



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

## **GRADO EN BIOTECNOLOGÍA** **2020 - 2021**

Estudio de la agregación amiloide de alfa-sinucleína  
por transformación líquido-sólido de gotas de  
proteína generadas por separación de fases

Study of alpha-synuclein amyloid aggregation by the  
liquid-to-solid transition of protein droplets generated  
by phase separation

Autora

**Gema Merino Loma**

Directores

**Nunilo Cremades Casasín**  
**Pablo José Gracia González**



Departamento de  
Bioquímica y Biología  
Molecular y Celular  
**Universidad Zaragoza**



Instituto Universitario de Investigación  
**Biocomputación y Física**  
**de Sistemas Complejos**  
**Universidad Zaragoza**

## **ÍNDICE**

RESUMEN / ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
Agregación amiloide en enfermedades neurodegenerativas .....	4
Alfa-sinucleína y la enfermedad de Parkinson .....	5
Alfa-sinucleína .....	6
Proceso de nucleación y formación de agregados amiloides en alfa-sinucleína.....	7
Separación de fases líquido-líquido (LLPS) .....	7
Transición de líquido a sólido (LSPT).....	8
LLPS mediada por $\alpha$ S.....	9
OBJETIVOS .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE WT- $\alpha$ S Y $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S .....	9
2. ENSAYO CON DISTINTOS AGENTES MACROMOLECULARES.....	10
3. ENSAYO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES WT- $\alpha$ S.....	11
4. ENSAYO CON DISTINTAS SONDAS.....	11
5. ENSAYO CON DISTINTAS VARIANTES $\alpha$ S .....	11
6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CAMPO ANCHO (WF) Y CONTRASTE DIFERENCIAL DE FASES (DIC).....	12
7. TRATAMIENTO DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE DATOS.....	12
RESULTADOS .....	12
1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE WT- $\alpha$ S Y $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S .....	12
2. ANÁLISIS Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA LLPS DE $\alpha$ S.....	13
3. ANÁLISIS CINÉTICO DE LA LLPS DE $\alpha$ S.....	14
4. COMPARATIVA DE LA LLPS DE $\alpha$ S PARA LAS DISTINTAS VARIANTES .....	17
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	19
CONSIDERACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS .....	23
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25
ANEXOS.....	28

## **RESUMEN / ABSTRACT**

La enfermedad de Parkinson está ligada a la agregación amiloide de alfa-sinucleína ( $\alpha$ S) en las neuronas. Cómo se origina este proceso aún no está claro. Actualmente la hipótesis de que la formación de condensados biomoleculares de  $\alpha$ S generados por separación de fases líquido-líquido (LLPS) puede ser un paso previo para la agregación amiloide de la proteína *in vivo*, a través de un proceso de transición de líquido a sólido (LSPT) de los condensados, cobra cada vez más fuerza. Así, recientes investigaciones tratan de reproducir este proceso *in vitro*. En este trabajo estudiamos los factores que afectan a los procesos LLPS y LSPT empleando condiciones de formación de condensados biomoleculares de  $\alpha$ S *in vitro* ya descritas, con el fin de aumentar la comprensión de este proceso y elucidar la implicación de las distintas regiones de  $\alpha$ S en ambos procesos. Nuestros resultados muestran la relevancia del tipo y concentración de agente macromolecular usado para inducir LLPS, de manera que concentraciones mayores de agente macromolecular favorecen LLPS de  $\alpha$ S a concentraciones menores de proteína. Utilizando Alexa Fluor como sonda en una batería de variantes de  $\alpha$ S con diferentes regiones de la proteína eliminadas, nuestros resultados sugieren un papel esencial del dominio C-terminal en la LLPS, probablemente por interacciones con el dominio N-terminal, en contra de lo sugerido en publicaciones anteriores. Por el contrario, el dominio central NAC, dispensable para la LLPS, posee una gran implicación en la LSPT de condensados de  $\alpha$ S formados en las condiciones de estudio. Los resultados presentados no pueden establecer una relación directa entre la LSPT de los condensados de  $\alpha$ S y la agregación amiloide, aunque varias evidencias experimentales, entre ellas el papel del dominio NAC en esta transición, sugieren que es posible que se produzcan procesos de agregación amiloide en el interior de los condensados de  $\alpha$ S.

Parkinson's disease relates to alpha-synuclein's ( $\alpha$ S) amyloid aggregation in neurons. How this process occurs remains unknown. Currently, the hypothesis that suggests that the formation of  $\alpha$ S biomolecular condensates by liquid-liquid phase separation (LLPS) could be a previous step for *in vivo* amyloid aggregation of the protein, through a liquid to solid phase transition (LSPT) process of the condensates, is becoming prevalent. Thus, recent investigations have tried to reproduce this process *in vitro*. In this work, we have studied the factors that affect both LLPS and LSPT processes under the conditions that have been recently described to trigger *in vitro*  $\alpha$ S condensate formation with the aim of increasing our understanding of the  $\alpha$ S-induced LLPS process and elucidate the role of the different regions of the protein in both LLPS and LSPT. As shown by our results, the type of macromolecular crowder used for inducing LLPS and its concentration are relevant parameters for visualising LLPS *in vitro*: higher crowder concentrations boost  $\alpha$ S LLPS at lower protein concentrations. By using Alexa Fluor as a fluorescence probe on a set of  $\alpha$ S truncated variants, we have observed that the C-terminal domain of the protein is essential for LLPS at the conditions tested, likely through interactions with the N-terminal domain. This finding differs from the theories developed in previous publications. On the contrary, the NAC central domain, which we have found that is dispensable for LLPS, has a relevant implication on the LSPT process of  $\alpha$ S condensates. We cannot establish a direct relation between the LSPT of  $\alpha$ S condensates and amyloid aggregation within the condensates, although, considering a number of experimental evidences obtain in our study, including the role of NAC domain

in this transition, we suggest that amyloid aggregation processes could take place inside  $\alpha$ S condensates.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Agregación amiloide en enfermedades neurodegenerativas**

Durante las dos últimas décadas han aumentado de forma notable las investigaciones sobre proteínas amiloides debido a su relevancia en diversas patologías humanas como la diabetes tipo II o las enfermedades neurodegenerativas. Además, se han encontrado amiloides funcionales con roles relevantes en la liberación de hormonas y la pigmentación (1,2). Se conocen más de 50 enfermedades neurodegenerativas entre las que destacan Alzheimer (EA), Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y Huntington (EH). Estas patologías poseen mecanismos moleculares similares por los cuales, de forma general, una proteína monomérica soluble, distinta para cada enfermedad, sufre un proceso de malplegamiento que le lleva a autoensamblarse en fibras amiloides y acumularse en el sistema nervioso central, generando disfuncionalidad sináptica, apoptosis neuronal, daño cerebral y neurodegeneración (3–5). Por tanto, la agregación amiloide es considerada como un proceso central en el desarrollo de este tipo de enfermedades neurodegenerativas.

Las proteínas conocidas que generan estos agregados no tienen similitudes evidentes en lo que respecta a sus funciones, estructura o secuencia y todavía se desconocen las causas por las que estas proteínas comienzan a autoensamblarse en el entorno celular. Gracias al estudio de estos procesos *in vitro*, en tubos de ensayo, se ha determinado que, en ciertas condiciones, diferentes para cada proteína, moléculas de proteína monomérica comienzan a interactuar y autoensamblarse primero en oligómeros que mantienen la estructura inicial del monómero de proteína, para luego ir adquiriendo estructura en lámina- $\beta$  y formar agregados muy ordenados de proteína. Estos agregados se definen por poseer una morfología fibrilar, ser altamente estables y presentar una estructura rica en lámina- $\beta$  característica, denominada estructura en lámina- $\beta$  cruzada. Además, estos agregados se tiñen con congo rojo y unen sondas fluorescentes tipo tioflavina con elevada afinidad, con el consiguiente aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia de estas moléculas. La molécula fluorescente más utilizada es la tioflavina T (ThT) que es usada para identificar agregados amiloides de proteínas y seguir sus cinéticas de formación (2).

Los agregados amiloides son termodinámicamente muy estables, incluso más que la conformación nativa de las proteínas. Su formación se rige por una variación de entalpía de activación desfavorable y una de entropía favorable que están relacionadas con la rotura de las interacciones entre la proteína y el agua y la exposición de residuos hidrofóbicos (6). Las fibras amiloides generalmente poseen un diámetro entre 7-13 nm, una largura en el rango de  $\mu$ m, no presentan ramificaciones y están formadas por protofilamentos enrollados entre sí. Estos protofilamentos están compuestos por protómeros de proteínas plegadas en hebras- $\beta$  que se disponen de forma perpendicular al eje central de la fibra e interactúan entre sí (interacciones intermoleculares) generando láminas- $\beta$  que corren a lo largo del eje de la fibra (2,3,5).

Existe controversia sobre qué especies generadas en el proceso de agregación amiloide de proteínas involucradas en enfermedad son tóxicas. Aunque en un inicio se pensó que los agregados fibrilares eran los más tóxicos, actualmente se cree que son las especies oligoméricas intermedias, aunque las especies fibrilares de pequeño tamaño parece que juegan un papel clave en la transmisión de neurodegeneración por el cerebro (1–5). Debido a que no se sabe con seguridad que especies son las más tóxicas, a la hora de prevenir la agregación amiloide se prefiere impedir que comience o eliminar las primeras especies generadas para no acumular especies intermedias patogénicas. Algunos mecanismos que previenen la agregación son las chaperonas. Otros que por el contrario favorecen la agregación son el aumento del estrés oxidativo y la disminución de los mecanismos que eliminan proteínas mal plegadas, ambos fenómenos que suceden con el envejecimiento (2,5).

### **Alfa-sinucleína y la enfermedad de Parkinson**

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la EA. No suele afectar a individuos menores de 50 años e incrementa su incidencia con la edad, siendo el máximo entre 85-89. Afecta a más hombres que mujeres y la mayoría de los casos son idiopáticos. Solo un 5% de ellos se denominan Parkinson familiar y son debidos a mutaciones genéticas heredadas en diversos genes, entre ellos el gen SNCA que codifica la proteína alfa-sinucleína ( $\alpha$ S). Además, estos casos se detectan a edades más tempranas que los esporádicos (7–9). Actualmente hay más de 6 millones de personas en el mundo con esta patología y se prevé que siga aumentando debido al envejecimiento de la población y la exposición ambiental asociada a la industrialización (8–10). El diagnóstico actualmente para esta enfermedad se basa en la combinación de manifestaciones clínicas y una respuesta favorable y mantenida a la L-DOPA. Los síntomas y signos más comunes son los motores, como rigidez, temblor, inestabilidad en la postura y bradiquinesia; y los no motores, como pérdida del olfato, trastornos del sueño, estreñimiento, depresión, ansiedad, apatía y deterioro cognitivo (9).

A nivel celular se observa una gran pérdida de las neuronas, en gran parte dopaminérgicas, de la sustancia negra, así como la presencia de cuerpos de Lewy (CL), principal característica de la enfermedad. Los CL son inclusiones esféricas citoplasmáticas sin membrana de diversos agregados proteicos cuyo principal componente es  $\alpha$ S en forma de agregados y fibras amiloides (8,11,12). Se desconocen las causas por las que  $\alpha$ S comienza la agregación en las neuronas y genera los CL. Se ha propuesto que este proceso podría verse afectado por condiciones de estrés en las neuronas, en parte asociadas al envejecimiento, así como localizaciones anómalas de la proteína en las neuronas y posibles alteraciones en sus modificaciones postraduccionales (PTMs). El resultado es la generación de especies agregadas tóxicas que conducen a la neurodegeneración mediante la disrupción de las funciones celulares como la disfuncionalidad sináptica y mitocondrial. Además de la EP el malplegamiento y la agregación de  $\alpha$ S están también implicadas en otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia con cuerpos de Lewy, demencia asociada al Parkinson, atrofia sistémica múltiple y de manera secundaria en EA. A estas enfermedades se les denomina colectivamente sinucleinopatías (12,13).

## Alfa-sinucleína

$\alpha$ S pertenece a la familia de las sinucleínas junto con beta-sinucleína ( $\beta$ S) y gamma-sinucleína ( $\gamma$ S). Es una proteína pequeña intrínsecamente desordenada de 14kDa (140 aa) y con una carga negativa neta a pH fisiológico (pI 4.36) (14). Está compuesta por 3 dominios. El N-terminal (residuos 1-60) cargado positivamente, presenta 4 repeticiones imperfectas de 11 aa, KTKEGV, similares a las de las apolipoproteínas. Es capaz de adquirir una estructura secundaria de hélice- $\alpha$  anfipática al interactuar con membranas lipídicas. Mutaciones en esta región están relacionadas con casos de Parkinson hereditario. El dominio central (residuos 61-95) se ha denominado históricamente NAC (non-amyloid component) y se le ha asignado como la región esencial para la formación de fibras amiloides, particularmente la región comprendida entre los residuos 71-82. Esta región es altamente hidrofóbica y está ausente en  $\beta$ S. Además, es capaz también de adquirir estructura en hélice al interactuar con membranas lipídicas, ya que posee otras 3 repeticiones KTKEGV. Por último, el dominio C-terminal (residuos 96-140) está cargado negativamente y se mantiene intrínsecamente desordenado en todas las estructuras reportadas para esta proteína. Es homólogo a las proteínas de choque térmico lo cual sugiere una posible función en la degradación de proteínas y su malplegamiento (14–16). Debido a que es una IDP,  $\alpha$ S no posee una estructura rígida y única, sino que muestra una alta plasticidad conformacional y dependiendo del ambiente adopta una conformación u otra. Se le ha denominado proteína camaleón por la gran versatilidad de conformaciones que es capaz de adoptar. Se puede encontrar extendida, en conformación de ovillo estadístico (random coil), o parcialmente plegada (pro-molten globule), o en estructura rica en hélice- $\alpha$  cuando se encuentra unida a membranas lipídicas o en conformación rica en lámina- $\beta$  como oligómeros y fibras amiloides (17).

$\alpha$ S es muy abundante en el cerebro, donde principalmente se encuentra en los terminales presinápticos de las neuronas y las células gliales, aunque se expresa en otras regiones del cuerpo. Generalmente se le considera una proteína citosólica, aunque también se puede encontrar en el núcleo, unida a diversas membranas o formando cuerpos de Lewy (18). Está codificada por el gen SNCA que por splicing alternativo da 17 transcritos codificantes distintos. Destacan las isoformas de 112, 126 y 140 aa, siendo esta última la principal. Se conocen 135 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) relacionados con la EP, las más estudiadas A30P, A53T, E46K y H50Q. Además, se han detectado 360 variaciones estructurales como inversiones, variaciones en el número de copias y deleciones en el gen. A su vez,  $\alpha$ S puede pasar por más de 300 PTMs como proteólisis, fosforilación, lipidación, oxidación, acilación, nitrogenación y ubiquitinación. Así los diferentes splicing varían el ratio de las isoformas y esto junto con las PTMs parecen influir en su capacidad de agregación y toxicidad (19,20).

Sus funciones fisiológicas siguen sin estar del todo claras. En forma monomérica es relevante en la regulación del movimiento de las vesículas sinápticas y en la liberación de neurotransmisores y regula la concentración de dopamina al asociarse con DAT1 y modular su actividad. Cuando está unida a la membrana puede actuar como chaperona de las proteínas de fusión SNARE entre otras. También suprime la apoptosis, regula los niveles de glucosa, es antioxidante y está implicada en la diferenciación neuronal (15). Todos los factores que afecten a su estructura como las mutaciones, las PTMs, el ratio

de las distintas isoformas, la solubilidad, la propagación entre células y la acumulación de  $\alpha$ S, junto con diversos factores externos aún por definir influyen en el balance entre función y disfunción de la proteína, iniciando procesos de autoensamblaje responsable de la formación de agregados amiloides involucrados en la enfermedad (17,21).

### **Proceso de nucleación y formación de agregados amiloides en alfa-sinucleína**

Según la teoría de nucleación clásica cuando se forman soluciones supersaturadas de proteínas y su concentración excede el límite de solubilidad, ese exceso de proteína forma una nueva fase por nucleación en la que unas pocas moléculas agregan formando complejos de proteínas asociados con una fase sólida. A estos núcleos se van uniendo más moléculas haciendo que las fibras crezcan. A los primeros eventos de ensamblaje se les denomina proceso de nucleación y se distingue entre nucleación homogénea cuando esta comienza en el seno de la disolución y nucleación heterogénea cuando lo hace en la superficie de determinadas interfases que catalizan la interacción entre monómeros. La nucleación heterogénea es energéticamente más favorable que la homogénea y por tanto se da con mayor frecuencia si la proteína se encuentra con superficies activas (22). Cuando la nucleación de nuevos agregados ocurre sobre la superficie de una fibra amiloide se le denomina nucleación secundaria y consiste en una nucleación heterogénea iniciada por agregados de la misma proteína que nuclea (Fig. A1, ver resumen gráfico en anexos).

Hasta hace muy poco, sólo se habían encontrado condiciones de formación de fibras de  $\alpha$ S en las que se daba una nucleación heterogénea. Sin embargo, como se ha demostrado hace poco por el grupo de investigación en el que se realizó este trabajo de fin de grado, cuando la proteína se encuentra en condiciones de baja hidratación, la ruta preferente para la formación de agregados amiloides es a través de procesos de nucleación homogénea (23). Estas condiciones son frecuentes en el interior condensados biomoleculares, como se explicará más tarde, por lo que se abre la posibilidad de que la agregación de esta proteína pueda suceder en este ambiente y que por lo tanto la ruta de agregación sea muy diferente a la estudiada hasta la fecha.

### **Separación de fases líquido-líquido (LLPS)**

En esta última década se ha enfatizado el estudio sobre distintos orgánulos celulares sin membrana, a la par que sobre su proceso de formación por LLPS. Estos orgánulos, también denominados condensados biomoleculares, debido a sus características, proporcionan el ambiente ideal de supersaturación para que se puedan dar procesos de nucleación (24–26). Hay dos condiciones necesarias para que se de LLPS en una solución. Primero, la diferencia de afinidades entre las moléculas debe generar una fuerza mayor que la tendencia entrópica a que todo se mezcle. Y segundo, el potencial químico de cada molécula debe ser el mismo en las dos fases, lo cual es posible ya que los potenciales químicos varían de forma no monótona con la concentración (24).

De esta manera es posible que una solución acuosa de proteína se separe en dos fases líquidas de distinta composición, una de ellas enriquecida en proteína y otra mucho más diluida. Se puede dar por atracción o repulsión entre diferentes componentes de la mezcla, aunque en el caso de LLPS de proteínas, generalmente se da por procesos de atracción o afinidad entre moléculas. Esta atracción se da por interacciones de larga

distancia multivalentes y de energía de unión moderada. El número de sitio de unión a otras moléculas, el grado de desorden y la flexibilidad estructural de la proteína también son importantes. Se ha visto que las IDPs poseen patrones de aminoácidos y regiones cargadas repetidas en sus dominios de baja complejidad que favorecen la LLPS, con dominios tipo prion o con pequeñas hélices- $\alpha$  conservadas evolutivamente (25,26).

Los condensados generados poseen propiedades de líquido ya que las interacciones que los mantienen son débiles y transitorias y se intercambian de manera rápida entre las diferentes regiones multivalentes de contacto. Al mantener las propiedades de líquido, estos condensados tienen una forma esférica, debido a la tensión superficial con la otra fase acuosa y sufren procesos de fusión y fisión originando nuevas formas esféricas. Poseen alta capacidad de movilidad y reordenamiento de los componentes, así como de intercambio con moléculas de la fase diluida. Esta forma de concentración de moléculas, sin la necesidad de formación de vesículas y bicapas lipídicas, supone una manera muy efectiva de incrementar la concentración local de algunas moléculas en la célula, bien para su almacenamiento o inhibición al atraparlas en espacios concretos de la célula, o para iniciar procesos de forma muy local como la aceleración de reacciones enzimáticas (24,27).

Los condensados celulares son mezclas complejas de múltiples componentes, los cuales se pueden dividir en dos grupos. Las moléculas andamio, responsables de la LLPS y formación del condensado, y las moléculas cliente que son moléculas que se concentran en el condensado pero que son componentes dispensables. Estas moléculas cliente pueden bien interaccionar con algún otro componente del condensado o simplemente particionarse preferentemente en el ambiente del condensado (26).

A nivel fisiológico están implicados en múltiples procesos celulares como procesos de transducción de señales, almacenamiento de mRNAs, respuestas al daño celular y organización del citoesqueleto, entre muchos otros. Por ello, en sí mismos, la LLPS y los condensados no se consideran tóxicos o patológicos (26,27).

### **Transición de líquido a sólido (LSPT)**

El proceso de LLPS proporciona un nuevo microambiente con unas propiedades muy diferentes al ambiente de la fase diluida, con una elevada concentración de macromoléculas y una menor actividad de agua que, si se prolonga mucho en el tiempo y las interacciones aumentan en duración o número, puede desencadenar en procesos de agregación o saturación que promueven la formación de cristales o geles sólidos. Esta transición se puede dar por entrecruzamiento de polímeros y una asociación más fuerte de proteínas lo cual acabaría dando lugar a fibras amiloides (16,27). Este cambio de estado de líquido a sólido impide que tengan lugar más reacciones y que los componentes difundan ya que se pierden las propiedades líquidas del condensado al pasar a ser sólido y comportarse como tal (24,27). Es importante resaltar que la LLPS y la transición líquido a sólido (LSPT) son dos procesos distintos y pueden suceder de forma independiente, aunque en muchas ocasiones la LLPS favorezca y promueva la LSPT al favorecer los procesos de nucleación (25).

Las células poseen mecanismos que regulan la LLPS e impiden que pasen a estado sólido mediante el control de la dinámica de las moléculas entre fases, generalmente a



través de la adición o eliminación de PTMs en las proteínas andamio. Aun así, hay condiciones como proteínas mutantes que agregan más fácilmente en las que la célula no puede disolver o limitar el crecimiento de los agregados (24). Existen evidencias para proteínas causantes de enfermedades neurodegenerativas, como tau y huntingtin, de que la LLPS promueve la formación de fibras amiloides relacionadas directamente con la patología (27).

### **LLPS mediada por $\alpha$ S**

Recientemente (en 2020), se han publicado dos artículos científicos en los que reportan por primera vez que  $\alpha$ S es capaz de promover LLPS tanto *in vitro* como en células y en *C. elegans*. En estos artículos, asocian la formación de condensados biomoleculares que contienen  $\alpha$ S *in vivo* con un proceso de LLPS mediado únicamente por  $\alpha$ S en condiciones de elevada concentración, aunque no hay evidencias experimentales de que los mecanismos de formación de condensados sean similares. En estos estudios se ha sugerido que las regiones N-terminal y NAC de  $\alpha$ S son las que dirigen principalmente el proceso de LLPS *in vitro*. Y han observado la maduración de los condensados de un comportamiento líquido a otro tipo gel después de semanas de incubación *in vitro* de las muestras con condensados. Finalmente, también concluyen que la LSPT de  $\alpha$ S desencadena la formación de agregados y que los factores y mutaciones asociados al Parkinson aceleran la LLPS y agregación de  $\alpha$ S (16,28).

En este trabajo se partió de la hipótesis de que el proceso de LLPS de  $\alpha$ S supone un paso previo a la agregación de  $\alpha$ S *in vivo* y se pretendió estudiar con mayor profundidad el proceso de LLPS de  $\alpha$ S y su posterior LSPT *in vitro* con especial énfasis en identificar las regiones de la proteína que son clave para cada uno de estos procesos.

### **OBJETIVOS**

1. Determinar las condiciones óptimas *in vitro* que favorecen la LLPS dando lugar a la formación de condensados de  $\alpha$ S de acuerdo a las condiciones recientemente descritas
2. Optimizar el tipo y concentración de agente macromolecular y el tipo de sonda fluorescente para la monitorización del proceso de LLPS
3. Estudiar el papel de diferentes regiones de  $\alpha$ S en el proceso de LLPS
4. Caracterizar la LSPT de los condensados de  $\alpha$ S generados
5. Estudiar el papel de diferentes regiones de  $\alpha$ S en el proceso de LSPT de los condensados de  $\alpha$ S

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE WT- $\alpha$ S Y $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S**

Seguimos el protocolo de expresión y purificación perfeccionado por el grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo (23). Recomendamos encarecidamente leer la purificación completa en la sección anexos, donde está explicada en profundidad, se detallan los materiales usados y como se desarrolló en concreto este proceso.

Brevemente resumido precultivamos, escalamos e incubamos las bacterias recombinantes *E.coli* BL21 productoras de  $\alpha$ S en LB, luego centrifugamos el cultivo, resuspendemos el pellet, removemos y volvemos a centrifugar. Conservamos el pellet y añadimos tampón de lisis e inhibidores de proteasas, sonicamos la muestra y centrifugamos conservando el sobrenadante al cual damos a un baño a 95 °C. Centrifugamos, cogemos el sobrenadante, añadimos sulfato de estreptomina y lo agitamos. Al sobrenadante le añadimos más sulfato de estreptomina y lo centrifugamos volviendo a conservar el sobrenadante al cual añadimos sulfato amónico y lo agitamos y centrifugamos. Conservamos el pellet y lo resuspendemos en tampón de diálisis y lo dializamos con agitación en cámara fría, luego filtramos la muestra obtenida. Preparamos los tampones de unión y elución y la propia columna aniónica e inyectamos la muestra dializada y vamos haciendo los cambios de tampón y recogiendo en fracciones el eluido de interés. Juntamos las fracciones que corresponden a  $\alpha$ S prácticamente pura y la concentramos centrifugado con un filtro de 10 kDa, luego conservamos la fracción retenida y la filtramos. Preparamos el tampón de elución, la propia columna de exclusión molecular e inyectamos la proteína concentrada, pasamos el tampón de elución y recogemos en fracciones las soluciones de interés. Concentramos las fracciones correspondientes al monómero de  $\alpha$ S centrifugando con un filtro 10 kDa, conservamos el retenido lo diluimos en PBS y medimos su concentración por espectroscopía UV a 275 nm. Hemos obtenido 10 mL de  $\alpha$ S a 553.6  $\mu$ M que alicuotamos y almacenamos a -80 °C. Para comprobar la pureza de la muestra y como se había desarrollado el proceso fuimos guardando alícuotas e hicimos una electroforesis desnaturizante en poliacrilamida (SDS-PAGE). El mismo protocolo se empleó tanto para WT- $\alpha$ S como para  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S.

## 2. ENSAYO CON DISTINTOS AGENTES MACROMOLECULARES

Preparamos los agentes macromoleculares dextrano 70 (70 kDa) y ficol 70 (70 kDa). Pesamos los agentes macromoleculares secos y los disolvemos en tampón de ensayo (25 mM Tris 50 mM NaCl, pH 7.4) mezclándolos con la noria para conseguir una concentración de 50 % (w/v). Preparamos tampón de diálisis (25 mM Tris 50 mM NaCl pH 7.4) y filtrado 0.45  $\mu$ m. A 4 °C realizamos la diálisis con tripas de 3500 Da (Spectrum™, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), cada hora cambiamos el tampón; hicimos 3 cambios de 0.5 L. Con un refractómetro (Mettler-Toledo, Ohio, EEUU) medimos la concentración de los agentes macromoleculares en las distintas soluciones, siendo 41% para la solución con ficol y 39% para la solución con dextrano. Los filtramos con filtros de jeringa de PVDF de 0.22  $\mu$ m y los guardamos en a -20 °C. Descongelamos WT- $\alpha$ S y le cambiamos el tampón de PBS a 25 mM Tris 150 mM NaCl mediante sucesivos filtrados con un filtro de centrifuga de 10 kDa a 13500 rpm sin que la proteína sobrepase 600  $\mu$ M para evitar una posible agregación en la centrifuga Allegra X-15R Beckman Coulter (Brea, California, Estados Unidos). Medimos la absorbancia con el NanoDrop™One Serie DS-11 (DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU) para saber la concentración y llevamos la misma a 500  $\mu$ M. Descongelamos el dextrano 39%, ficol 41% que habíamos preparado y PEG 8 (8 kDa) al 39% preparado por otros miembros del grupo. Preparamos las muestras cuyas condiciones finales son 0.01% azida, 25 mM Tris 150 mM NaCl, 2  $\mu$ M  $\alpha$ S marcada fluorescentemente con AlexaFluor488 (AF488- $\alpha$ S), 200  $\mu$ M WT- $\alpha$ S y el agente macromolecular y concentración correspondientes. Añadimos los componentes en ese orden. En una placa non-binding

de 96 pocillos Greiner bio-one (Kremsmünster, Austria) ponemos una gota de 10  $\mu$ L en el centro del pocillo, haciendo un duplicado por cada condición que son el control negativo sin agente macromolecular y los distintos agentes macromoleculares dextrano, ficol y PEG8 a 5, 10, 15 y 20%, un total de 26 gotas. Observamos y tomamos imágenes en un microscopio de fluorescencia de campo ancho (ver siguientes capítulos de métodos) a los 20 min, cerrando con la tapa, y a los 60 min, abierto sin tapa (Tabla A1, ver resumen condiciones finales en anexos).

### **3. ENSAYO CON DISTINTAS CONCENTRACIONES WT- $\alpha$ S**

Escogemos las condiciones de los agentes macromoleculares óptimas obtenidas del ensayo anterior, PEG8 5 y 10%, y experimentamos con las concentraciones de  $\alpha$ S 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M. Preparamos la solución de las gotas cuyas condiciones finales son 0.01 % azida, tampón 25 mM Tris 150 mM NaCl, 1  $\mu$ M AF488- $\alpha$ S y las concentraciones respectivas de WT- $\alpha$ S agente macromolecular indicadas en la tabla a continuación. Añadimos los componentes en ese orden. En una placa non-binding de 96 pocillos Greiner bio-one (Kremsmünster, Austria) ponemos las gotas como se describe en el capítulo anterior, haciendo un duplicado por cada condición, un total de 18 gotas. Observamos y tomamos imágenes en un microscopio de fluorescencia de campo ancho (ver siguientes capítulos de métodos) a 20 min cerrado y 20, 45, 70 abierto (Tabla A2, ver resumen condiciones finales en anexos).

### **4. ENSAYO CON DISTINTAS SONDAS**

Preparamos la solución de las gotas cuyas condiciones finales son 0.01% azida, tampón 25 mM Tris 150 mM NaCl, 1  $\mu$ M AF488- $\alpha$ S o 10% Pyr- $\alpha$ S, 100  $\mu$ M de WT- $\alpha$ S y PEG8 5 % y realizamos el ensayo homólogo a los anteriores. Observamos y tomamos imágenes en un microscopio de fluorescencia de campo ancho (ver siguientes capítulos de métodos) a los 20 min (pocillo cerrado con tapa) y a los 40,50, 80, 120 min y 20 horas con el pocillo abierto (sin tapa) (Tabla A3, ver resumen condiciones finales en anexos).

### **5. ENSAYO CON DISTINTAS VARIANTES $\alpha$ S**

Experimentamos con las variantes  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S,  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S,  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S,  $\Delta$ 104-140- $\alpha$ S y  $\beta$ S, usando WT- $\alpha$ S como control. Preparamos la solución de las gotas cuyas condiciones finales son 0.01% azida, tampón 25 mM Tris 150 mM NaCl; 1  $\mu$ M AF488- $\alpha$ S o 50  $\mu$ M tioflavina-T (ThT), 100  $\mu$ M de la variante correspondiente y PEG8 5%. Añadimos los componentes en ese orden. En una placa de 96 pocillos ponemos las gotas, hacemos un duplicado por cada condición. Obtuvimos resultados poco reproducibles y decidimos extremar las condiciones de agregación para ver mejor los procesos LLPS y LSPT. Así, repetimos el ensayo, pero con 0.01% azida, tampón 25 mM Tris 150 mM NaCl; 2  $\mu$ M AF488- $\alpha$ S o 100  $\mu$ M tioflavina-T (Carbosynth, Compton, Reino Unido), 200  $\mu$ M de la variante de  $\alpha$ S correspondiente y 10% de PEG8. Repetimos el ensayo una tercera vez con las últimas condiciones para WT- $\alpha$ S,  $\beta$ S y  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S, para este último lo ponemos tanto en forma de gota como de pocillo. Introducimos un nuevo formato de ensayo, en el que en vez de poner una gota llenamos un pocillo hasta la mitad con la muestra. El objetivo es ver si la variante  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S da LLPS en estas condiciones (ver capítulo de resultados). Repetimos el ensayo una cuarta vez para todas las variantes con las últimas condiciones. Observamos y tomamos imágenes en un microscopio de fluorescencia de

campo ancho (ver siguientes capítulos de métodos) cada 5 min durante 3 horas sin tapa (experimento en TimeLapse) (Tabla A4, ver resumen condiciones finales en anexos).

## **6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CAMPO ANCHO (WF) Y CONTRASTE DIFERENCIAL DE FASES (DIC)**

Usamos un microscopio de fluorescencia invertida Leica Dmi8 (Leica Microsystems, Alemania) con un objetivo 40x (magnificación 400x) a temperatura ambiente con una bombilla de halogenuro metálico de mercurio EL6000 para la microscopía de fluorescencia de campo ancho (WF) y con una bombilla halógena para la microscopía de contraste diferencial de fases (DIC). Usamos unas lentes objetivo de aire 40x (Leica Microsystems, Alemania) para enfocar y recoger la luz de la muestra. Para la microscopía WF se usaron filtros estándar GFP (excitación y emisión a 460-500 nm y 512-542 nm, respectivamente) y filtros estándar DAPI (excitación y emisión a 352 - 402 nm y 417 - 477 nm, respectivamente). Para la microscopía DIC usamos el mismo objetivo para iluminar la muestra y recoger la luz reflejada. Con una cámara Leica DFC7000 CCD (Leica Microsystems, Alemania) detectamos la luz recogida. Con microscopía DIC usamos 100 ms de exposición y 50 o 100 ms con microscopía WF.

## **7. TRATAMIENTO DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE DATOS**

Las imágenes obtenidas se analizaron con ImageJ (NIH, USA) para poder compararlas mejor y obtener resultados numéricos. Ajustamos su intensidad para compararlas entre sí, editamos el LUT a escala verde de las imágenes obtenidas con filtro GFP y a escala azul las obtenidas por filtro DAPI y las imágenes de los TimeLapse las montamos en stacks generando videos. Para estudiar la evolución del número de condensados en los experimentos de TimeLapse convertimos los stacks de DIC con AF488- $\alpha$ S en binarios y analizamos las partículas con los parámetros de tamaño de 0-infinito y la circularidad de 0-1. Para estudiar la evolución de la intensidad de ThT por imagen completa medimos la intensidad media de los stacks de GFP con ThT y normalizamos los resultados de cada stack para compararlos posteriormente, además calculamos el promedio para cada variante. Para estudiar la intensidad relativa de ThT de los condensados individuales vamos seleccionando distintos condensados con la herramienta de recorte oval y las seguimos midiendo la intensidad a distintos tiempos sin variar el área oval seleccionada, además en el primer tiempo analizado medimos con ese mismo área la intensidad de fluorescencia del fondo (fase diluida). Así, dividimos respectivamente las intensidades de los condensados en los distintos tiempos con la intensidad del fondo propio para que sean comparables entre sí y así poder seguir posibles cambios en la fluorescencia de los condensados con el tiempo. Además, para comparar la evolución promedio de los condensados individuales en varias variantes de  $\alpha$ S hacemos la media de estos valores y calculamos su desviación estándar.

## **RESULTADOS**

### **1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE WT- $\alpha$ S Y $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S**

Siguiendo el protocolo de purificación de  $\alpha$ S optimizado en el grupo de investigación, obtuvimos 10 mL de WT- $\alpha$ S monomérica a 553.6  $\mu$ M (79 mg), cantidad suficiente para

realizar este trabajo. Fuimos guardando alícuotas durante la purificación para valorarla mediante electroforesis y analizamos los cromatogramas obtenidos con las columnas de intercambio aniónico y de exclusión molecular para evaluar el rendimiento de la purificación. El cromatograma de la columna de intercambio aniónico (Fig. A2, ver cromatograma en anexos) muestra la absorbancia a 280 nm del volumen eluido (azul), vemos cambios en la misma al variar el porcentaje de tampón B (25 mM Tris 1.5 M NaCl pH 7.7) (naranja). A los 80 mL eluidos cambiamos de 0 a 7.5% de tampón B y recogemos tres fracciones de los picos generados correspondientes a oligómeros de WT- $\alpha$ S y algunas proteínas contaminantes. A los 143 mL eluidos cambiamos de 7.5 a 20% de tampón B y recogemos el pico en fracciones de la 5 a la 12 y las juntamos; corresponden a WT- $\alpha$ S. A los 206 mL eluidos cambiamos de 20 a 100% B y vemos un pico correspondiente a proteínas contaminantes de mayor carga negativa y a ADN no eliminado con el paso de precipitación con estreptomicina. Para purificar WT- $\alpha$ S monomérica y eliminar posibles oligómeros realizamos la columna de exclusión molecular (Fig. A3, ver cromatograma en el anexo) sobre la mezcla de fracciones 6-12. Obtenemos dos picos pequeños sobre 120 mL eluidos que recogemos en las fracciones 1-2 y 3-4; corresponden a oligómeros de WT- $\alpha$ S. Sobre 140 mL eluidos sale el pico más grande correspondiente a WT- $\alpha$ S monomérica, lo recogemos en las fracciones 6-12 y las juntamos. No se ven picos significativos a volúmenes de elución posteriores que se corresponderían con fragmentos más pequeños que WT- $\alpha$ S monomérica. Realizamos una electroforesis SDS-PAGE cargando las distintas muestras recogidas durante todo el proceso. Observamos un alto rendimiento en la purificación, obteniendo ya tras la columna de intercambio aniónico una elevada cantidad de WT- $\alpha$ S que tras su paso por la columna de exclusión molecular nos da una menor cantidad, pero altamente pura en WT- $\alpha$ S monomérica, lo cual nos indica que durante la purificación se han podido dar procesos de oligomerización (Fig. A4, ver gel de electroforesis en anexos).

Seguimos el mismo protocolo para purificar  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S, una de las variantes que usamos en los ensayos. El cromatograma de la columna de exclusión molecular no presentaba los picos esperados, siendo el correspondiente a los oligómeros mucho más grande de lo normal, lo cual nos lleva a pensar que la proteína se concentró demasiado y oligomerizó durante el proceso. Pablo Gracia, miembro del grupo, purificó la proteína con éxito y confirmó su pureza por SDS-PAGE análogamente a WT- $\alpha$ S (Fig. A5-A6, ver cromatogramas de las columnas de purificación realizada por Pablo Gracia en anexos).

## **2. ANÁLISIS Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA LLPS DE $\alpha$ S**

Una vez purificamos WT- $\alpha$ S, empezamos estudiando el tipo de agente macromolecular y la concentración del mismo para ver qué condiciones favorecen más la LLPS. Nos basamos en las condiciones reportadas más reciente (16,28) y las que estaban siendo utilizadas en el grupo de investigación (23) para elegir el rango de concentración. Escogimos dextrano 70, ficol 70 y PEG 8 a 5, 10, 15 y 20% tratando así de imitar *in vitro* en la medida de lo posible las condiciones de aglomeración macromolecular del interior celular. Dextrano no potencia la formación de condensados a ninguna concentración y tiempo, por tanto lo descartamos como agente macromolecular. Ficol potencia la concentración de  $\alpha$ S en pequeñas estructuras redondeadas de un tamaño mucho menor que los condensados que se suelen visualizar. No se sabría decir si son

condensados, aunque visualmente a los 60 minutos sin tapa ficol al 15% da un resultado similar al PEG8 al 15%. Por último, PEG8 parece proporcionar las mejores condiciones para la formación de condensados de  $\alpha$ S. Concretamente 5 y 10% de PEG8 nos permiten ver condensados de mayor tamaño lo cual nos beneficia para estudiar su formación (Fig. A7-A8, ver resumen gráfico e imágenes de microscopía en anexos).

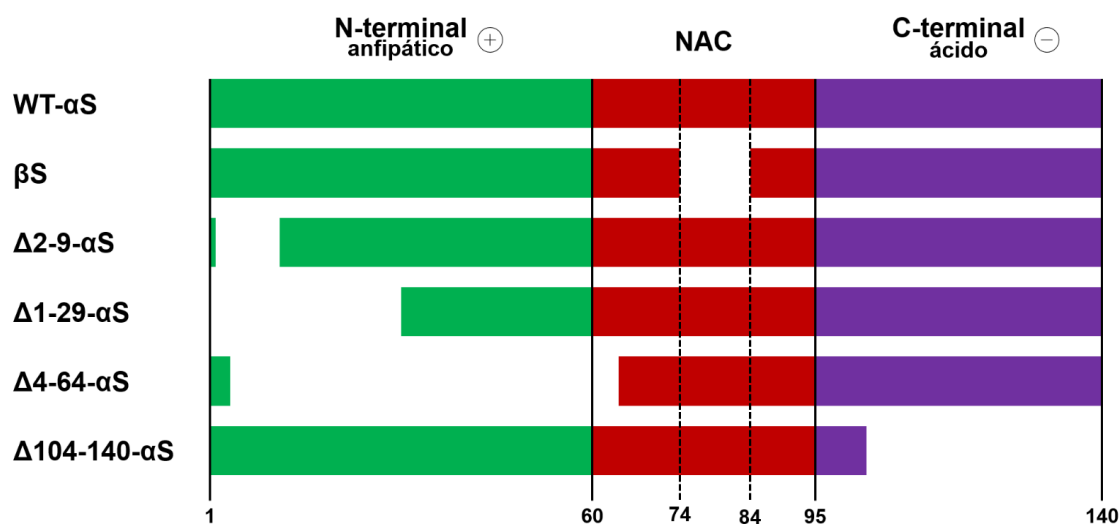
Con los resultados anteriores decidimos usar PEG8 al 5 o 10% como agente macromolecular para estudiar el efecto de la concentración de  $\alpha$ S. Elegimos el rango de 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M basándonos en la literatura reciente (16,28,29) y las concentraciones fisiológicas que puede alcanzar  $\alpha$ S en el interior celular de forma local (28,30). Vemos que a mayor concentración de proteína y de agente macromolecular se favorece LLPS. PEG8 al 5% nos permite ver la formación de condensados a 45 minutos (sin tapa) a partir de 100  $\mu$ M de WT- $\alpha$ S. En cambio, con PEG8 10% la formación de condensados a estas concentraciones es evidente a los 20 minutos. Comparativamente, a los 45 minutos también se observa LLPS al 10% PEG8 a 50  $\mu$ M de  $\alpha$ S. A los 70 minutos se observó la formación de condensados en todas las condiciones estudiadas (Fig. A9-A10, ver resumen gráfico e imágenes de microscopía en anexos), indicando que hay procesos que dependen de la concentración de proteína que gobiernan la cinética de LLPS en las condiciones estudiadas. Estos resultados muestran que, en estas condiciones, la LLPS se da por procesos de nucleación lentos que gobiernan la cinética de formación de condensados en el orden de concentraciones estudiadas. Las condiciones de LLPS de  $\alpha$ S que se han publicado hasta el momento en la literatura han sido PEG8 al 10% y 200 $\mu$ M de  $\alpha$ S. Del estudio del efecto de agentes de aglomeración macromolecular y de la concentración de  $\alpha$ S que hemos realizado, proponemos usar PEG8 5% y 100 $\mu$ M  $\alpha$ S como condiciones más suaves capaces de promover también la LLPS y permitir el estudio de la evolución de los condensados generados.

De momento solo hemos usado AF488 como sonda, por ello para comprobar que no genera ningún artefacto que condicione la LLPS usamos la sonda pireno (Pyr) acoplada mediante una reacción maleimida-tiol a  $\alpha$ S en el residuo 85 (Pyr85- $\alpha$ S). Para visualizar Pyr85- $\alpha$ S usamos el filtro DAPI. Aunque no podemos comparar la intensidad bruta de las gotas porque, aunque todas las disoluciones llevan 10% de Pyr85-As, no todas las gotas ni los condensados son del mismo tamaño (y por ello la intensidad entre distintas gotas no es comparable), vemos que la proteína con esta sonda se comporta idéntica a la proteína con la sonda AF488. Este ensayo nos confirma que AF488- $\alpha$ S y Pyr85- $\alpha$ S siguen los patrones esperados de formación de condensados tanto en tiempo, como en tamaño y forma y no afectan a la LLPS (Fig. A11, ver imágenes de microscopía en anexos). Teniendo todo en cuenta decidimos seguir usando AF488- $\alpha$ S al 1% de la concentración final de proteína y visualizándolo con el filtro GFP ya que esta sonda sí que nos permite comparar las intensidades entre distintos experimentos y no afecta a la LLPS. Estos resultados indican que el tipo de la sonda fluorescente utilizada no es relevante ni condiciona, por tanto, la LLPS ni la posterior agregación de  $\alpha$ S.

### **3. ANÁLISIS CINÉTICO DE LA LLPS DE $\alpha$ S**

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la observación y análisis de la LLPS de  $\alpha$ S nos planteamos estudiar cómo afectan las distintas regiones de la proteína al proceso. Para ello escogemos las variantes truncadas  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S,  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S,  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S,

$\Delta 104-140-\alpha S$  y  $\beta S$  que sería, en términos de secuencia,  $\Delta 74-84-\alpha S$  (como mayor diferencia en secuencia con respecto a la WT- $\alpha S$ ) (Fig. 1).  $\Delta 2-9-\alpha S$  y  $\Delta 1-29-\alpha S$ , nos permiten estudiar la relevancia de los primeros residuos del dominio N-terminal y  $\Delta 4-64-\alpha S$  del dominio completo. Por su parte con  $\Delta 104-140-\alpha S$  veremos la influencia del dominio C-terminal y con  $\beta S$  la del dominio central NAC, que ha sido reportada como esencial para la formación de fibras amiloides en concreto los residuos 71-82, pero aún no se sabe su importancia en la LLPS.

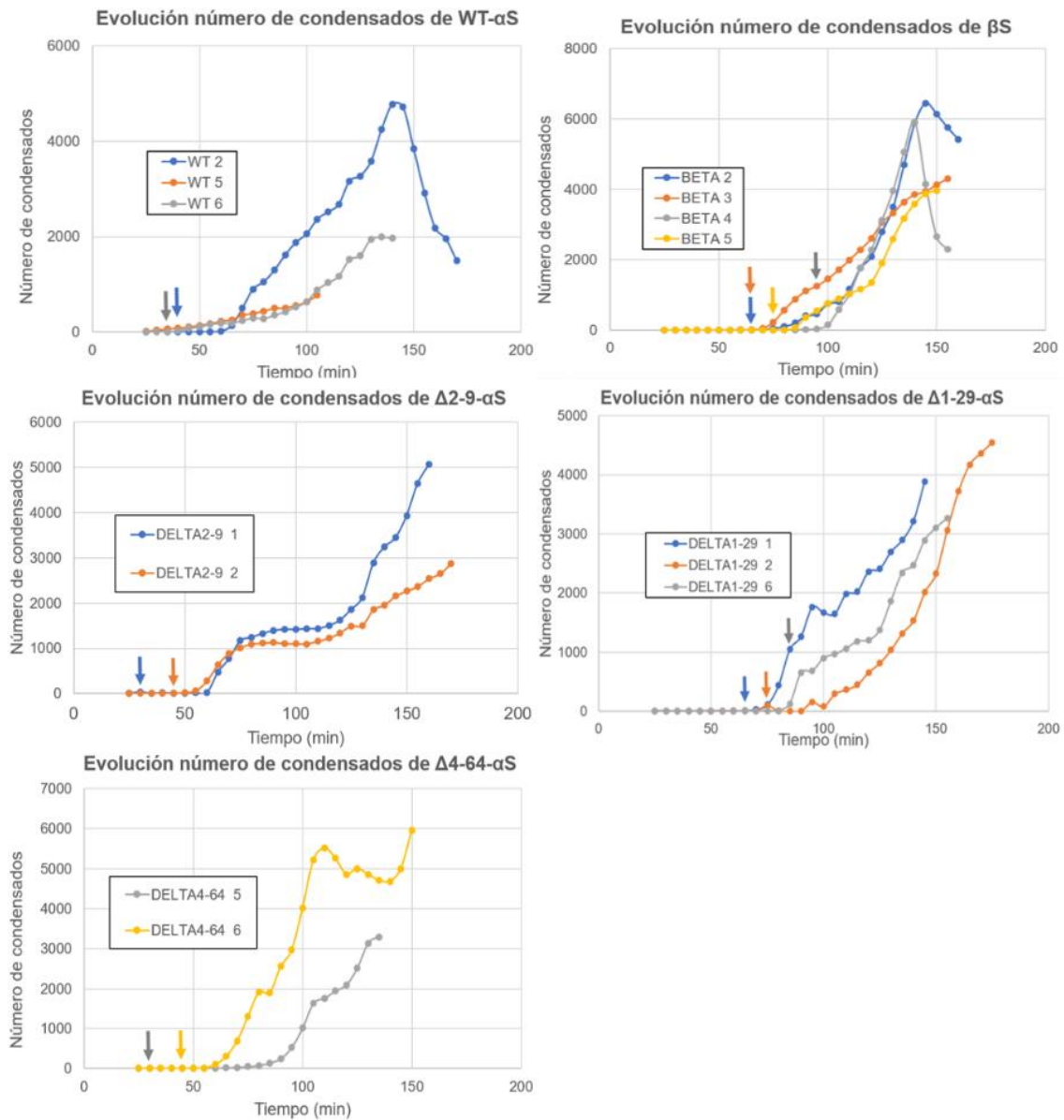


**Figura 1.** Esquema de las variantes de  $\alpha S$  empleadas en este estudio. En verde está el dominio N-terminal (1-60 residuos) que es anfipático y está cargado positivamente a pH fisiológico, en rojo el dominio central NAC (61-95 residuos), involucrado en la agregación amiloide de la proteína, y en morado el dominio C-terminal (96-140 residuos) que está cargado negativamente a pH fisiológico. WT- $\alpha S$  posee la secuencia completa,  $\beta S$  carece de los residuos 74-84 y posee ligeras variaciones en residuos individuales. El resto de variantes carecen de la región que se indica en sus respectivos nombres.

Decidimos usar las condiciones suaves que dan lugar a LLPS, 100  $\mu M$  de proteína y 5% PEG8, pero los tiempos de LLPS entre las réplicas eran muy distintos y poco reproducibles, por ello usamos 200  $\mu M$  de proteína y 10% PEG8 y con estas condiciones realizamos todos los experimentos. El método de contabilización de condensados por ImageJ no es del todo preciso, muchos condensados no son detectados automáticamente, y por ello consideramos este análisis como cualitativo. Aun así, nos proporciona las cinéticas exponenciales de aparición de condensados que, junto con un análisis visual de los TimeLapse, nos da información relevante sobre la implicación de las distintas regiones de  $\alpha S$  en el proceso de LLPS mediado por  $\alpha S$ .

WT- $\alpha S$  es tomada como referencia;  $\beta S$  da lugar a condensados de menor tamaño que WT- $\alpha S$ ;  $\Delta 2-9-\alpha S$  y  $\Delta 1-29-\alpha S$  forman condensados muy similares a WT- $\alpha S$ ;  $\Delta 4-64-\alpha S$  en unas replicas forma condensados que parecen surgir en el interior de la gota y no en el borde como en el resto de variantes, y en otras replicas no forma condensados sino agregados fibrilares; y por último  $\Delta 104-140-\alpha S$  no forma condensados sino unas agregados (Fig. 2). Con  $\Delta 4-64-\alpha S$  hicimos un ensayo adicional llenando un pocillo en vez de colocar una gota para comprobar si realmente se podían generar condensados del interior de la solución. Se hicieron seis pocillos y no se vieron condensados en ninguno de ellos. Existe una variabilidad considerable en los tiempos de aparición de

condensados entre las réplicas incluso en el mismo ensayo, por ello consideramos que hay otros factores externos que también afectan al proceso. De hecho, observamos que la muestra debe tener un formato de gota y que esté en contacto con el aire para que se dé el proceso y que éste se inicia en el borde de la gota en la triple interfase aire/agua/placa, por lo cual creemos que factores que regulan la deshidratación de la gota e implican esta triple interfase están implicados en la nucleación de la formación de condensados de  $\alpha$ S en las condiciones de estudio.

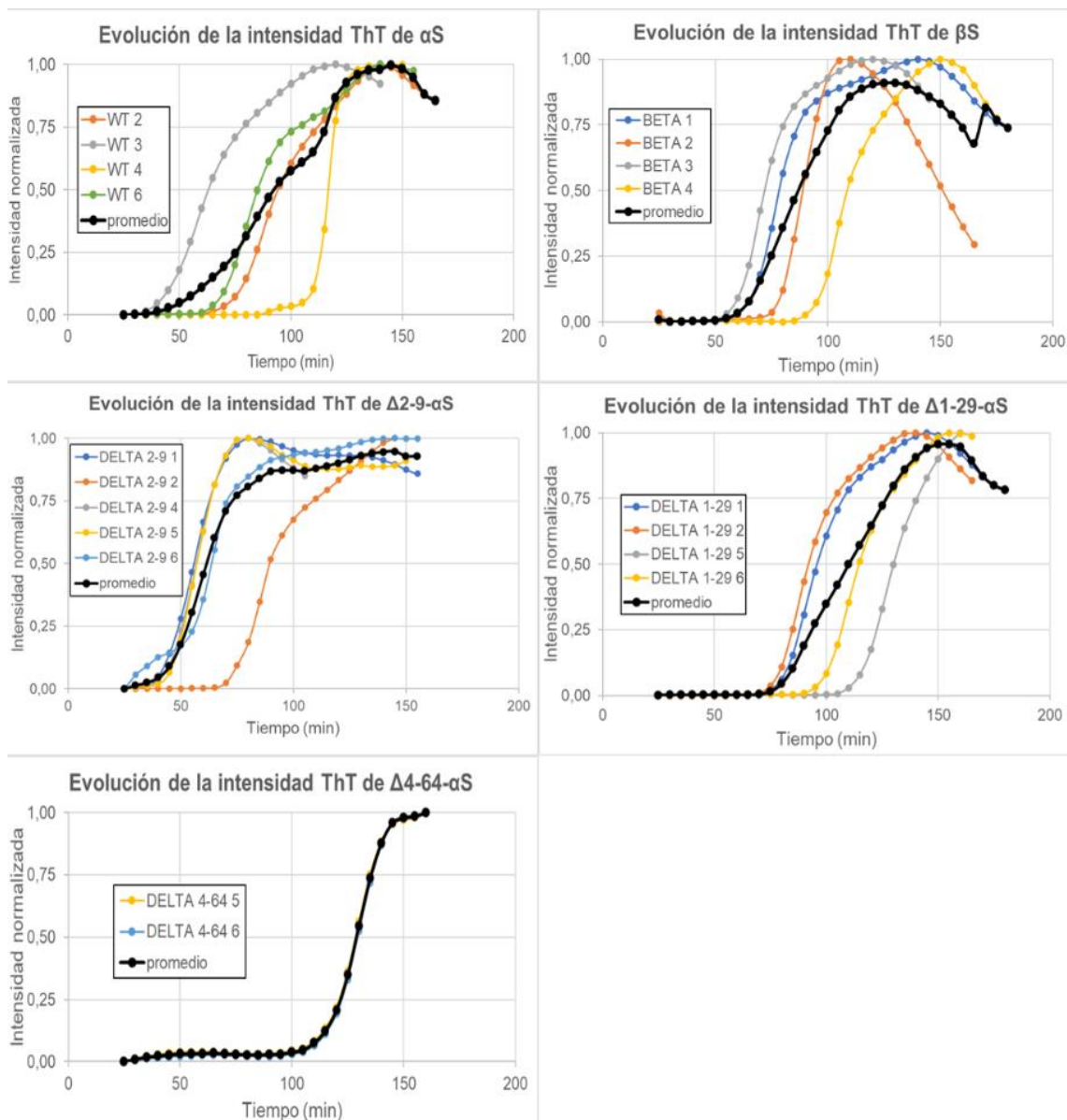


**Figura 2.** Gráficas de la evolución en el tiempo de la aparición de condensados de las diferentes variantes de  $\alpha$ S en el borde de la gota de muestra. Se marcan con flechas el tiempo real de aparición de los condensados mediante análisis visual de cada muestra. Se muestran sólo las réplicas en las que a tiempo 0 en el TimeLapse la gota de muestra es una solución homogénea para poder estudiar la cinética de aparición de condensados. Todos los ensayos se realizaron a 200  $\mu$ M de proteína y 10% PEG8. En azul, naranja, gris y amarillo se muestran las distintas réplicas de los experimentos de cada variante donde se indica el número de réplica al que corresponde.

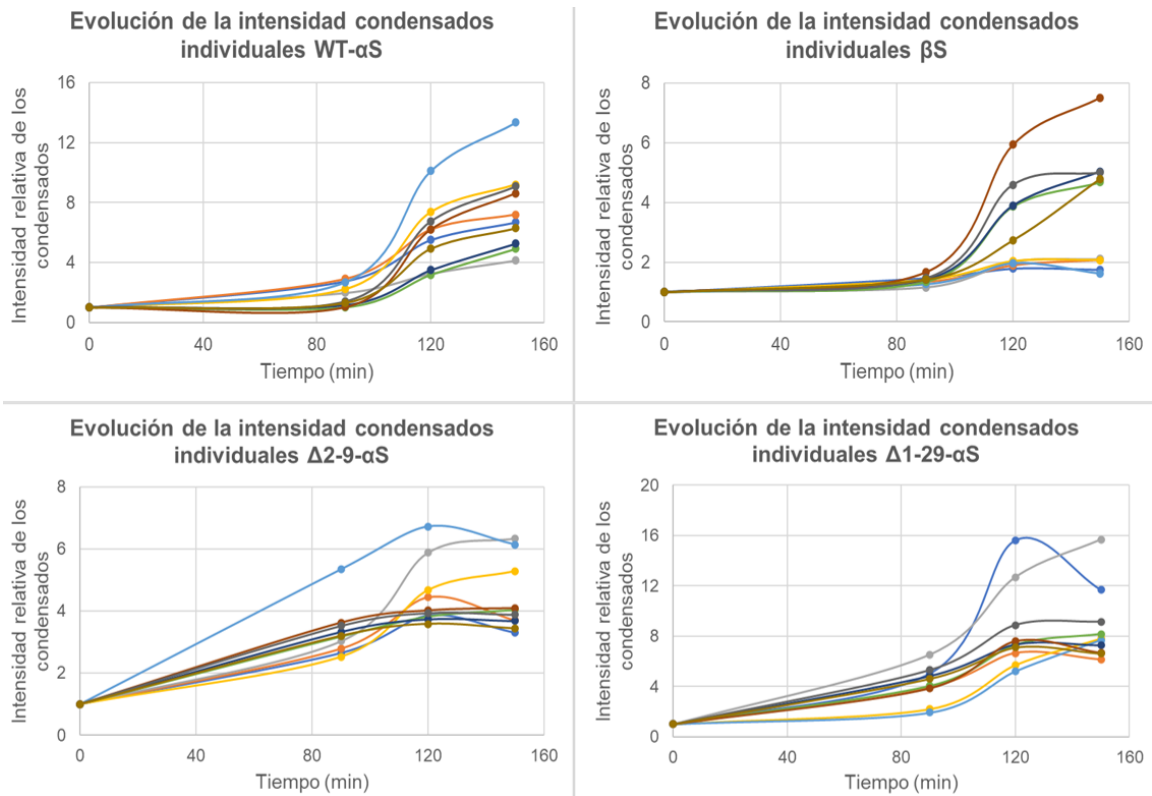


#### 4. COMPARATIVA DE LA LLPS DE $\alpha$ S PARA LAS DISTINTAS VARIANTES

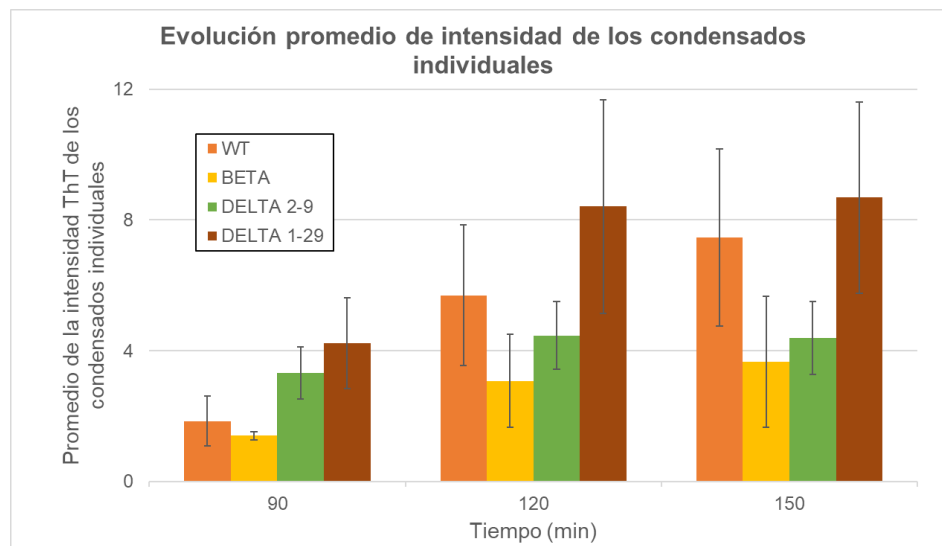
Con estos ensayos también medimos la evolución de la intensidad de la sonda fluorescente tioflavina-T (ThT) para estudiar una posible LSPT que resulte en la formación de agregados amiloides. Esta sonda tienen la característica diferencial de unir agregados amiloides de forma específica, lo que aumenta su rendimiento cuántico de fluorescencia (1,3). Para ello realizamos dos análisis, uno sobre la intensidad total de las imágenes de las gotas y otro sobre condensados individuales. Ambos análisis reflejan la forma sigmoidea del aumento de intensidad de fluorescencia de ThT.



**Figura 3.** Gráficas de evolución en el tiempo de la intensidad de ThT normalizada para WT- $\alpha$ S,  $\beta$ S,  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S,  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S y  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S. Todos los ensayos se realizaron a 200  $\mu$ M de proteína y 10% PEG8. En azul oscuro, naranja, gris, amarillo, azul claro y verde se representan las distintas réplicas de los experimentos de cada variante y en negro el promedio de esas réplicas.



**Figura 4.** Gráficas de evolución en el tiempo de la intensidad de ThT de los condensados individuales de WT- $\alpha$ S,  $\beta$ S,  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S,  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S y  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S. Todos los ensayos se realizaron a 200  $\mu$ M de proteína y 10% PEG8. En azul oscuro, azul eléctrico, azul claro, gris oscuro, gris claro, amarillo, naranja, marrón, rojo y verde se muestran la evolución de la intensidad de distintos condensados en el tiempo. Para cada variante se estudiaron 10 condensados de distintas réplicas.



**Figura 5.** Comparación de la intensidad de ThT de los condensados individuales de WT- $\alpha$ S en naranja,  $\beta$ S en amarillo,  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S en verde y  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S en rojo. Todos los ensayos se realizaron a 200  $\mu$ M de proteína y 10% PEG8.

En el análisis de intensidad total de la imagen vemos que el aumento de intensidad sucede antes en  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S, seguido por WT- $\alpha$ S,  $\beta$ S y  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S más o menos a la par y por último en  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S que se produce significativamente más tarde que en el resto de

las variantes (Fig. 3). En el análisis de intensidad de los condensados individuales (Fig. 4-5) vemos que todas las variantes tiene un aumento progresivo de la intensidad en los tiempos iniciales, pero a tiempos finales, esencialmente sólo WT- $\alpha$ S sigue aumentando, mientras que las demás variantes mantienen un máximo de intensidad alcanzado a tiempos anteriores. Destaca que  $\beta$ S tiene una intensidad menor que WT- $\alpha$ S en los tiempos de medida y que  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S posee la intensidad más alta junto con WT- $\alpha$ S.

## **DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

Las condiciones de formación de condensados biomoleculares por LLPS de proteínas *in vitro* se han estudiado a lo largo de la última década con el objetivo de semejarlas a las condiciones *in vivo* y conocer mejor su implicación el entorno celular. Los agentes macromoleculares son uno de los elementos principales, ya que simulan el ambiente aglomerado del citosol, y son ampliamente utilizados en el estudio de procesos de LLPS *in vitro* (31–33). A pesar de que todavía no se entiende y genera controversia cómo este efecto de aglomeración macromolecular, que disminuye la difusión de los componentes, aumenta la formación de estructuras más compactas de las proteínas, así como la interacción entre macromoléculas y formación de complejos, apoyando la teoría del volumen excluido, modifica la LLPS de IDPs como  $\alpha$ S (34).

Los polímeros sintéticos PEG, ficol y dextrano se han reportado como los agentes macromoleculares más usados en estudios *in vitro* como agentes inertes que mejor simulan el efecto de volumen excluido *in vitro*. Para poder emplear un agente macromolecular en un estudio, éste debe ser soluble en agua y no debe interaccionar específicamente con el sistema biológico de interés (25,35–39). Considerando esto, hemos decidido estudiar las capacidades aglomerantes de PEG, ficol y dextrano en nuestro sistema *in vitro* de LLPS de  $\alpha$ S. Así, hemos encontrado que el dextrano no posee capacidad de inducción de LLPS de  $\alpha$ S en el rango de concentraciones estudiado (entre 0-20%), mientras que el ficol y el PEG sí que favorecen LLPS de  $\alpha$ S en este rango de concentraciones. Esto nos lleva a pensar que la naturaleza química y viscosidad de los agentes macromoleculares ejerce un efecto sobre la LLPS de la proteína, como ya se aludía en un amplio estudio que relaciona los diferentes efectos de agentes macromoleculares con su impacto sobre la LLPS de proteínas (40). Sugerimos que la alta viscosidad del dextrano afecta negativamente a su capacidad de inducir la formación de condensados biomoleculares de  $\alpha$ S, posiblemente porque las interacciones proteína-proteína necesarias para ello están, al menos relativamente, desfavorecidas por la menor difusión de las moléculas y, por tanto, una menor tasa de encuentro, en ese medio. Sin embargo, al utilizar polímeros que dan lugar a un medio de reacción más fluidos que el dextrano, LLPS de  $\alpha$ S se favorece al aumentar la aglomeración de la solución.

La siguiente condición relevante para que se dé LLPS es la concentración de proteína. De forma fisiológica en el cerebro el 1% del contenido proteico del citosol de las neuronas es  $\alpha$ S (12), en los terminales presinápticos se han medido 50-100  $\mu$ M de  $\alpha$ S y niveles superiores a 100  $\mu$ M en estados patológicos (28,30). Valorando estas concentraciones *in vivo* y el rango de 5-500  $\mu$ M usado en estudios recientes *in vitro* (16,28,29) decidimos explorar el rango 25-200  $\mu$ M de  $\alpha$ S para el estudio de LLPS.

Hemos visto, como ya se había reportado en los estudios anteriores, que a mayor concentración de  $\alpha$ S se favorece LLPS a menores concentraciones de agente macromolecular. Aportamos nuevos datos al campo al ver que con 5% PEG8 a concentraciones de proteína entre 100 y 200  $\mu$ M se observa LLPS a los 45 minutos, aunque a tiempos más largos, de 70 minutos, también se observa a concentraciones mucho menor de 25-50  $\mu$ M. A concentraciones de 10% PEG8 y 100  $\mu$ M de  $\alpha$ S LLPS se observa a los 20 minutos. Así a los 70 minutos, se observa LLPS con soluciones de 25  $\mu$ M de  $\alpha$ S tanto a 5% como a 10% de PEG8. Destaca que nuestros tiempos de aparición de condensados de  $\alpha$ S están en el rango de los minutos mientras que en los estudios previos hablan de horas o usan concentraciones  $>200$   $\mu$ M de  $\alpha$ S o concentraciones de agentes macromoleculares más elevadas o añaden diversas sales o iones para alcanzar la LLPS en pocos minutos. Por tanto, sugerimos que nuestro set-up es un mejor potenciador de la LLPS de  $\alpha$ S y que, por tanto, la configuración del experimento tiene un efecto en el proceso de LLPS, lo que, a priori, sugiere que el proceso no sigue el comportamiento termodinámico esperado y existen factores adicionales que influyen en gran medida la formación de los condensados de  $\alpha$ S en estas condiciones.

Estudiamos, además, el efecto de la sonda fluorescente en el sistema de LLPS de  $\alpha$ S. En la literatura se emplea habitualmente Alexa Fluor 488 unido de forma covalente a la proteína, AF488- $\alpha$ S, como marcaje para seguir la distribución de la proteína en la muestra mediante microscopia (28,41,42). Hemos querido comprobar que, efectivamente, no produce artefactos que perturben la visualización de la fluorescencia o interfieran con el proceso de LLPS y para ello hemos comparado el efecto de esta sonda con la sonda pireno, Pyr85- $\alpha$ S. Con ambas sondas los ensayos se desarrollaron según lo previsto y de manera totalmente comparable, confirmando que AF488- $\alpha$ S no afecta a LLPS ni a LSPT, por ello hemos decidido seguir usándola como sonda. Además, la intensidad dada por Pyr85- $\alpha$ S no nos permite comparar distintos condensados entre sí como ya se comentó en los resultados de manera que, si bien sirvió para demostrar que la LLPS y LSPT no depende de la sonda utilizada, no se empleó para más experimentos.

Durante el desarrollo de este trabajo nos planteamos la implicación del formato, gota encima de placa, sobre la LLPS. La forma de media esfera de la gota, el proceso de deshidratación que sufre y los patrones de condensados observados, generados desde el borde de la gota, en la triple interfase aire/agua/placa nos lleva a pensar que se puede estar dando un proceso que se ha denominado “efecto anillo de café” (43), la cual crearía corrientes dentro de la gota de muestra que favorecerían la concentración de los distintos componentes en los bordes de la misma. Además, la triple interfase aire/agua/placa parece ser el lugar de origen de la mayoría de los condensados iniciales. Tanto la presencia de una deshidratación progresiva por contacto con el aire como la triple interfase no son elementos que se encuentren *in vivo* que, además, parecen estar acelerando el proceso de LLPS *in vitro*. Esta situación nos beneficia a la hora de generar los condensados de forma más rápida pero también puede ser una fuente de variabilidad no controlada en el experimento. Nos planteamos que esto sea la causa de que las réplicas de un mismo experimento tengan tiempos de LLPS distintos.

A través del estudio con variantes truncadas de  $\alpha$ S hemos visto que las distintas regiones de la proteína afectan de forma diferente a la LLPS. Con  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S y  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S

la aparición de condensados es muy similar a la de WT- $\alpha$ S, por ello sugerimos que estos residuos eliminados pertenecientes al dominio N-terminal no son relevantes para el proceso de LLPS, a diferencia de su papel clave en el auto-ensamblaje de  $\alpha$ S en agregados amiloides (44). Estos resultados sugieren que el proceso de nucleación de  $\alpha$ S resultante en la formación de condensados en las condiciones de estudio no se asemeja al proceso de nucleación de la agregación amiloide de la proteína hasta ahora reportado.

Con  $\beta$ S también se formaron condensados, aunque de menor tamaño que los observados con WT- $\alpha$ S, así pensamos que los residuos 74-84 del dominio NAC tampoco son esenciales para dar LLPS, pero estarían implicados en interacciones que proporcionan estabilidad a los condensados.

Con  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S, en unas replicas hemos visualizado condensados y en otras en cambio agregados fibrilares. Por ello creemos que la barrera energética entre dar LLPS o agregación es muy similar en esta variante, en las condiciones de estudio. Así pequeñas variaciones en las condiciones experimentales pueden llevar a agregación amiloide o a la formación de condensados. Esto podría sugerir que algunos de los residuos 30-60 de la región N-terminal tengan un papel relevante en el proceso de LLPS y que por tanto su ausencia ralentice el proceso, haciendo que las cinéticas de LLPS y agregación amiloide sean más similares. En WT- $\alpha$ S, sin embargo, el proceso de LLPS en las condiciones de estudio se ve cinéticamente favorecido al proceso de agregación amiloide, lo que lleva a que observemos condensados y no agregación. La formación de condensados, por tanto, es una forma de inhibir la agregación amiloide de la proteína en estas condiciones.

Con  $\Delta$ 104-140- $\alpha$ S no hemos visto LLPS, por ello consideramos que el dominio C-terminal es esencial y prioritario para formar condensados. Sería interesante generar una variante  $\Delta$ 1-103- $\alpha$ S y ver si el fragmento C-terminal de la proteína es capaz de dar LLPS por sí solo o por el contrario necesita residuos de otros dominios como podrían ser los residuos 4-64.

Los resultados obtenidos contradicen en parte los reportados en estudios recientes (2020ray, 2020h, 2021sawner) que consideran el dominio central NAC como principal conductor de LLPS debido a su efecto hidrofóbico y a que no han visto LLPS con  $\beta$ S, hecho que si hemos visualizado en nuestro trabajo. Por otra parte, coincidimos en que el dominio C-terminal puede promover LLPS quizás gracias a ser una región intrínsecamente desordenada, ya que se ha visto que estas favorecen la LLPS (25,28,45). Las distintas secuencias de aminoácidos y especialmente la distribución de los residuos cargados podrían ser los motivos por los cuales unas regiones favorecen, a través de las interacciones intermoleculares que forman, la LLPS. Un estudio de 2019 concluye que las regiones con un patrón definido de carga poseen un rango mayor de posibilidades de dar LLPS que las regiones con un patrón de cargas no definido (46). Teniendo esto en cuenta vemos (Fig.6), como los dominios C-terminal poseen un patrón claro de cargas, mientras que el dominio NAC apenas está cargado lo cual apoyaría que C-terminal es probable que promueva LLPS por interacciones electrostáticas con la región N-terminal y que la región NAC no tenga un papel relevante.

Dominio N-terminal (residuos 1-60)

**MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAAGKTEKGVLYVGSKTEGVVHGVAIVAETKTK**

Dominio central NAC (residuos 61-95)

**EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV**

Dominio C-terminal (residuos 96-140)

**KKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA**

**Figura 6.** Secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ S dividida en sus 3 dominios N-terminal, central o NAC y C-terminal. En rojo están los residuos cargados negativamente asparagina (D) y glutamina (E) y en azul los cargados positivamente lisina (K).

El dominio N-terminal está cargado positivamente y el C-terminal negativamente (Fig.1 y 6) lo cual promueve que se puedan dar interacciones intermoleculares electrostáticas entre ambas regiones. En situaciones de aglomeración las proteínas tienden a ocupar el menor volumen posible (47) y esto hace se vean fomentadas conformaciones más compactas que pueden favorecer estas interacciones intermoleculares electrostáticas que acabarían siendo uno de los factores promoventes de la LLPS de  $\alpha$ S. Esto explica también porque con las variantes  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S y  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S si se forman condensados en todas las réplicas, ya que estas variantes conservan parte del N-terminal mientras que en  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S se ha eliminado prácticamente todo el dominio.

Se ha visto como muchas otras IDPs conducen y regulan la LLPS de orgánulos sin membrana donde tienen gran importancia las interacciones entre proteínas con cargas opuestas, con electrolitos y con policationes o polianiones según el caso (48–51). Por ejemplo, Tau, otra IDP estudiada en el grupo de investigación donde se ha desarrollado este trabajo que, además, interacciona con  $\alpha$ S y está relacionada también con la neurodegeneración(52); sufre LLPS gracias a procesos de coacervación complejos dirigidos por interacciones electrostáticas. Lo que es más, actualmente también se está estudiando si la LLPS y la agregación amiloides de tau son procesos secuenciales o independientes que comparten las mismas condiciones de formación (38,53).

Hemos mostrado como con el tiempo los condensados sufren una LSPT mediante el aumento de fluorescencia emitida por la sonda ThT, lo cual es indicativo de que los condensados se hacen más viscosos (pierden propiedades de líquido) con la posible formación de agregados amiloides. En el campo está muy extendido que la emisión de fluorescencia con ThT reporta la transformación a agregados amiloides en el interior de condensados de proteína, no en vano es una de las características principales de los agregados amiloides. Sin embargo, debido a que ThT es un rotor molecular fluorescente, cuyo rendimiento cuántico aumenta al disminuir la rotación del fluoróforo con respecto al resto de la molécula, al hacerse la solución del condensado más viscosa, es posible que el aumento de fluorescencia de ThT observado con el tiempo simplemente refleje un aumento de la viscosidad de los condensados con el tiempo sin que se produzcan procesos de agregación amiloide. En cualquier caso, este aumento de fluorescencia de ThT con el tiempo en los condensados, refleja un proceso de LSPT, aunque no podamos determinar el estado sólido concreto que se genera pudiendo ser agregados amiloides, geles u otro tipo de sólidos. Experimentos adicionales como tinción con congo rojo, dicroísmo circular, microscopia de fuerza atómica o microscopia electrónica, entre otros confirmarían si son o no agregados amiloides (54,55).

Las variantes presentan pequeñas diferencias en la evolución de la intensidad ThT. WT- $\alpha$ S da en un inicio una intensidad baja que no deja de aumentar con el tiempo hasta ser de las más altas.  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S aumenta al inicio, pero con el tiempo se mantiene constante a un valor final considerablemente más bajo que WT- $\alpha$ S.  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S posee una intensidad algo más alta que WT- $\alpha$ S aumenta bruscamente y luego sigue aumentando más débilmente o incluso solo manteniéndose. Por último,  $\beta$ S posee la menor intensidad inicial que aumenta, pero sigue siendo la más baja. Estos resultados nos sugieren que los residuos 74-84 son relevantes en la LSPT, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura de que los residuos 71-82 son claves para la agregación amiloide (16,56). Por tanto, aunque esta región no está involucrada para la formación de los condensados líquidos, parece ser clave para su transformación en condensados con propiedades más sólidas. Estos resultados, por tanto, sugieren que la naturaleza de las interacciones que inicialmente dan origen a los condensados de  $\alpha$ S son distintas a las que luego llevan a la proteína a formar complejos más estables entre moléculas de  $\alpha$ S en el interior del condensado, siendo estas últimas más similares a las encontradas en los procesos de autoensamblaje en agregados amiloides.

Finalmente mencionar que los resultados obtenidos, a pesar de las limitaciones ya descritas, aportan nueva información al campo y abren nuevas vías de investigación. Resumiendo, hemos demostrado que las condiciones experimentales para el estudio de la LLPS de  $\alpha$ S influyen sobre el mismo y que regiones de los dominios de  $\alpha$ S están o no involucrados en LLPS y LSPT de distintas formas.

## **CONSIDERACIONES PARA FUTUROS ESTUDIOS**

Para mejorar las condiciones *in vitro* de la LLPS de  $\alpha$ S se deberían estudiar más profundamente las interacciones que se establecen entre el agente macromolecular elegido y la proteína, a la par que buscar otros aglomerantes que emulen de forma más realista el interior celular, para ello nos podríamos ayudar de herramientas informáticas (32). Además, se requeriría una mayor investigación sobre el efecto de los agentes macromoleculares sobre las propiedades biofísicas del interior de los condensados mediante ensayos FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), ensayos de humedecimiento de superficies y seguimiento por microscopía de eventos de fusión y fisión (57). También sería interesante buscar otros formatos y condiciones experimentales que obliguen al estudio del sistema en una gota sobre una placa, para así evitar efectos de deshidratación por contacto con el aire y efectos artificiales inducidos por la triple interfase aire/agua/placa y, de esta manera, identificar condiciones en las que se produzca LLPS en el seno de la disolución, siendo éstas lo más similares posible a condiciones del medio celular o incluso introducir membranas lipídicas en la solución para generar una interfase agua/lípido que si se da *in vivo* y con la que  $\alpha$ S interacciona (58,59).

Para ampliar el conocimiento con respecto a qué regiones de  $\alpha$ S promueven y son esenciales para la LLPS sugerimos estudiar los residuos y sus cargas, valorar sobre qué residuos ocurren PTMs en la proteína *in vivo* y que estén relacionadas con patologías y con esa información, ayudada por predictores informáticos (45), generar nuevas variantes de  $\alpha$ S con las que realizar ensayos de LLPS. Sobre la LSPT sería relevante usar las técnicas antes nombradas para saber si se forman agregados

amiloides con certeza y a partir de ahí incrementar el estudio sobre las distintas regiones. Para poder elaborar un estudio cuantitativo del número de condensados biomoleculares generados es necesario buscar otro software que sea más preciso o mejorar los parámetros actuales de conteo de ImageJ. Además, para obtener mejores estadísticas sería interesante realizar más réplicas de los experimentos.

## **CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**

- El set-up experimental en que se ha estudiado la LLPS y LSPT de  $\alpha$ S tiene un efecto claro sobre los resultados observados. Otras condiciones en las que se promuevan estos procesos de forma más controlada y con más relevancia fisiológica deben ser exploradas.
  - El dextrano no es capaz, como agente macromolecular, de promover la LLPS de  $\alpha$ S en nuestro sistema, mientras que ficol y PEG sí.
  - Las condiciones óptimas para el estudio de LLPS de  $\alpha$ S en las condiciones actualmente reportadas son: PEG8 a concentraciones en torno a 5-10% y a concentraciones de  $\alpha$ S en torno a 100-200  $\mu$ M.
  - La adición de la sonda AF488 a  $\alpha$ S para el seguimiento de LLPS y LSPT no afecta a dichos procesos.
  - Los residuos 104-140 del dominio C-terminal son esenciales para inducir LLPS en las condiciones estudiadas.
  - Los residuos 4-64 del dominio N-terminal aumentan la barrera cinética de nucleación de LLPS.
  - Los condensados biomoleculares de  $\alpha$ S generados por LLPS en las condiciones de estudio sufren procesos de LSPT con el tiempo.
  - Los residuos 74-84 del dominio central NAC de  $\alpha$ S no son necesarios para la LLPS, pero sí están implicados en la LSPT.
- 
- The experimental set-up, in which LLPS and LSPT of  $\alpha$ S have been studied, has a clear effect on the observed results. Other conditions that promote these processes in a controller way and with better physiology relevance must be explored.
  - As a crowder, dextran is not able to promote  $\alpha$ S LLPS in our set-up, whereas ficol and PEG are.
  - The optimum conditions for the study of  $\alpha$ S LLPS in the actual reported conditions are PEG concentrations around 5-10% and  $\alpha$ S concentrations around 100-200  $\mu$ M.
  - AF488 fluorescent probe addition to  $\alpha$ S to follow LLPS and LSPT do not affect the mentioned processes.
  - In the studied conditions, the 104-140 residues from C-terminal domain are essential for generating LLPS.
  - The 4-64 residues from N-terminal domain increase the kinetic barrier of LLPS nucleation.
  - In the studied conditions, the  $\alpha$ S biomolecular condensates generated by LLPS undergo LSPT processes over the time.
  - The 74-84 residues from NAC central domain of  $\alpha$ S are not needed for LLPS but are implicated for LSPT.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Toyama BH, Weissman JS. Amyloid structure: Conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:557–85.
2. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem.* 2017;86(May):27–68.
3. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004;10(7):S10.
4. Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol.* 2008;65(2):184–9.
5. Cremades N, Dobson CM. The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases. *Neurobiol Dis.* 2018;109:178–90.
6. Buell AK, Dhulesia A, White DA, Knowles TPJ, Dobson CM, Welland ME. Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(21):5247–51.
7. Li J, Uversky VN, Fink AL. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry.* 2001 Sep;40(38):11604–13.
8. Davie CA. A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull.* 2008;86(1):109–27.
9. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(6):548–60.
10. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem DR. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis.* 2018;8(s1):S3–8.
11. Lücking CB, Brice\* A. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci C.* 2000;57(13):1894–908.
12. Kim WS, Kagedal K, Halliday GM. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimer's Res Ther.* 2014;6(1):1–9.
13. Mahul-Mellier AL, Burtscher J, Maharjan N, Weerens L, Croisier M, Kuttler F, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply  $\alpha$ -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(9):4971–82.
14. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. The Proteomics Protocols Handbook. *Proteomics Protoc Handb.* 2005;571–608.
15. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci.* 2016;21(2).
16. Ray S, Singh N, Kumar R, Patel K, Pandey S, Datta D, et al.  $\alpha$ -Synuclein aggregation nucleates through liquid–liquid phase separation. *Nat Chem.* 2020;12(8):705–16.
17. Alderson TR, Markley JL. Biophysical characterization of  $\alpha$ -synuclein and its controversial structure. *Intrinsically Disord Proteins.* 2013;1(1):e26255.
18. Gámez-Valero A, Beyer K. Alternative splicing of alpha- and beta-synuclein genes plays differential roles in synucleinopathies. *Genes (Basel).* 2018;9(2).
19. Beyer K.  $\alpha$ -Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol.* 2006;112(3):237–51.
20. Barrett PJ, Timothy Greenamyre J. Post-translational modification of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Brain Res.* 2015;1628:247–53.
21. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell biology and pathophysiology of  $\alpha$ -synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3).
22. Srivastava AK, Pittman JM, Zerweck J, Venkata BS, Moore PC, Sachleben JR, et al.  $\beta$ -Amyloid aggregation and heterogeneous nucleation. *Protein Sci.* 2019;28(9):1567–81.
23. Camino JD, Gracia P, Chen SW, Sot J, De La Arada I, Sebastián V, et al. The

- extent of protein hydration dictates the preference for heterogeneous or homogeneous nucleation generating either parallel or antiparallel  $\beta$ -sheet  $\alpha$ -synuclein aggregates. *Chem Sci*. 2020;11(43):11902–14.
24. Hyman AA, Weber CA, Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:39–58.
  25. 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*. 2015;163(1):123–33.
  26. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(5):285–98.
  27. Elbaum-Garfinkle S. Matter over mind: Liquid phase separation and neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2019;294(18):7160–8.
  28. Hardenberg MC, Sinnige T, Casford S, Dada S, Poudel C, Robinson L, et al. Observation of an  $\alpha$ -synuclein liquid droplet state and its maturation into Lewy body-like assemblies. *bioRxiv*. 2020;
  29. Sawner AS, Ray S, Yadav P, Mukherjee S, Panigrahi R, Poudyal M, et al. Modulating  $\alpha$ -Synuclein Liquid–Liquid Phase Separation. *Biochemistry*. 2021;
  30. Galvagnion C, Maltsev A, Meisl G, Müller MBD, Challa PK, Kirkegaard JB, et al. Correction for: A natural product inhibits the initiation of  $\alpha$ -synuclein aggregation and suppresses its toxicity (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2017) 114 (E1009-E1017) DOI: 10.1073/pnas.1610586114). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(12):E2543.
  31. Ellis RJ. Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(10):597–604.
  32. Vweza AO, Song CG, Chong KT. Liquid–liquid phase separation in the presence of macromolecular crowding and state-dependent kinetics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
  33. Foffi G, Pastore A, Piazza F, Temussi PA. Macromolecular crowding: Chemistry and physics meet biology (Ascona, Switzerland, 10-14 June 2012). *Phys Biol*. 2013;10(4).
  34. Bernal-Conde LD, Ramos-Acevedo R, Reyes-Hernández MA, Balbuena-Olvera AJ, Morales-Moreno ID, Argüero-Sánchez R, et al. Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles. *Front Neurosci*. 2020;13(January):1–22.
  35. Monterroso B, Zorrilla S, Sobrinos-Sanguino M, Keating CD, Rivas G. Microenvironments created by liquid-liquid phase transition control the dynamic distribution of bacterial division FtsZ protein. *Sci Rep*. 2016;6(October):1–13.
  36. Boeynaems S, Bogaert E, Kovacs D, Konijnenberg A, Timmerman E, Volkov A, et al. Phase Separation of C9orf72 Dipeptide Repeats Perturbs Stress Granule Dynamics. *Mol Cell*. 2017;65(6):1044-1055.e5.
  37. Kaur T, Alshareedah I, Wang W, Ngo J, Moosa MM, Banerjee PR. Molecular crowding tunes material states of ribonucleoprotein condensates. *Biomolecules*. 2019;9(2).
  38. Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, Zoltowska KM, Bennett RE, Dujardin S, et al. Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J*. 2018;37(7):1–21.
  39. André AAM, Spruijt E. Liquid–liquid phase separation in crowded environments. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):1–20.
  40. Ghosh A, Mazarakos K, Zhou HX. Three archetypical classes of macromolecular regulators of protein liquid-liquid phase separation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(39):19474–83.
  41. Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, et al. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: Implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet*. 2003;12(20):2625–35.
  42. Hughes CD, Choi ML, Ryten M, Hopkins L, Drews A, Botía JA, et al. Picomolar

- concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 2019;137(1):103–20.
43. Mampallil D, Eral HB. A review on suppression and utilization of the coffee-ring effect. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;252:38–54.
  44. Mcglinchey RP, Ni X, Jiang J, Lee JC. Main Manuscript for The N- terminus of  $\alpha$ -synuclein dictates fibril formation. 2021;118(35):1–7.
  45. Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell.* 2019;176(3):419–34.
  46. McCarty J, Delaney KT, Danielsen SPO, Fredrickson GH, Shea JE. Complete Phase Diagram for Liquid-Liquid Phase Separation of Intrinsically Disordered Proteins. *J Phys Chem Lett.* 2019;10(8):1644–52.
  47. Minton AP. Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in “crowded” media. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(1):65–9.
  48. Uversky VN, Kuznetsova IM, Turoverov KK, Zaslavsky B. Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. *FEBS Lett.* 2015;589(1):15–22.
  49. Feric M, Vaidya N, Harmon TS, Mitrea DM, Zhu L, Richardson TM, et al. Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell.* 2016;165(7):1686–97.
  50. Mountain GA, Keating CD. Formation of Multiphase Complex Coacervates and Partitioning of Biomolecules within them. *Biomacromolecules.* 2020;21(2):630–40.
  51. Lu T, Spruijt E. Multiphase Complex Coacervate Droplets. *J Am Chem Soc.* 2020;142(6):2905–14.
  52. Yan X, Uronen RL, Huttunen HJ. The interaction of  $\alpha$ -synuclein and Tau: A molecular conspiracy in neurodegeneration? *Semin Cell Dev Biol.* 2020;99:55–64.
  53. Lin Y, Fichou Y, Zeng Z, Hu NY, Han S. Electrostatically Driven Complex Coacervation and Amyloid Aggregation of Tau Are Independent Processes with Overlapping Conditions. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(4):615–27.
  54. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods.* 2004;34(1):151–60.
  55. Bruggink KA, Müller M, Kuiperij HB, Verbeek MM. Methods for analysis of amyloid- $\beta$  aggregates. *J Alzheimer's Dis.* 2012;28(4):735–58.
  56. Näsström T, Adén J, Shibata F, Andersson PO, Karlsson BCG. A capped peptide of the aggregation prone NAC 71– 82 amino acid stretch of  $\alpha$ -synuclein folds into soluble  $\beta$ -sheet oligomers at low and elevated peptide concentrations. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
  57. Wang Z, Zhang G, Zhang H. Protocol for analyzing protein liquid–liquid phase separation. *Biophys Reports.* 2019;5(1):1–9.
  58. Jo E, McLaurin JA, Yip CM, St. George-Hyslop P, Fraser PE.  $\alpha$ -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34328–34.
  59. Ruipérez V, Darios F, Davletov B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res.* 2010;49(4):420–8.

## **ANEXOS**

Esta sección está compuesta por:

- Listado de abreviaturas y términos usados en este trabajo.....	28
- TimeLapse y material adicional.....	28
- Materiales y métodos detallado.....	29
- Figuras referenciadas en el texto.....	32
- Tablas referenciadas en el texto.....	41

### **Listado de abreviaturas y términos usados en este trabajo**

$\alpha$ S	alfa-sinucleína
$\beta$ S	beta-sinucleína
$\gamma$ S	gamma-sinucleína
aa	aminoácidos
CL	cuerpos de Lewy
DIC	contraste diferencial de fases (differential interference contrast)
EA	enfermedad de Alzheimer
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EH	enfermedad de Huntington
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
EP	enfermedad de Parkinson
IDP	proteína intrínsecamente desordenada (intrinsically disordered protein)
LB	caldo de Lisogenia (Lysogeny broth)
LLPS	separación de fases líquido-líquido (liquid-liquid phase separation)
LSPT	transición de fase líquido-a-sólido (liquid to solid phase transition)
NAC	componente no amiloide (non amyloid component)
PTMs	modificaciones postraduccionales (post-translational modification)
rpm	revoluciones por minuto
SNP	polimorfismo de nucleótido único (single nucleotide polymorphism)
ThT	tioflavina T
WF	fluorescencia de campo ancho (widefield fluorescence)
WT	tipo silvestre o natural (wild type)

### **TimeLapse y material adicional**

Se adjuntan en el siguiente enlace las imágenes y TimeLapses de este trabajo de fin de grado. Los distintos archivos están nombrados como R, de resultados, y el número que corresponde según la numeración de la sección resultados. Dentro de los resultados del subapartado 5, ensayo con distintas variantes  $\alpha$ S, los vídeos de los TimeLapse han sido nombrados con los números correspondientes a la delección, beta o wt según el caso, el filtro que se empleó DIC o GFP, la sonda usada AF488- $\alpha$ S (ALX) o tioflavina (THT) y el número de réplica.

<https://drive.google.com/drive/folders/183VeZgCsqh4xpCH3zdbriVTC1FZmo-tE?usp=sharing>

## **Materiales y métodos detallado**

### **1. Expresión y purificación de WT- $\alpha$ S y $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S**

#### **1.1 Alfa-sinucleína WT**

Descongelamos las bacterias recombinantes *E.coli BL21 (DE3)* poseedoras de un plásmido codificante de alfa-sinucleína ( $\alpha$ S) con resistencia a ampicilina. Preparamos 6.25 L de medio de cultivo LB (Sigma Aldrich, Madrid, España) y los autoclavamos. Preparamos un precultivo de 250 mL con ampicilina (Carbosynth, Compton, Reino Unido) a 100  $\mu$ L/mL e inoculamos las bacterias con la punta de una micropipeta. Incubamos 20 h a 37 °C y 220 revoluciones por minuto (rpm). Escalamos el precultivo a 6 L con ampicilina 100  $\mu$ L/mL e incubamos a 37 °C y 180 rpm midiendo la densidad óptica a 600 nm cada 2 h, alcanzando la densidad óptima de 0.6-0.8 unidades arbitrarias un poco antes de las 4 h e inducimos la sobreexpresión de  $\alpha$ S añadiendo IPTG (Carbosynth, Compton, Reino Unido) 1mM en el cultivo y lo incubamos 20 h a 28 °C y 180 rpm. El cultivo se centrifuga en la centrifuga AVANTI J-26 XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) con el rotor de aluminio de ángulo fijo JA-10 Beckman Coulter 10 min a 4 °C y 9700 rpm. Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos todo el pellet en 200 mL de NaCl 150 mM removiendo con la espátula. Después centrifugamos la solución con el rotor de aluminio de ángulo fijo JA-20 Beckman Coulter 30 min a 4 °C y 13000 rpm. Eliminamos el sobrenadante y congelamos el pellet a -20 °C.

Descongelamos el pellet y por 1 L de cultivo inicial añadimos 20 mL de tampón de lisis (Tris 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Carbosynth, Compton, Reino Unido) 2 mM e inhibidores de proteasas (Merck Millipore, Burlington, MA, EEUU)). Hicimos 6 ciclos de sonicación (Sonicator American Laboratory Trading, East Lyme, CT, United States) de 1 min a potencia 80 y 1 min descanso removiendo el vaso que se encontraba inmerso en una mezcla de agua/hielo. Centrifugamos la solución con el rotor JA-20 30 min a 4 °C y 13000 rpm. Nos quedamos con el sobrenadante, lo transferimos a tubos Falcon de 50 mL y lo dejamos 25 min en un baño a 95 °C para precipitar proteínas termosensibles. Centrifugamos la solución con el rotor JA-20 30 min a 4 °C y 13000 rpm. Nos quedamos con el sobrenadante y le añadimos 10 mg de sulfato de estreptomina (Carbosynth, Compton, Reino Unido) por 1 mL de sobrenadante y lo agitamos 15 min a 4 °C para precipitar el DNA. Nos quedamos con el sobrenadante y centrifugamos con el rotor JA-20 30 min a 4 °C y 13000 rpm. Nos quedamos con el sobrenadante y volvemos a añadir estreptomina y a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar más DNA. Nos quedamos con el sobrenadante y añadimos 361 mg de sulfato amónico (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) por 1 mL de sobrenadante, lo agitamos 30 min a 4 °C para precipitar la  $\alpha$ S. Centrifugamos la solución con el rotor JA-20 30 min a 4 °C y 13000 rpm, nos quedamos con el pellet y lo congelamos a -20 °C.

Descongelamos el pellet y lo resuspendemos en tampón de diálisis Tris 25 mM pH 7.7, añadiendo 6-7 mL de Tris por 1 L de cultivo inicial. Dializamos la solución con una membrana de 3500 Da Spectrum™ (Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) a 4 °C con agitación realizando un cambio de tampón de 1 L cada 3 h, realizamos 3 cambios. Obtenemos unos 40 mL de solución dializada de  $\alpha$ S que filtramos con filtros de jeringa PVDF de 0.45  $\mu$ m y lo almacenamos a 4 °C. Preparamos los tampones A o de unión (25 mM Tris pH 7.7) y el tampón B o de elución (25 mM Tris 1.5 M NaCl pH 7.7), los

desgasificamos y filtramos con filtros de vacío de 0.22  $\mu\text{m}$  para usarlos en la columna aniónica HiPrep™ Q Fast Flow 16/10 (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Inglaterra, RU) conectada a Äkta prime plus (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Inglaterra, RU). La columna aniónica posee un volumen de 20 mL y trabaja con un flujo máximo de 5 mL/min y presión máxima 0.15 MPa. Primero pasamos agua Mili-Q por la columna para eliminar el etanol 20% en el que se conserva cuando no se usa. Luego pasamos 100 mL tampón A para equilibrar, tampón B para activar la columna y nuevamente tampón A para volver a equilibrar. Inyectamos la solución dializada y filtrada de  $\alpha\text{S}$  y pasamos 2 volúmenes de columna (CV) de tampón A y luego 5 CV de B a 7.5% y otros 5 a 20%, recogiendo las fracciones 5-12. Por último, pasamos otros 5 CV de tampón B al 100% para eliminar el DNA que no se consigue eliminar mediante la precipitación con sulfato de estreptomicina. Finalmente pasamos 5 CV de agua-MilliQ y 3 CV de etanol 20% para limpiar y conservar la columna y el equipo. Juntamos las fracciones eluidas ya que, puesto que es un protocolo estandarizado en el grupo de investigación y reproducible, sabemos que estas fracciones corresponden a  $\alpha\text{S}$  prácticamente pura, y las concentramos centrifugándolas por intervalos de 20 min a 4 °C y 4000 rpm en un filtro de 10 kDa. Nos quedamos con la fracción retenida, unos 10 mL, y la filtramos con un filtro de jeringa de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ .

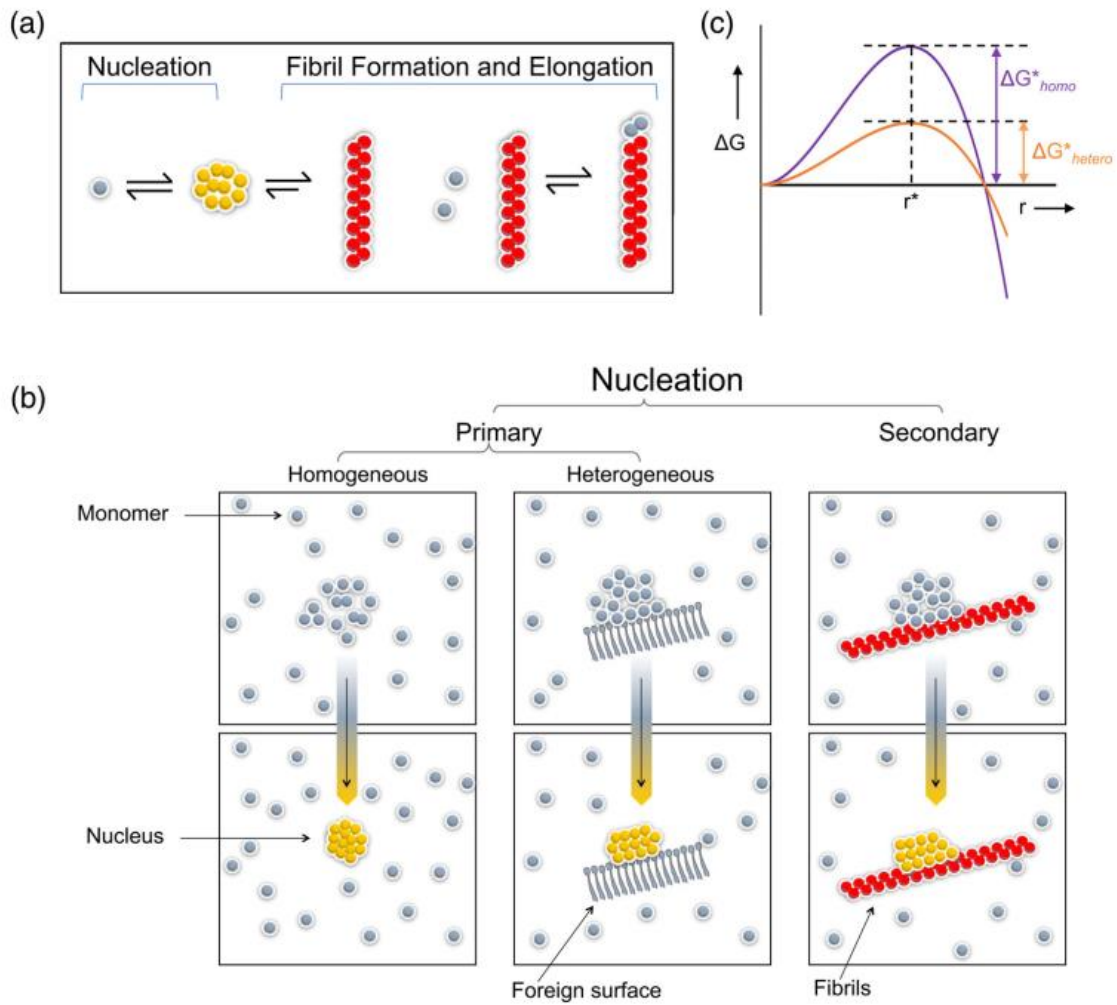
Para la columna de cromatografía de exclusión molecular (SEC) HiLoad® 26/600 Superdex (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Inglaterra, RU) conectada a al Äkta prime plus (Cytiva GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Inglaterra, RU) preparamos el tampón A o de elución (PBS 8.01 mM fosfato 150 mM NaCl y pH 7.4) desgasificado y filtrado con un filtro de vacío de 0.22  $\mu\text{m}$ . La columna exclusión molecular posee un volumen de 320 mL y trabaja con un flujo máximo de 2 mL/min y presión máxima 0.3 MPa. Pasamos 1 CV de agua MilliQ para limpiar el etanol de la columna, luego pasamos 1 volumen de tampón A para equilibrar. Inyectamos la solución de proteína concentrada y, tras eluir con tampón A, recogemos dos picos en las fracciones 2 y 4, y posteriormente 6-12 (ver sección de resultados). Limpiamos la columna con agua MilliQ y, después, con etanol 20 %. No recogimos los picos de los fragmentos  $\alpha\text{S}$ , que eluyen después de la fracción que corresponde al monómero, debido a que este protocolo está muy optimizado y se sabe qué picos corresponden al monómero. Concentramos las fracciones 6-12 con la centrifuga Allegra X-15R Beckman Coulter (Brea, California, Estados Unidos) con el rotor SX4400 por intervalos de 20 min a 4 °C y 4000 rpm con un filtro de 10 kDa. Obtenemos 5 mL que diluimos con PBS hasta 10 mL. Medimos la concentración, 553.6  $\mu\text{M}$ . Para ello usamos el coeficiente de extinción 5600  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Protparam, ExPASy server) y la espectroscopia UV a 275 nm del NanoDrop™One Serie DS-11 (DeNovix, Wilmington, Delaware, EEUU), luego alícuotamos la solución y la almacenamos a -80 °C.

Para comprobar la pureza de la muestra y el resultado de todo el proceso de purificación, fuimos guardando alícuotas en distintos puntos del mismo para hacer una electroforesis desnaturalizante en poliacrilamida (SDS-PAGE). Esto se muestra en la sección de resultados.

## 1.2. Alfa-sinucleína $\Delta 2-9$

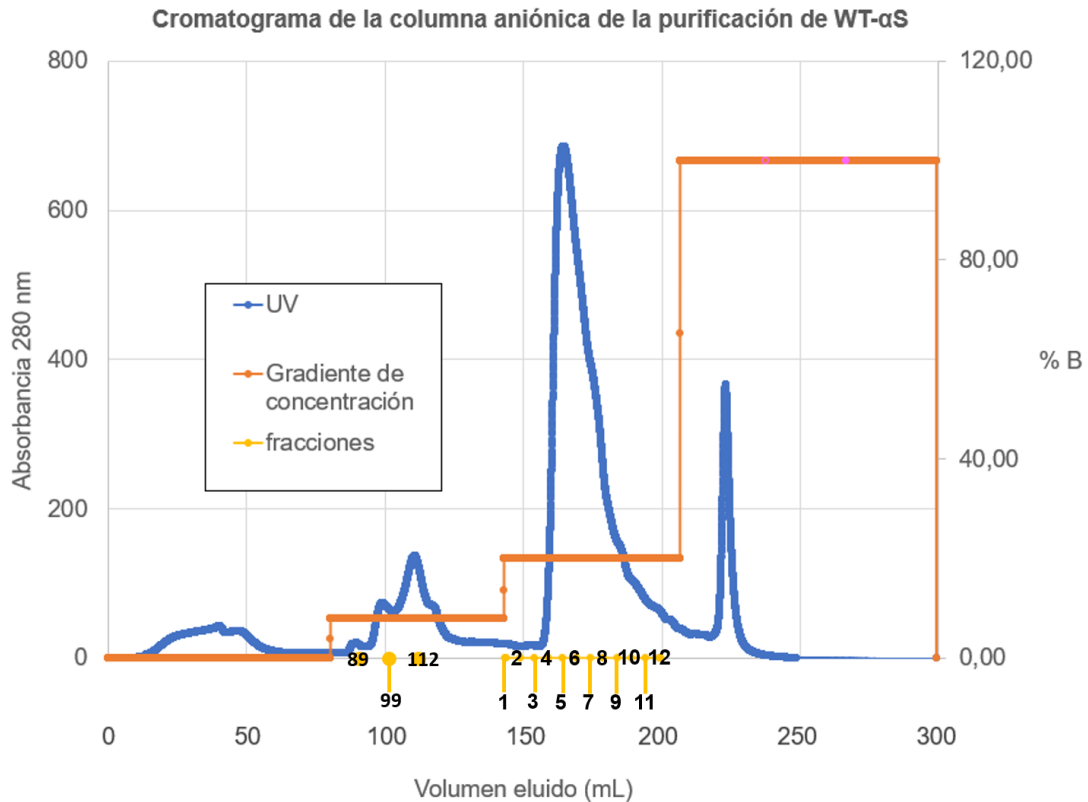
Seguimos exactamente el mismo protocolo que usamos con la WT- $\alpha$ S, pero usamos 16 L de medio de cultivo LB para aumentar la cantidad total de proteína producida ya que el nivel de sobreexpresión de esta variante es menor que el de la proteína WT. La purificación no dio los resultados esperados (ver sección de Resultados). Por ello, otro miembro del grupo, Pablo Gracia, repitió posteriormente la purificación con éxito y esta proteína fue utilizada para los posteriores ensayos. El resto de las variantes empleadas en los ensayos (ver sección de resultados) fueron purificadas por el Dr. José Daniel Camino. La preparación y marcaje fluorescente de la proteína marcada con la sonda AlexaFluor488 (AF488- $\alpha$ S) y con pireno (Pyr- $\alpha$ S) mediante una reacción maleimida-tiol en el residuo 122 y 85, respectivamente, tras una mutación puntual a cisteína (N122C y A85C, respectivamente) fue realizada por Pablo Gracia.

**Figuras referenciadas en el texto**

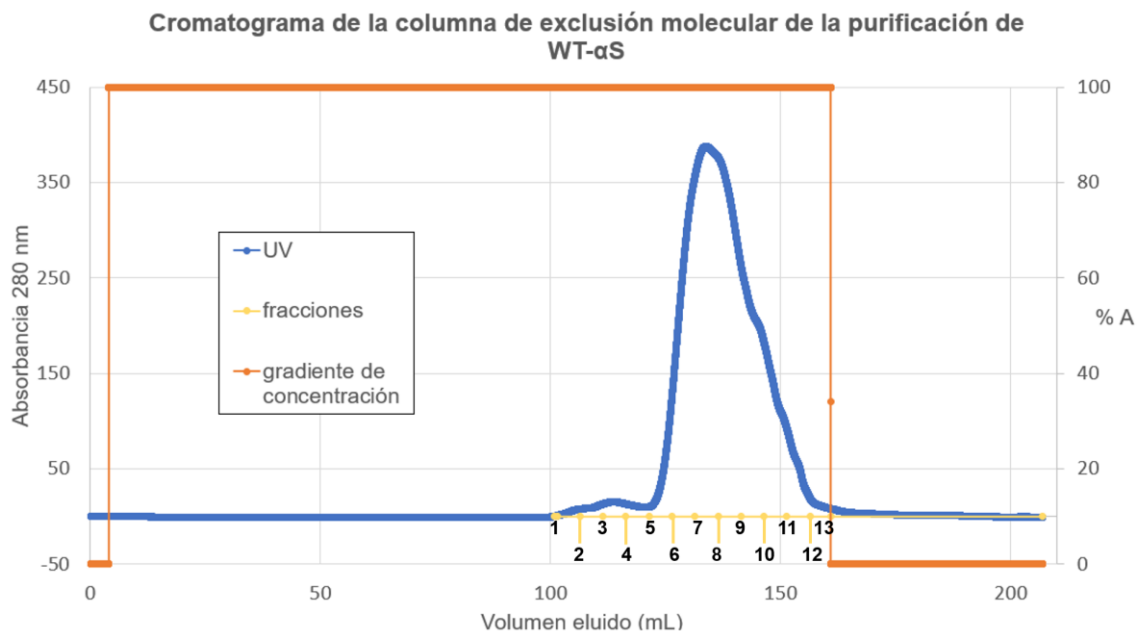


**Figura A1.** a) Representación del proceso de nucleación, formación de fibras y elongación. b) Esquema de las diferencias entre la nucleación primaria homogénea, la nucleación primaria heterogénea y la nucleación secundaria heterogénea. c) Gráfica de la energía libre de Gibbs frente al radio de los monómeros, para un mismo radio la barrera energética para que se dé nucleación heterogénea es menor. Imagen obtenida del artículo Srivastava et al (22).

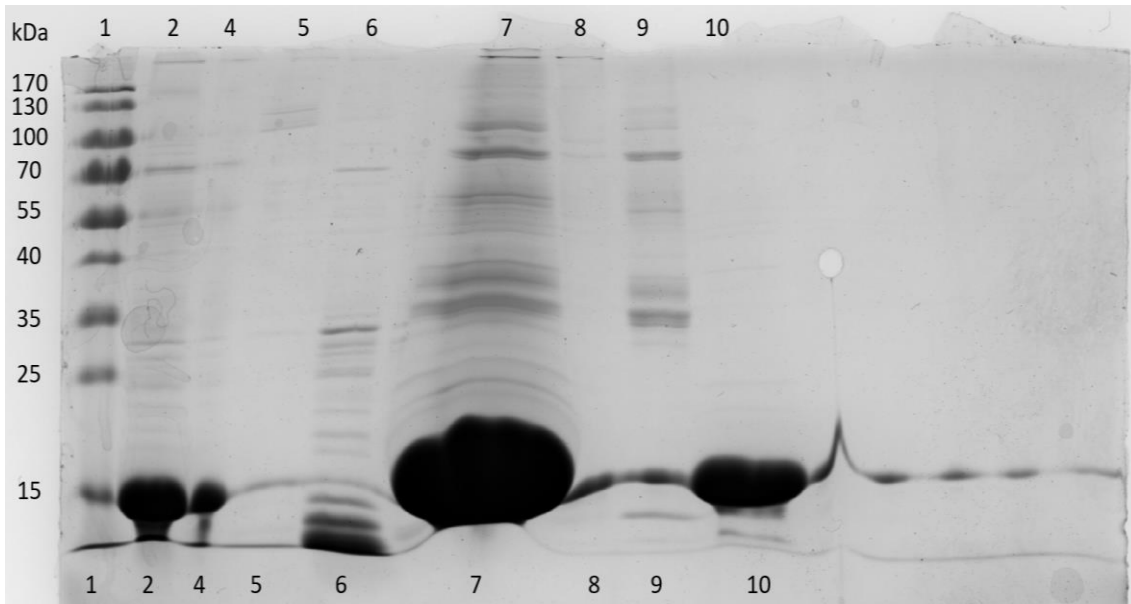




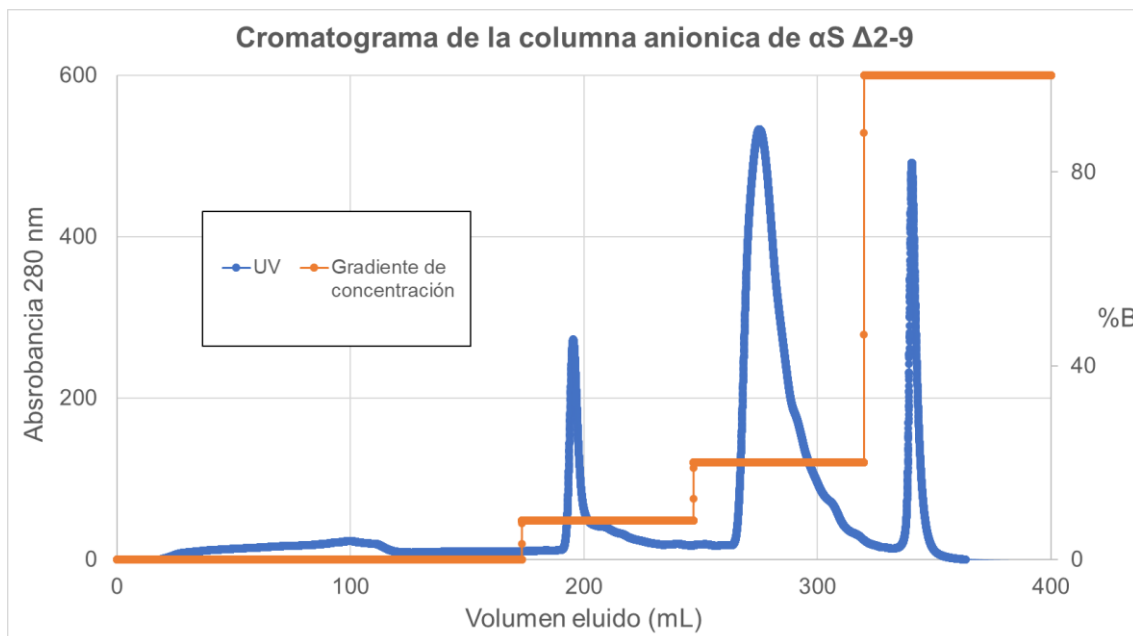
**Figura A2.** Cromatograma de intercambio aniónico de la purificación de WT- $\alpha$ S. Reflejado en el eje izquierdo en azul la absorbancia a 280 nm, en el eje derecho en naranja el % de tampón B (elución) y en el eje de abscisas el volumen eluido de la columna, mostrando en amarillo las distintas fracciones recogidas con su identificación numérica.



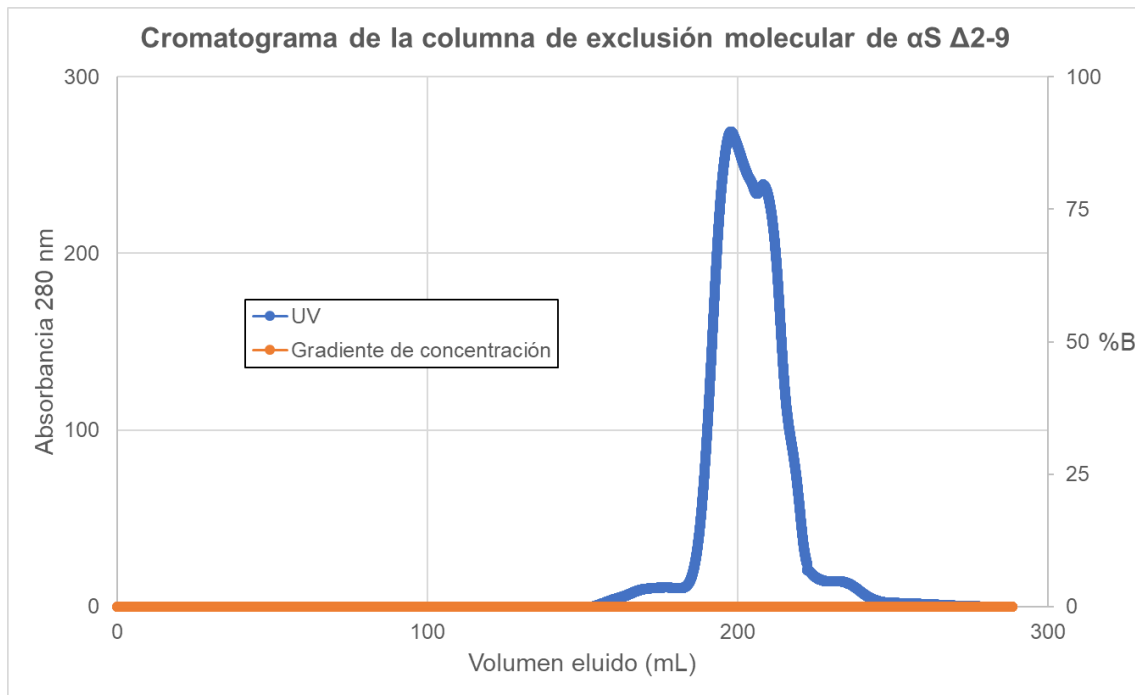
**Figura A3.** Cromatograma de exclusión molecular de la purificación de WT- $\alpha$ S. Reflejado en el eje izquierdo en azul la absorbancia a 280 nm, en el eje derecho en naranja el % de tampón A y en el eje de abscisas el volumen eluido de la columna, mostrando en amarillo las distintas fracciones recogidas con su identificación numérica.



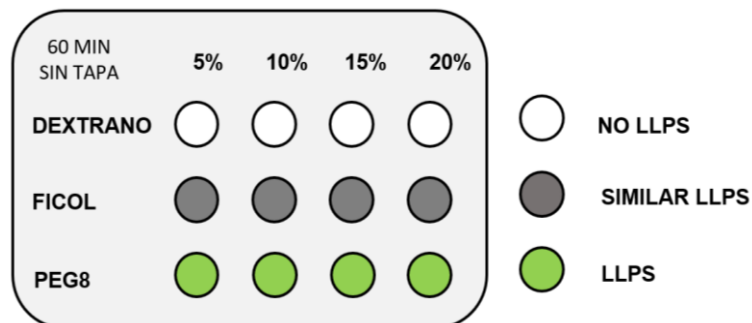
**Figura A4.** Gel de electroforesis SDS-PAGE de la calidad de la purificación de WT- $\alpha$ S. Hay 10  $\mu$ L de solución por carril salvo del marcador de pesos moleculares que hay 5  $\mu$ L. Los carriles están cargados: carril 1 con marcador de peso molecular, carril 2 con solución dializada que inyectamos en la columna aniónica antes de ser filtrada, carril 4 con fracción 89 de la columna aniónica, carril 5 con fracción 99 de la columna aniónica, carril 6 con fracción 112 de la columna aniónica, carril 7 con fracciones 5-12 de la columna aniónica filtradas a 0.45  $\mu$ m, es decir, la solución que inyectamos de la columna de exclusión, carril 8 con fracción 1-2 de la columna de exclusión, oligómeros de WT- $\alpha$ S, carril 9 con fracción 3-4 de la columna de exclusión, oligómeros de WT- $\alpha$ S y carril 10 con fracciones 6-12 de la columna de exclusión, monómero de WT- $\alpha$ S.



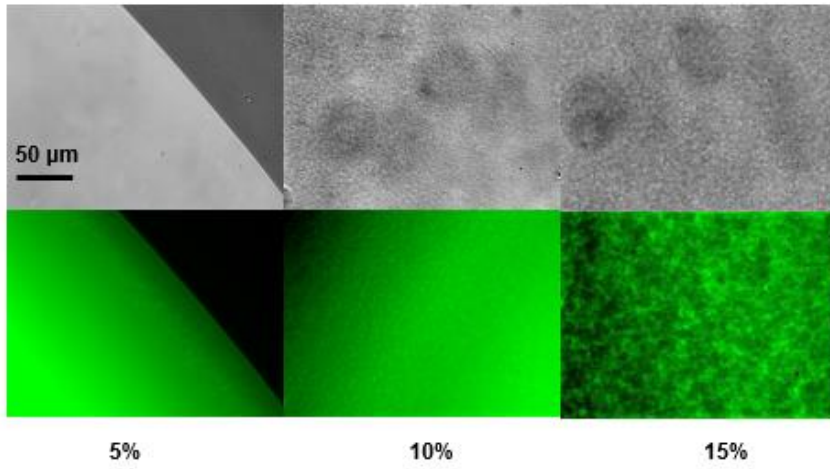
**Figura A5.** Cromatograma de intercambio aniónico de la purificación de  $\alpha$ S  $\Delta$ 2-9 realizada por Pablo Gracia. Reflejado en el eje izquierdo en azul la absorbancia a 280 nm, en el eje derecho en naranja el % de tampón B (elución) y en el eje de abscisas, volumen eluido de la columna.



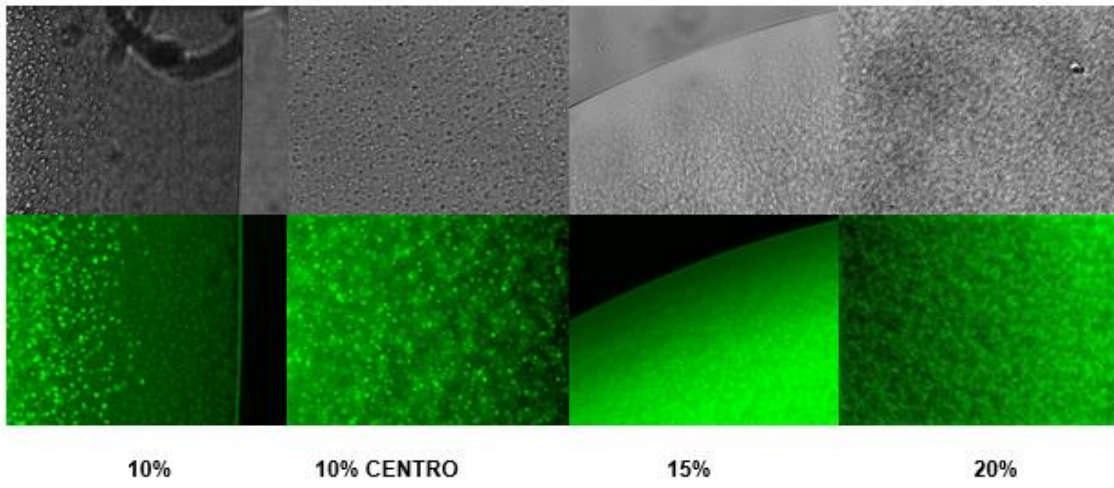
**Figura A6.** Cromatograma de exclusión molecular de la purificación de  $\alpha$ S  $\Delta$ 2-9. Realizada por Pablo Gracia Reflejado en el eje izquierdo en azul la absorbancia a 280 nm, en el eje derecho en naranja el % de tampón B y en el eje de abscisas, volumen eluido de la columna.



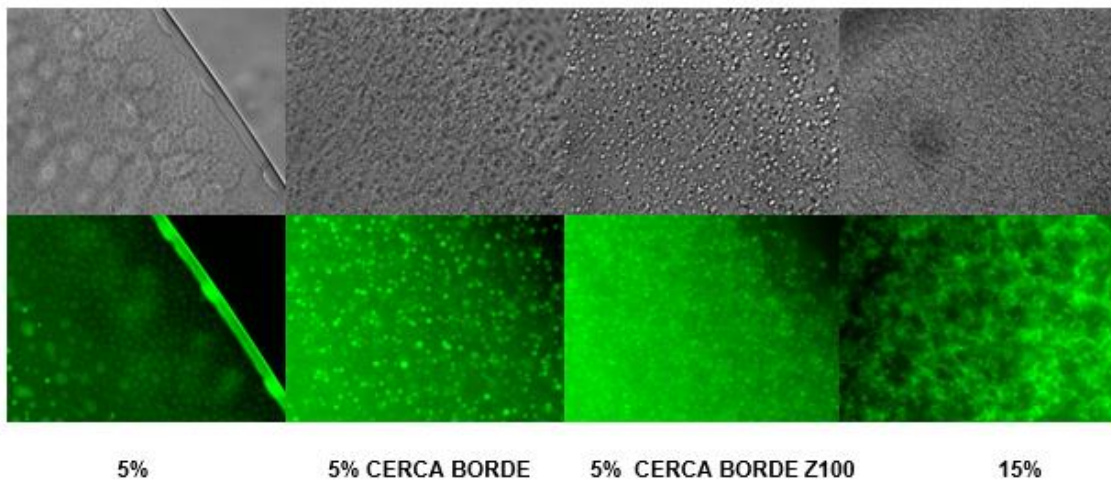
**Figura A7.** Resumen gráfico de la LLPS de WT- $\alpha$ S (a 200  $\mu$ M) a tiempo 60 minutos (sin tapa) en presencia de diferentes agentes macromoleculares (dextrano 70 kDa, ficol 70 kDa y PEG 8 kDa) a distintas concentraciones. En blanco cuando no se ven condensados, en gris cuando se ven estructuras similares a los condensados habituales de LLPS y en verde cuando se ven y reconocen los condensados formados por LLPS.



**FICOL TIEMPO 60MIN SIN TAPA 40X**

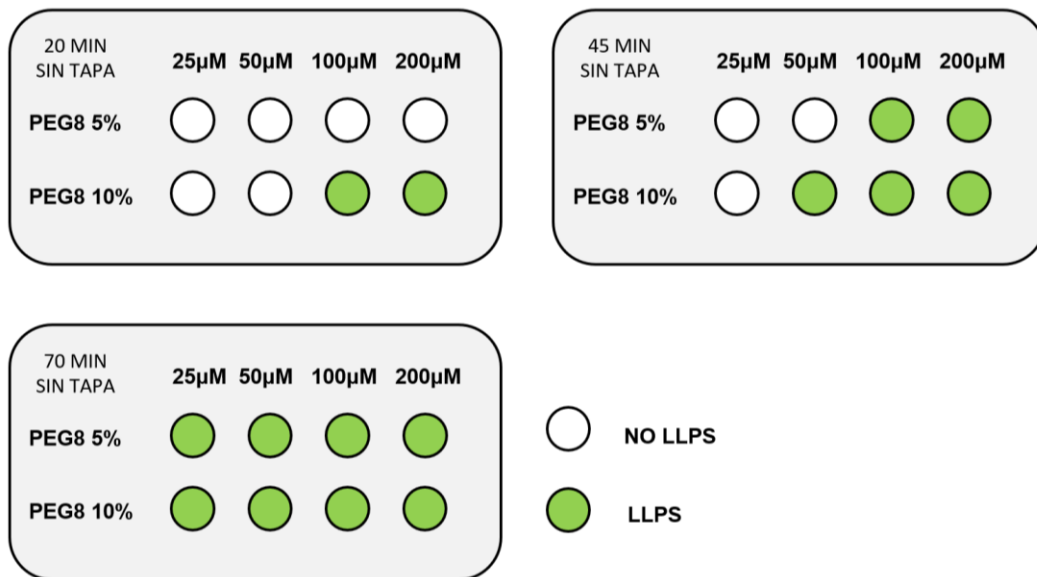


**PEG8 TIEMPO 25MIN SIN TAPA 40X**



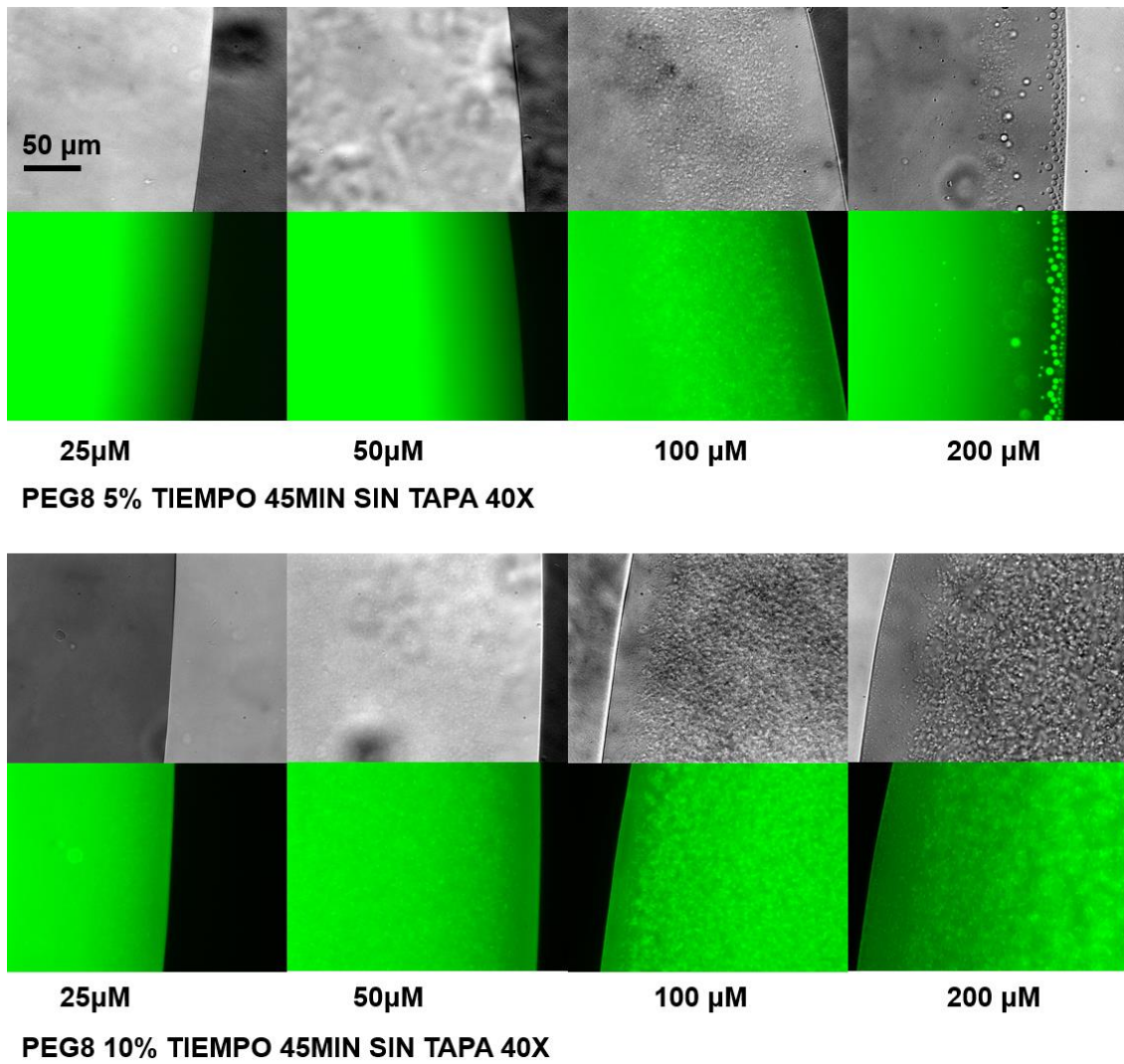
**PEG8 TIEMPO 60MIN SIN TAPA 40X**

**Figura A8.** Imágenes de microscopía de soluciones de WT- $\alpha$ S con diferentes agentes macromoleculares a diferentes concentraciones. El panel superior corresponde a las soluciones de proteína con ficol al 5, 10 o 15%, respectivamente (de izquierda a derecha), a los 60 minutos de mezclar la muestra y exponer la solución al aire. El panel del centro corresponde a las soluciones de proteína con PEG 8 al 10, 15 o 20% (de izquierda a derecha), a los 25 minutos de haber preparado la muestra (pocillo abierto). Se muestra también una imagen representativa del centro de la gota de solución de proteína de la solución al 10% PEG8. El panel inferior corresponde a PEG 8 al 5, 10 y 15 %, a los 60 minutos de exposición de la muestra (formato gota) al aire. En todos los casos se muestra una imagen del borde de la solución (formato gota) excepto en la segunda imagen por la izquierda que se muestra una imagen representativa de la solución próxima al borde de la gota, pero más hacia el centro. Todas las imágenes fueron tomadas cerca del fondo del pocillo. Las imágenes en gris corresponden a microscopía DIC (fila de arriba) y en verde a microscopía WF con filtro GFP (fila de abajo) con el que vemos la intensidad de AF488-  $\alpha$ S.

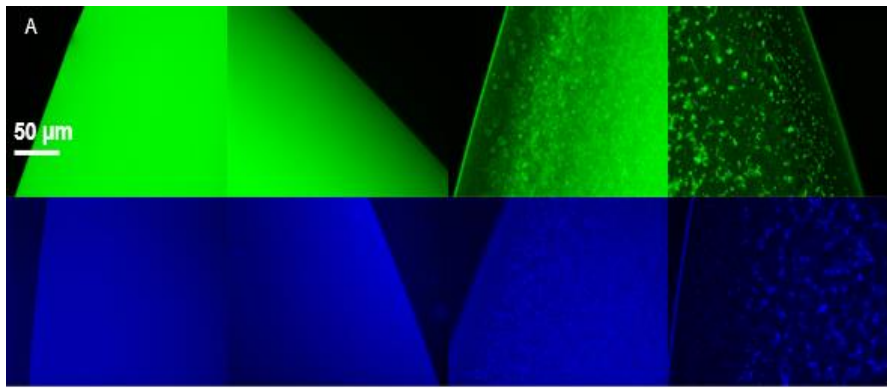


**Figura A9.** Resumen gráfico del proceso de LLPS a los 20, 45 o 70 minutos de haber preparado la muestra (formato gota) y exponerla al aire (pocillo abierto sin tapa). Las muestras contenían PEG8 al 5 o 10% en tampón (25 mM Tris 150 mM NaCl) y WT- $\alpha$ S a 25, 50, 100 o 200  $\mu$ M. El blanco se representan las condiciones en las que no se observaron condensados, mientras que en verde se representan las condiciones en las que se da LLPS.



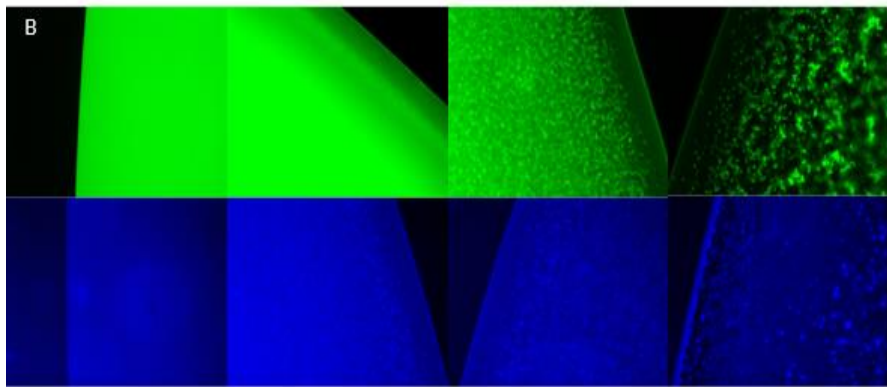


**Figura A10.** Imágenes de microscopía de soluciones de WT- $\alpha\text{S}$  a diferentes concentraciones en presencia de PEG8 al 5% (paneles superiores) o al 10% (paneles de abajo) a los 45 minutos de exposición de la muestra (formato gota) al aire. Todas las fotos están tomadas en el borde de la gota a la altura del fondo del pocillo. Las imágenes en color gris corresponden a microscopía DIC y las verdes a microscopía WF con el filtro GFP con el que podemos ver la intensidad de fluorescencia de AF488-  $\alpha\text{S}$ .

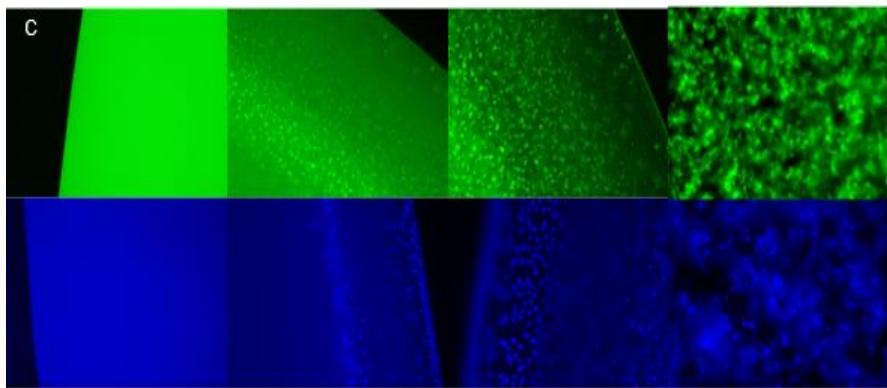


40 MIN      80 MIN      120 MIN      20 H

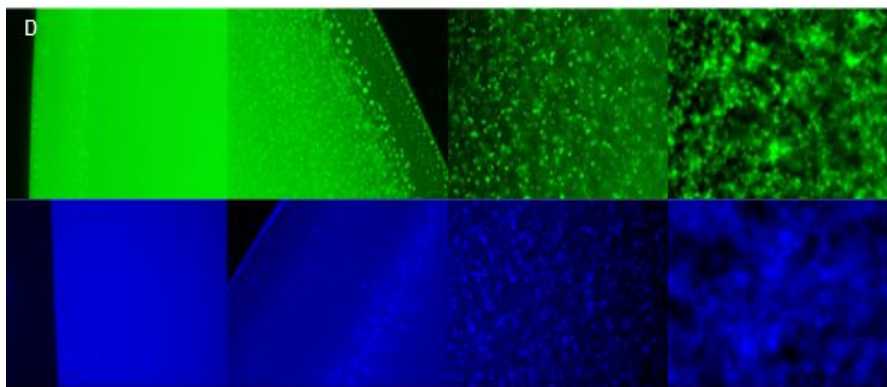
25  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{S}$  5% PEG CON AF488- $\alpha\text{S}$  o PYR85- $\alpha\text{S}$



50  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{S}$  5% PEG CON AF488- $\alpha\text{S}$  o PYR85- $\alpha\text{S}$



100  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{S}$  5% PEG CON AF488- $\alpha\text{S}$  o PYR85- $\alpha\text{S}$



200  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{S}$  5% PEG CON AF488- $\alpha\text{S}$  o PYR85- $\alpha\text{S}$

**Figura A11.** Análisis de la influencia de la sonda fluorescente utilizada para realizar el seguimiento de la LLPS en  $\alpha$ S. El panel A corresponde a 25  $\mu$ M  $\alpha$ S, el B a 50  $\mu$ M  $\alpha$ S, el C a 100  $\mu$ M  $\alpha$ S y el D a 200  $\mu$ M  $\alpha$ S. Todas las gotas poseen 5% PEG8 y las imágenes emparejadas son replicas una con AF488- $\alpha$ S y la otra con PYR85- $\alpha$ S, además todos los paneles están divididos en las columnas de 40, 80, 120 minutos y 20 horas de exposición de las muestras (formato gota) al aire. Las imágenes verdes corresponden al filtro GFP con el que vemos la intensidad de AF488- $\alpha$ S y las azules al filtro DAPI con el que vemos la intensidad de PYR85- $\alpha$ S. Los tiempos indicados son aproximados pueden variar  $\pm$  10 minutos.



### Tablas referenciadas en el texto

Azida	Tampón	[AF488- $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	[ $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	Agente macromolecular
0.01%	25 mM Tris 150 mM NaCl	2	200	5-10-15-20%

**Tabla A1.** Condiciones finales de la solución de los condensados con dextrano, ficol o PEG8 como agente macromolecular (ensayo con distintos agentes macromoleculares).

Azida	Tampón	[AF488- $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	[ $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	Agente macromolecular
0.01%	25 mM Tris 150 mM NaCl	1	25-50-100-200	5 o 10%

**Tabla A2.** Condiciones finales de la solución de las gotas con PEG8 a 5 o 10% (ensayo con distintas concentraciones WT- $\alpha$ S).

Azida	Tampón	[AF488- $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	[Pyr- $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	[ $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	Agente macromolecular
0.01%	25 mM Tris 150 mM NaCl	1	2.5-5-10-20	25-50-100-200	5%

**Tabla A3.** Condiciones finales de la solución de las gotas con AF488- $\alpha$ S o Pyr- $\alpha$ S (ensayo con distintas sondas).

Azida	Tampón	[AF488- $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	[ThT] ( $\mu$ M)	[ $\alpha$ S] ( $\mu$ M)	Agente macromolecular
0.01%	25 mM Tris 150 mM NaCl	2	100	200	5 o 10%

**Tabla A4.** Condiciones finales de la solución de las gotas con las variantes  $\Delta$ 2-9- $\alpha$ S,  $\Delta$ 1-29- $\alpha$ S,  $\Delta$ 4-64- $\alpha$ S,  $\Delta$ 104-140- $\alpha$ S,  $\beta$ S y WT- $\alpha$ S con AF488-  $\alpha$ S o ThT (ensayo con distintas variantes  $\alpha$ S).