e apesar de avanços muito recentes ao nível da inteligência artificial (IA) que permitem prever com bastante sucesso a estrutura tridimensional de uma proteína, ainda precisamos de evoluir ao nível da compreensão da relação entre estrutura e função destas moléculas essenciais à vida (Outeiro e Vieira, 2023). O que sabemos, desde há já algum tempo, é que a estrutura de uma proteína está intimamente relacionada com a sua função, e que se alterarmos a estrutura, poderemos afectar essa função e comprometer o normal funcionamento do sistema biológico em que essa proteína existe. Numa situação extrema, a alteração da estrutura pode levar ao desenovelamento e até à agregação da proteína, despoletando uma série de respostas e consequências que podem alterar a fisiologia celular, com vantagens adaptativas ou comprometendo a sua viabilidade.

Ao longo dos anos, a minha investigação tem-se focado no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no desenovelamento e na agregação de proteínas, em particular no contexto de patologias caracterizadas pela acumulação de agregados proteicos, como as doenças neurodegenerativas, diabetes, ou alguns tipos de cancro. Recentemente, vários estudos em diversos sistemas biológicos revelaram que o processo de agregação é mais complexo do que imaginávamos e que, interessantemente, pelo menos alguns tipos de agregação parecem ter evoluído para aumentar a flexibilidade adaptativa das células, fazendo assim parte da biologia “normal” dos sistemas biológicos.

1.2. Priões: um genoma, ‘dois’ fenótipos

O meu interesse na área do desenovelamento e agregação de proteínas remonta aos anos 90, quando na Europa vivemos o receio de uma pandemia causada pela doença das vacas loucas. Nessa altura, fiquei fascinado pelos trabalhos de Stanley Prusiner, Susan Lindquist, John Collinge, e de vários outros investigadores da área dos priões (Prusiner 1982; Patino et al., 1996; Collinge et al., 1989). A ideia de que uma proteína podia existir em duas conformações meta-estáveis, conferindo diferentes fenótipos e que, no caso das doenças priónicas, uma infecção podia ser causada apenas por uma proteína, era ‘revolucionária’.

Na levedura *S. cerevisiae*, Susan Lindquist e outros colegas demonstravam que a proteína Sup35 podia existir num estado solúvel na célula, ou num estado agregado, e que este fenótipo molecular se traduzia em diferentes fenótipos celulares, conferindo vantagens adaptativas em ambientes diferentes (True and Lindquist, 2000; True et al., 2004).

Actualmente, o processo de agregação é compreendido de forma ainda mais profunda, e considera-se que consiste, num dado momento, num processo de separação de fase líquida, em que as proteínas se “desmisturam” do ambiente líquido em que se encontram, podendo numa fase mais avançada do processo formar uma fase sólida, agregada, e praticamente irreversível (Patel et al., 2015; Alberti and Hyman, 2021). Estas alterações no enovelamento/desenovelamento das proteínas levam a uma perda de função e também a um possível ganho de função tóxica, no caso de algumas proteínas, sendo que ambas contribuem para patologias como cancro, diabetes, infecções, e doenças neurodegenerativas.

1.3. Proteostasia: enovelamento e desenovelamento de proteínas no denso ambiente celular

In vitro, o processo de agregação tem sido muito estudado ao longo dos anos, e sabemos que o processo de ‘montagem’ dos agregados segue uma curva exponencial, depois de uma fase ‘lag’, atingindo depois um ‘plateau’ quando os monómeros são todos consumidos (Serio et al., 2000; Conway et al., 2000). Mas como se processa o enovelamento/desenovelamento no denso ambiente celular, onde a concentração de proteínas e outras biomoléculas é extremamente elevada? As células precisam de controlar, com grande precisão, todos estes processos, e manter a homeostasia das proteínas (proteostasia) (Balch et al., 2008). Em particular,

precisam de assistir no enovelamento em diferentes ambientes sub-celulares, e precisam detectar e atuar perante situações em que as proteínas sofrem desenovelamento. Para isto, vários sistemas e vias celulares convergem no que se designou como a rede de proteostasia, incluindo as chaperonas moleculares e vias de degradação como o sistema da ubiquitina-proteasoma, e autofagia (Gidalevitz et al., 2010). No entanto, a rede de proteostasia é bastante mais complexa, incluindo vias de sinalização que permitem à célula responder em situações ambientais que alteram a proteostasia por forma a evitar danos/toxicidade celular.

1.4. Agregação de proteínas: uma característica comum a várias doenças neurodegenerativas

Em situações diversas, como na presença de factores de stress, na presença de mutações, de modificações pós-tradução, ou apenas como consequência do envelhecimento, a rede de proteostasia pode falhar, e as proteínas podem sofrer desenovelamento e adoptar conformações alteradas, despoletando processos de agregação, podendo algumas das espécies formadas causar citotoxicidade (**Figura 1**).

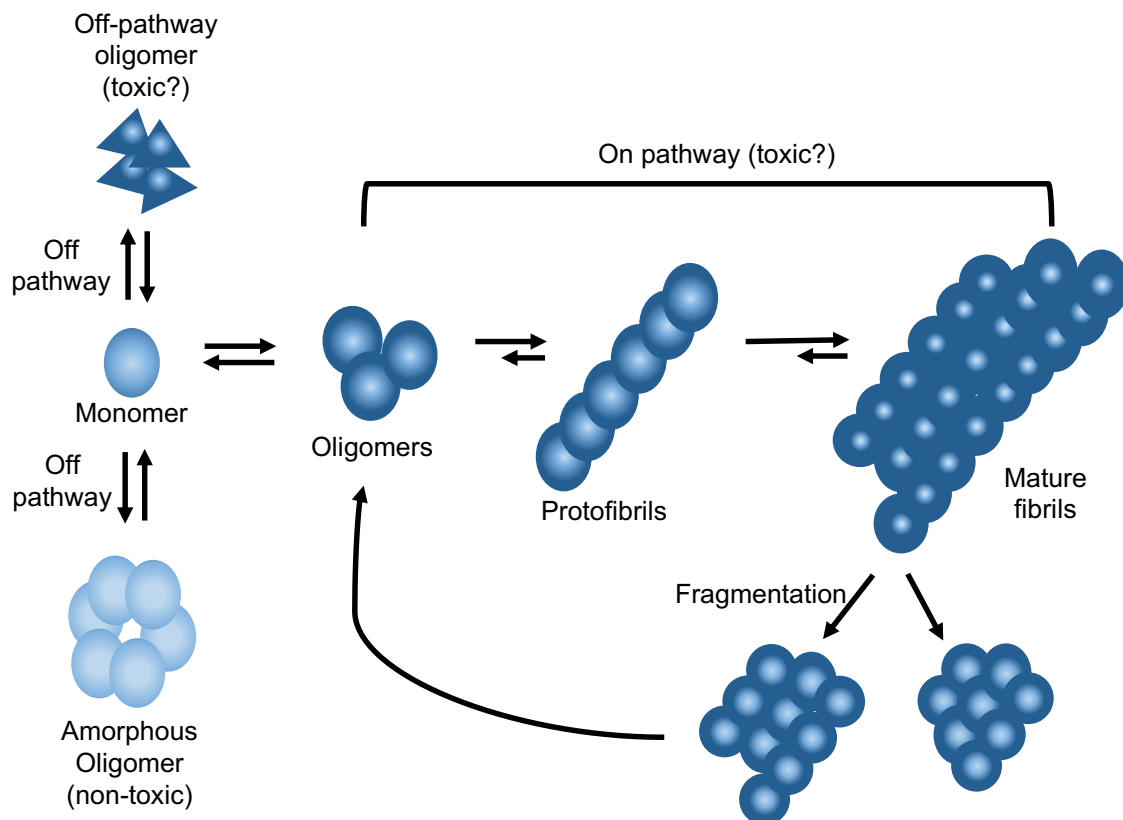


Figura 1. Esquema ilustrativo do processo de agregação e toxicidade de proteínas. As proteínas, num estado monomérico, podem seguir vias distintas, sendo que, numa delas, podem formar oligómeros que continuam o processo de montagem, originando protofibrilhas e depois fibras de amilóide, que são a forma mais estável. Estas fibras podem sofrer fragmentação, funcionando como ‘sementes’ que aceleram o processo de agregação. Neste processo, algumas espécies podem ser citotóxicas.

Pensa-se que este processo de agregação seja, no geral, comum a várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, ou outras doenças menos comuns como as doenças priónicas, mas com consequências devastadoras para o cérebro (**Figura 2**).

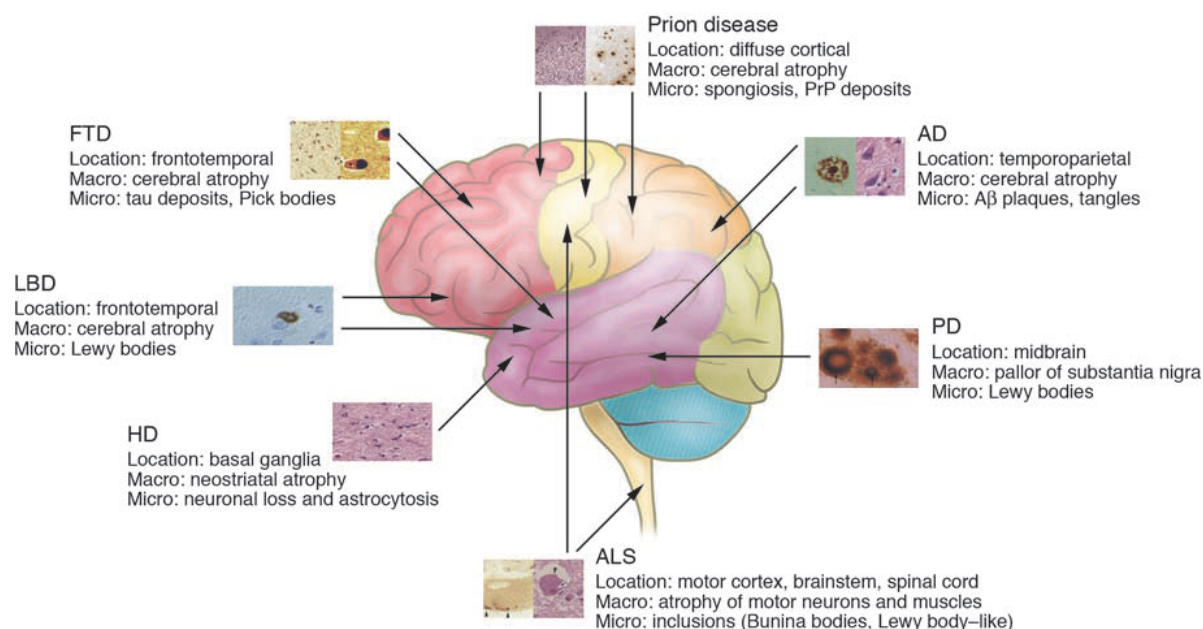


Figura 2. As principais doenças neurodegenerativas e as patologias associadas. Adaptado de (Bertram and Tanzi, 2005).

Na verdade, uma característica comum às várias doenças neurodegenerativas é, para além da morte celular em regiões específicas, a acumulação de agregados proteicos no cérebro e, pelo menos em algumas destas doenças, até noutros órgãos.

1.5. Etiologia de doenças complexas e inexistência de terapias eficazes

Apesar de algumas doenças neurodegenerativas terem sido descritas há mais de 100 anos (há mais de 200 anos no caso da doença de Parkinson), a verdade é que ainda

não compreendemos em detalhe os mecanismos moleculares que despoletam estas doenças. Isto faz com que ainda não tenhamos terapias capazes de evitar ou interferir com a progressão destas doenças, apesar de já terem sido conduzidos milhares de ensaios clínicos. Só muito recentemente foram obtidos alguns sinais de sucesso que, apesar de serem ainda ténues, nos sugerem que temos de continuar a procurar compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas várias doenças.

Por um lado, sabemos que factores genéticos explicam apenas uma fracção (~10%) dos casos de doença de Parkinson ou doença de Alzheimer.

Algumas doenças neurodegenerativas, como a de Huntington, são puramente genéticas, e seguem as leis de Mendel. Por outro lado, nas doenças complexas, o que temos é uma conjugação de alterações genéticas que, por si só, não causam doença, mas que, juntamente com factores ambientais, podem aumentar o risco para desenvolvermos doença. Entre estas doenças complexas incluem-se várias doenças neurodegenerativas.

Sabemos que os processos moleculares que levam ao envelhecimento são o maior factor de risco para o aparecimento das doenças neurodegenerativas, e que factores ambientais podem despoletar alterações epigenéticas que contribuem para o aparecimento destas doenças.

1.6. De James Parkinson à definição biológica da doença de Parkinson

A minha investigação tem utilizado, essencialmente, a doença de Parkinson como um modelo de estudo dos mecanismos moleculares envolvidos em processos neurodegenerativos. James Parkinson descreveu a doença em 1817, sendo que o nome da doença foi apenas definido alguns anos depois, por Jean-Martin Charcot, considerado 'o pai da Neurologia', que reconheceu o trabalho fundamental de James Parkinson na descrição da doença (Parkinson, 1817). Na verdade, Charcot refinou a definição e reconheceu a bradicinesia como uma característica importante da doença (Charcot, 1872).

Actualmente, a doença de Parkinson é conhecida como uma doença bastante complexa em que a fase motora é que leva ao diagnóstico, mas onde uma fase pré-motora evidencia já sinais como hipósmia, alterações no sono REM, ou alterações gastro-intestinais. Estes sinais sugerem o envolvimento de várias áreas cerebrais, e mesmo de órgãos para além do cérebro, como o intestino, mesmo antes do envolvimento da substância 'nigra', conhecida por ser a região do cérebro onde ocorre

mais morte neuronal na doença de Parkinson. Este processo degenerativo é, na verdade, o responsável pelas alterações no movimento que são características da doença.

Os avanços na genética, na neuroimagem, neuropatologia, e na biologia molecular, sugerem que devemos pensar na doença de Parkinson como uma síndrome, e não como uma única doença (**Figura 3**). Assim, estamos num momento em que é necessário utilizar uma série ampla de critérios para definirmos a doença de Parkinson com base na biologia, e não apenas com base em critérios clínicos descritivos e, em muitos casos, subjectivos.

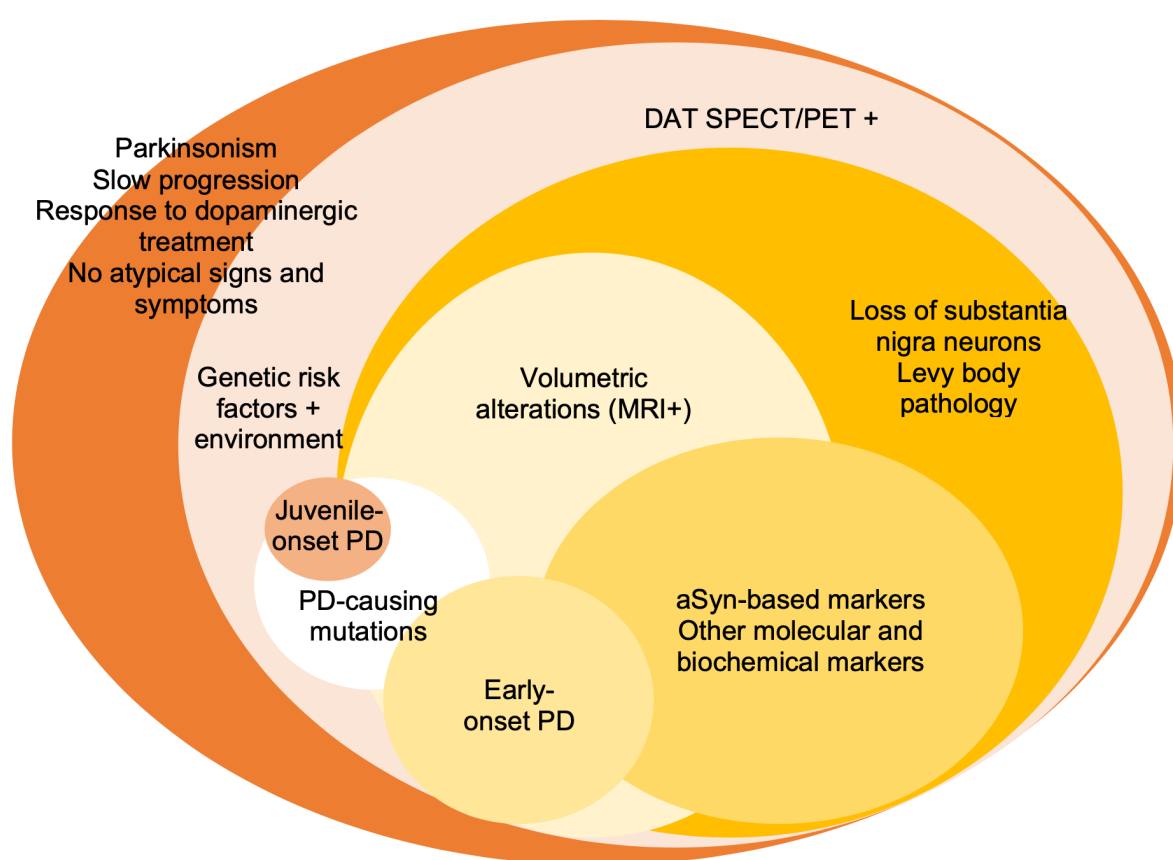


Figura 3. O que é a doença de Parkinson? Actualmente, técnicas de neuroimagem, biomarcadores, genética, e critérios clínicos, permitem-nos perceber que existem diferentes tipos de doença de Parkinson (Outeiro et al., 2023).

Nos últimos anos, tenho trabalhado com vários líderes internacionais neste tema, sendo que identificámos a necessidade e propusemos um novo sistema de classificação da doença de Parkinson que pode ser utilizado na investigação, pelo

menos numa fase inicial, mas que servirá também de base para o diagnóstico e diferenciação entre diferentes tipos de doença de Parkinson (Hoeglinger et al., 2023).

2. Sinucleinopatias e o seu estudo

2.1. A agregação de alfa-sinucleína e o seu estudo em modelos celulares

Vários mecanismos moleculares têm sido implicados na etiologia da doença de Parkinson. Entre eles encontramos a disfunção mitocondrial, stress oxidativo, neuroinflamação, e alterações na função de vias envolvidas na proteostasia. A agregação da alfa-sinucleína em corpos de Lewy, os agregados proteicos característicos na doença de Parkinson e na demência com corpos de Lewy, são também considerados um importante mecanismo na doença de Parkinson. Mais recentemente, foi proposta uma hipótese que considera que a progressão dos sintomas clínicos da doença está relacionada com um espalhamento progressivo da acumulação da patologia de Lewy no cérebro (Braak, 2003). Esta hipótese tem sido bastante utilizada, mas sofre também de algumas limitações, pois uma percentagem significativa de casos de doença de Parkinson não seguem o padrão de espalhamento da patologia proposto por Braak. Por outro lado, não podemos ainda afirmar de forma cabal que a patologia de Lewy é a responsável pela neurodegeneração na doença de Parkinson e noutras sinucleinopatias.

No entanto, com base na evidência genética, em que mutações pontuais ou multiplicações do gene que codifica para a alfa-sinucleína, parece incontornável assumir que a proteína tem um papel central nas sinucleinopatias. Neste sentido, desde a associação da proteína à doença de Parkinson em 1997 (Polymeropoulos et al., 1997; Spillantini et al., 1997), têm sido desenvolvidos vários modelos laboratoriais para estudar a biologia da alfa-sinucleína e os mecanismos moleculares que a associam às várias patologias.

2.2. Microscopia de super-resolução para estudar a arquitectura dos agregados de alfa-sinucleína

Em 1912, muito antes da identificação da alfa-sinucleína como um dos principais componentes dos agregados proteicos que se acumulam nos cérebros dos doentes de Parkinson, Friedrich Lewy observou e descreveu estes agregados (Lewy, 1912).

Depois, com a identificação da alfa-sinucleína nos corpos de Lewy, vários modelos laboratoriais foram desenvolvidos para tentar mimetizar a agregação da proteína e permitir o seu estudo.

Ao longo dos anos, o meu trabalho resultou no desenvolvimento de vários modelos celulares simples que permitem estudar a formação de agregados de alfa-sinucleína, quer de forma directa, através de fusões com proteínas fluorescentes, quer de forma indirecta, utilizando técnicas de imunocitoquímica (Outeiro and Lindquist, 2003; Outeiro et al., 2008; Lázaro et al., 2014). Com estes modelos, tem sido possível estudar o efeito de mutações, de modificações pós-tradução, ou de factores ambientais, na agregação da alfa-sinucleína. No entanto, tem-se tornado evidente que, provavelmente, os agregados de maiores dimensões podem não ser os mais citotóxicos. Assim, torna-se essencial recorrer a técnicas de microscopia mais sofisticadas, chamadas de super-resolução, para identificar e estudar agregados de menores dimensões, estudar a sua arquitectura molecular, e identificar factores capazes de interferir com a sua formação. Neste sentido, temos utilizado técnicas como microscopia de STED e, mais recentemente, microscopia de expansão, com resultados inovadores (Lázaro et al., 2014; Weish et al., 2021).

2.3. Modificações pós-tradução: glicação e doença de Parkinson

Um outro tema de investigação em que o meu grupo se tem focado é no estudo do efeito de modificações pós-tradução como moduladores conformacionais que podem potenciar a via de agregação de diversas proteínas. Este tema é particularmente relevante no contexto da alfa-sinucleína, uma vez que várias modificações pós-tradução foram já identificadas, incluindo a fosforilação da serina na posição 129 (pS129), que é considerada um marcador da patologia em modelos laboratoriais.

Entre outras, temos estudado um tipo de modificações que considero importante no contexto da doença de Parkinson, por estabelecer uma possível ligação com a diabetes, uma doença que está associada com um risco aumentado para o desenvolvimento de doença de Parkinson (Culliname et al., 2023). Esta modificação pós-tradução é a glicação, e consiste na reacção não-enzimática entre açucares e certos aminoácidos (Vicente-Miranda and Outeiro, 2010). O metabolismo de glucose gera, por defeito, metilglioxal, um aldeído altamente reactivo que modifica resíduos de lisina ou arginina. A alfa-sinucleína não possui nenhuma arginina na sua sequência primária, mas possui 15 lisinas. Através de estudos em diversos modelos, incluindo

leveduras, linhas celulares humanas, linhas celulares iPS, em drosófila, ou em ratinho, demonstrámos que a glicação por metiglioxal potencia a formação de oligómeros de alfa-sinucleína, e que aumenta a toxicidade da proteína (Vicente-Miranda et al., 2017; Farzadfard et al., 2022). Estes estudos são inovadores e importantes, pois sugerem novos possíveis alvos terapêuticos.

2.4. A glicação como alvo terapêutico em sinucleinopatias

Os nossos resultados sugerem que a glicação pode ocorrer em consequência de alterações em factores ambientais (como na diabetes, ou em consequência de outras alterações metabólicas), causando um desequilíbrio na proteostasia, levando à oligomerização de alfa-sinucleína e à sua toxicidade. Assim, o nosso objectivo seguinte foi procurar reduzir a glicação para repor a proteostasia. Para isso, procurámos moléculas capazes de interferirem com a quantidade de metiglioxal disponível, reduzindo a glicação. Nestes estudos, utilizámos novamente a drosófila como modelo, e demonstrámos que as moléculas testadas melhoram o fenótipo motor característico das moscas transgénicas para alfa-sinucleína. Em conjunto com estudos em modelos celulares, verificámos uma redução na glicação da proteína. Estes resultados sugerem que a glicação pode de facto ter potencial terapêutico no contexto das sinucleinopatias (Vicente-Miranda et al., 2017).

2.5. Conclusões

Estes estudos aqui descritos representam uma pequena fracção do nosso trabalho de investigação ao longo dos anos, mas ilustram o progresso que temos feito no sentido de estudar os processos de agregação de proteínas e de perceber as respostas celulares à agregação.

Se, por um lado, os modelos laboratoriais que utilizámos são essenciais para nos permitirem testar mecanismos moleculares básicos, tem-se tornado também evidente que necessitamos de utilizar e desenvolver modelos mais complexos que procuram recapitular o contexto genético e celular das células no ambiente complexo do cérebro humano. Estes modelos e os estudos feitos com técnicas cada vez mais sensíveis, vão permitir-nos tratar não apenas os sintomas mas, como todos esperamos, as causas destas e de outras doenças neurodegenerativas.

3. Perspetivas futuras de investigação

Quais são então os nossos objectivos de investigação no futuro?

Considero que a experiência que adquiri ao longo dos últimos quase 25 anos me deixa numa situação privilegiada para continuar a assumir um papel relevante nesta área a nível internacional.

Por um lado, pretendo continuar a apostar em estudos de translação, apostando cada vez mais em estudos com amostras humanas. Neste contexto, uma oportunidade imediata que se coloca é a da implementação da técnica de RT-QuIC (real-time quacking-induced conversion) para o apoio ao diagnóstico da doença de Parkinson. Os contactos que tenho a nível internacional, e a experiência que temos na produção e utilização de alfa-sinucleína neste tipo de ensaios, irão permitir-nos oferecer este teste como diagnóstico e como ferramenta de investigação.

Por outro lado, pretendo implementar técnicas de microscopia de super-resolução, como a microscopia de expansão, para continuar a estudar a arquitectura molecular de vários tipos de agregados proteicos.

Finalmente, uma área que pretendo continuar a explorar, por poder abrir diversas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, é o estudo dos efeitos das modificações pós-tradução na agregação de proteínas. A glicação, em particular, é uma modificação de grande interesse dada a relação próxima entre a diabetes e neurodegeneração. Um prolongamento desta temática irá permitir-me investigar, de forma mais aprofundada, a relação entre alguns tipos de cancro (como melanoma) e a doença de Parkinson.

4. Referências

Livros

- Protein structure and function, Gregory A. Petsko and Dagmar Ringe, 2009. Oxford University Press.

Artigos científicos

- Alberti S, Hyman AA. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Mar;22(3):196-213. doi: 10.1038/s41580-020-00326-6. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33510441.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science.* 2008 Feb 15;319(5865):916-9. doi: 10.1126/science.1141448. PMID: 18276881.
- Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2005 Jun;115(6):1449-57. doi: 10.1172/JCI24761. PMID: 15931380; PMCID: PMC1137006.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr;24(2):197-211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9. PMID: 12498954.
- Charcot J-M. 1872. Delaparalysie agitante. In *Oeuvres Complètes (t1) Leçons sur les maladies du système nerveux*, pp.155–188. A Delahaye, Paris.
- Collinge J, Harding AE, Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Boughey AM, Shah T, Crow TJ. Diagnosis of Gerstmann-Sträussler syndrome in familial dementia with prion protein gene analysis. *Lancet.* 1989 Jul 1;2(8653):15-7. doi: 10.1016/s0140-6736(89)90256-0. PMID: 2567794.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* 1998 Nov;4(11):1318-20. doi: 10.1038/3311. PMID: 9809558.
- Cullinane PW, de Pablo Fernandez E, König A, Outeiro TF, Jaunmuktane Z, Warner TT. Type 2 Diabetes and Parkinson's Disease: A Focused Review of Current Concepts. *Mov Disord.* 2023 Feb;38(2):162-177. doi: 10.1002/mds.29298. Epub 2022 Dec 26. PMID: 36567671.

- Farzadfard A, König A, Petersen SV, Nielsen J, Vasili E, Dominguez-Meijide A, Buell AK, Outeiro TF, Otzen DE. Glycation modulates alpha-synuclein fibrillization kinetics: A sweet spot for inhibition. *J Biol Chem.* 2022 May;298(5):101848. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101848. Epub 2022 Mar 18. PMID: 35314196; PMCID: PMC9034100.
- Gidalevitz T, Kikis EA, Morimoto RI. A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr Opin Struct Biol.* 2010 Feb;20(1):23-32. doi: 10.1016/j.sbi.2009.11.001. Epub 2010 Jan 5. PMID: 20053547; PMCID: PMC3050498.
- Höglinger, G.U., Adler, C.H., Berg, D., Klein, C., Outeiro, T.F., Poewe, W., Postuma, R., Stoessl, J., & Lang, A.E. (2023). Towards a Biological Definition of Parkinson's Disease. Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202304.0108.v1>.
- Lewy, FH. *Handbuch der Neurologie*, ed M Lewandowsky (Springer, Berlin) Vol. III, 920–933 (1912).
- Outeiro TF, Lindquist S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science.* 2003 Dec 5;302(5651):1772-5. doi: 10.1126/science.1090439. PMID: 14657500; PMCID: PMC1780172.
- Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, Hyman BT, McLean PJ. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS One.* 2008 Apr 2;3(4):e1867. doi: 10.1371/journal.pone.0001867. Erratum in: *PLoS One.* 2008;3(5). doi: 10.1371/annotation/9282f173-df82-4b70-9120-b4e62b3dadb1. PMID: 18382657; PMCID: PMC2270899.
- Lázaro DF, Rodrigues EF, Langohr R, Shahpasandzadeh H, Ribeiro T, Guerreiro P, Gerhardt E, Kröhnert K, Klucken J, Pereira MD, Popova B, Kruse N, Mollenhauer B, Rizzoli SO, Braus GH, Danzer KM, Outeiro TF. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS Genet.* 2014 Nov 13;10(11):e1004741. doi: 10.1371/journal.pgen.1004741. PMID: 25393002; PMCID: PMC4230739.
- Outeiro TF, Alcalay RN, Antonini A, Attems J, Bonifati V, Cardoso F, Chesselet MF, Hardy J, Madeo G, McKeith I, Mollenhauer B, Moore DJ, Rascol O, Schlossmacher MG, Soreq H, Stefanis L, Ferreira JJ. Defining the Riddle in Order to Solve It: There Is More Than One "Parkinson's Disease". *Mov Disord.*

2023 Jul;38(7):1127-1142. doi: 10.1002/mds.29419. Epub 2023 May 8. PMID: 37156737.

- Outeiro TF, Vieira TCRG. AI and protein structure and function in neurological disease: relevance to disease management. *Nat Rev Neurol*. 2023 Aug;19(8):453-454. doi: 10.1038/s41582-023-00840-z. PMID: 37394622.
- Parkinson J. 1817. An essay on the shaking palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Needlyand Jones, London.
- Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, Stoyanov S, Mahamid J, Saha S, Franzmann TM, Pozniakovski A, Poser I, Maghelli N, Royer LA, Weigert M, Myers EW, Grill S, Drechsel D, Hyman AA, Alberti S. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):1066-77. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.047. PMID: 26317470.
- Patino MM, Liu JJ, Glover JR, Lindquist S. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*. 1996 Aug 2;273(5275):622-6. doi: 10.1126/science.273.5275.622. PMID: 8662547.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7. doi: 10.1126/science.276.5321.2045. PMID: 9197268.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982 Apr 9;216(4542):136-44. doi: 10.1126/science.6801762. PMID: 6801762.
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*. 2000 Aug 25;289(5483):1317-21. doi: 10.1126/science.289.5483.1317. PMID: 10958771.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997 Aug 28;388(6645):839-40. doi: 10.1038/42166. PMID: 9278044.

- True HL, Lindquist SL. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):477-83. doi: 10.1038/35035005. PMID: 11028992.
- True HL, Berlin I, Lindquist SL. Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature*. 2004 Sep 9;431(7005):184-7. doi: 10.1038/nature02885. Epub 2004 Aug 15. PMID: 15311209.
- Vicente Miranda H, Outeiro TF. The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation. *J Pathol*. 2010 May;221(1):13-25. doi: 10.1002/path.2682. PMID: 20186922.
- Vicente Miranda H, Szego ÉM, Oliveira LMA, Breda C, Darendelioglu E, de Oliveira RM, Ferreira DG, Gomes MA, Rott R, Oliveira M, Munari F, Enguita FJ, Simões T, Rodrigues EF, Heinrich M, Martins IC, Zamolo I, Riess O, Cordeiro C, Ponces-Freire A, Lashuel HA, Santos NC, Lopes LV, Xiang W, Jovin TM, Penque D, Engelender S, Zweckstetter M, Klucken J, Giorgini F, Quintas A, Outeiro TF. Glycation potentiates α -synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies. *Brain*. 2017 May 1;140(5):1399-1419. doi: 10.1093/brain/awx056. Erratum in: *Brain*. 2021 Jul 28;144(6):e58. PMID: 28398476.
- Weish P, Lázaro DF, Palmares L, Santos PI, Stadelmann C, Höglinger GU, Rizzoli SO, Outeiro TF., Super-resolution microscopy informs on the molecular architecture of alpha-synuclein inclusions in model systems and in the human brain. *bioRxiv* 2021.04.25.441304; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.25.441304>

