

Trabajo Fin de Grado

Título del trabajo: Caracterización de los factores y primeros eventos de malplegamiento en la agregación amiloide de α -sinucleína.

Autor/es

Jorge Tarancón Diez

Director/es

Nunilo Cremades Casasin

Pablo José Gracia González

Indice.

Resumen	3
Introducción	4
Objetivos	9
Materiales y métodos	10
Resultados	15
Discusión de resultados	21
Conclusiones	24
Bibliografía	25
Anexo	28

Resumen.

La α -sinucleína es una proteína muy estudiada por su implicación en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. La agregación amiloide de esta proteína está relacionada con la toxicidad neuronal que conlleva la aparición de estas enfermedades, pero, pese a los estudios sobre el tema, todavía se desconocen los factores y los mecanismos que median su agregación. Parte de este desconocimiento se debe a la falta de condiciones experimentales *in vitro* que emulen lo que sucede *in vivo*. Parece ser que la agregación de α -sinucleína se favorece en el interior o la superficie de condensados celulares (los denominados orgánulos sin membrana) que se generan en las neuronas en condiciones de estrés.

Este trabajo estudia, a modo preliminar, el comportamiento de α -sinucleína en diferentes microambientes resultado de un proceso de separación de fases líquido-líquido *in vitro*. Como primer paso para ello se caracterizó la formación y morfología de dos tipos de coacervados en función de la salinidad y la temperatura. Para ello se usaron técnicas de turbidimetría y microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). A estos coacervados ya formados se les añadió α -sinucleína recombinante purificada, de la que parte era proteína marcada fluorescentemente a fin de evaluar por microscopía de fluorescencia el comportamiento de α -sinucleína. Se observó que la α -sinucleína parecía particionar preferentemente en coacervados artificiales *in vitro* con una carga neta ligeramente negativa. Este primer hallazgo abre la puerta a futuros estudios de agregación amiloide y cinéticas de agregación en modelos *in vitro*, más cercanos a las condiciones fisiológicas neuronales reales que los ensayos *in vitro* anteriores.

Abstract.

The α -synuclein is a very studied protein because of its implication in some neurodegenerative diseases such as Parkinson Disease. The amyloid aggregation of this protein it is related with the neurological toxicity that triggers the disease, but, despite the many studies about this subject, it remains still unknown how and why the amyloid aggregation begins. One of the causes that explain this absence of knowledge is the lack of *in vitro* experimental conditions that simulate what happens *in vivo*. It seems that α -synuclein aggregation is triggered in the inside or the surface of cellular condensates (described as membraneless organelles). These cellular condensates are generated in neurons after some stress conditions.

This work elucidates, as a preliminary study, the behavior of α -synuclein in different microambiances generated due to an *in vitro* liquid-liquid phase separation. Firstly, the morphology and formation of two types of coacervates regarding the temperature and salinity were evaluated. Turbidimetry and Differential Interference Contrast (DIC) microscopy assays were used for this purpose. We added recombinant purified α -synuclein to this previously formatted coacervates. Part of the α -synuclein added was labelled with fluorescence in order to study the partition processes via fluorescence microscopy. We have observed that α -synuclein tends to particionate preferentially in the inside of low-negatively charged coacervates. This first discovery leaves the door wide open to future studies about the amyloid aggregation and kinetics inside an *in vitro* coacervate model, closer to the *in vivo* conditions than current *in vitro* assays used.

Introducción.

La α -sinucleína (α S) es una proteína intrínsecamente desordenada (IDP) de 140 aminoácidos expresada en el sistema nervioso central, conocida por la formación de agregados y fibras amiloides (*Figura 1*) presentes en patologías neurodegenerativas denominadas sinucleinopatías, entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) (1) o la atrofia sistémica múltiple (1). Su función fisiológica no se conoce con exactitud, pero se cree que participa en la plasticidad sináptica y el transporte de vesículas con neurotransmisores (2). La agregación amiloide está implicada en muchas enfermedades, la mayor parte neurodegenerativas. La proteína nuclea y forma oligómeros amiloides tóxicos (3), y posteriormente se forman fibras amiloides que terminan por causar la muerte celular. En el caso de la α -sinucleína, se han caracterizado diversos tipos de oligómeros, con diferentes toxicidades y grados de infectividad (4) y se ha avanzado bastante en la comprensión de este proceso de forma global, identificándose diferentes mecanismos de nucleación (5).

Sin embargo, las causas moleculares por las que esta proteína comienza a agregar en el entorno celular son en gran medida desconocidas. La sobreexpresión de la proteína en células neuronales se ha observado que no potencia la agregación de la misma, sino que otros factores celulares, como una desregulación de los procesos de control de homeostasis y proteostasis, son necesarios para la acumulación intracelular de agregados de α S tóxicos (2,6). Ciertas mutaciones y duplicaciones o triplicaciones del gen que codifica la α S son causas directas de ciertas formas hereditarias de la enfermedad de Párkinson, y se han relacionado con un incremento de la agregación de α S (7), aunque estas formas sólo representan un porcentaje muy pequeño de todos los casos de sinucleinopatías, siendo en su gran mayoría patologías esporádicas sin una causa hereditaria aparente. Para iniciar la agregación de α S en cultivos neuronales, además de una sobre-expresión de la proteína, se utilizan mecanismos para incrementar el estrés oxidativo mediante un aumento de especies reactivas de oxígeno, o, alternativamente, mecanismos para reducir la actividad de los procesos de eliminación de proteínas como el proteasoma (8); mecanismos, a su vez, asociados con el avance progresivo de la edad en las personas (9). Cómo la alteración de estos mecanismos promueve la agregación de α S y su acumulación en forma de agregados amiloides en la célula es todavía un misterio. En el tubo de ensayo, α S forma agregados amiloides en presencia de interfases hidrofílicas/hidrofóbicas, como la interfase aire/agua o interfases lípido/agua, aunque la composición lipídica de las vesículas que promueven la agregación amiloide de α S *in vitro* es muy particular y sin relevancia fisiológica (10,11). De hecho, estudios estructurales en detalle de las fibras de α S extraídas de cerebro de pacientes han revelado diferencias drásticas con respecto a las fibras que se generan en la actualidad *in vitro*, en el tubo de ensayo (12), lo que

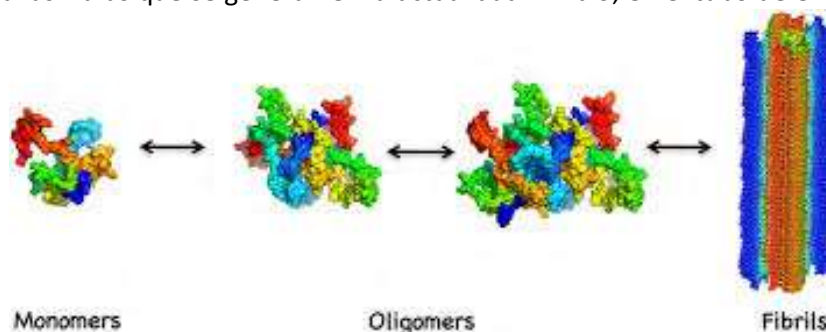


Figura 1. Imagen esquemática de la transformación de monómeros de sinucleína en fibras amiloides. Figura modificada a partir de *Cremades et al* (4).

indica que las condiciones utilizadas para agregar a la proteína *in vitro* no recapitulan, ni se asemejan, a los microentornos y/o interfases celulares que promueven la nucleación de la proteína en agregados amiloides *in vivo*, los cuales a su vez son desconocidos lo cual obliga a innovar y desarrollar condiciones *in vitro* novedosas y que emulen condiciones celulares reales.

Es posible que una suma de factores como los ya descritos provoquen una localización intracelular incorrecta de la α S y que esto conlleve a su agregación. Variables como el grado de ubiquitinación y la oxidación de metioninas se ha visto que influyen en la toxicidad y tipo de fibras de α S formadas (13). Estas modificaciones postraduccionales pueden influir en la localización de α S en la célula y, por tanto, dependiendo de su localización, influir en su propensión a agregar.

En este contexto, recientemente se han descrito los denominados “orgánulos sin membrana” celulares, tales como los gránulos de estrés, gránulos P o cuerpos de Cajal, entre otros (14–16). Destacamos dos por su localización citoplasmática: los gránulos de estrés y los cuerpos P (17). Ambos tipos de orgánulos sin membrana o coacervados se encuentran de manera fisiológica en neuronas y su formación y degradación está regulado por procesos como la autofagia (18). En cada célula hay entre 0 y 30 unidades de cada una de estas estructuras, exhibiendo los gránulos de estrés una forma más irregular y un mayor tamaño (entre 0,5 y 5 μ m) (19). Estos compartimentos celulares retienen propiedades líquidas y tienen una estructura dinámica dado que carecen de una bicapa lipídica delimitándolos (15). Se forman por separación de fases líquido-líquido (*liquid-liquid phase separation* o sus siglas LLPS en inglés). La LLPS es un

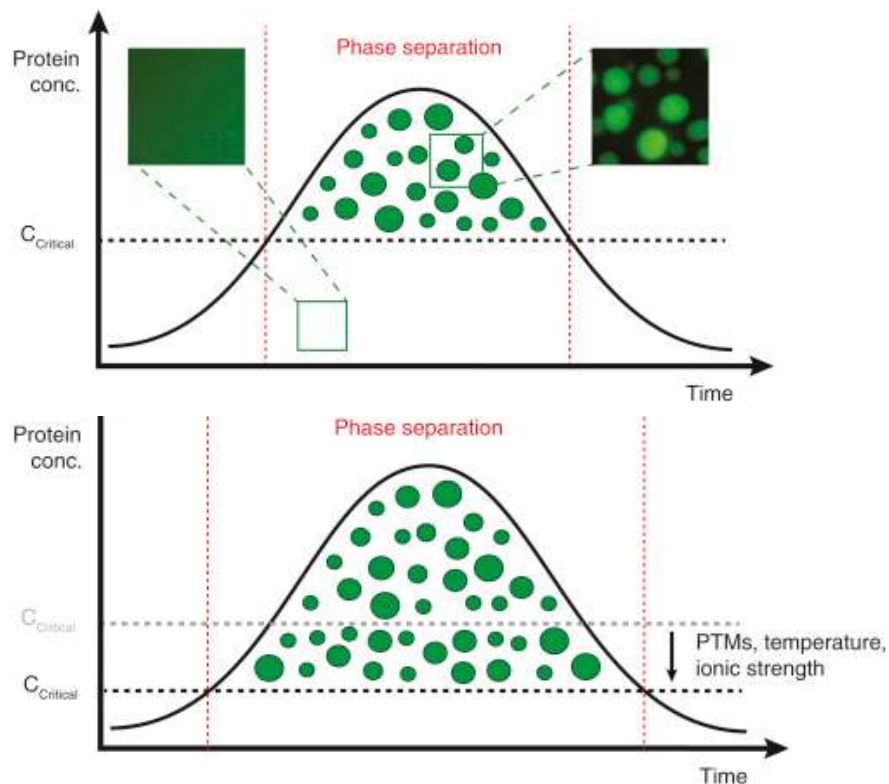


Figura 3. La separación de fases líquido-líquido ocurre cuando los componentes de los coacervados pasan una concentración mínima crítica. Por encima de esta concentración el estado de menor energía del sistema implica separar una previa fase homogénea en dos fases heterogéneas. Esta concentración crítica puede variar en función de la temperatura, fuerza iónica o pH de la disolución, aunque también de las modificaciones post-traduccionales de la proteína implicada en la separación de fases. Imagen sacada del artículo de Hyman *et al* (22).

proceso biofísico espontáneo en el cual a partir de una sola fase homogénea con varios componentes en solución, se forman dos fases diferenciadas en las que encontramos una fase condensada (o coacervado) y una fase diluida (20) (Figura 2). Este proceso se produce porque a una determinada concentración y a unas determinadas condiciones, ciertas moléculas, particularmente ciertas proteínas intrínsecamente desordenadas y moléculas de ácido ribonucleico (ARN), establecen interacciones entre ellas más favorables que las interacciones que pudieran establecer con el agua. La fase concentrada o coacervado posee por tanto una elevada concentración en proteínas y/o ARNs y una baja concentración en agua, por lo que tienen una densidad mayor y unas propiedades fisico-químicas distintas al medio acuoso, aunque mantiene propiedades de líquido. Al formarse, por tanto, inicialmente se forman fases condensadas esféricas dispersas en el medio diluido acuoso (Figura 3). Este proceso es totalmente reversible y su formación en muchos casos está regulada por señalizaciones endógenas o mensajeros químicos externos (21).

Factores químicos o electrostáticos podrían también mediar en la formación de orgánulos sin membrana (22). Estos orgánulos sin membrana pueden fusionarse entre ellos, disolverse o intercambiar material con el exterior. Los elementos que los componen, en su mayor parte ARN, proteínas y en algunas ocasiones pequeñas moléculas, se encuentran en distinta concentración en el interior que en el exterior (22). De esta manera la célula organiza distintos compartimentos celulares en los que llevar a cabo reacciones bioquímicas complejas, regular procesos esenciales para la célula (23) o simplemente almacenar un determinado ARN o proteína (24).

Estudios sobre la composición proteica de estos coacervados fisiológicos indican la elevada presencia de proteínas intrínsecamente desordenadas en su composición (25) debido, entre otros factores, a que la carencia de dominios concretos aumenta su capacidad de hacer de andamiaje para la interacción multivalente con moléculas de ARN u otras biomoléculas (26). Por otro lado, algunas de las proteínas intrínsecamente desordenadas que se han identificado

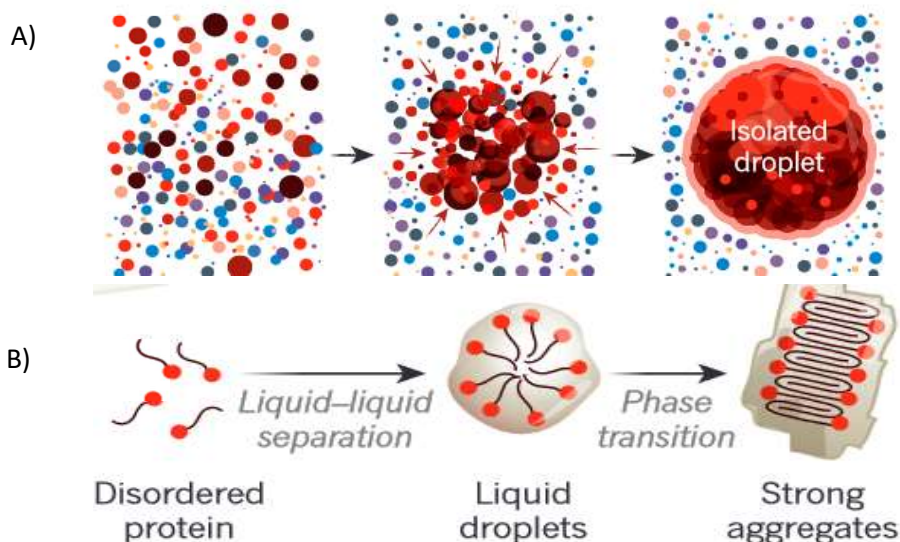


Figura 2. Representación esquemática de LLPS y la formación de posibles agregados en su interior a partir de proteínas IDP. A) Esquema de cómo a partir de una fase se forman dos fases de composición heterogénea. B) Esquema de la nucleación resultante en la formación de agregados amiloides que ha sido descrita en algunos tipos de coacervados generados por proteínas IDP amiloidogénicas como TDP-43 o tau. Modificados a partir de Dolgin et al (20).

como promotoras de formación de coacervados fisiológicos están a su vez relacionados con enfermedades neurodegenerativas mediante su agregación amiloide, como la proteína TDP-43 involucrada en la Demencia Frontotemporal, o la proteína tau involucrada en la enfermedad de Alzheimer (27), y se ha observado que en estos coacervados, estas proteínas pueden iniciar el proceso de agregación y formación de agregados amiloides tóxicos (28).

En lo que respecta a los coacervados en general, la barrera energética para la nucleación en agregados amiloides podría reducirse muy considerablemente debido a las propiedades electroquímicas particulares de este entorno (la proteína se encuentra rodeada de un solvente con propiedades distintas), así como al aumento de la concentración local de la proteína en su interior (15). La diferencia de propiedades físico-químicas en el interior de los coacervados con respecto al exterior y la posibilidad de libre difusión de moléculas entre el interior y el exterior de los coacervados debido a la carencia de membranas lipídicas que lo delimiten, permite la acumulación selectiva de ciertas moléculas en el interior o en la interfase de los coacervados, lo que también podría hacer que se desencadenasen procesos de agregación de proteínas que de esta manera se viesan concentradas mediante la partición selectiva en diferentes microambientes, sin necesidad de formar parte activa en el proceso de LLPS. Un ejemplo sería el caso de la proteína actina, que se ha demostrado *in vitro* que se particiona y se internaliza preferencialmente en determinados tipos de coacervados previamente formados, donde se desencadena su nucleación y formación de fibras de forma especialmente efectiva (29).

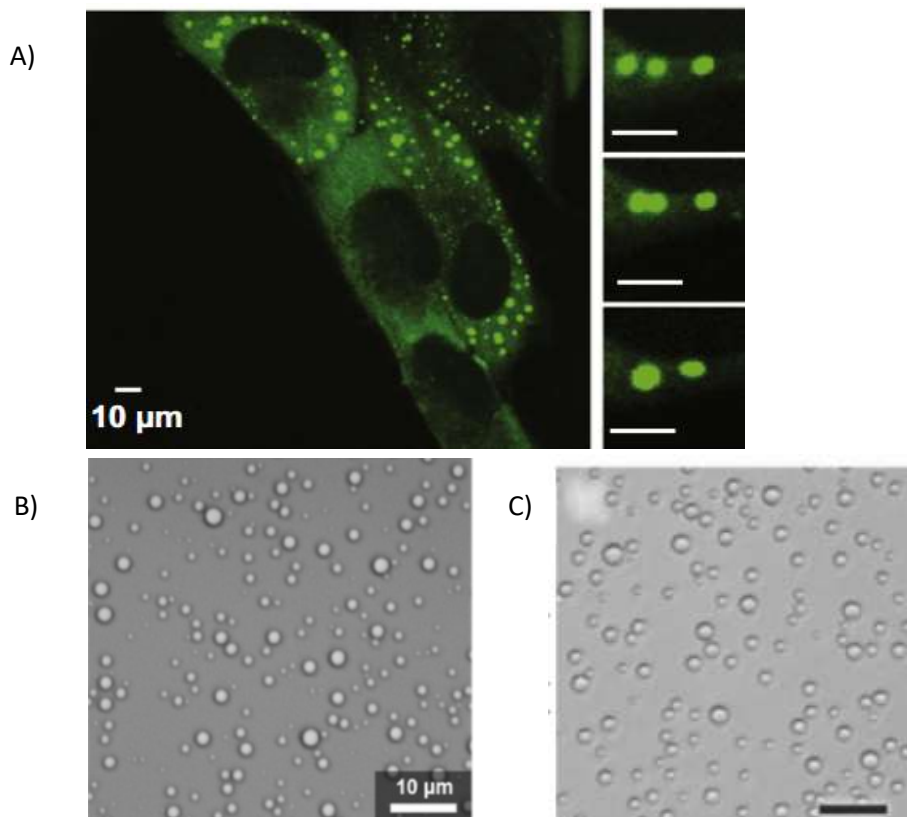


Figura 4. A) Imagen de microscopía de fluorescencia de células en cultivo donde los gránulos de estrés han sido marcados con GFP; a la derecha se muestran capturas de imagen del proceso de fusión de dos gránulos. Imagen modificada de *Molliex et al* (17). B) Imagen de microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC) de coacervados de pLK y pRE. Imagen modificada de *McCall et al* (29). C) Imagen de microscopía de DIC de coacervados de poli-U y espermina. Imágen modificada a partir de *Aumiller et al* (32).

La interacción fisiológica multivalente entre moléculas de ARN con secuencias y estructuras concretas y moléculas de proteínas, principalmente con proteínas intrínsecamente desordenadas (o IDPs por sus siglas en inglés), determina la formación de estos orgánulos de membrana en un proceso altamente regulado (24,30) (Figura 5). Dada la complejidad en los mecanismos de formación y la naturaleza y propiedades de los coacervados formados, y al mismo tiempo debido a la importancia que se está descubriendo que éstos tienen en la homeostasis celular, es cada vez más importante buscar modelos simplificados de estos coacervados. En la actualidad existen varios modelos simplificados artificiales que mimetizan las propiedades de los coacervados fisiológicos y que están ampliamente caracterizados, lo que permite su control y su uso en estudios complejos *in vitro*. Algunos ejemplos son los coacervados generados por la interacción de poli-L-lisina (pLK) y poli-R-ácido glutámico (pRE), o los formados por la interacción entre el ARN poli-uracilo (poli-U) y espermina, o los coacervados con alginato de sodio y dextrano, entre otros (29,31–33). Los dos primeros coacervados mencionados, de poli-U/espermina y pLK/pRE son especialmente interesantes para el estudio de partición proteica al ser ambos coacervados electrostáticos.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este proyecto nos planteamos el estudio del comportamiento de αS en diferentes tipos de coacervados electrostáticos sintéticos con el fin de caracterizar los efectos de partición y acumulación de αS en este tipo de coacervados y que en última instancia pudiesen llevar a la formación de agregados amiloides de esta proteína. Si así se demostrase, se habrían encontrado condiciones *in vitro* significativamente más relevantes desde el punto de vista fisiológico para el estudio del proceso de agregación amiloide de αS y se abriría una nueva línea de investigación para la identificación del papel de la agregación de αS en coacervados fisiológicos en el desarrollo de neurodegeneración y enfermedad.

Mientras se estaba finalizando esta memoria, salió publicado un artículo en el que muestran que αS puede promover LLPS por sí misma (34), aunque todavía existen muchos puntos dudosos al respecto. En todo caso, sigue siendo relevante el estudio de la partición de la proteína en coacervados ya generados, siendo éstos entornos particularmente idóneos para el auto-ensamblaje de proteínas (29).

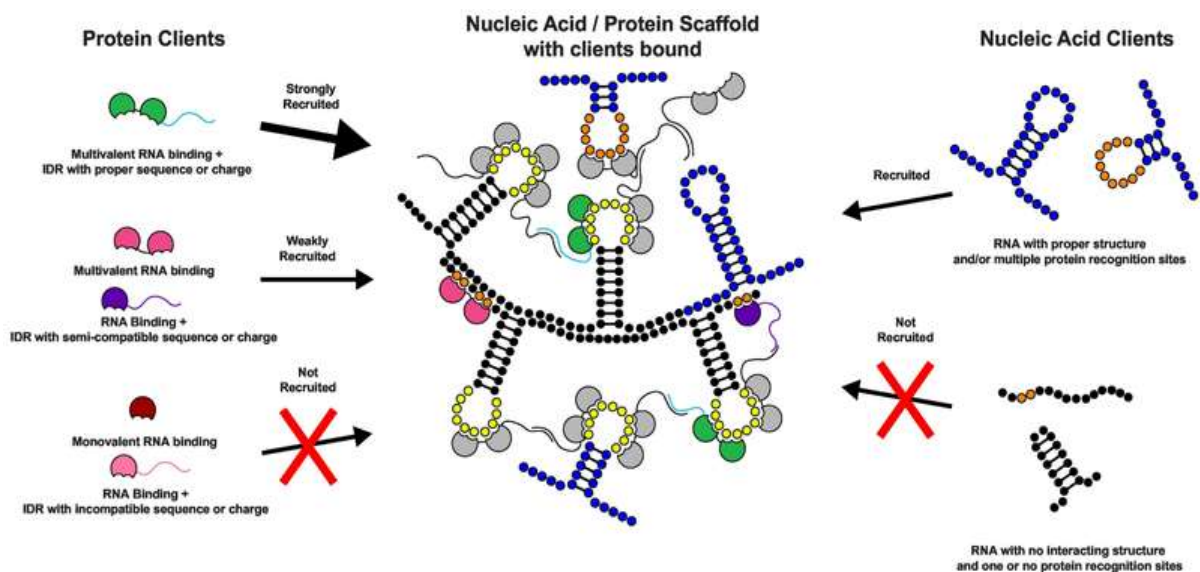


Figura 5. Representación de la especificidad en la formación de coacervados fisiológicos, las interacciones implicadas entre RNA y proteínas IDR y la diferencia entre proteínas "andamio" y proteínas "cliente". Figura modificada a partir de Ditlev *et al* (24).

Objetivos.

En este trabajo estudiamos el comportamiento de una proteína intrínsecamente desordenada como la α S en distintos coacervados artificiales. Esta proteína, y en concreto su agregación y formación de fibras amiloides, es extremadamente relevante desde el punto de vista científico y médico, ya que está implicada en varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Párkinson. A su vez, los orgánulos sin membrana o coacervados celulares constituyen un elemento poco estudiado todavía que recapitula aspectos de la bioquímica celular cruciales y poco accesibles mediante sistemas *in vitro* habituales. Además de esto, su relevancia fisiológica sigue al alza ya que cada vez más parecen ser importantes en la homeostasis celular. Comprobar si α S interacciona de forma selectiva y se internaliza en coacervados artificiales de composición y propiedades definidas, supone un reto de alto grado de interés y un avance en el conocimiento sobre la agregación amiloide de α S.

Los objetivos específicos planteados en este proyecto son:

- Caracterizar la formación de dos tipos de coacervados *in vitro* que nos permitan simular las condiciones de diferentes tipos de coacervados fisiológicos: poli-L-lisina/poli-R-ácido glutámico y poli-U/espermina.
- Evaluar la morfología y distribución de los coacervados en función de las condiciones de la solución (tampón, salinidad y temperatura).
- Estandarizar los procedimientos de síntesis de estos coacervados en el laboratorio.
- Generar α S recombinante para los estudios de partición.
- Estudiar la partición de α S en los diferentes microambientes generados tras la formación de los diferentes tipos de coacervados.

Materiales y métodos.

Expresión de α S humana silvestre (Wild-Type, WT).

α S WT se expresó en bacterias *E. coli* y se purificó de acuerdo con un protocolo optimizado por nuestro grupo de investigación. En este caso, purificamos un volumen total de 8 litros de cultivo de *E. coli*. A partir de un plásmido comercial de expresión con resistencia al antibiótico ampicilina, se transformaron bacterias *E. coli* BL21-Gold (DE3). Las bacterias se transformaron mediante choque térmico durante 40 segundos a 42°C. Las bacterias transformadas se incubaron en agitación a 37°C, tras lo cual se sembraron 200 μ l del volumen transformado en placas de agarosa a las que se añadió ampicilina a una concentración de 100 mg/L. Dejamos crecer colonias durante la noche en estufa a 37°C. Al día siguiente se prepararon precultivos en Erlenmeyer de 250 ml con medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina 100 mg/L. De las placas, se seleccionaron las colonias de bacterias que aparecían aisladas, se recogieron con una punta de micropipeta estéril y se depositaron en el interior de los Erlenmeyer de 250 ml. Los precultivos se dejaron crecer ca. 10 h a 37°C y 220 rpm. Al día siguiente estos precultivos se usaron para escalar a ocho litros de cultivo en medio LB con ampicilina 100 mg/L. Estos cultivos fueron incubados a 180 rpm y 37 °C y se hicieron medidas cada hora para monitorizar la densidad óptica del cultivo, usando en un espectrofotómetro a 600 nm. Cuando la densidad óptica llegó a 0,7 (unidades arbitrarias) se añadió 240 mg/L de inositol- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para provocar la sobreexpresión de la proteína en las bacterias. Los cultivos se incubaron a 180 rpm a 28 °C hasta el día siguiente. Al día siguiente los ocho litros de cultivo se centrifugaron en una centrífuga AVANTI J-26 XP (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos) durante 10 minutos a 9.700 rpm en el rotor JA-10 de ángulo fijo de aluminio de Beckman Coulter. El pellet obtenido se resuspendió en PBS (phosphate buffer saline (62 mg $Na_2H_2PO_4$; 208 mg Na_2HPO_4 ; 1,752 g NaCl en 200 ml de H_2O) y se centrifugó de nuevo, para lavarlo.

Purificación de α S WT humana

El sedimento o pellet de bacterias se resuspendió en 200 ml de solución de lisis bacteriana compuesta por tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,7, 2 mM EDTA e inhibidores de proteasas. Las bacterias se lisaron sonicando en frío (sonicador American Laboratory Trading, East Lyme, CT, Estados Unidos) en 5 ciclos de amplitud 60 de un minuto, con un minuto de descanso. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm en un rotor JA-20 de ángulo fijo de aluminio Beckman Coulter (Brea, California, Estados Unidos) durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se incubó durante media hora en un baño caliente a 95 °C. Al ser la α S una proteína intrínsecamente desordenada y termoestable, no precipita y quedó en el sobrenadante tras una centrifugación a 13.000 rpm en un rotor JA-20 de ángulo fijo de aluminio de la empresa Beckman Coulter para la centrífuga AVANTI J-26 XP (Brea, California, Estados Unidos) durante 30 minutos. A continuación, se añadió al sobrenadante sulfato de estreptomycin (10 mg por cada ml de sobrenadante) para precipitar el DNA presente en el extracto crudo. Tras añadir la estreptomycin, se incubó la mezcla 15 minutos en la cámara fría con rotación para su homogenización y centrifugamos de nuevo a 13.000 rpm en el rotor anterior durante 30 minutos. Este paso se realiza una vez más para eliminar todo el DNA posible. En el siguiente paso, se precipitó la α S presente en el sobrenadante añadiendo 361 mg de sulfato de amonio por cada ml de sobrenadante a 4°C. El pellet se puede congelar en este paso a -80 °C o proseguir con la purificación.

El pellet se resuspende en 40 ml de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,7 y se dializa para eliminar el exceso de sales y otras moléculas pequeñas utilizando una bolsa de diálisis de poro limitado a 3.500 Da Spectrum™ (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La diálisis se realiza en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,7 a 4°C con agitación, cambiando el líquido de la diálisis cada hora hasta completar 4 pases de diálisis. Posteriormente, se continuó la purificación mediante una columna de intercambio aniónico marca HiPrep™ Q Fast Flow 16/10 (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England, UK). El empleo de una columna aniónica se debe a que α S tiene carga neta negativa (-9,4 por monómero) al pH de trabajo que será lo más próximo posible a pH= 7,7. El manejo de la columna aniónica, y la posterior columna de cromatografía de exclusión molecular, se realiza en un aparato Äkta prime plus (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England, UK). La solución de proteína se resuspendió en un tampón de fuerza iónica 68 mM (Tampón A: Tris-HCl 25 mM, pH=7,7) y se inyecta en la columna previamente equilibrada en dicho tampón. Utilizando una columna aniónica, α S se unirá a la columna por sus cargas negativas. Una vez eluidos dos volúmenes de columna, hacemos pasar por la columna una solución mezcla de la primera con una segunda solución con mayor salinidad (Tampón B: Tris-HCl 25 mM, pH=7,7 y 1,5 M NaCl). Primero pasamos un volumen de columna de una mezcla con 7,5 % tampón B y tras ello pasamos una solución 20 % de tampón B. Guardamos este último eluido ya que contiene nuestra proteína de interés. Para lavar posteriormente la columna se pasan dos volúmenes de columna de solución 100 %B y se lava con agua Milli-Q y etanol 20%, condiciones de almacenaje de la columna. El último paso de la purificación consiste en una cromatografía de exclusión molecular. Para inyectar en la columna, se concentró la muestra hasta un volumen inferior a 5 ml usando ciclos de centrifugación a 4000 rpm en una centrífuga Allegra X-15R Beckman Coulter (Brea, California, Estados Unidos) y el rotor SX4400 de la misma empresa durante 10 min utilizando centricones de 10 kDa de poro. La solución de proteína se filtró antes de inyectar con un filtro de 0,22 μ m. La columna, de marca HiLoad® 26/600 Superdex® 75pg (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England, UK) ha sido previamente equilibrada en 25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl. Se recogieron fracciones de 5 mililitros. En los picos de absorbancia de interés se comprobó la presencia y pureza de α S mediante un gel de poliacrilamida al 12% (el peso molecular de la α S es de 14.460 Da).

Purificación del mutante de α -sinucleína N122C para el posterior etiquetado con fluoróforo.

Para incorporar a la proteína de manera específica moléculas de diversa funcionalidad, como por ejemplo sondas fluorescentes extrínsecas como Alexa Fluor 488, se utiliza la incorporación de cisteínas en la proteína en las posiciones deseadas mediante mutagénesis para utilizar así la reactividad del grupo tiol de este aminoácido. La reacción más típica para unir covalentemente otras moléculas es maleimida-tiol. Dado que el resto de la secuencia de la α S carece de cisteínas, el etiquetado molecular será exclusivo de este residuo. La posición elegida en este caso fue la posición 122, donde se cambió una asparagina a una cisteína (N122C). Esta posición tiene un buen rendimiento de etiquetado con sondas Alexa (valorado previamente en el grupo de investigación) y a la vez se encuentra en el extremo C-terminal, región que menos afecta para la unión a interfases así como para la agregación de la proteína. El plásmido con el gen de α S mutado (α S N122C), su purificación y etiquetado con Alexa Fluor 488 (AF488) fue previamente realizado por otro miembro del grupo de investigación que lo cedió para los experimentos que requirieron α S etiquetada con AF488. El protocolo de expresión y purificación del mutante N122C de α S es idéntico en todos los pasos al protocolo de purificación de la proteína silvestre, excepto en que en las disoluciones de tampón se añade agente reductor (DTT a 10 mM) para evitar la formación de puentes disulfuro entre moléculas de proteína a través de la cisteína presente en esta variante de la proteína.

Formación de coacervados de poli-L-lisina y poli-D/L-ácido glutámico.

Para la generación *in vitro* de coacervados de poli-L-lisina (pLK) y poli-D/L-ácido glutámico (poli-R-ácido glutámico o pRE) se siguieron los protocolos explicados en un artículo científico recientemente publicado (29). Posteriormente en el trabajo nos referiremos a estos componentes por sus acrónimos pLK y pRE. Los polianiones y policationes empleados fueron comprados como polvo sólido a la empresa *Alamanda Polymers Inc.* (Huntsville, Alabama, USA). Estudios previos demostraron que para asegurar la formación de coacervados, uno de los dos componentes (o ambos) debían estar en mezcla racémica L/D (35).

Se prepararon soluciones stock de 10 mM de cada polipéptido en 1 ml de agua MiliQ a pH=7,00. La solución stock se distribuyó en fracciones de 50 μ l y se guardaron a 4°C en la cámara fría. A partir de las soluciones stock, los coacervados se prepararon a una concentración final de 0,5 mM de pLK y 0,5 mM de pRE, añadiendo siempre en primer lugar el polipéptido de carga negativa. El pH final de la solución se vigiló que siempre estuviese lo más cercano a 7,00 posible. Para los estudios con α S, el tampón en el que se generaron los coacervados fue HEPES 20 mM, pH 7.00, tras comprobarse que el tampón no afecta a la formación de coacervados (*Figura 9*). La formación de coacervados en las publicaciones de referencia se había reportado en agua. La elección de este tampón radica en que es un tampón sin cargas ni fosfatos que puedan interaccionar con los coacervados y que tampona a pH neutro.

Formación de coacervados de poli-U y espermina.

Para la generación *in vitro* de coacervados de poli-U y espermina se siguieron los protocolos explicados en un artículo científico recientemente publicado (31). Los distintos reactivos empleados fueron comprados como polvo sólido a la empresa farmacéutica *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania). Se preparó una solución stock de 10 % (w/w) de poli-U en agua libre de nucleasas (StemCell Technologies™, Vancouver, BC, Canadá), teniendo cuidado en su elaboración de evitar la degradación por RNAsas ambientales. Para ello se limpió el material empleado con NaOH 0.1M y se emplearon puntas con filtro libres de RNAsas. El stock de espermina se preparó al 10 % (w/w) en agua Milli-Q. A partir de las soluciones stock, los coacervados se prepararon a una concentración final de 0,5 % (w/w) de espermina (aprox. 16-22 mM) y 0,05 % (w/w) de poli-U (aprox. 0,5-0,6 μ M), con una concentración final de 1 mM de MgCl₂ y 5 mM de tampón HEPES pH 7,0

Análisis de los coacervados por turbidimetría.

Las muestras de coacervados generadas se compararon con muestras control (blancos) por turbidimetría. La turbidimetría es la técnica analítica que determina cuanto se atenúa un haz de luz de cierta longitud de onda al pasar a través de una suspensión líquida debido a la dispersión de luz provocada por las partículas presentes en la suspensión, las cuales dispersarán más luz cuanto más grandes sean siempre que la longitud de onda de la luz sea mayor o igual al tamaño de las partículas. Por tanto, muestras con coacervados en torno a 1 μ m (tamaño estándar de coacervados al poco tiempo de generarse) dispersarán la luz cuando ésta tiene una longitud de onda similar al tamaño de las partículas (ca. 500 nm) mucho más que las soluciones sin coacervados. Esta técnica, por tanto, nos permite caracterizar la formación de coacervados (29,31). La dispersión de luz se cuantificó en un lector de placas SPECTROstar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) a través de medidas de absorbancia a 550 nm por triplicado para tanto las muestras como para los blancos.

Análisis de los coacervados por microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC).

Los coacervados fueron evaluados en un microscopio óptico y por microscopía diferencial de contraste de interferencia (differential interference contrast microscopy o sus siglas en inglés DIC) en un microscopio Leica DMI 6000B (Leica Microsystems AF, Wetzlar, Alemania). Mediante microscopía de campo ancho (*widefield*) podemos aumentar el contraste en muestras no teñidas y transparentes, obteniéndose imágenes con cierta apariencia en tres dimensiones. En comparación con la técnica de contraste de fases convencional, la cual se basa en cambios en la longitud del camino óptico, la microscopía de DIC está basada en el gradiente de la longitud del camino óptico. Los gradientes repentinos producen el alto contraste y el efecto de relieve 3-D que es característico del DIC. Para ello se usó una lámpara de luz blanca Leica. Se evaluó la presencia de coacervados y su morfología en los dos tipos de sistemas estudiados tanto en placas de 96 pocillos de plástico como sobre portaobjetos de vidrio, para comprobar si había alguna diferencia en función del material. Las imágenes se tomaron a 40 aumentos y con el objetivo con una apertura numérica de 0,6.

Los coacervados de poli-U y espermina, al ser dependientes de temperatura, se manejaron en una cámara de cristal de condiciones regulables acoplada al microscopio. Las imágenes se tomaron a una temperatura de 35°C para estos coacervados.

Microscopía de fluorescencia.

Los estudios de partición de α S en los dos sistemas de coacervados se realizaron en placas *non-binding* de 96 pocillos Greiner bio-one (Kremsmünster, Austria) en un volumen de 150 μ l al que se añadió 1 μ M de α S N122C marcada con AF488 e inmediatamente después 10 μ M de α S sin marcar. Tras mezclar suavemente por pipeteo, se estudió la partición de α S entre las dos fases en los dos sistemas de coacervados mediante microscopía de fluorescencia utilizando el mismo microscopio empleado para la microscopía de DIC. Se utilizó el filtro de excitación *Bandpass 470/40* dicróico 500, y el filtro de emisión *Bandpass 525/50* para evaluar la AF488- α S marcada en la posición 122. La lámpara de fluorescencia empleada fue una lámpara de haluro Lumen 200 Pro de Prior. De esta manera incidimos sobre la muestra luz en la longitud de onda que provoca la excitación de la proteína GFP (489 nm) y observamos la emisión de esa fluorescencia con un filtro barrera que sólo deja pasar la luz con la longitud de onda asociada a esa emisión (509 nm).

Se tomaron imágenes a 100 μ m y a 300 μ m del fondo de pocillo a 40 aumentos. Los coacervados de poli-U y espermina, al ser dependientes de temperatura, se manejaron en una cámara de condiciones regulables acoplada al microscopio. Las imágenes se tomaron a una temperatura de 35 °C para estos coacervados. Los coacervados de pLK y pRE se manipularon a temperatura ambiente de en torno a unos 22 °C. Las imágenes se tomaron con un tiempo de exposición de entre 50 y 200 ms, buscando el contraste óptimo. Posteriormente se corrigió el contraste con el software libre de procesamiento digital de imagen *ImageJ*.

Resultados:

Purificación.

El protocolo de purificación de α S ha sido optimizado con anterioridad y se realiza de manera regular y estandarizada en el grupo de trabajo. Por ello no se realizó un seguimiento exhaustivo del rendimiento de la purificación en los diferentes pasos mediante por ejemplo electroforesis. Como comprobación del proceso de purificación, se analizaron los cromatogramas obtenidos de los pasos de cromatografía de intercambio aniónico (*Figura 6*) y de exclusión molecular (*Figura 7*). En estos cromatogramas se observa la absorbancia a 280 nm de la solución que eluye de la columna a tiempo real (línea azul). Como se puede ver en la *Figura 6*, en la columna de intercambio aniónico, la señal de absorbancia aumentó ligeramente al pasar de 0 a 7.5 % de solución B (línea rosa), que se corresponde con la elución de una pequeña cantidad de otras proteínas contaminantes. La α S eluyó al pasar un 20 % de buffer B, junto con otras posibles proteínas con una carga neta negativa similar que pudieran quedar tras los pasos anteriores de purificación. En nuestro caso, debido a los pasos previos de precipitación, la α S se encuentra ya en un grado de pureza muy alto en este punto del proceso de purificación. El pico intenso de absorbancia que apareció al lavar la columna con 100 % de buffer B se corresponde principalmente con restos de ADN que no precipitaron en el paso anterior de precipitación con estreptomycin, así como otros posibles contaminantes proteicos que presenten mayor carga neta negativa que la α -sinucleína al pH de trabajo.

Con el fin de obtener fracciones puras en la especie monomérica de α S y eliminar posibles formas oligoméricas, así como fragmentos de la proteína que se generan normalmente durante el proceso de sobreexpresión y purificación, se realizó un último paso de cromatografía de exclusión molecular. Como se puede ver en la *Figura 7*, el cromatograma obtenido muestra un pico principal que aparece aproximadamente tras eluir 140 ml después de la inyección de muestra que corresponde a la fracción monomérica de α S pura, mientras que la fracción de oligómeros aparece a los 115 ml y la fracción de fragmentos de proteína a los 160-190 ml.

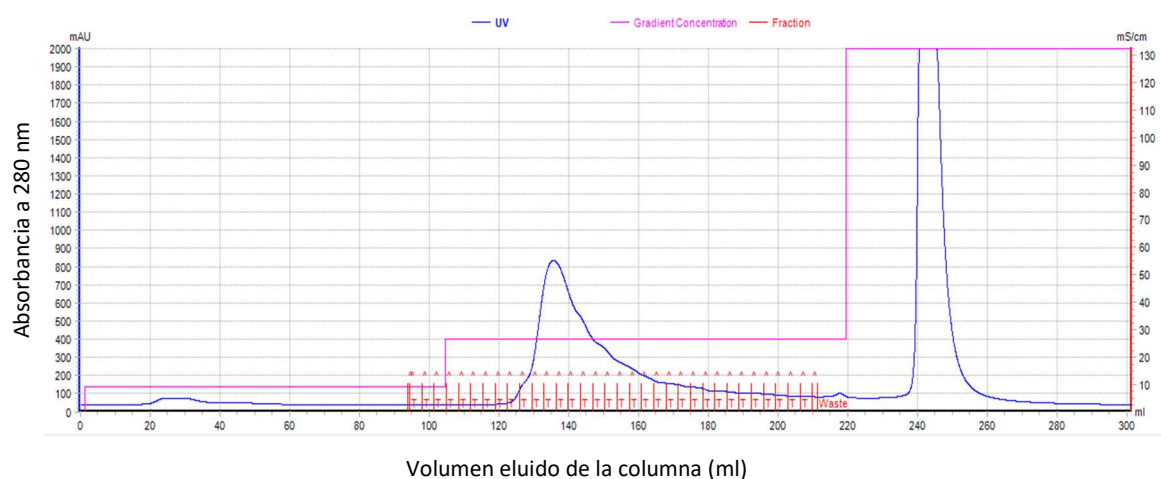


Figura 6. Cromatograma de la columna aniónica de la purificación de α S WT. Las marcas rojas indican las fracciones que se recogieron. La línea rosa indica el gradiente de concentración salina empleado expresado en tanto por ciento de la fracción de solución B utilizada en cada paso. La línea azul corresponde a la absorbancia en el UV (280nm) de la solución a la salida de la columna. El pico de absorbancia observado al añadir 20 % de buffer B corresponde a la elución de la α -sinucleína.

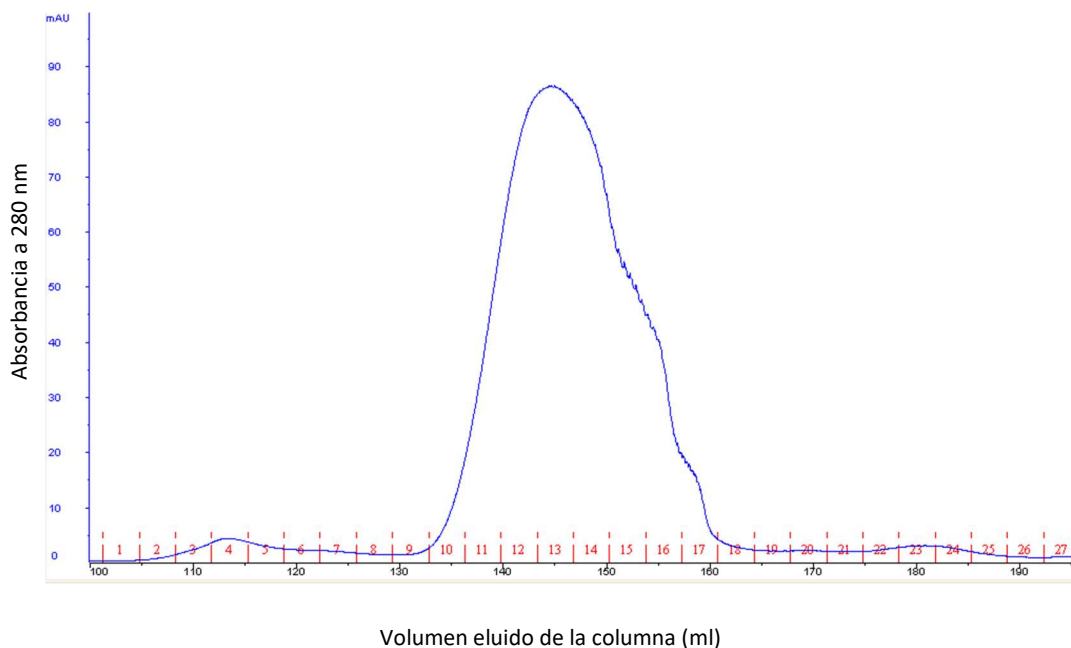


Figura 7. Cromatograma de la columna de exclusión molecular de la purificación de α -sinucleína WT. Las marcas rojas indican las fracciones que se recogieron. El pico de absorbancia a 145 ml de eluido corresponde a la sinucleína monomérica que nos interesa. A 115 ml aparecen oligómeros y a 180 ml fragmentos de sinucleína. De esta manera, las fracciones correspondientes a la proteína monomérica pura fueron recogidas.

Un análisis por geles de poliacrilamida nos permitió saber que las fracciones recogidas para el pico principal contenían α S pura. Estas fracciones se concentraron empleando centricones en ciclos de centrifugación a 4.000 rpm en un rotor SX4400 para la centrífuga Allegra X-15R Beckman Coulter (Brea, California, Estados Unidos). Se evaluó la concentración de proteína en un espectrofotómetro NanoDrop™One Serie DS-11 (DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU) midiendo la absorbancia a 275 nm y conociendo el coeficiente de extinción molar de la proteína a esa longitud de onda ($5.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La solución de proteína monomérica pura se repartió en alícuotas de 0,5 ml, que se guardaron a -80°C hasta su uso. Se logró purificar una cantidad de aproximadamente 150 miligramos de α S WT pura de 8 litros de cultivo.

Formación y estabilidad de los coacervados de pLK/pRE en función de diversos parámetros físico-químicos.

Los coacervados de pLK y pRE se realizaron siguiendo el trabajo de McCall *et al* (29). En este artículo habían estudiado estos coacervados en distintas concentraciones salinas (entre 0 M y 1,5 M de NaCl) en agua Milli-Q a pH 7,0. Cabe destacar que, en nuestro caso, como se esperaba, los coacervados de pLK y pRE, tras mezclarse por pipeteo, mostraron inmediatamente turbidez a simple vista en las condiciones en las que había un 0,1M de NaCl. Por tanto, hemos sido capaces de reproducir las condiciones de partida necesarias para la formación y por tanto uso de coacervados de pLK/pRE.

Lo primero que comprobamos fue si los coacervados se comportan del mismo modo en agua Milli-Q y en tampón HEPES 20 mM, pH 7,0, ya que éste es el tampón en el que estudiaremos el comportamiento de α S. Se observó que los coacervados mantienen la misma morfología y niveles de turbidez (medida a 550 nm) independientemente de si se emplea tampón HEPES 20 mM o agua Milli-Q, ambos a pH 7,0. (Figura 9). Este resultado permitía, por tanto, utilizar el tampón HEPES 20 mM, pH 7,0 como tampón adecuado de estudio. Del mismo modo, se

comprobó por imágenes de DIC que la morfología y comportamiento de los coacervados era similar tanto en placas de 96 pocillos de plástico como sobre un portaobjetos de vidrio. Este control es importante, ya que, en nuestras manos, el material y la forma del contenedor es un factor relevante en algunos sistemas de formación de coacervados, sugiriendo que, en algunos sistemas de coacervados, ciertas interfases juegan un papel importante. En base a la observación sobre la independencia del sistema pLK/pRE del contenedor de la solución, se decidió realizar todos los estudios de fluorescencia en placas de 96 pocillos.

Posteriormente, se estudió la dependencia de la formación de estos coacervados con la temperatura, usando medidas por triplicado de turbidimetría en el lector de placas a temperaturas crecientes. Se demostró que estos coacervados mantienen estables sus niveles de turbidez entre los 20 °C y los 40 °C, notándose un ligero descenso de esta turbidez conforme subimos la temperatura a partir de 40 °C (Figura 8). Esta independencia de la temperatura de los coacervados de pLK y pRE *in vitro* nos permite trabajar a temperatura ambiente en posteriores experimentos. Aunque trabajemos a temperatura ambiente, los coacervados serán similares a los que se generarían a 37 °C, y por tanto más similares de los posibles coacervados fisiológicos a los que queremos emular *in vitro*.

Los coacervados se analizaron por microscopía DIC para evaluar su morfología y comportamiento (Figura 9). La morfología es esferoide con un diámetro de entre 2 y 5 μm . La mayor parte de coacervados se concentran de manera casi estática a, aproximadamente, 100 μm del fondo del pocillo, sin encontrarse coacervados por debajo de este nivel. Por encima de este nivel los coacervados aparecen en un movimiento browniano y en mucha menor concentración. Este comportamiento no aparecía descrito en las publicaciones científicas previas relativas a estos coacervados (29). Podría deberse a que los coacervados son más densos que la otra fase más diluida, por lo que pasado un tiempo tienden a depositarse en el fondo del contenedor por efectos de gravedad y ralentizar allí su movimiento debido a un incremento de la viscosidad en ese punto de la solución. La explicación de por qué se acumulan a 100 μm y no en la base del pocillo no está clara.

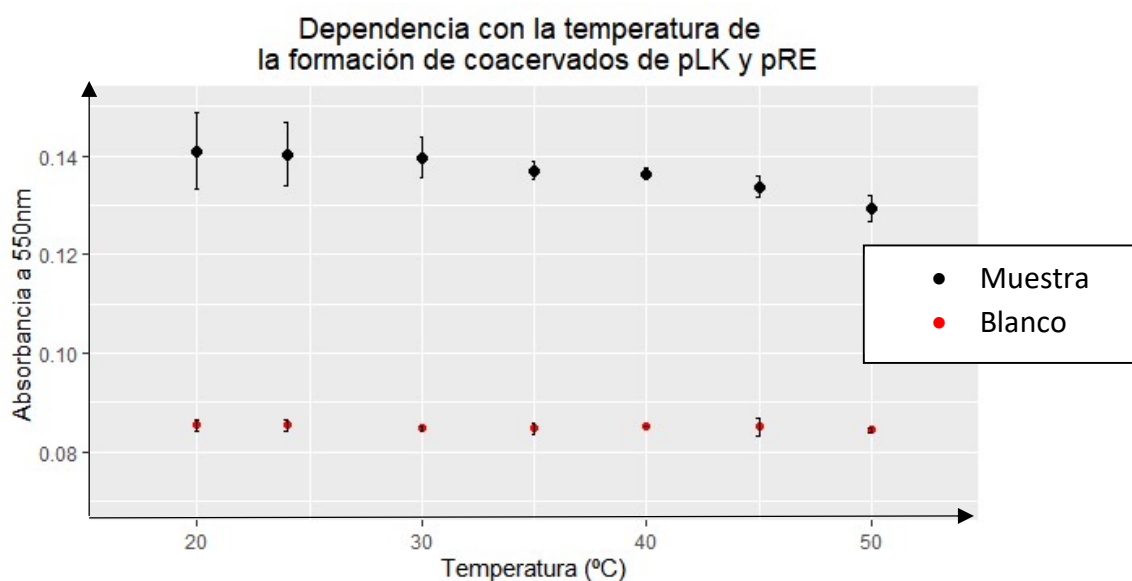


Figura 8. Dependencia de la temperatura en la formación de coacervados de pLK y pRE (0,5 mM de cada polipéptido) en buffer HEPES 20 mM pH 7,0, 0,1 M NaCl.

Por otro lado, se estudió el efecto de la fuerza iónica en la formación de los coacervados mediante microscopía DIC (Figura 9). La formación de los coacervados está relacionada con la salinidad de la solución. En soluciones con nula concentración salina y en soluciones con una salinidad alta (1,5 M NaCl) no encontramos coacervados, mientras que a concentraciones de NaCl de 0,1 M la separación de fases promovida por el sistema pLK/pRE se ve muy favorecida.

Partición de α S en los coacervados de pLK/pRE

Con el fin de estudiar la posible partición de α S a estos coacervados, se añadió proteína marcada con el fluoróforo Alexa Fluor™ 488 en la posición 122, en una concentración 1 μ M en la solución de coacervados pLK/pRE en HEPES 20 mM pH 7,0, 0,1 M NaCl. Inmediatamente después se añadieron 9 μ M de proteína sin marcar, ya que ciertos procesos de separación de fases y partición pueden requerir una cantidad mínima de proteína presente; se escogió 10 μ M de concentración total de α S en base a otros estudios anteriores sobre la partición de moléculas cliente en diferentes sistemas de coacervados. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (en torno a 20 °C), para asegurarnos que la proteína tiene tiempo para particionar en los coacervados, tomamos imágenes a 40 aumentos utilizando microscopía DIC y de fluorescencia (Figura 10). Las imágenes se tomaron a 100 micras y a 300 micras del fondo del pocillo, observándose que la intensidad de fluorescencia estaba concentrada en el interior de los coacervados y por tanto indicando que α S se incorpora preferentemente en el microambiente generado por los coacervados del sistema pLK/pRE.

Se observó que añadir 10 μ M de α S sin marcar mejora la partición de la proteína marcada en los coacervados. Probablemente al aumentar la cantidad de proteína se acelera el proceso de partición de α S. Para corroborar los resultados observados en el microscopio de campo ancho (*widefield*) LeicaAF, se decidió probar a obtener imágenes de fluorescencia de los coacervados y la partición de α S en un microscopio confocal con un *background* de fluorescencia prácticamente despreciable. Las imágenes de fluorescencia que obtuvimos anteriormente con el microscopio LeicaAF (Figura 10) muestran mucha fluorescencia en el *background* debido a que es un microscopio de campo ancho, aunque permite observar la partición de α S en los coacervados.

El microscopio confocal disponible en el BIFI (Instituto Universitario de investigación en Biocomputación y Física de Sistemas complejos), no obstante, no está optimizado para realizar toma de imágenes rápidas, ya que es un equipo especializado para experimentos de espectroscopía de fluorescencia de partícula individual en difusión y no para microscopía confocal, por lo que las imágenes que se tomaron son borrosas, debido a que la velocidad de escaneo de la imagen es demasiado lenta con respecto a la velocidad de difusión de los coacervados, por lo que los coacervados aparecen en la imagen deformados. En todo caso, se observa que la fluorescencia se concentra exclusivamente en ciertas áreas que podemos asignar a coacervados que han difundido durante el tiempo de adquisición de la imagen y, efectivamente, el nivel de fluorescencia y por tanto partición de α S en la fase más acuosa es mucho menor que en los coacervados y del nivel de fluorescencia aparente de la fase más acuosa observada mediante el microscopio de campo ancho. En el futuro se utilizará por tanto microscopía confocal en otro equipo para la cuantificación de la partición de α S en coacervados.

En conclusión, las imágenes obtenidas en ambos microscopios indican que α S se particiona de forma diferente entre los diferentes microambientes generados por LLPS de este sistema y que, de hecho, tiene preferencia por concentrarse en la fase densa, referida como coacervados ricos en pLK/pRE.

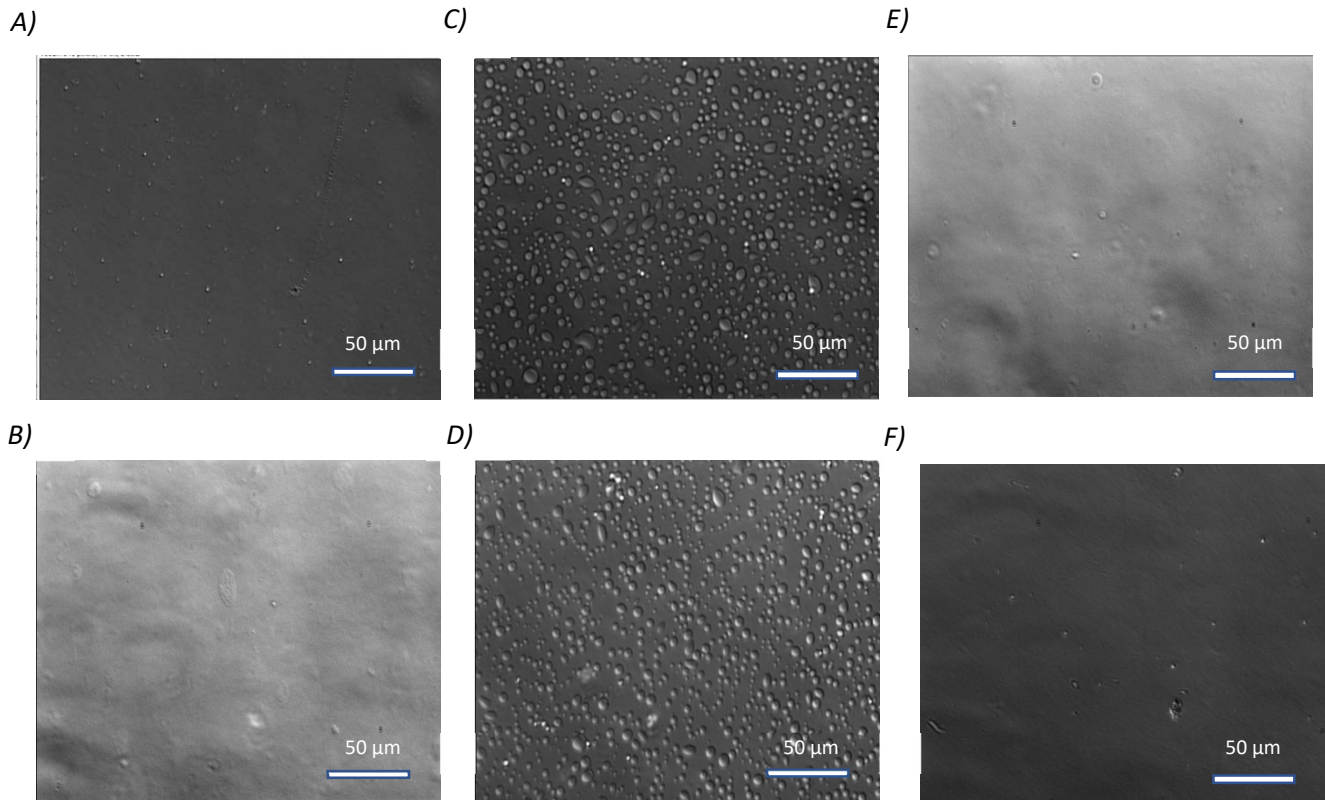


Figura 9. Imágenes de microscopía de DIC de coacervados de pLK 0,5mM y pRE 0,5 mM a 100 μm del fondo de pocillo de una placa de 96 pocillos en función del buffer y fuerza iónica. A) En Milli-Q a 0M NaCl. B) En HEPES 20 mM a 0M NaCl. C) En Milli-Q a 0,1 M NaCl. D) En HEPES 20 mM a 0,1M de NaCl. E) En Milli-Q a 1,5M de NaCl. F) En HEPES 20 mM a 1,5M de NaCl.

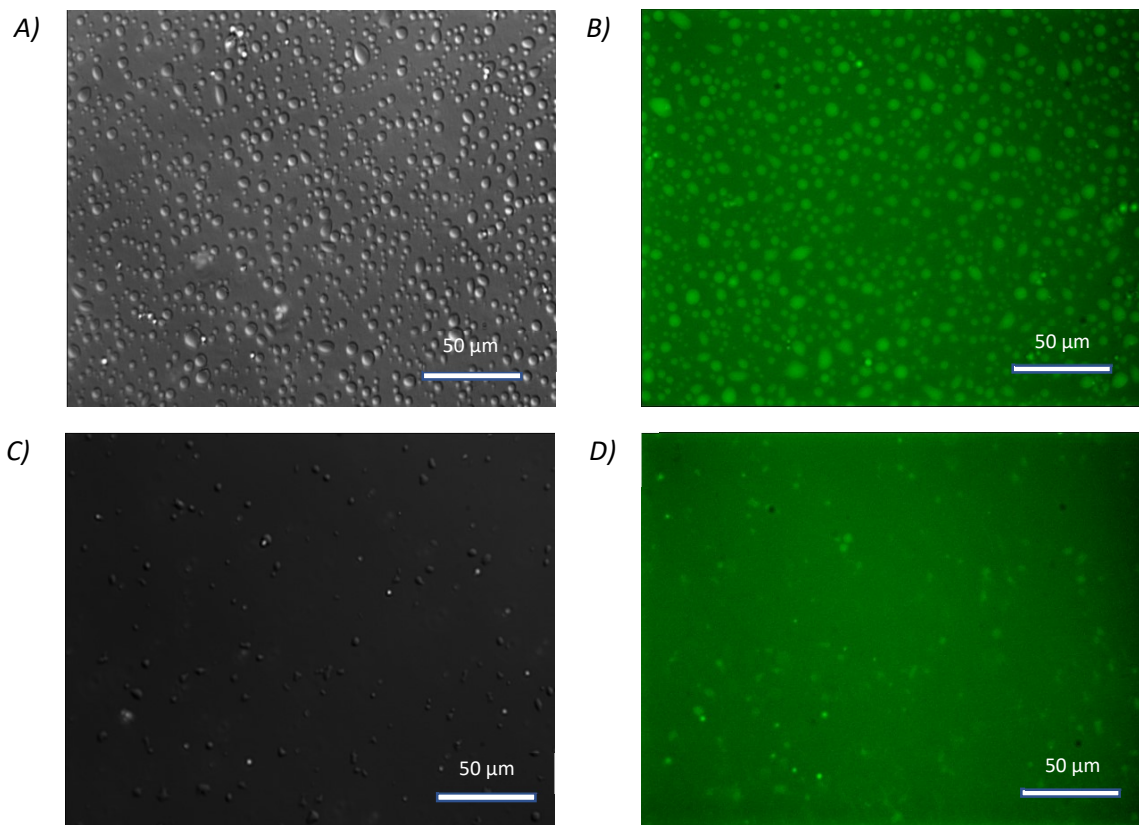


Figura 10. Imágenes pocillo de placa de 96 pocillos de coacervados 0,5mM de pLK y 0,5mM de pRE. A) Imagen DIC a 100 μm de distancia del fondo. B) Imagen de fluorescencia (filtro GFP) a 100 μm de distancia del fondo. C) Imagen DIC a 300 μm de distancia del fondo. D) Imagen de fluorescencia (filtro GFP) a 300 μm de distancia del fondo.

Formación y estabilidad térmica de coacervados de poli-U ARN y espermina.

Los coacervados de poli-U ARN y espermina se prepararon de acuerdo con lo explicado en la sección materiales y métodos. Al mezclar los componentes de los coacervados en un tubo Eppendorf, y tras mezclarse por pipeteo, no aparece turbidez de manera inmediata como ocurría en el caso de los coacervados de pLK y pRE. Sólo si calentamos el Eppendorf con la yema de los dedos, por ejemplo, se aprecia turbidez, ya que la formación de estos coacervados es dependiente de la temperatura, tal y como indica la bibliografía al respecto (31).

Los coacervados se analizaron por turbidimetría tal y como se ha descrito para los coacervados de pLK/pRE a distintas temperaturas para estudiar el efecto de ésta sobre este tipo de coacervados. La dependencia de estos coacervados con la temperatura ya se describe en la bibliografía (31), habiéndose observado que a partir de una temperatura de 27 °C aproximadamente se produce el fenómeno de separación de fases (*Aumiller et Al*) (32). Determinar a qué temperatura los coacervados *in vitro* son estables es necesario para poder trabajar a dicha temperatura en los siguientes estudios de partición de αS . Estas mediciones de turbidimetría corroboran esta primera observación empírica y nos indican que los estudios con αS deberán realizarse en un rango de temperaturas entre los 30 °C y los 37 °C. Se observó que los coacervados se forman a partir de una temperatura umbral a partir de la cual se mantienen estables, con un ligero descenso progresivo de la absorbancia conforme aumentamos la temperatura. (*Figura 11*)

Posteriormente los coacervados se analizaron mediante microscopía DIC para evaluar su morfología (*Figura 12*). Los resultados son muy similares a los observados para los coacervados de pLK y pRE. La morfología es similar (tamaño entre 2 y 5 micras) y la mayor parte de coacervados se concentran de manera casi estática a, aproximadamente, 100 μm del fondo del pocillo. Por encima de este nivel los coacervados aparecen en un movimiento browniano y en mucha menor concentración, hecho que no estaba descrito en los artículos científicos que previamente han trabajado con estos coacervados (31). Como en el caso de los coacervados de pLK/pRE, la explicación de por qué se acumulan a 100 μm de una manera más estática no está clara; podría deberse a que los coacervados son más densos que la otra fase presente, por lo

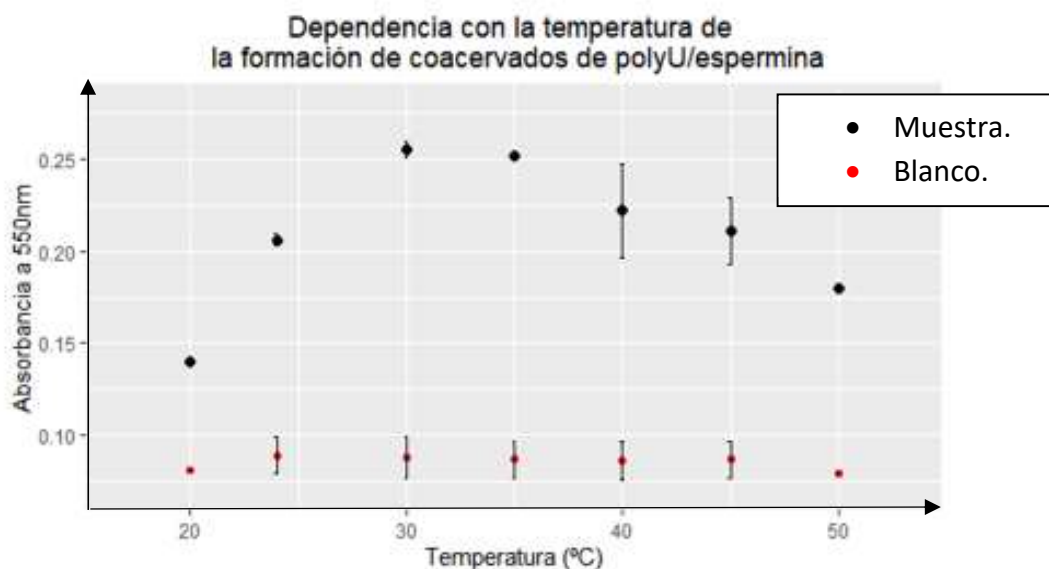


Figura 11. Dependencia de la temperatura en la formación de coacervados de poli-U y espermina en tampón HEPES 20 mM pH 7,0 y 1 mM MgCl₂.

que pasado un tiempo tienden a depositarse, pero no se entiende en este momento por qué lo hacen a una distancia de unos 100 μm del fondo y no en la base del pocillo.

Partición de αS en los coacervados de poli-U/espermina

Al igual que en el caso anterior, se añadieron 10 μM de αS sin marcar inmediatamente después de añadir α -sinucleína marcada para promover la partición de la proteína a los coacervados. Las imágenes fueron tomadas a 35 $^{\circ}\text{C}$ gracias a un montaje en cámara de vidrio del microscopio que permite regular la temperatura y humedad en su interior. Se tomó una imagen un minuto después de añadir la proteína marcada y mezclarla por un suave pipeteo, y otra tras 15 minutos de incubación en reposo, para asegurarnos que la proteína había tenido tiempo para introducirse en los coacervados, tomamos imágenes en el filtro de excitación *Bandpass 470/40* y de emisión *Bandpass 525/50* (Figura 13).

En las imágenes de fluorescencia de campo ancho (Figura 13), se aprecia que la fluorescencia se concentra más en el exterior de los coacervados, i.e., en la fase acuosa de la mezcla de dos fases, y que el proceso de partición es relativamente lento en la escala de tiempos de decenas de minutos, ya que la partición selectiva de αS en la fase acuosa es más evidente a los 15 minutos después de añadir la proteína con respecto a un tiempo de incubación de 1 minuto. Las imágenes se tomaron a 100 μm del fondo del pocillo, ya que es la zona en la que se había comprobado una mayor densidad de coacervados.

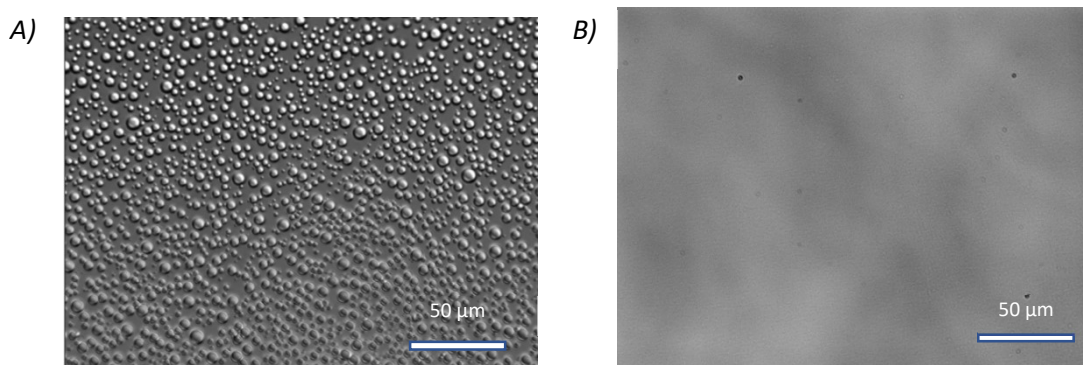


Figura 12. Imágenes de microscopía DIC de coacervados 0,05 %wt poli-U y 0,5 %wt espermina (con objetivo de 40X aumentos). A) Imagen tomada a 100 μm del fondo del pocillo. B) Imagen tomada a 300 μm del fondo del pocillo

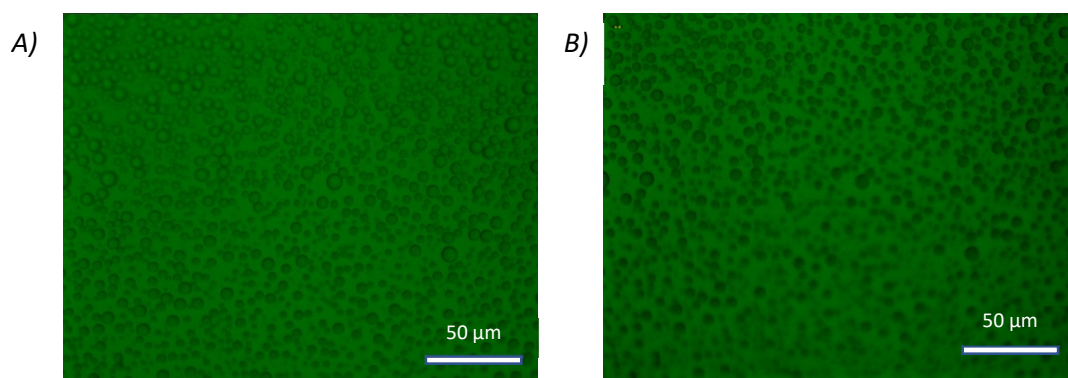


Figura 13. Imagen de microscopía de fluorescencia de coacervados generados al mezclar 0,05 % wt poli-U y 0,5 % wt espermina en HEPES 20 mM, pH 7,0 (filtro GFP, objetivo de 40X aumentos). A) Imagen tomada a 100 μm del fondo del pocillo un minuto después de añadir αS marcada. B) Imagen tomada a 100 μm del fondo del pocillo 15 minutos después de añadir αS marcada.

Discusión de resultados:

Nuestro estudio nos permite establecer que α S se particiona de manera muy distinta dependiendo de las propiedades de las diferentes fases generadas por LLPS en los dos sistemas estudiados. En los coacervados de pLK y pRE se observa que α S se particiona preferentemente y, por tanto, se concentra bien en el interior o en la interfase de estos coacervados (i.e en la fase densa menos acuosa), mientras que para los coacervados de poli-U y espermina, la proteína se concentra en la fase acuosa y es excluida preferentemente del entorno de los coacervados. Para avanzar en estos resultados preliminares y discernir por ejemplo si la proteína se acumula en el interior de los coacervados de pLK/pRE o en su interfase, se ve necesario en futuros estudios el uso de microscopía confocal. No obstante, este estudio preliminar deja claro la diferencia de comportamiento de α S en función del tipo de coacervado formado por separación de fases. Estos comportamientos diferentes podrían explicarse por la distinta composición de los coacervados. Puede influir el espacio interior que quede entre los componentes del coacervado (que depende de la compactación que puedan llegar a tener), pero podría influir también la composición electrostática de los coacervados y de la proteína. Los coacervados de poli-U/espermina presentan en su interior una elevada carga neta negativa que podría influenciar y repeler a la α S que al pH de estudio (pH 7.0) se encuentra cargada negativamente (-9,4 cargas por monómero). Sería relevante estudiar la partición de α S a un pH menor o incluso una variante de α S sin la región C-terminal donde se concentran las cargas negativas de esta proteína.

Posteriores estudios en otros sistemas podrían arrojar luz sobre el comportamiento y tendencia de partición de α S en otros microambientes, como por ejemplo coacervados electrolíticos generados a partir de poli-lisina y ATP (36) o coacervados formados por alginato de sodio (32). Por otra parte, también sería interesante estudiar el comportamiento de α S en coacervados no electrolíticos o formados por proteínas (37). Sin embargo, cabe preguntarnos cuáles son los coacervados más similares a las condiciones fisiológicas y centrar los estudios en ese tipo de coacervados.

Los coacervados *in vivo*, y especialmente en las neuronas (*Figura 14*), están principalmente constituidos por ARN, proteínas (la mayor parte intrínsecamente desordenadas) y pequeñas moléculas electrolíticas (24). No debemos olvidar que todos los comportamientos que observamos *in vitro* deben de ser lo máximo posible correlacionables con lo que puede suceder *in vivo*. En un futuro se podrán plantear estudios en células en cultivo donde se indague sobre la partición de α S en los coacervados en el entorno celular. Entre los coacervados fisiológicos que podrían ser relevantes para la partición preferente de α S y su agregación en células neuronales, los coacervados de p62 son particularmente relevantes, ya que las dos proteínas más abundantes después de α S en los cuerpos de Lewy (característicos de la enfermedad de Párkinson) son ubiquitina y p62 (38,39). Los coacervados de p62 se forman como consecuencia de la interacción de p62 con proteínas poliubiquitinadas y estos coacervados se acumulan como consecuencia de fallos en el sistema de autofagia, sistema comprometido en la enfermedad de Párkinson (40).

Estos coacervados, por tanto, generarían un microambiente bastante neutro, en el que, según nuestros datos preliminares α S podría particionar y concentrarse preferentemente. Otros condensados, generados por interacciones con moléculas de ARN, a priori tendrían una carga neta negativa mayor, tal y como ocurre en los coacervados de poly-U y espermina donde nuestros datos indican que α S se ve preferencialmente excluida. Esta hipótesis se está analizando en la actualidad en el grupo.

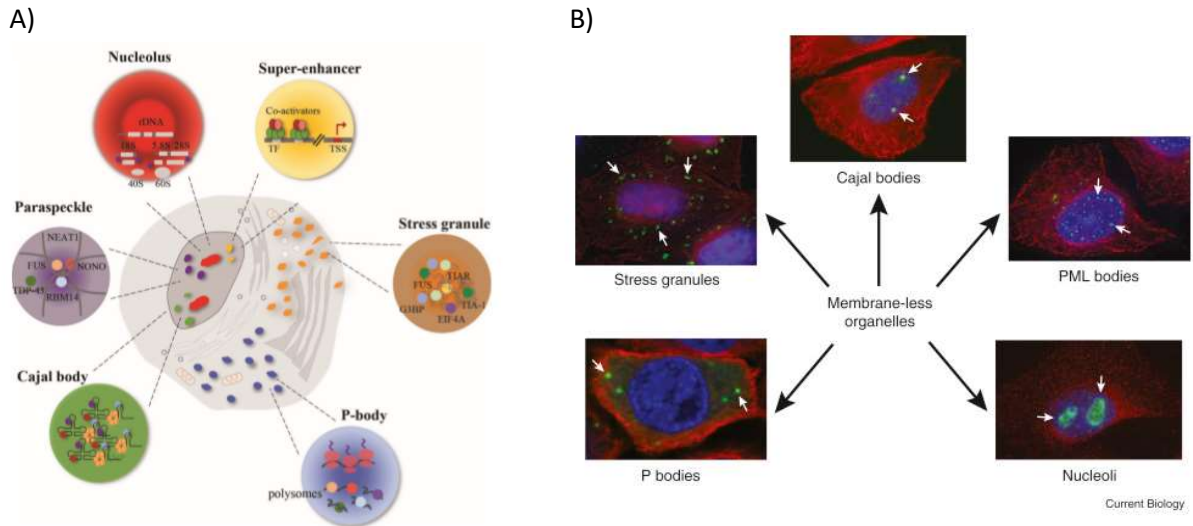


Figura 14. A) Esquema de los principales orgánulos sin membrana descritos y su localización celular. Figura modificada a partir de *Verdile et al.* B) Imágenes de fluorescencia *in vivo* de los mismos orgánulos sin membrana. Figura modificada a partir de *Alberti et al (41)*.

Un último factor interesante que cabe discutir es la posibilidad de que la propia αS fuese capaz de dirigir su propia separación de fases liquido-liquido. En este trabajo hemos estudiado el comportamiento de αS en coacervados ya formados. Sin embargo, sería interesante plantearse si αS por sí sola o mediada por su interacción con otras moléculas es capaz de producir coacervados. Muchas proteínas IDP se han descrito como mediadores en la formación de coacervados (22,41), y mientras se redactaba este trabajo se ha publicado que αS es capaz de promover LLPS por sí sola (34) (Ray S. et al., *Nature Chemistry* 2020), aunque los tiempos requeridos para la formación de los condensados descritos son extremadamente largos para un proceso de LLPS.

El hecho de que αS se particione preferentemente en coacervados como los generados por el sistema pLK/pRE constituye un interesante punto de partida para avanzar en el estudio del uso de coacervados como microambientes especiales que pueden promover procesos de oligomerización y agregación amiloide, en particular en el caso de αS , y que tienen relevancia fisiológica. *In vivo*, αS podría acumularse en este tipo de coacervados/condensados por una desregulación en los mecanismos de su degradación o en el transporte y formación de estos coacervados.

Este acúmulo podría favorecer la agregación de la proteína debido al aumento de la concentración local de proteína, y a las propiedades particulares del entorno de los condensados, como una elevada concentración de cargas y una restricción importante en la hidratación de las moléculas, lo que resultaría en una disminución de las barreras energéticas de nucleación. Con los datos preliminares generados en este estudio, se han establecido unas condiciones idóneas para el estudio de la posible nucleación de αS en agregados amiloides en sistemas de LLPS. Para ello, se podrían utilizar técnicas de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia de molécula única (*single-molecule FRET*, técnica disponible en este grupo de investigación) ya que, si los monómeros de αS nuclea y polimerizan, adquieren una conformación distinta y reducen la distancia entre las moléculas fluorescentes unidas a cada monómero (42,43) (Figura 15), produciendo por tanto una variación en la eficiencia de FRET que podríamos cuantificar. Además, tratándose de una técnica de molécula única, podríamos

potencialmente distinguir entre diferentes estados conformacionales de la proteína que coexistan en los sistemas de coacervados o separación de fases siempre y cuando estos diferentes estados conformacionales posean una diferencia en la distancia entre moléculas fluorescentes suficientemente grande como para dar un buen contraste de FRET.

Un trabajo encontrado en la bibliografía determinó que la actina se particionaba en coacervados de tipo pLK/pRE, pero que se concentraba en la periferia de estos coacervados (29). Del mismo modo, sería interesante discernir si α S se concentra en el interior de los coacervados de pLK/pRE de manera homogénea o si, por el contrario, se concentra en la interfase del coacervado. Un microscopio confocal nos permitirá determinar si dentro de un coacervado la fluorescencia se distribuye en los límites de este o no y del mismo modo mediante las técnicas de FRET mencionadas anteriormente nos permitirían saber si la nucleación y formación de fibras ocurre de manera homogénea en el interior del coacervado o sólo cerca de su interfase, tal y como se ha descrito para la actina (29).

Evaluar la cinética de formación y la estructura de estos agregados amiloides formados en coacervados es vital para posteriores estudios. Debemos saber si los procesos de agregación amiloide que estudiamos *in vitro* se correlacionan con los que ocurren *in vivo*, siendo los coacervados sintéticos un modelo citomimético que puede ser relevante para recrear *in vitro* microambientes celulares relevantes para el estudio de estos procesos.

Demostrando que ciertos coacervados artificiales provocan la partición preferencial de α S en su interior y que en ese caso la nucleación de la proteína en agregados amiloides es un proceso favorable y relativamente rápido, tal y como se ha descrito para otras proteínas (29), podremos plantear la hipótesis de que este proceso pueda ocurrir de una manera similar *in vivo*.

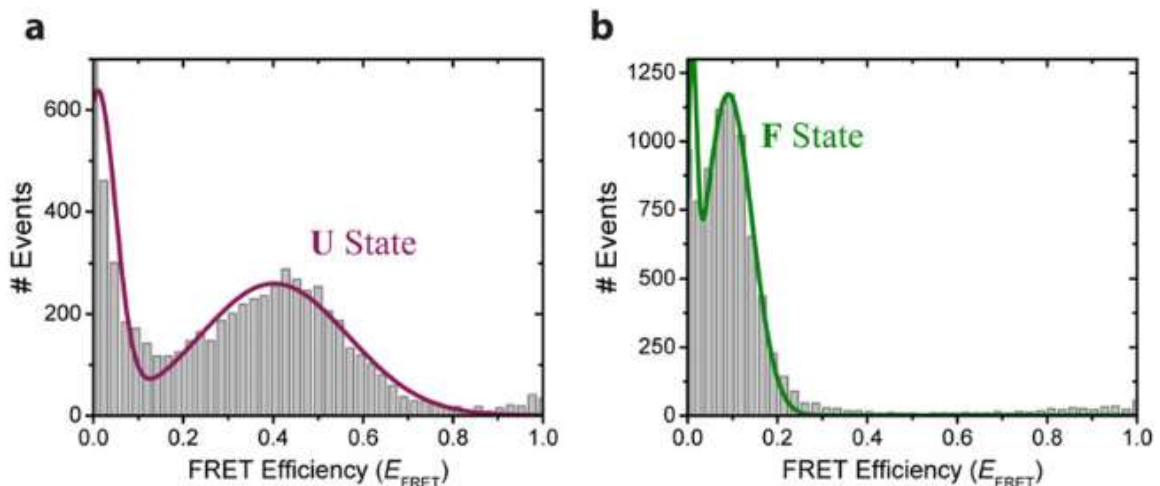


Figura 15. Gráfica de las eficiencias de FRET (E) reportadas para a) monómero de α S, b) α S al oligomerizar. La posición y elección de los fluoróforos es clave para lograr una diferencia en la distribución de E en las distintas conformaciones de la proteína. Figura modificada a partir de Ferreon ACM et al. (43)

Conclusiones:

Este primer estudio del comportamiento de α -sinucleína en coacervados moleculares *in vitro* plantea la siguiente conclusión: α -sinucleína parece particionar en coacervados ya formados de naturaleza electrostática con carga ligeramente negativa y, a la luz de esto, se posibilita el futuro estudio *in vitro* en otros tipos de coacervados o incluso investigar las cinéticas de agregación amiloide en estos entornos moleculares todavía tan poco estudiados.

Conclusions:

This first study about the behavior of α -synuclein in coacervates models *in vitro* allows for the following conclusion: α -synuclein seems to partition in electrostatic coacervates with a mild negative charge and, in the light of this finding, it is possible to continue the research in the future with other types of coacervates or even to investigate the kinetics of amyloid aggregation in these still almost unknown molecular environment.

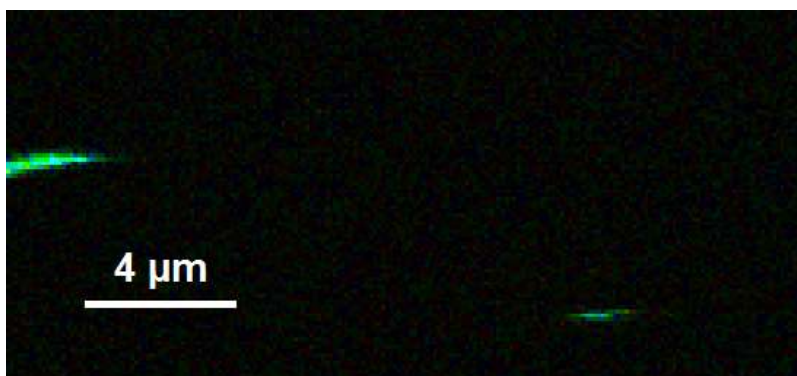
Bibliografía:

1. McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM. α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism & Related Disorders*. enero de 2014;20:S62-7.
2. Cheng F, Vivacqua G, Yu S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. diciembre de 2011;42(4):242-8.
3. Wong YC, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med*. 7 de febrero de 2017;23(2):1-13.
4. Cremades N, Chen SW, Dobson CM. Structural Characteristics of α -Synuclein Oligomers. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;329:79-143.
5. Froula JM, Castellana-Cruz M, Anabtawi NM, Camino JD, Chen SW, Thrasher DR, et al. Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J Biol Chem*. 05 de 2019;294(27):10392-406.
6. Erustes AG, Stefani FY, Terashima JY, Stilhano RS, Monteforte PT, da Silva Pereira GJ, et al. Overexpression of α -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. *J Neurosci Res*. 2018;96(1):160-71.
7. García SS. Estudio de factores genéticos que afectan a casos esporádicos de la Enfermedad de Parkinson. :58.
8. Cliffe R, Sang JC, Kundel F, Finley D, Klenerman D, Ye Y. Filamentous Aggregates Are Fragmented by the Proteasome Holoenzyme. *Cell Reports*. 19 de febrero de 2019;26(8):2140-2149.e3.
9. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. julio de 2019;20(7):421-35.
10. Perissinotto F, Stani C, De Cecco E, Vaccari L, Rondelli V, Posocco P, et al. Iron-mediated interaction of alpha synuclein with lipid raft model membranes. *Nanoscale*. 2020;10.1039.D0NR00287A.
11. Lv Z, Hashemi M, Banerjee S, Zagorski K, Rochet J-C, Lyubchenko YL. Assembly of α -synuclein aggregates on phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. septiembre de 2019;1867(9):802-12.
12. Kisilevsky R, Raimondi S, Bellotti V. Historical and Current Concepts of Fibrillogenesis and In vivo Amyloidogenesis: Implications of Amyloid Tissue Targeting. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2016 [citado 7 de mayo de 2020];3. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2016.00017/full>
13. Moon SP, Balana AT, Galesic A, Rakshit A, Pratt MR. Ubiquitination Can Change the Structure of the α -Synuclein Amyloid Fiber in a Site Selective Fashion. *J Org Chem*. 7 de febrero de 2020;85(3):1548-55.
14. Kroschwald S, Maharana S, Mateju D, Malinowska L, Nüske E, Poser I, et al. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *Elife*. 4 de agosto de 2015;4:e06807.

15. Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoegge C, Gharakhani J, et al. Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science*. 26 de junio de 2009;324(5935):1729-32.
16. Gallo CM, Wang JT, Motegi F, Seydoux G. Cytoplasmic Partitioning of P Granule Components Is Not Required to Specify the Germline in *C. elegans*. *Science*. 17 de diciembre de 2010;330(6011):1685-9.
17. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, et al. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell*. septiembre de 2015;163(1):123-33.
18. Buchan JR, Kolaitis R-M, Taylor JP, Parker R. Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48/VCP Function. *Cell*. junio de 2013;153(7):1461-74.
19. Spector DL. SnapShot: Cellular Bodies. *Cell*. diciembre de 2006;127(5):1071.e1-1071.e2.
20. Dolgin E. What lava lamps and vinaigrette can teach us about cell biology. *Nature*. marzo de 2018;555(7696):300-2.
21. Davis D, Yuan H, Yang Y-M, Liang F-X, Sehgal PB. Interferon- α -induced cytoplasmic MxA structures in hepatoma Huh7 and primary endothelial cells. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018;22(2):86-94.
22. Hyman AA, Weber CA, Jülicher F. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11 de octubre de 2014;30(1):39-58.
23. Rai AK, Chen J-X, Selbach M, Pelkmans L. Kinase-controlled phase transition of membraneless organelles in mitosis. *Nature*. 2018;559(7713):211-6.
24. Ditlev JA, Case LB, Rosen MK. Who's In and Who's Out-Compositional Control of Biomolecular Condensates. *J Mol Biol*. 02 de 2018;430(23):4666-84.
25. Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, et al. Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell*. mayo de 2012;149(4):753-67.
26. Wang JT, Smith J, Chen B-C, Schmidt H, Rasoloson D, Paix A, et al. Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically disordered proteins in *C. elegans*. *eLife*. 23 de diciembre de 2014;3:e04591.
27. Uversky VN. Targeting intrinsically disordered proteins in neurodegenerative and protein dysfunction diseases: another illustration of the D2 concept. *Expert Rev Proteomics*. agosto de 2010;7(4):543-64.
28. Ambadipudi S, Biernat J, Riedel D, Mandelkow E, Zweckstetter M. Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau. *Nat Commun*. 17 de 2017;8(1):275.
29. McCall PM, Srivastava S, Perry SL, Kovar DR, Tirrell MV. Partitioning and Enhanced Self-Assembly of Actin in Polypeptide Coacervates. 2018;23.

30. Lin Y, Protter DSW, Rosen MK, Parker R. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol Cell*. 15 de octubre de 2015;60(2):208-19.
31. Aumiller WM, Pir Cakmak F, Davis BW, Keating CD. RNA-Based Coacervates as a Model for Membraneless Organelles: Formation, Properties, and Interfacial Liposome Assembly. *Langmuir*. 4 de octubre de 2016;32(39):10042-53.
32. Jeong S, Kim B, Lau H-C, Kim A. Gelatin-Alginate Complexes for EGF Encapsulation: Effects of H-Bonding and Electrostatic Interactions. *Pharmaceutics*. 14 de octubre de 2019;11(10).
33. Chenglong W, Shuhan X, Jiayi Y, Wencai G, Guoxiong X, Hongjing D. Dextran-based coacervate nanodroplets as potential gene carriers for efficient cancer therapy. *Carbohydr Polym*. 1 de marzo de 2020;231:115687.
34. Ray S, Singh N, Kumar R, Patel K, Pandey S, Datta D, et al. α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nature Chemistry*. 8 de junio de 2020;1-12.
35. Perry SL, Leon L, Hoffmann KQ, Kade MJ, Priftis D, Black KA, et al. Chirality-selected phase behaviour in ionic polypeptide complexes. *Nat Commun*. mayo de 2015;6(1):6052.
36. Deng N-N, Huck WTS. Microfluidic Formation of Monodisperse Coacervate Organelles in Liposomes. *Angewandte Chemie*. 2017;129(33):9868-72.
37. Schreiber A, Stühn LG, Geissinger SE, Huber MC, Schiller SM. Directed Assembly of Elastin-like Proteins into defined Supramolecular Structures and Cargo Encapsulation In Vitro. *J Vis Exp*. 8 de abril de 2020;(158).
38. Kuusisto E, Parkkinen L, Alafuzoff I. Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J Neuropathol Exp Neurol*. diciembre de 2003;62(12):1241-53.
39. Sun D, Wu R, Zheng J, Li P, Yu L. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Research*. abril de 2018;28(4):405-15.
40. Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The Role of Autophagy in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. abril de 2012 [citado 23 de junio de 2020];2(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312403/>
41. Alberti S. Phase separation in biology. *Current Biology*. 23 de octubre de 2017;27(20):R1097-102.
42. Nath A, Sammalkorpi M, DeWitt DC, Trexler AJ, Elbaum-Garfinkle S, O'Hern CS, et al. The conformational ensembles of α -synuclein and tau: combining single-molecule FRET and simulations. *Biophys J*. 7 de noviembre de 2012;103(9):1940-9.
43. Moosa MM, Ferreon JC, Ferreon ACM. Single-Molecule FRET Detection of Early-Stage Conformations in α -Synuclein Aggregation. *Methods Mol Biol*. 2019;1948:221-33.

Anexo:



Anexo 1. Imagen de fluorescencia del microscopio MicroTime200 de PicoQuant (Berlin, Alemania). La fluorescencia se concentra en unos puntos concretos de forma distinta a los coacervados debido al largo tiempo de adquisición de imagen del microscopio.