

COMMUNICATION

Modélisation expérimentale de l'agrégation et de la propagation de l' α -synucléine dans les synucléinopathies

MOTS-CLÉS : MALADIE DE PARKINSON. ALPHA-SYNUCLÉINE. CORPS DE LEWY. MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES. PRIONS. CONFORMATION PROTÉIQUE.

Experimental modelling of α -synuclein aggregation and spreading in synucleinopathies.

KEY-WORDS : PARKINSON DISEASE. ALPHA-SYNUCLEIN. LEWY BODIES. NEURODEGENERATIVE DISEASES. PRIONS. PROTEIN CONFORMATION

Mathieu BOURDENX ^{*,**}, Benjamin DEHAY^{*,**}, Erwan BEZARD^{*,**}

RÉSUMÉ

Depuis sa découverte il y a maintenant dix-huit ans, l' α -synucléine a acquis un rôle central dans la clinicopathologie de la maladie de Parkinson et des autres synucléinopathies. Des études récentes ont permis de suggérer que cette protéine pathologique possédait des propriétés d'agrégation et de propagation, possiblement transconformationnelle, proches de celles présentées par les protéines prion. Les études princeps montrant une transmission de « l'hôte au greffon » de la synucléinopathie, chez des patients ayant reçu une greffe de neurones dopaminergiques embryonnaires, ont renforcé l'intérêt de la communauté scientifique pour cette hypothèse. La compréhension des mécanismes sous-jacents à la transmission d'une cellule à l'autre de l' α -synucléine pathogène et à la transconformation pathologique apparaît maintenant essentielle à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. De nouveaux modèles animaux, basés sur ce nouveau mécanisme, permettent aujourd'hui de modéliser ces aspects jusqu'alors non étudiés. L'utilisation de ces nouveaux modèles chez les rongeurs ou les primates non-humains devrait permettre de valider les approches thérapeutiques.

* Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33000 Bordeaux, France

** CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, 33000 Bordeaux, France

Tirés à part : Docteur Erwan BEZARD, même adresse, erwan.bezard@u-bordeaux.fr

Article reçu le 16 juillet 2015

SUMMARY

During the past two decades, a myriad of studies have suggested a central pathogenic role for α -synuclein in Parkinson's disease. Recent studies have unravelled self-aggregation and prion-like spreading properties for α -synuclein. Of particular importance was the seminal observation of Lewy body-like structures in grafted fetal dopaminergic neurons of patients with Parkinson's disease. This conceptual breakthrough generated the "host-to-the-graft" hypothesis or prion-like hypothesis. Nowadays, mechanisms underlying these new properties appear as putative disease-modifying targets. As the lack of valid animal models for Parkinson's disease is considered as a roadblock toward therapeutic intervention, the use of the newly developed models based on the prion-like properties of α -synuclein should allow future target validation.

INTRODUCTION

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative d'étiologie inconnue associée, entre autres, à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc) [1]. La caractéristique anatomopathologique principale est une accumulation intracytoplasmique de protéines ayant une conformation anormale. Ces agrégats éosinophiles, initialement décrits en 1912, prennent le nom de corps de Lewy dans le corps cellulaire et neurites de Lewy dans les prolongements neuronaux. Ces corps de Lewy n'affectent pas seulement la population des neurones dopaminergiques et sont trouvés dans un grand nombre de populations neuronales à la fois périphériques et centrales [2].

Le syndrome clinique classique est caractérisé par une tétrade de symptômes moteurs : rigidité articulaire, bradykinésie, instabilité posturale et tremblement de repos. Ces symptômes cardinaux sont associés à des symptômes non moteurs (cognitifs, troubles du sommeil ou dysfonctions autonomes).

Les traitements existant à ce jour sont symptomatiques, de types pharmacologiques ou neurochirurgicaux. Le traitement symptomatique pharmacologique de référence est le précurseur de la dopamine (L-3,4-dihydroxyphénylalanine — L-Dopa). Ce traitement réduit significativement les troubles moteurs tels la bradykinésie et l'hypokinésie mais entraîne l'apparition de mouvements anormaux involontaires, appelés dyskinésies, chez la majorité des patients. Malheureusement, il n'existe actuellement pas de traitement capable de réduire ou ralentir le processus de dégénérescence dans la maladie de Parkinson.

Implications de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson.

Comme de nombreuses maladies neurodégénératives, la maladie de Parkinson est caractérisée par une accumulation anormale d'une protéine de conformation aberrante. Les corps de Lewy sont des inclusions intraneuronales dont le composant protéique majoritaire est l' α -synucléine (α -syn) [3]. Initialement décrits par Friedrich H. Lewy en 1912 et nommés par Konstantin Tretiakoff en 1919, ils correspondent à

des inclusions circulaires de 5 à 25 μm dans lesquelles il est possible de distinguer un centre éosinophile dense et une couronne pâle où l' α -syn est majoritairement située. Au début des années 1990, avant son identification comme élément constituant des corps de Lewy, l' α -syn avait été décrite comme étant le précurseur d'un peptide trouvé dans la partie amyloïde des plaques séniles présentes chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Des études ultérieures ont permis de montrer que cette protéine pré-synaptique était régulée au cours du développement et, par exemple, impliquée dans l'apprentissage du chant chez le Diamant mandarin [4, 5]. Le premier lien entre l' α -syn et la maladie de Parkinson a été établi en 1997 par la publication d'une mutation ponctuelle de l' α -syn, la substitution Ala53Thr, dans une famille italienne et trois familles grecques [6].

À ce jour, six mutations « faux-sens » ont été identifiées : Ala53Thr, Ala30Pro, Glu46Lys, His50Gln, Gly51Asp, Ala53Glu. Bien que ces mutations restent extrêmement rares, il est intéressant de noter qu'elles entraînent des syndromes cliniques distincts. En effet, seule la mutation Ala30Pro induit une maladie de Parkinson identique à la forme sporadique alors que les autres mutations induisent des formes cliniquement plus précoces associées à une progression rapide et des symptômes secondaires tels que des hallucinations, des démences, des altérations du tractus pyramidal ou des dysfonctions autonomes. L'identification ultérieure de familles présentant une duplication ou triplication d'une large portion du bras long du chromosome 4, incluant le gène de l' α -syn, a permis de suggérer qu'une augmentation de la quantité de protéine, sans mutation, pouvait à elle seule causer la maladie [7, 8]. Enfin, une relation de corrélation entre la quantité de protéine et la sévérité du syndrome clinique a pu être déterminée par l'observation de familles ayant une triplication du gène qui présentaient une forme cliniquement plus sévère que les familles n'ayant qu'une duplication. Dix-sept ans après sa découverte, de très nombreuses études ont confirmé l'implication de l' α -syn dans la maladie de Parkinson et nous avons récemment proposé que la recherche thérapeutique sur la maladie de Parkinson se focalise maintenant sur cette cible [1].

Fonction et structure

Bien que sa fonction exacte reste à ce jour inconnue, l' α -syn a été impliquée dans la régulation de l'activité synaptique par le contrôle de la libération des vésicules synaptiques [9]. Cette protéine de 14 kDa possède trois domaines distincts : un domaine comprenant la terminaison aminée (acides aminés 1 à 60), un domaine central appelé non-amyloïde (acides aminés 61 à 95) et un domaine comprenant la terminaison carboxyle (acides aminés 96 à 140) [10]. De manière surprenante, l'ensemble des mutations identifiées chez les patients est localisé dans le premier domaine. Ce domaine est caractérisé par six répétitions d'un motif riche en lysine, très conservé, identique à ceux des lipoprotéines [10]. Le domaine central non-amyloïde, riche en acides aminés hydrophobes, s'avère essentiel pour les propriétés d'agrégation de l' α -syn [11].

La structure secondaire de la protéine, si elle existe, reste extrêmement contestée. En effet, certaines études ont montré que l' α -syn existait sous la forme d'un tétramère stable avec un repliement sous forme d'hélice α alors que d'autres études suggèrent que l' α -syn est majoritairement présente sous la forme d'une protéine non repliée [12-14]. Ces différentes conformations dépendraient d'un équilibre dynamique. L' α -syn serait non repliée en solution aqueuse mais adopterait un repliement secondaire contenant des hélices α lors de l'interaction avec des membranes lipidiques. Les mutations de l' α -syn induiraient des modifications dans cet équilibre en favorisant une forme particulière : monomère, oligomère ou forme fibrillaire [15, 16].

La recherche actuelle se focalise sur l'identification de la ou des espèce(s) toxique(s). Deux hypothèses sont envisagées : selon la première, les espèces toxiques seraient les agrégats amyloïdes matures tels que les corps de Lewy, et, selon la seconde, les espèces toxiques seraient des formes de poids moléculaires inférieurs tels que des oligomères. Au vu des études récentes, la seconde hypothèse semble la plus probable en raison, notamment, de la description d'une toxicité accrue des formes mutées incapables de former des fibrilles [17, 18]. Les corps de Lewy seraient des formes d'agrégats stables sur un plan thermodynamique et probablement cytoprotectrices [1, 19] bien que cette hypothèse reste intensément débattue. Les oligomères d' α -syn, qui sont considérés comme les formes les plus toxiques, possèdent une propension accrue aux liaisons lipidiques et augmentent la perméabilité membranaire de diverses organites telles que les mitochondries ou les lysosomes [20, 21]. Ces propriétés sont communes à la majorité des protéines à tendance agrégative trouvées dans les maladies neurodégénératives.

Plusieurs modifications post-traductionnelles de l' α -syn ont été décrites puis identifiées dans les corps de Lewy. La plus étudiée est de loin la phosphorylation de la sérine 129. Plus de dix ans après son identification [22], il est difficile de conclure quant à sa conséquence fonctionnelle et éventuellement toxique du fait d'une variabilité importante dans les méthodes et résultats de la littérature. D'autres modifications post-traductionnelles telles que la troncation de la terminaison carboxyle, la nitration des tyrosines 39, 125 ou 133 ont aussi été décrites dans des tissus provenant de patients parkinsoniens [23, 24]. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les conséquences.

L'HYPOTHÈSE PRION POUR LA MALADIE DE PARKINSON

De manière identique à ce qu'ils avaient décrits au début des années 1990 pour la progression de la pathologie du peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer, le laboratoire d'Heiko Braak a émis, en 2003, une hypothèse selon laquelle la progression de la synucléinopathie aurait une évolution cohérente et prévisible chez les patients parkinsoniens [25]. Toujours selon Braak et collaborateurs, la pathologie suivrait une progression caudo-rostrale entre des

régions connectées sur un plan anatomique. Elle débiterait en effet dans les bulbes olfactifs ou le noyau dorsal du nerf vague (X) et n'atteindrait les neurones dopaminergiques du SNc, qu'au stade 3 sur une échelle de 5 [25].

En 2008, trois groupes indépendants ont étudié la présence ou non d'une synucléinopathie dans des cerveaux de patients ayant reçus une greffe de neurones mésencéphaliques embryonnaires dans le putamen. Ces trois études montrent que 3 patients (sur 8 étudiés au total) présentent une synucléinopathie dans le greffon, avec des inclusions présentant des caractéristiques communes avec les corps de Lewy [26-28]. Ces résultats, en cohérence avec l'hypothèse de Braak, sont à l'origine de « l'hypothèse prion », ou « hypothèse de l'hôte au greffon » pour la maladie de Parkinson.

Après avoir été longtemps mystérieux, les prions ont été initialement identifiés par Stanley B. Prusiner en 1982 qui comprit leur nature protéique et forgea ainsi le terme de « PROteinaceous INfectious particles », prion. Leur propriété exceptionnelle relève de l'acquisition d'un caractère infectieux par la protéine prion (PrP) à la suite d'un changement conformationnel. La protéine PrP adopte une conformation pathologique suite à un événement post-traductionnel enrichissant son contenu en feuillets β et influence le repliement d'autres protéines PrP vers cette conformation pathologique. On parle alors de transconformation. Parmi les encéphalopathies spongiformes transmissibles chez l'homme, on peut citer la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, l'insomnie familiale fatale et le kuru.

Les agrégats d' α -syn trouvés dans les synucléinopathies sont de type amyloïde à l'exception des inclusions gliales cytoplasmiques de l'atrophie multisystématisée. Les protéines amyloïdes sont des protéines capables de former des assemblages de monomères avec une structure quaternaire contenant des feuillets β croisés [29]. Les propriétés amyloïdes de l' α -syn sont responsables de sa capacité d'agrégation. L'état amyloïde est un état thermodynamique stable. Actuellement plus de 30 protéines amyloïdes ont été associées à des maladies humaines, même si certaines protéines possèdent cette conformation dans un contexte non pathologique [30, 31]. La formation de dépôts amyloïdes passe par un mécanisme autoalimenté dans lequel toutes les étapes servent de modèle à l'étape précédente [29].

Au cours des dix dernières années, des hypothèses similaires ont été émises pour la majorité des maladies neurodégénératives. Un comportement de type prion a été décrit pour les protéines impliquées dans ces différentes maladies: α -syn pour la maladie de Parkinson, huntingtine pour la maladie de Huntington, tau pour la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies, $A\beta$ pour la maladie d'Alzheimer, superoxyde dismutase 1 et TAR DNA-binding protein 43 pour la sclérose latérale amyotrophique.

Transmission de cellule à cellule de l' α -synucléine

L'hypothèse de Braak concernant la progression prédictible de la synucléinopathie suggère que l' α -syn pourrait être transmise d'une cellule à une autre. Néanmoins, les mécanismes cellulaires permettant la libération ou l'assimilation sont encore inconnus. Bien que l' α -syn ne possède pas de séquence d'adressage au réticulum endoplasmique, ce qui prévient sa sécrétion par la machinerie classique d'exocytose, l' α -syn a été détectée dans le compartiment extracellulaire [plasmatique ou liquide cérébro-spinal] chez l'homme ou dans le milieu de culture de cellules neuronales [20, 32, 33]. Plusieurs études ont montrées que l' α -syn serait libérée dans des exosomes par un mécanisme dépendant du calcium [33]. Concernant l'assimilation par une cellule réceptrice, plusieurs mécanismes ont été suggérés allant de l'endocytose classique à la diffusion passive en passant par l'existence de structure « tunnel » permettant un passage direct d'une cellule à une autre [1].

Inoculation, transconformation et propagation de l' α -synucléine chez l'animal

Les études récentes chez l'animal ont permis de renforcer l'hypothèse prion pour la maladie de Parkinson. En effet, l'injection intrastriatale d'agrégats d' α -syn synthétisés et agrégés *in vitro* chez des souris sauvages ou transgéniques induit une agrégation de l' α -syn endogène (rongeur), une dégénérescence des neurones dopaminergiques et une synucléinopathie progressant au cours du temps dans des régions interconnectées [34]. Il est intéressant de remarquer que des souris knock-out pour l' α -syn ne développent pas de pathologie [34]. Ces résultats confirment l'importance de la protéine endogène dans l'initiation et la progression de la pathologie. Cette observation est la seule preuve d'une éventuelle transconformation chez l'animal étant donné qu'aucune étude n'a pu démontrer à ce jour une interaction directe. Un second travail a montré que l'injection dans la SNc d' α -syn agrégée induit aussi une progression de la synucléinopathie même si dans ce cas il n'a pas été observé de dégénérescence des neurones dopaminergiques [35]. Une dernière étude n'a pas pu confirmer l'induction d'une pathologie chez des animaux non transgéniques [36]. Ces études ont toutefois utilisé des méthodes de synthèse, de protocole d'agrégation et d'injection différentes, ce qui empêche toute comparaison claire des résultats obtenus.

Une autre critique globale pouvant être adressée à ces études est l'utilisation d'agrégats synthétiques d' α -syn qui sont généralement considérés comme faiblement pathogènes [37]. En effet, les agrégats provenant des patients auraient des propriétés pathogènes qui ne peuvent pour le moment être reproduites par les agrégats synthétiques. Pour répondre à cette objection, les laboratoires de Miquel Vila, Jose A. Obeso et Erwan Bezard ont purifié des corps de Lewy à partir de mésencéphales de patients parkinsoniens. Leur inoculation à la souris sauvage et au primate non humain a induit une accumulation intracellulaire d' α -syn pathologique, la progression dans des régions interconnectées et la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques [38]. L'absence de pathologie induite par les

corps de Lewy privés d' α -syn par immunoprécipitation renforce le rôle central de l' α -syn dans l'initiation de la synucléinopathie. Il est intéressant de noter que les doses injectées nécessaires à l'induction d'une synucléinopathie sont très différentes selon l'inoculum utilisé, synthétique ou purifié à partir de cerveaux de patients. En effet la dose injectée pour le matériel humain était de l'ordre de la centaine de picogrammes alors que pour le matériel synthétique elle était de la dizaine de microgrammes [34, 35, 38]. Ce rapport de dose de l'ordre de la dizaine de milliers suggère fortement une spécificité aux agrégats humains. Le laboratoire de Stanley B. Prusiner a montré, dans une étude concomitante, des résultats similaires à partir d'homogénats non purifiés de cerveaux de patients atteints d'atrophie multisystématisée, une autre maladie neurodégénérative de la famille des synucléinopathies [39].

Récemment plusieurs laboratoires ont décrit l'existence de différentes souches de formes fibrillaires d' α -syn ayant des propriétés distinctes. En 2013, le laboratoire de Virginia M. Lee et John Q. Trojanowski a montré que certaines souches d' α -syn synthétique initiaient l'agrégation de la protéine tau, suggérant ainsi des mécanismes communs et croisés dans les maladies neurodégénératives [40]. Plus récemment le groupe de Ronald Melki a montré l'existence de différentes formes fibrillaires d' α -syn ayant des toxicités différentes [41]. L'injection de ces différentes formes fibrillaires chez le rat n'induit que peu ou pas d'altération comportementale, mais une différence anatomopathologique apparaît si les animaux ont au préalable reçu une injection d'un virus adéno-associé permettant la surexpression de la forme humaine de l' α -syn mutée Ala53Thr [42]. Ces différences sont interprétées par les auteurs comme la preuve de l'existence de différentes souches pathologiques d' α -syn conduisant à différentes pathologies. Ces résultats restent préliminaires et les différences observées subtiles. L'identification de souches différentes induisant des synucléinopathies distinctes telles que la maladie de Parkinson, l'atrophie multisystématisée ou la démence à corps de Lewy serait un pas de plus dans la confirmation de l'« hypothèse prion » en gardant à l'esprit que la démonstration expérimentale reste à faire.

En terme de sécurité sanitaire, il est important de préciser que même si l' α -syn possédait des propriétés transconformationnelles identiques à celles des prions, il n'existe à ce jour aucune preuve amenant à envisager qu'une quelconque transmission interindividuelle puisse exister comme c'est le cas pour les encéphalopathies spongiformes transmissibles. Bien que des études complémentaires soient nécessaires, une étude a montré l'absence de transmission de maladie de Parkinson ou de maladie d'Alzheimer chez les receveurs d'hormone de croissance purifiée à partir de cerveaux cadavériques [43].

STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

L'agrégation de l' α -syn est maintenant considérée comme un des éléments pathogènes essentiels dans le cadre des synucléinopathies. De nombreuses stratégies sont

actuellement testées dans les modèles précliniques mais, pour le moment, peu ont fait l'objet d'une translation vers la clinique [1].

Les stratégies les plus évidentes ciblent la synthèse de l' α -syn ou sa dégradation. A ce jour, les résultats concernant la diminution de la synthèse d' α -syn par des interventions d'interférence ARN dans les modèles précliniques sont contradictoires [1]. L' α -syn étant dégradée par une balance entre les systèmes « ubiquitine-protéasome » et « autophagie-lysosome », l'augmentation de l'activité d'une de ces voies pourrait s'avérer bénéfique. Bien qu'il n'existe à ce jour pas d'étude utilisant des activateurs du système ubiquitine-protéasome, l'augmentation du flux autophagique associée à une augmentation de la biogénèse lysosomale s'est avérée bénéfique dans plusieurs modèles précliniques de la maladie de Parkinson [1]. Les stratégies mentionnées précédemment utilisent majoritairement des vecteurs viraux dont l'utilisation en recherche clinique est possible mais limitée pour le moment. L'identification de petites molécules pouvant spécifiquement moduler les voies autophagiques permettrait plus probablement une application rapide chez les patients.

Certaines stratégies se sont focalisées sur la modulation des modifications post-traductionnelles, mais les résultats sont à ce jour trop contradictoires pour tirer une conclusion ferme [1]. En revanche, les approches d'inhibition de l'agrégation présentent un intérêt non négligeable. La surexpression de protéines chaperonnes (telles que HSP104) ou d'un dérivé du thé vert (epigallocatechin-3-gallate) ont amené des résultats positifs dans des modèles *in vitro*. Les études, réalisés *in vivo*, avec des modulateurs allostériques de l' α -syn ou des inhibiteurs de prolyl-oligopeptidase ont aussi conduit à des résultats positifs [44-46].

Récemment, l'utilisation d'anticorps dirigés contre l' α -syn est apparue comme une stratégie intéressante pour augmenter son élimination. Plusieurs essais cliniques de phase I utilisant des anticorps dirigés contre l' α -syn ont récemment débuté, l'un d'entre eux dans le cadre d'un consortium européen (Sympath — <http://www.sympath-project.eu>). Bien que ces stratégies présentent un intérêt certain, plusieurs questions mécanistiques restent à ce jour sans réponse. Tout d'abord, l' α -syn est une protéine majoritairement trouvée, chez l'homme, au niveau des membranes des érythrocytes, où son rôle est inconnu [47]. Les modèles animaux utilisés pour les démonstrations précliniques d'efficacité de cette stratégie expriment l' α -syn humaine uniquement dans le système nerveux central. L'effet des anticorps sur l' α -syn périphérique reste à ce jour inconnue. Ensuite, contrairement aux plaques séniles de la maladie d'Alzheimer, les corps et neurites de Lewy sont des agrégats intracellulaires et le(s) mécanisme(s) par lequel ces anticorps permettraient l'élimination de ces agrégats intracellulaires reste(nt) à ce jour inconnu. Ces immunothérapies s'inspirent d'études sur la maladie d'Alzheimer, initiées il y a plusieurs années, ce qui permet d'avoir aujourd'hui des résultats cliniques. Deux études utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les plaques amyloïdes ont montré une absence de ralentissement de la détérioration cognitive malgré une diminution du nombre des plaques séniles [48, 49]. Cette observation soulève une question majeure: serons-nous capable de diminuer ou d'abolir les lésions induites

par l'agrégation de l' α -syn ? Une seule preuve expérimentale positive existe pour le moment [50]. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ce résultat. Il n'existe à ce jour pas de stratégie ciblant directement la transconformation de l' α -syn. L'effort de recherche fondamentale pour la compréhension de ce mécanisme permettra de cibler spécifiquement cette étape essentielle dans l'initiation de la pathologie.

La majorité des études mentionnées précédemment ont été réalisées dans des modèles rongeurs surexprimant l' α -syn humaine. Les preuves d'efficacité doivent être obtenues dans différents modèles complémentaires, notamment par l'utilisation de modèles de « l'hypothèse prion ». Bien que peu toxiques, ces modèles, permettront de montrer l'efficacité ou non du traitement sur la progression de la synucléinopathie, élément à ce jour manquant dans les démonstrations d'efficacité précliniques.

CONCLUSION

La recherche fondamentale et préclinique des 18 dernières années a permis de montrer le rôle central de l' α -syn dans la maladie de Parkinson. La recherche préclinique laisse supposer qu'une stratégie efficace contre l'agrégation, la toxicité ou la progression de la pathologie associée à cette protéine pourrait être bénéfique pour les patients. Il est cependant nécessaire de développer des marqueurs précoces et robustes pour dépister plus tôt cette maladie et ainsi permettre sa prise en charge dans ses phases précliniques.

RÉFÉRENCES

- [1] Dehay B, Bourdenx M, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, et al. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurology*. 2015;14:855-66.
- [2] Dickson DW. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8).pii:a009258.
- [3] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839-40.
- [4] Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, et al. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*. 1995;14:467-75.
- [5] George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*. 1995;15:361-72.
- [6] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276:2045-7.

- [7] Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003;302(5646):841.
- [8] Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364:1167-9.
- [9] Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of alpha-synuclein. *Neuron*. 2013;79(6):1044-66.
- [10] Rochet JC, Hay BA, Guo M. Molecular insights into Parkinson's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;107:125-88.
- [11] Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(4):2380-6.
- [12] Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT, Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 1996;35(43):13709-15.
- [13] Gould N, Mor DE, Lightfoot R, Malkus K, Giasson B, Ischiropoulos H. Evidence of native alpha-synuclein conformers in the human brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(11):7929-34.
- [14] Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011;477(7362):107-10.
- [15] Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine*. 1998;4(11):1318-20.
- [16] Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):571-6.
- [17] Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(10):4194-9.
- [18] Cremades N, Cohen SI, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell*. 2012;149(5):1048-59.
- [19] Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM. Aggregates formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(6):4625-31.
- [20] Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, et al. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of Neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(34):9220-32.
- [21] Volles MJ, Lansbury PT, Jr. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry*. 2002;41(14):4595-602.
- [22] Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology*. 2002;4(2):160-4.
- [23] Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. 2000;290(5493):985-9.
- [24] Kellie JF, Higgs RE, Ryder JW, Major A, Beach TG, Adler CH, et al. Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain

- tissue by intact protein mass spectrometry. *Scientific Reports*. 2014;4:5797.doi: 10.1038/srep05797.
- [25] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 2003;24(2):197-211.
- [26] Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*. 2008; 14(5):504-6.
- [27] Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*. 2008;14(5):501-3.
- [28] Mendez I, Vinuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H, et al. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature Medicine*. 2008;14(5):507-9.
- [29] Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45-51.
- [30] Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 2009; 325(5938):328-32.
- [31] Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2012;19(4):167-70.
- [32] El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(13):1945-7.
- [33] Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of Neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(20):6838-51.
- [34] Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*. 2012;338(6109):949-53.
- [35] Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 4):1128-38.
- [36] Sacino AN, Brooks M, Thomas MA, McKinney AB, McGarvey NH, Rutherford NJ, et al. Amyloidogenic alpha-synuclein seeds do not invariably induce rapid, widespread pathology in mice. *Acta neuropathologica*. 2014;127(5):645-65.
- [37] Jucker M, Walker LC. Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of Neurology*. 2011;70(4):532-40.
- [38] Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Annals of Neurology*. 2014;75(3):351-62.
- [39] Watts JC, Giles K, Oehler A, Middleton L, Dexter DT, Gentleman SM, et al. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(48):19555-60.

- [40] Guo JL, Covell DJ, Daniels JP, Iba M, Stieber A, Zhang B, et al. Distinct alpha-synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell*. 2013;154(1):103-17.
- [41] Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nature Communications*. 2013; 4:2575.
- [42] Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, et al. alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*. 2015;522(7556):340-4.
- [43] Irwin DJ, Abrams JY, Schonberger LB, Leschek EW, Mills JL, Lee VM, et al. Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurology*. 2013;70(4):462-8.
- [44] Prabhudesai S, Sinha S, Attar A, Kotagiri A, Fitzmaurice AG, Lakshmanan R, et al. A novel “molecular tweezer” inhibitor of alpha-synuclein neurotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2012; 9(2):464-76.
- [45] Savolainen MH, Richie CT, Harvey BK, Mannisto PT, Maguire-Zeiss KA, Myohanen TT. The beneficial effect of a prolyl oligopeptidase inhibitor, KYP-2047, on alpha-synuclein clearance and autophagy in A30P transgenic mouse. *Neurobiology of d Disease*. 2014;68:1-15.
- [46] Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, Levin J, Shi S, Schmidt F, et al. Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson’s disease. *Acta neuropathologica*. 2013;125(6):795-813.
- [47] Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, et al. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008; 22(5):1327-34.
- [48] Doody RS, Farlow M, Aisen PS, Alzheimer’s Disease Cooperative Study Data A, Publication C. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer’s disease. *The New England Journal of Medicine*. 2014;370(15):1460.
- [49] Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer’s disease. *The New England Journal of Medicine*. 2014;370(4):322-33.
- [50] Lim Y, Kehm VM, Lee EB, Soper JH, Li C, Trojanowski JQ, et al. alpha-Syn suppression reverses synaptic and memory defects in a mouse model of dementia with Lewy bodies. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011; 31(27):10076-87.