

# Роль фазового разделения биополимеров в пространственно- временной организации внутриклеточного пространства

---

ФОНИН А.В.

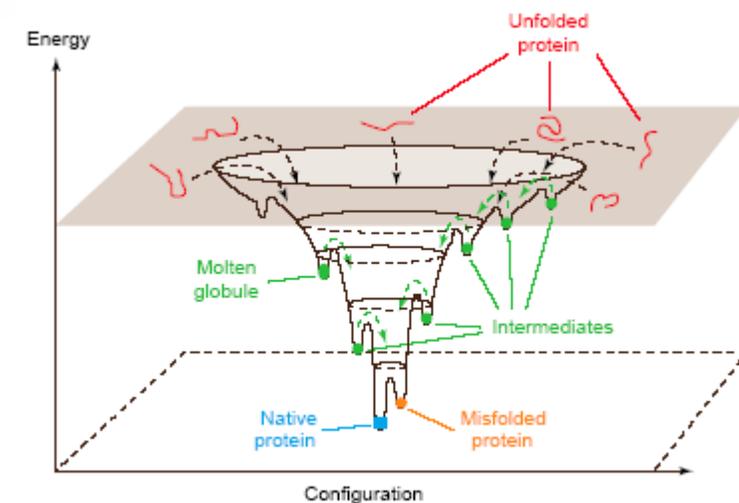
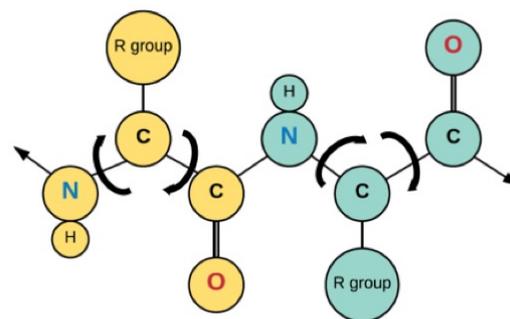
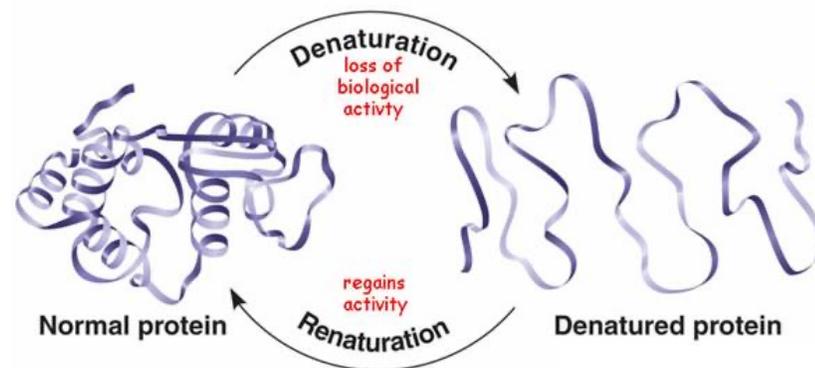
# Что определяет сворачивание белков?

**Эксперименты Анфинсена 1962**

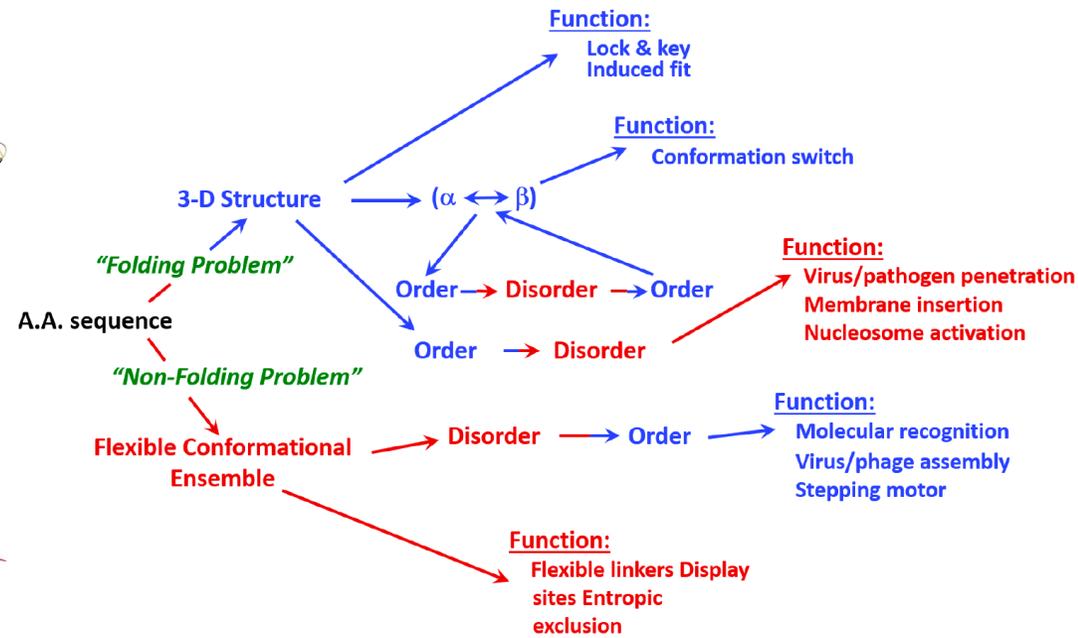
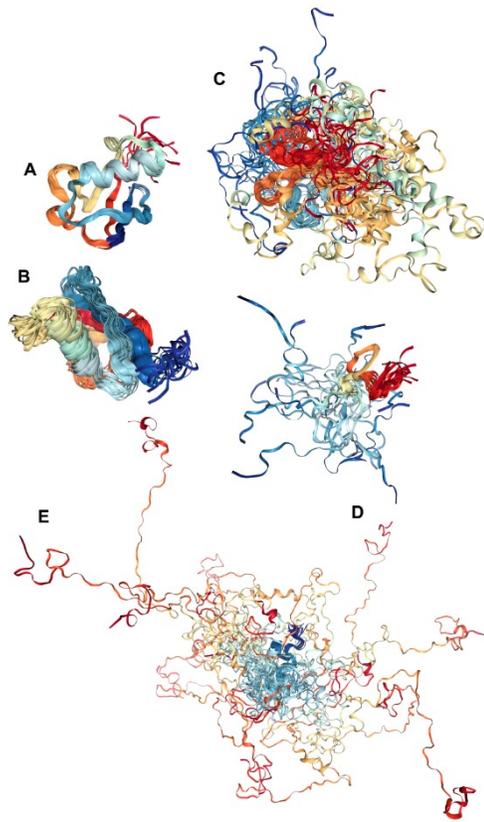
**Парадокс Левинтала 1968**

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

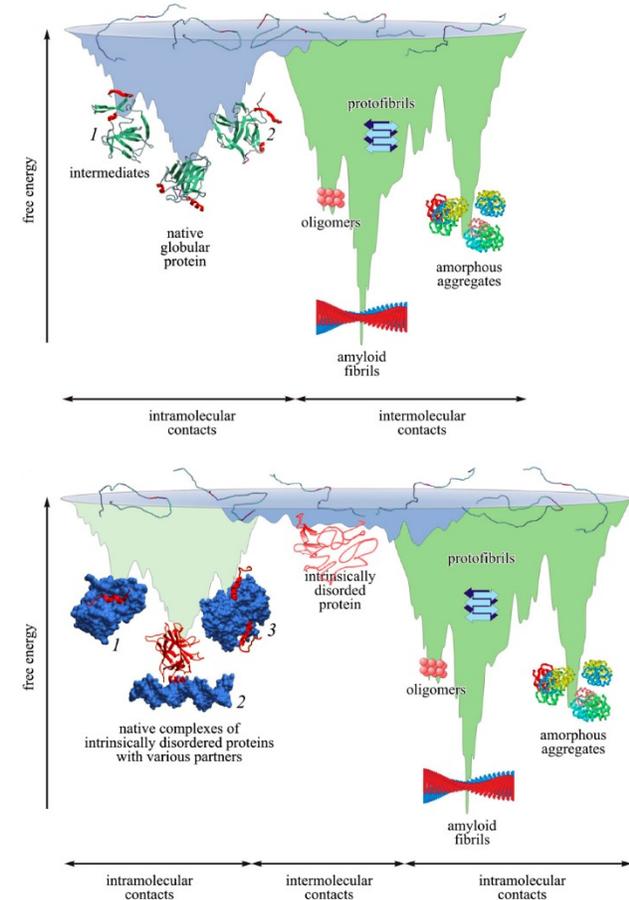
Аминокислотная последовательность полипептидной цепи определяет не только третичную структуру белка, но и путь её достижения



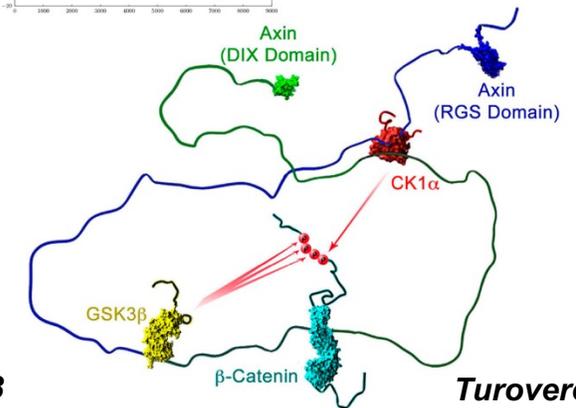
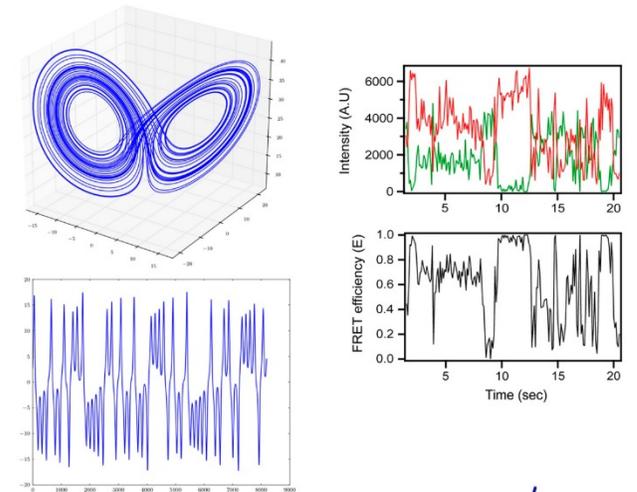
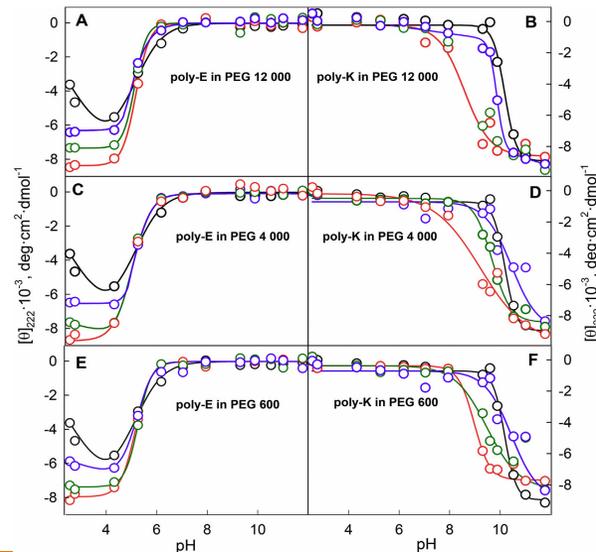
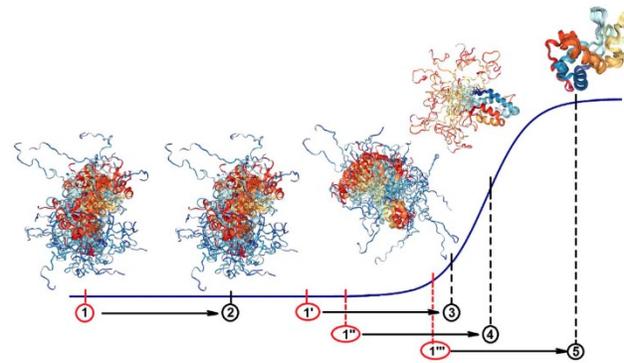
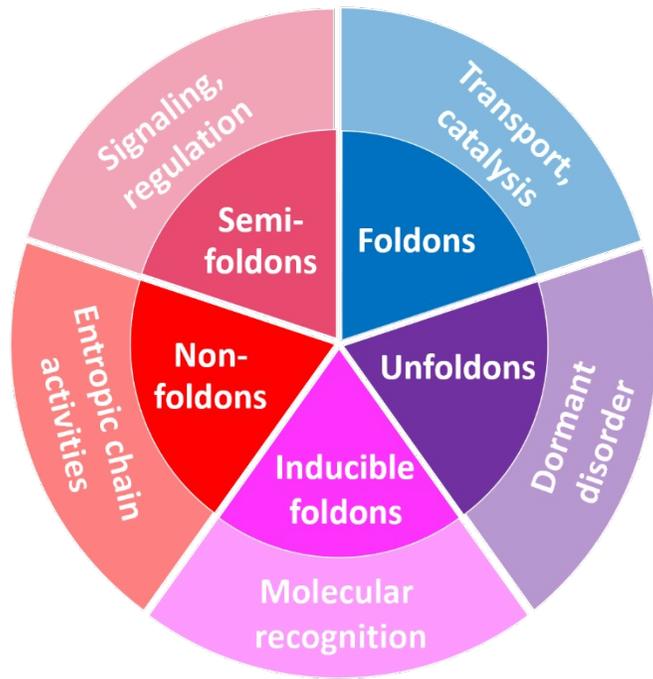
# Смена парадигм в представлениях о белках на рубеже столетий



Uversky et al., 2010



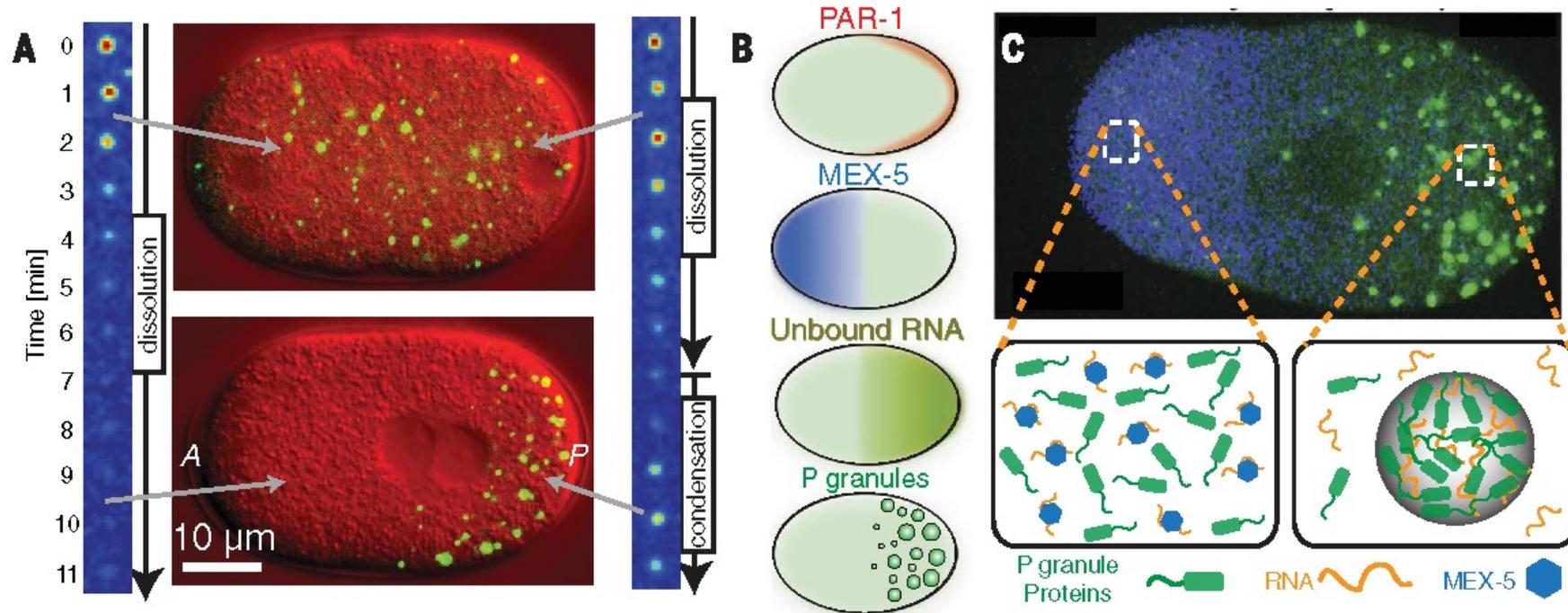
# Мозаичная и стохастическая природа IDPs и IDPRs. Роль макромолекулярного краудинга



Fonin et al., 2018

Turoverov et al., 2019

## Перемещение Р-гранул в зародышевой клетке *C. elegans*



(A). Первоначально равномерно распределенные по клетке Р-гранулы (верхняя панель), со временем концентрируются в задней области клетки нижняя панель (A, anterior; P, posterior)

(B) Набор взаимосвязанных реакционно-диффузионных систем, обеспечивающих сегрегацию Р-гранул: асимметричное распределение PAR-1 и других белков полярности → градиент MEX-5, связывающий РНК, → накопление свободной РНК, необходимой для формирования Р-гранул в задней части → формирование Р-гранул в задней части клетки. (C) Схема поясняющая распределение Р-гранул против градиента MEX-5 через механизм конкуренции РНК

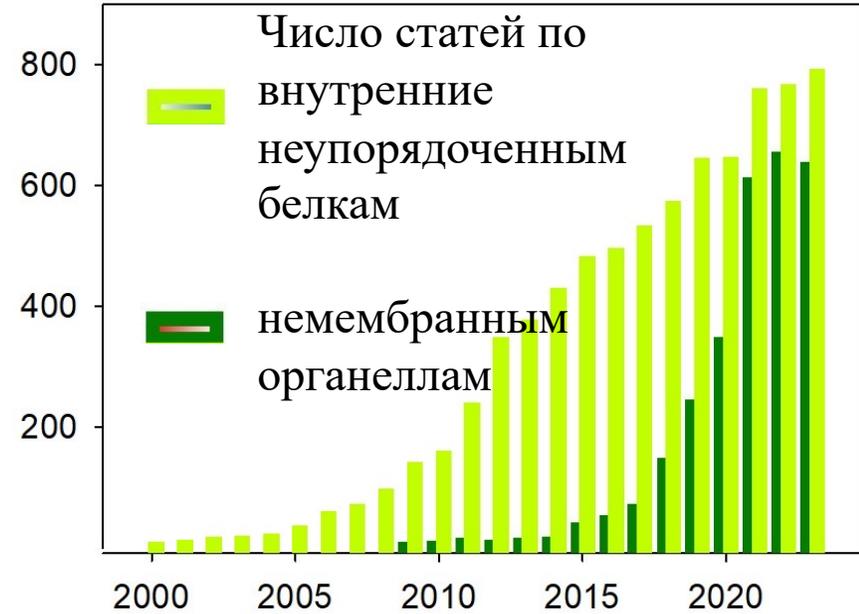
Shin and Brangwynne, Science 357, 1253 (2017)

Лауреаты 19th ежегодной премии Wiley в области биомедицинских наук за прорывные работы в клеточной биологии: исследования образования немембранных органелл



- Немембранные органеллы - динамичные структуры, которые образуются в результате обратимого высоко контролируемого в биологических системах фазового перехода типа жидкость–жидкость;
- Фазовое разделение типа жидкость – жидкость – общий механизм образования всех немембранных органелл клетки, несмотря на различия в их составе, локализации, размере и функциях

Рост числа публикаций



2000. Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. Proteins. 41(3):415-27

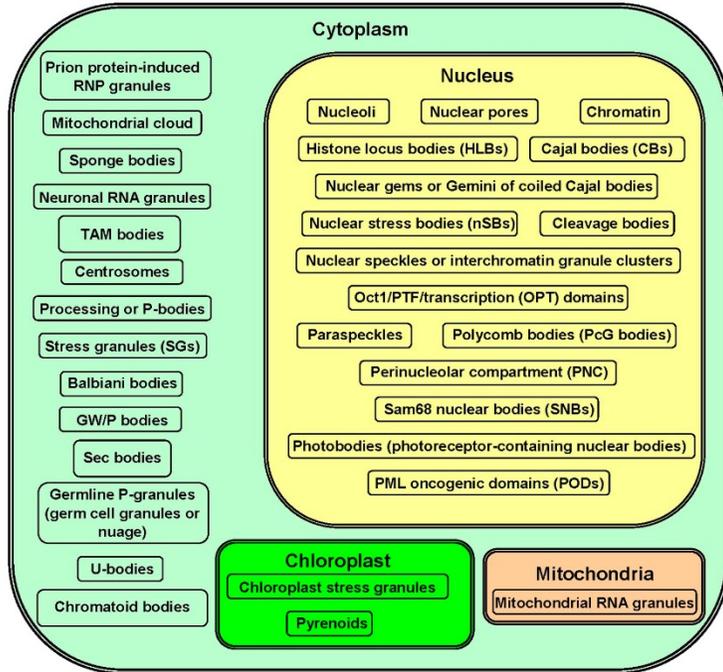
2009. Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoesge C, Gharakhani J, Julicher F, Hyman AA. Science 324(5935):1729–1732.

2011. Hyman AA, Brangwynne CP. Dev Cell. 21(1):14-6.

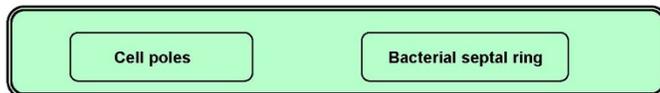
2012. Li P, Banjade S, Cheng HC, Kim S, Chen B, Guo L, Llaguno M, Hollingsworth JV, King DS, Banani SF, Russo PS, Jiang QX, Nixon BT, Rosen MK. Nature 483(7389):336-40.

# Смена парадигм в представлениях о пространственно-временной организации внутриклеточного пространства в 10-х годах 21 века

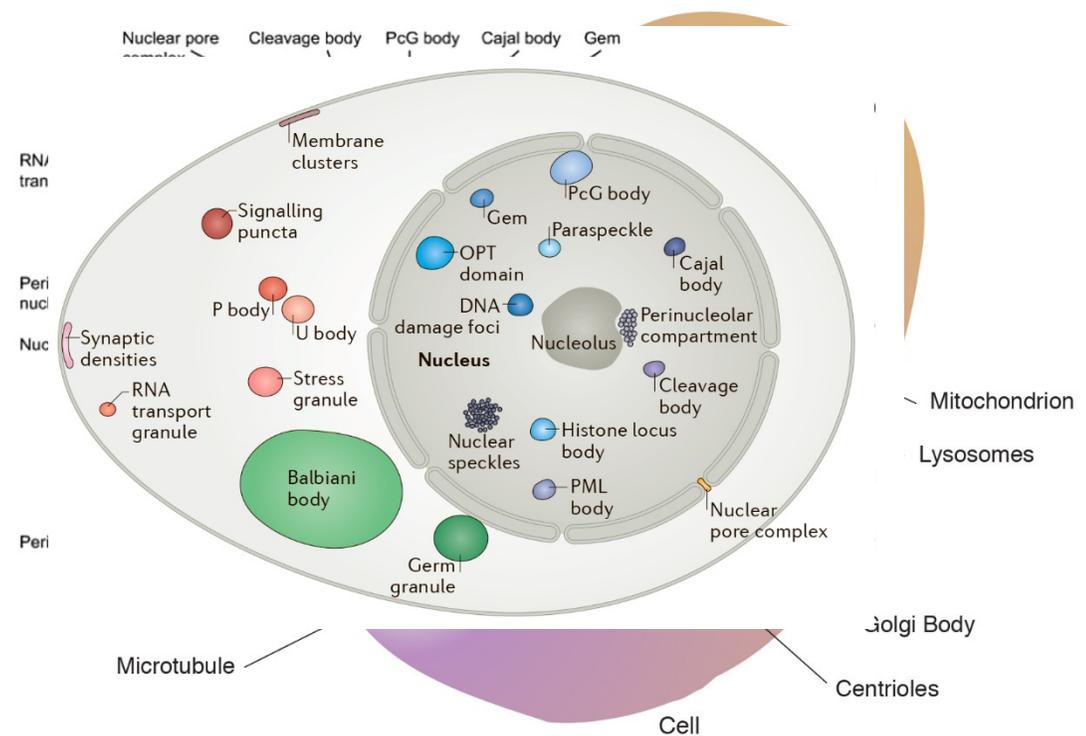
Eukaryotic proteinaceous membrane-less organelles



Prokaryotic proteinaceous membrane-less organelles

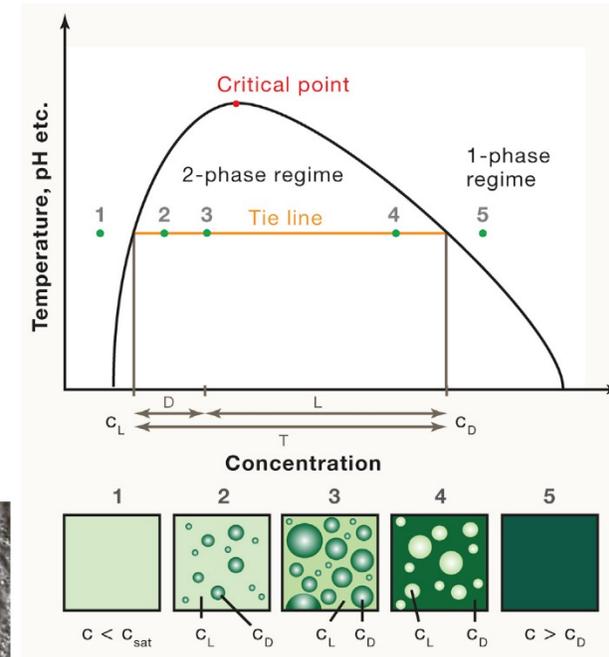
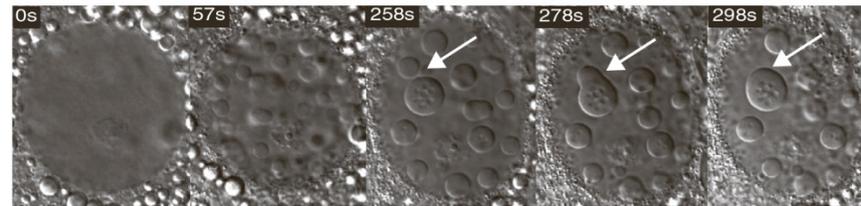
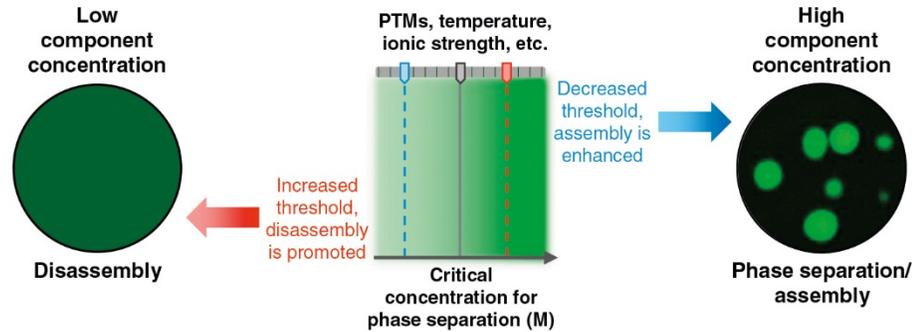
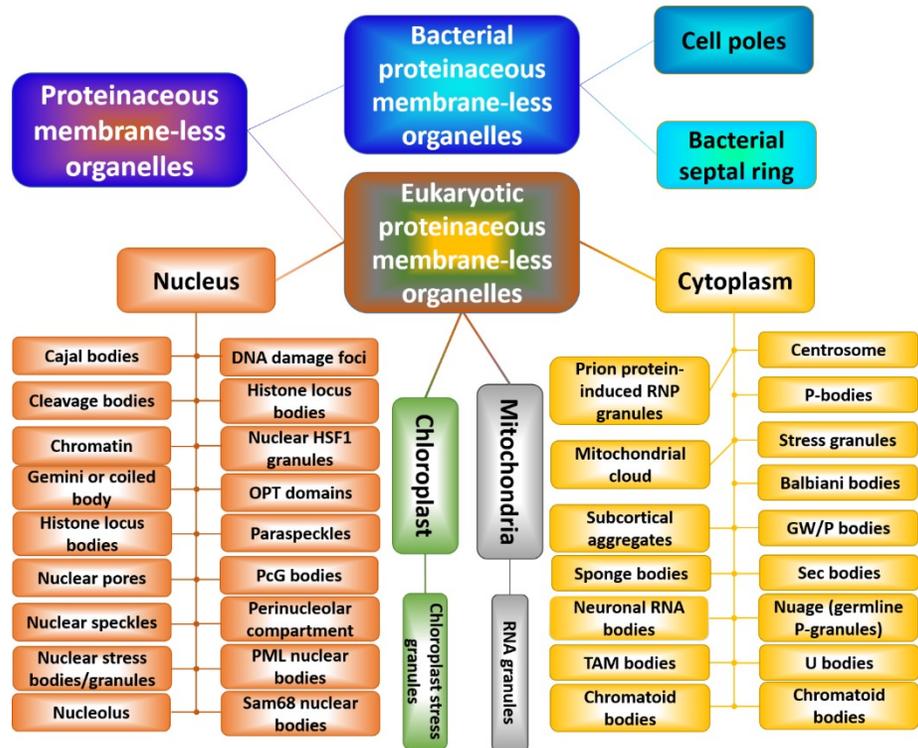


ой  
уктуры



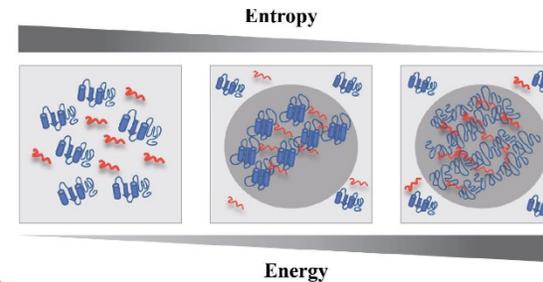
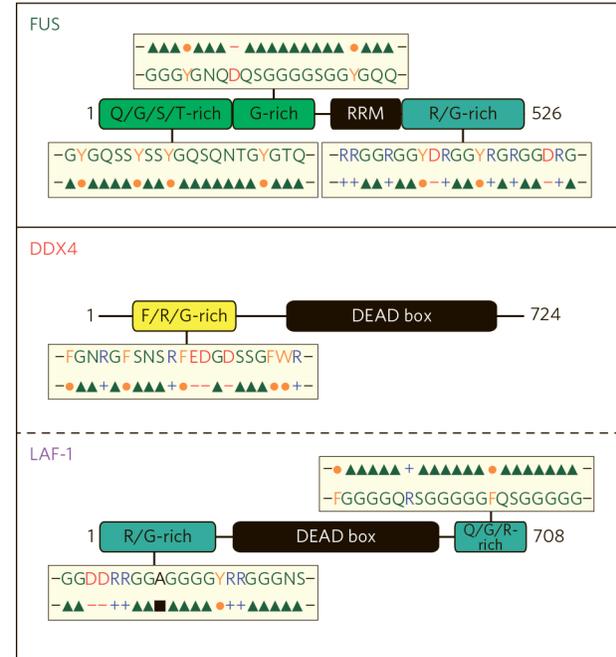
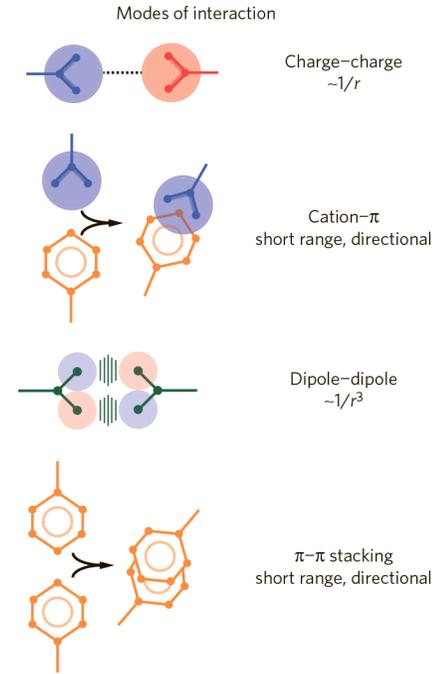
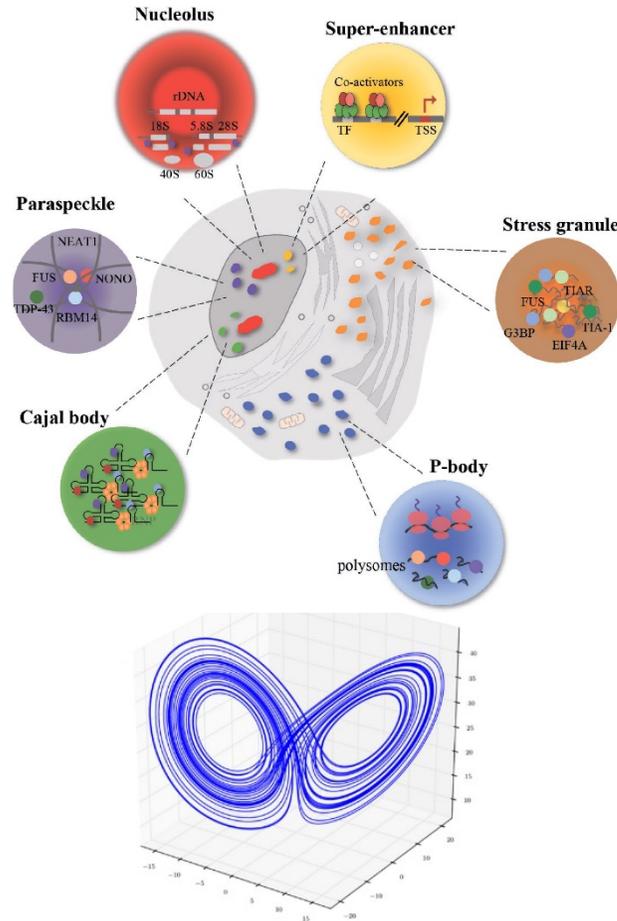
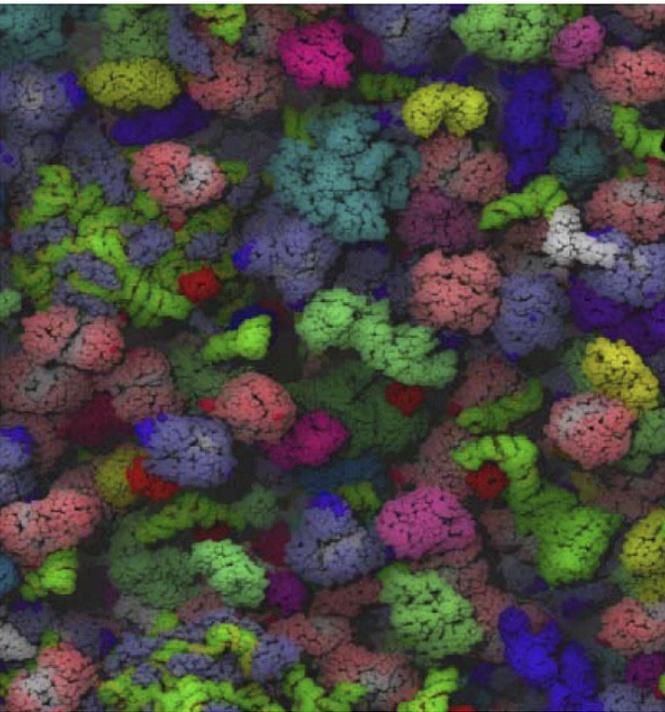
Banani et al., 2017

# Основной принцип организации немембранных органелл – фазовый переход биополимеров типа «жидкость – жидкость»



Alberti et al., 2019

# Физический смысл фазового разделения в биологических системах. Баланс между энтальпией и энтропией

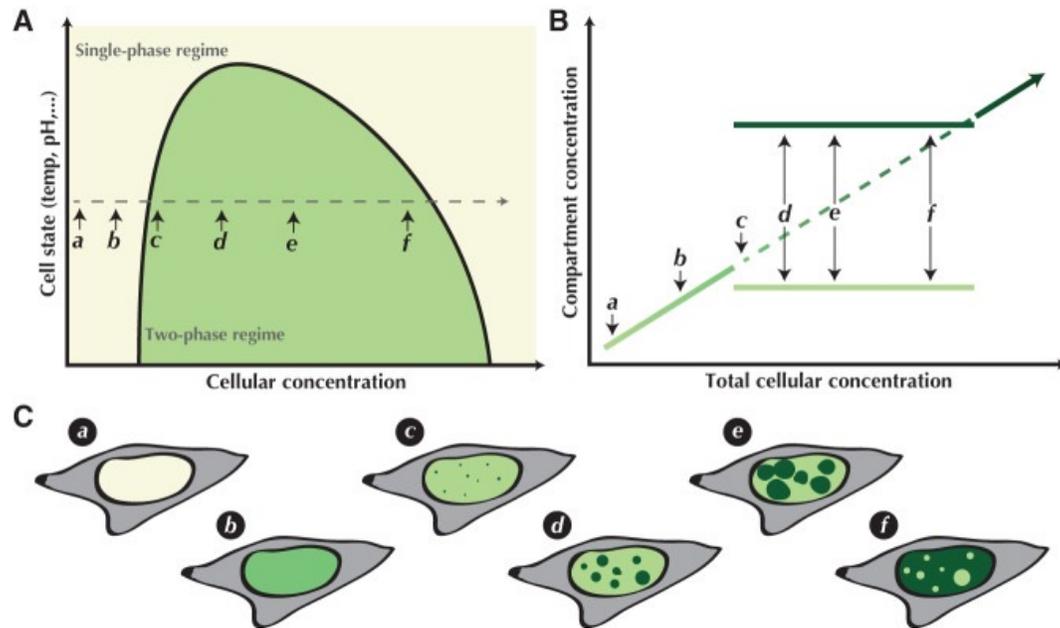


Brangwynne et al., 2015

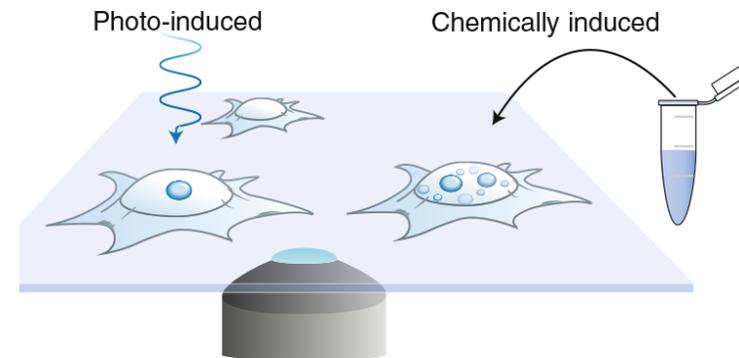
# Как можно управлять фазовым разделением в биологических системах?

Регулировать слабые неспецифические взаимодействия или энтропию системы

Регулировать (или вводить) сильные специфические взаимодействия

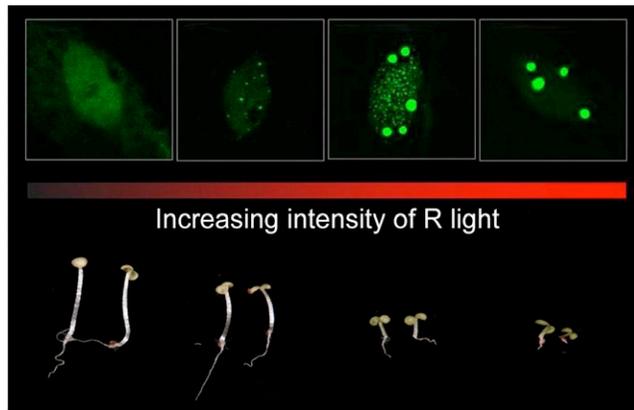
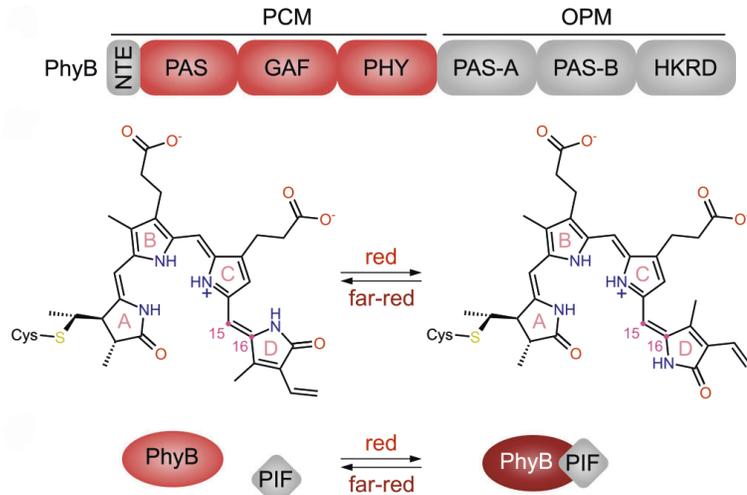


## Специфическая димеризация/олигомеризация

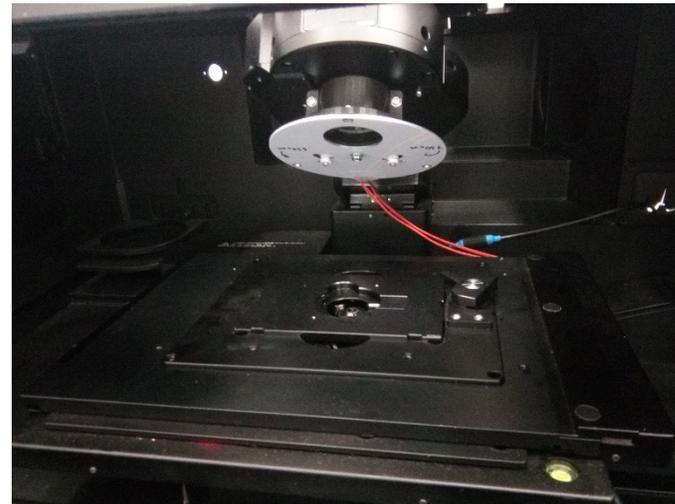
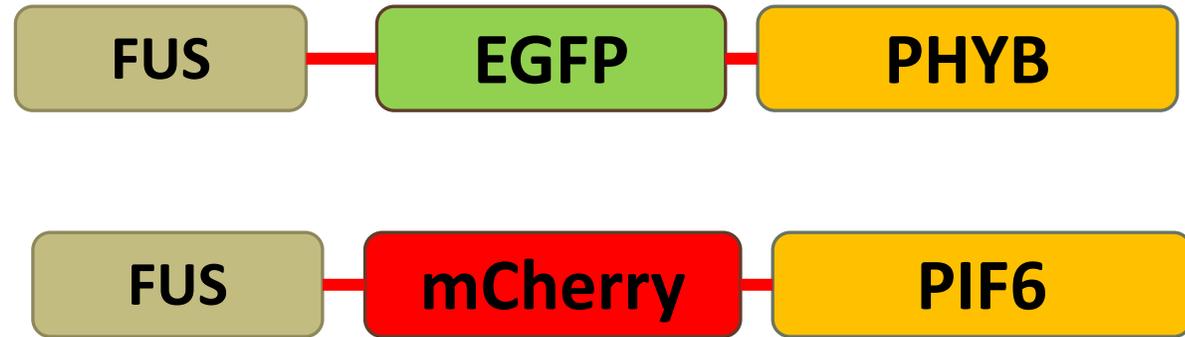


Bracha et al., 2019

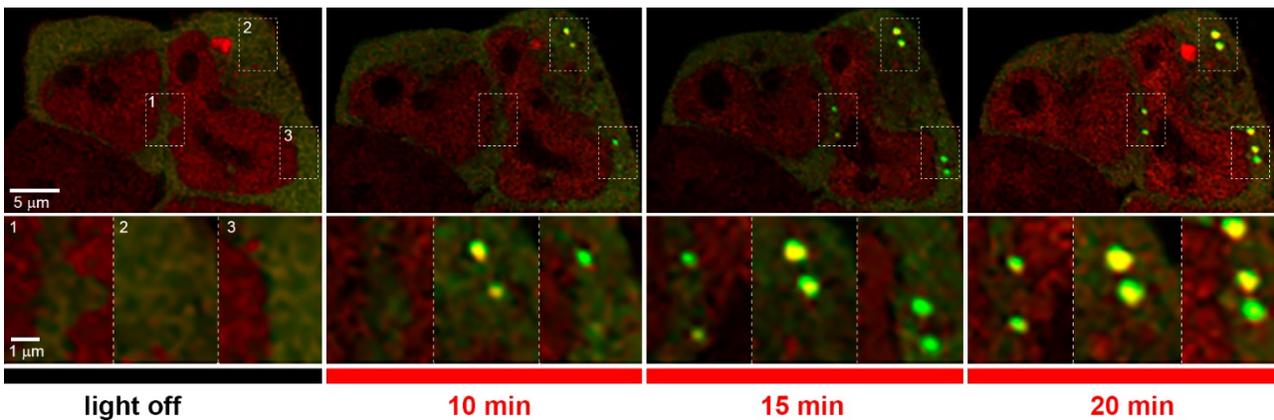
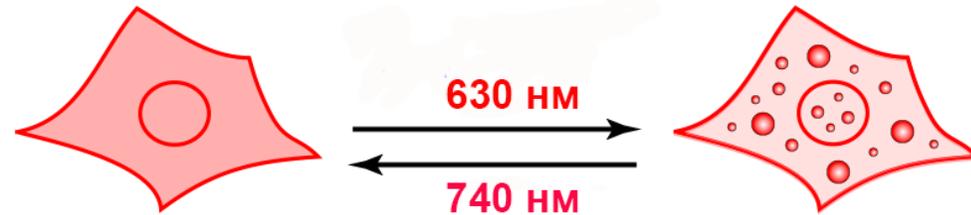
# Оптогенетическая платформа для фазового разделения в биологических системах на основе гетеродимеризации фитохромов



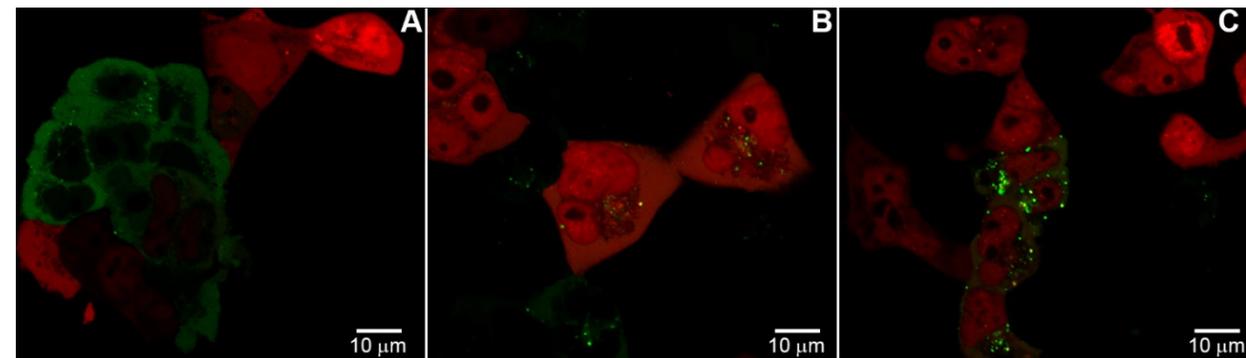
Van Buskrik et al., 2012



# Светозависимое обратимое фазовое разделение



Возникновение и увеличение размеров немембранных органелл в клетках HEK293, обеспечивающих стабильную экспрессию белков FUS-EGFP-PhyB и FUS-mCherry-PIF6, в присутствии 15 мкМ хромофора rhyB – фикоцианобилина (PCB). (Fonin et al., 2021)



Пространственное распределение FUS-EGFP-PhyB и FUS-mCherry-PIF6 белков в клетках HEK293.

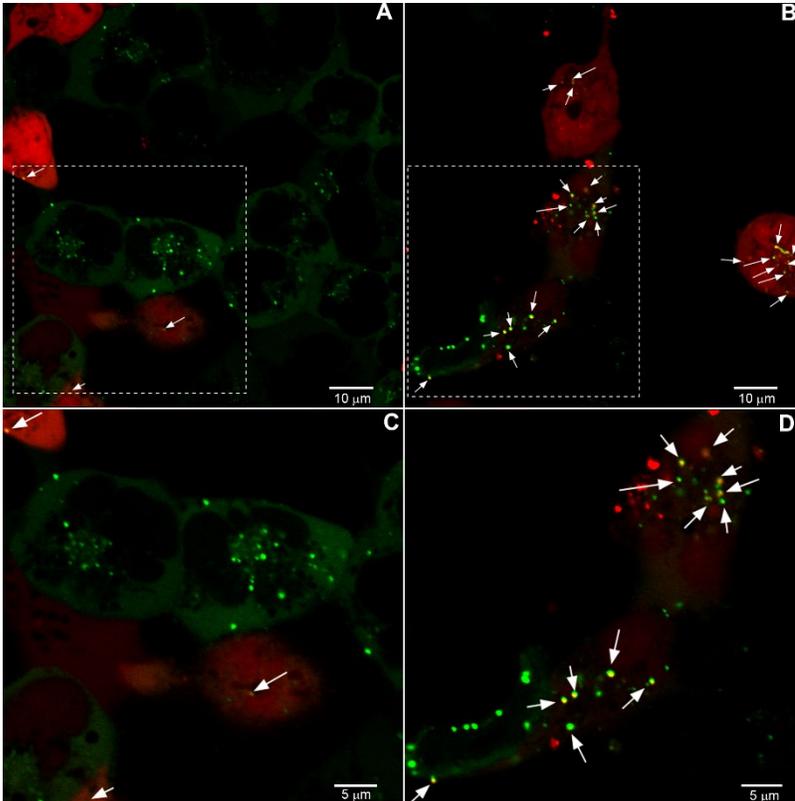
Панель А: В отсутствие кофактора

Панель В: В отсутствие освещения 630 нм светом;

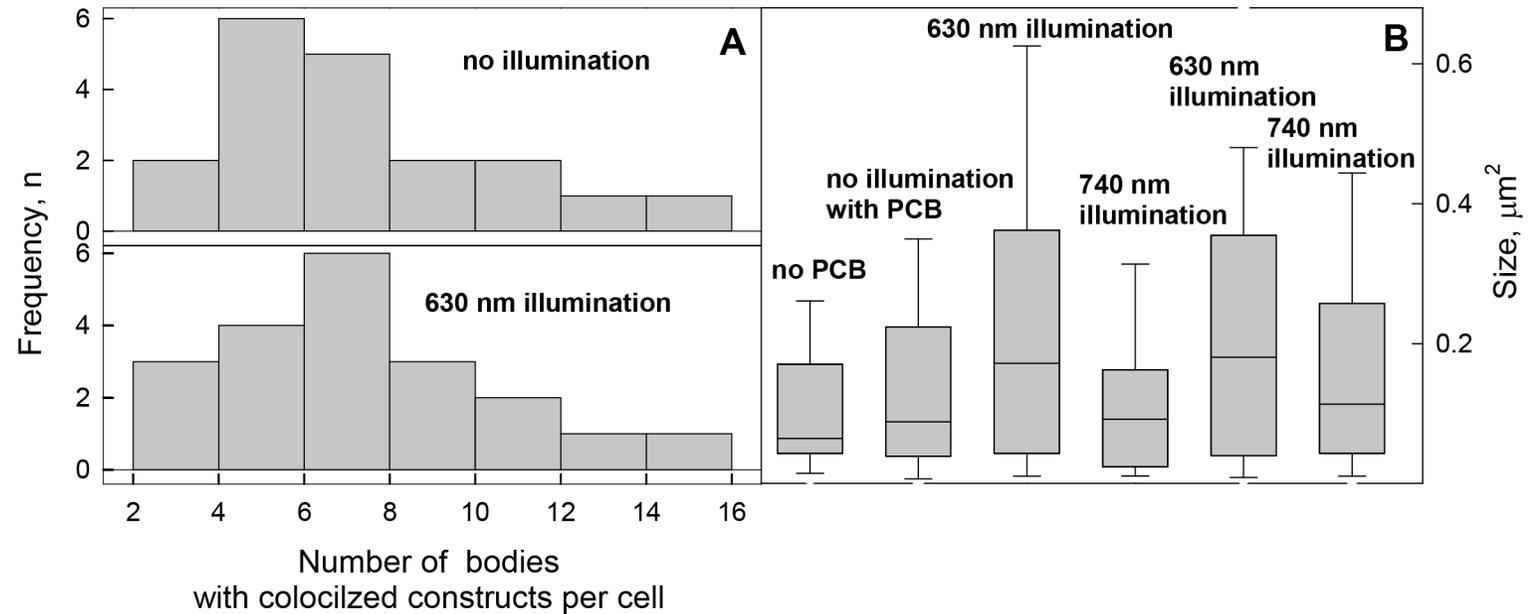
Панель С: После 30 мин. освещения клеток 630 нм светом

(Fonin et al., 2021)

# Размер фотоиндуцируемых немембранных органелл в животных клетках соответствует размеру «маленьких» фототелец в растительных клетках

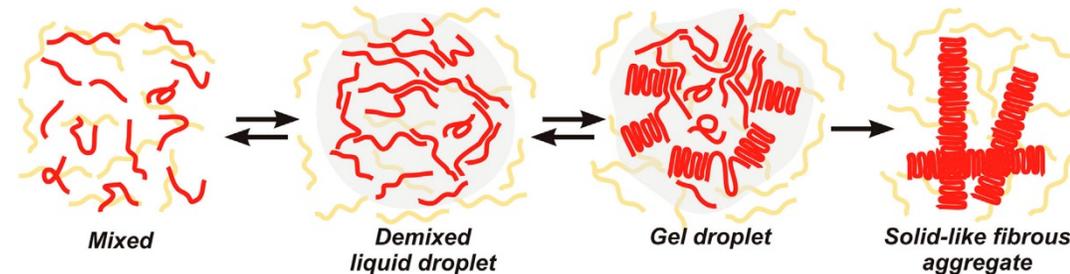
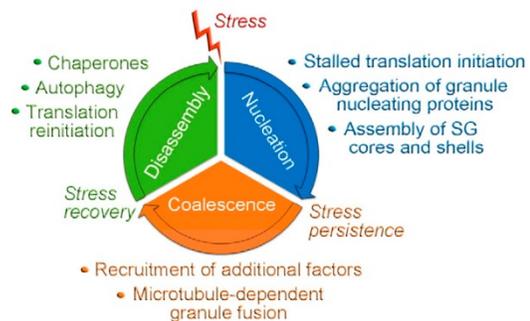
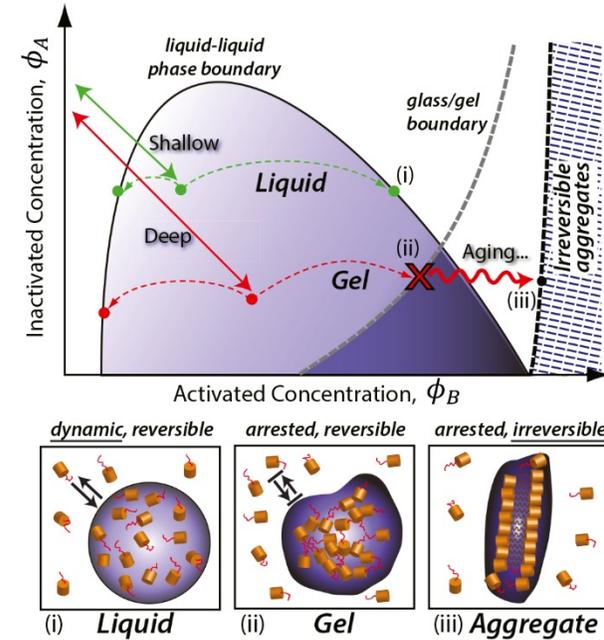
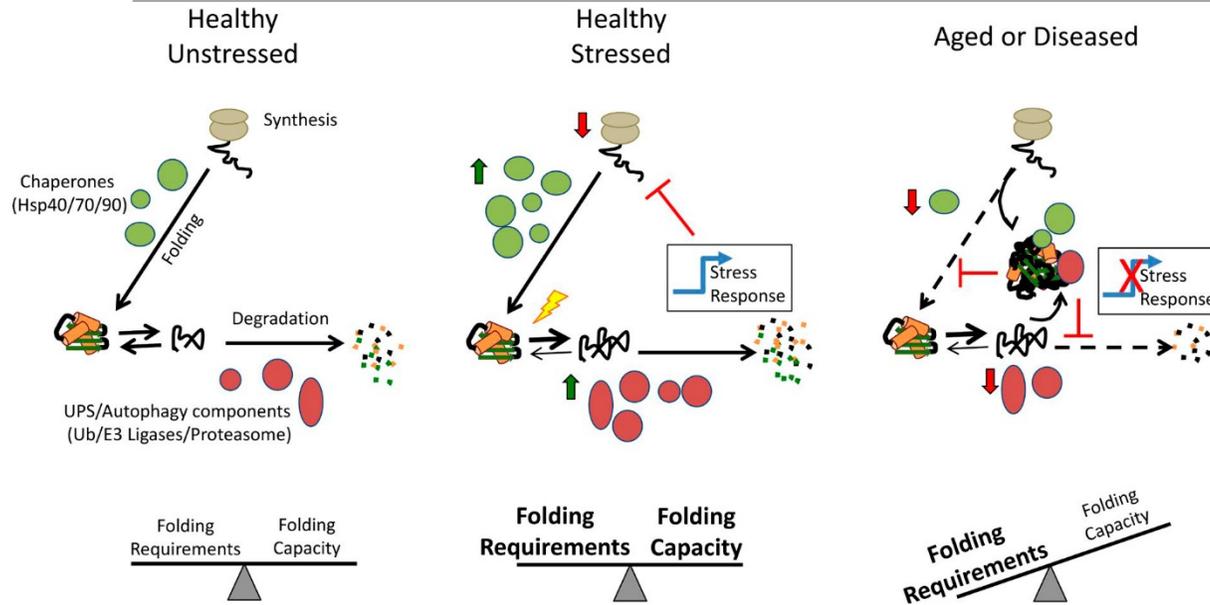


Пространственное распределение FUS-EGFP-PhyB и FUS-mCherry-PIF6 в клетках HEK293 до после 45 мин. Облучения 630 нм светом. (Fonin et al., 2021)

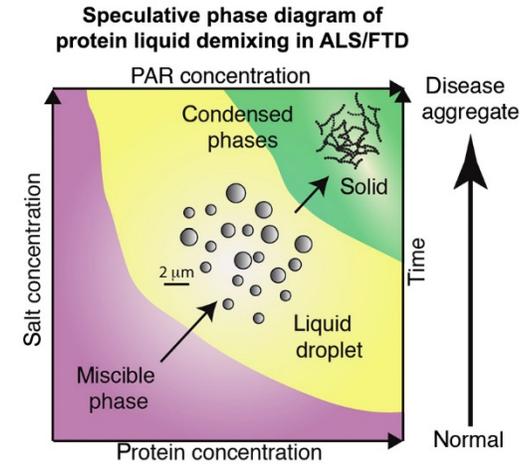
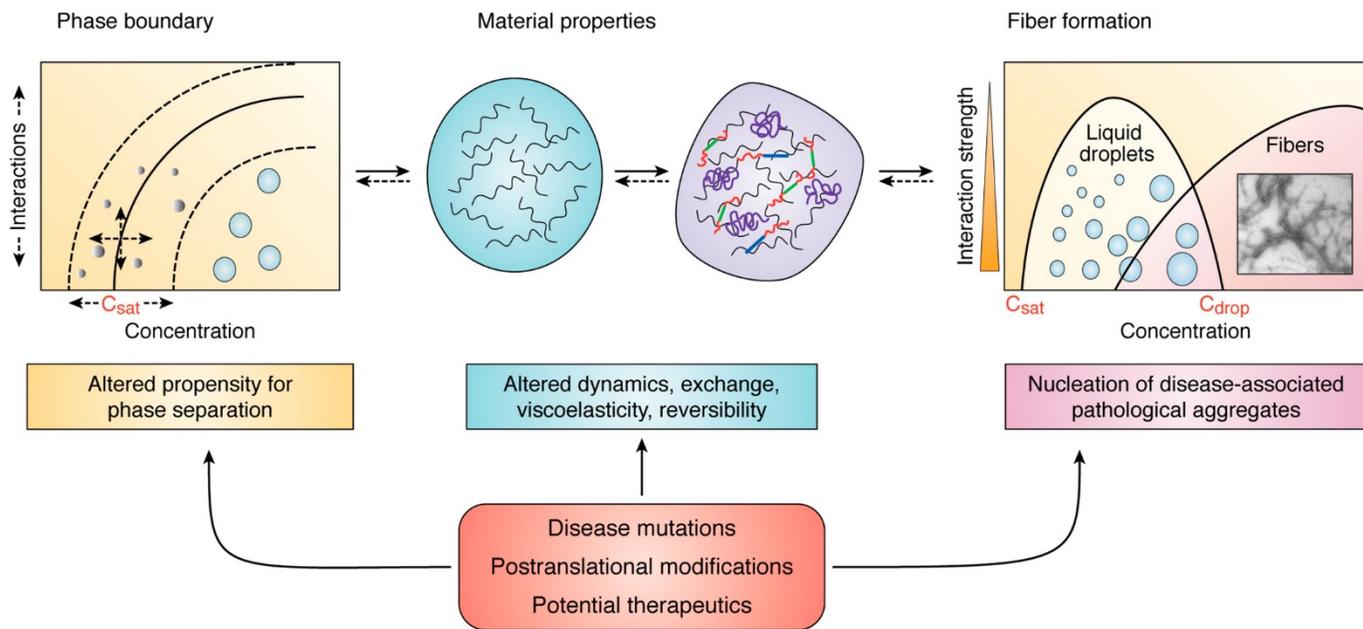


Распределение телец, одновременно содержащих FUS-EGFP-PhyB и FUS-mCherry-PIF6 по количеству телец на клетку и по размеру телец в зависимости от схемы освещения. (Fonin et al., 2021)

# Немембранные органеллы и старение. Стресс-гранулы.



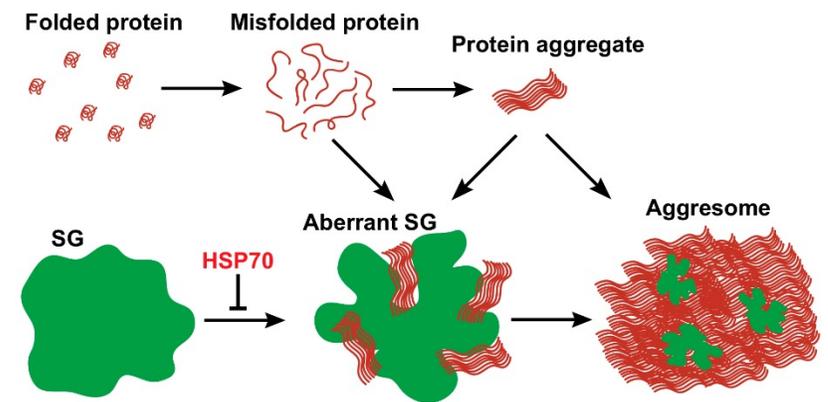
# Немембранные органеллы и нейродегенеративные заболевания



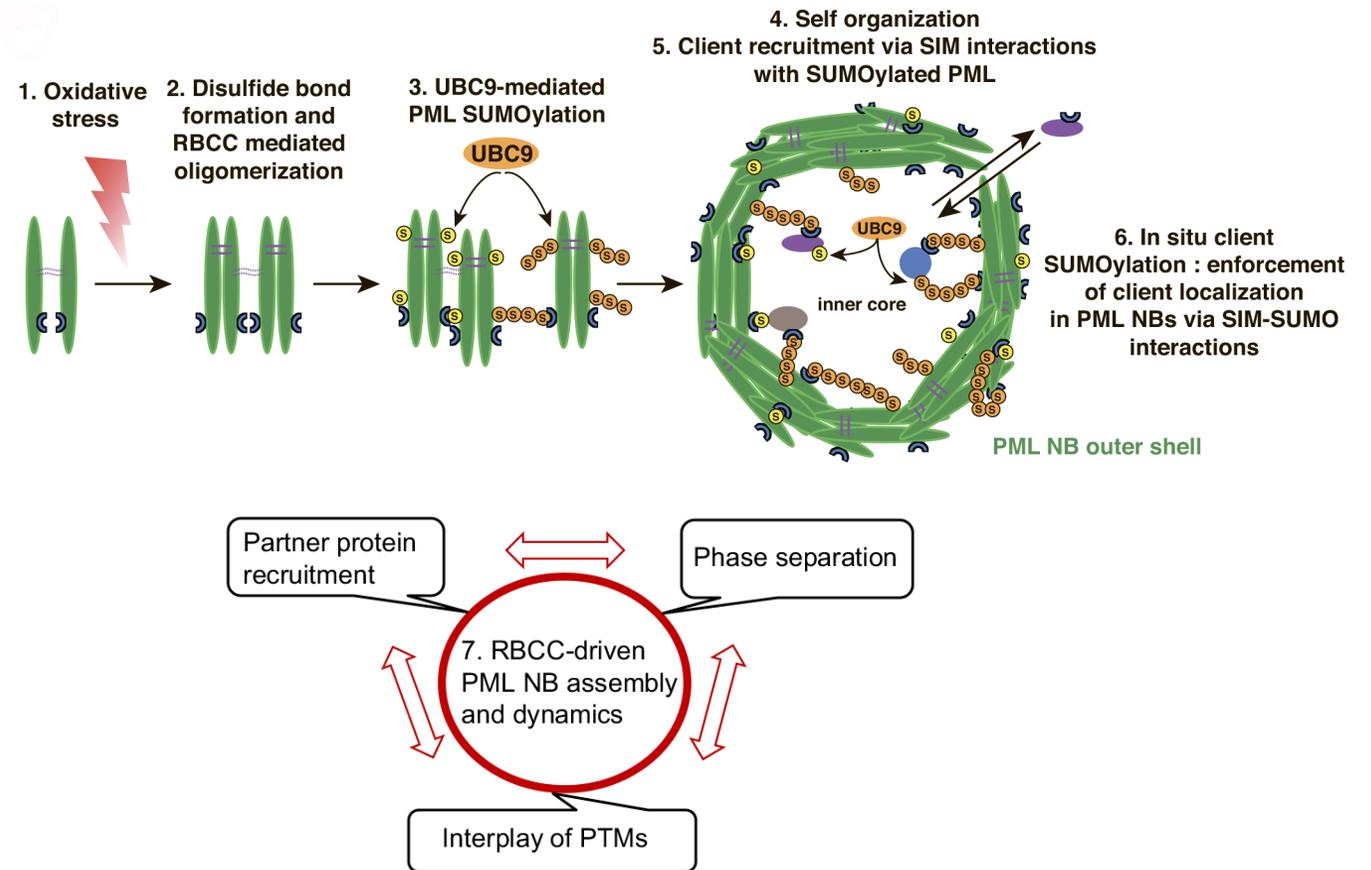
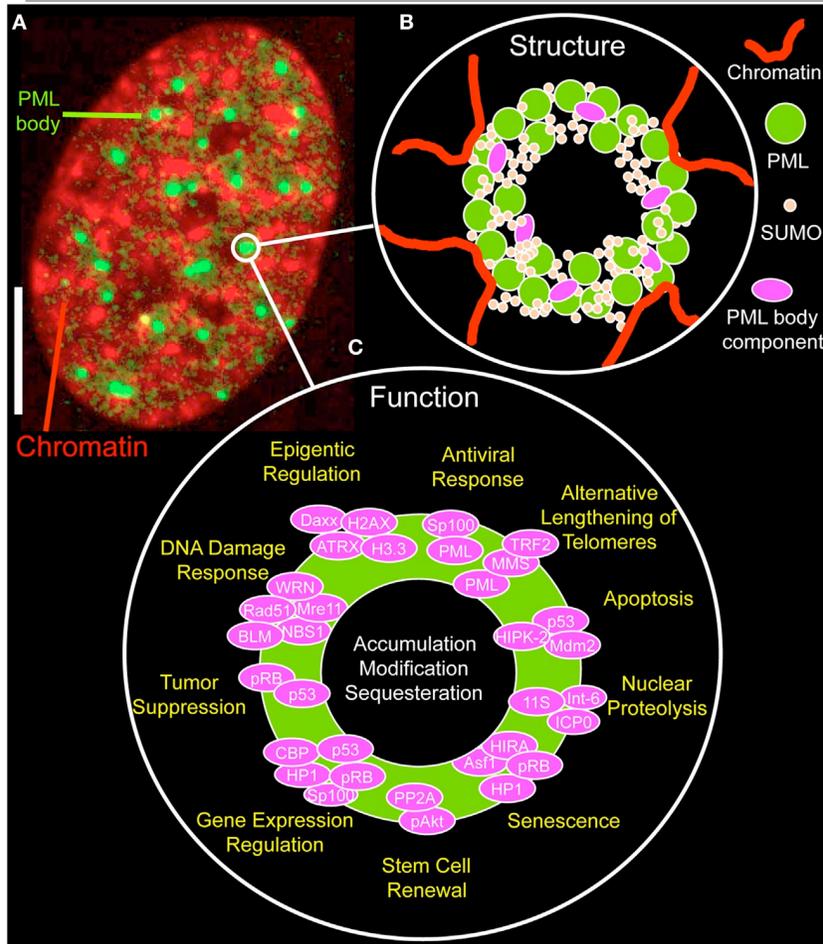
**The ALS/FTD PAR proteome**

Not yet known to aggregate in ALS/FTD		Known to aggregate in ALS/FTD
<i>CST3</i>	<i>MATR3</i>	<i>SQSTM1</i>
<i>DISC1</i>	<i>PFN1</i>	<i>VCP</i>
<i>DYNC1H1</i>	<i>SETX</i>	<i>TDP43**</i>
<i>EWSR1**</i>	<i>SYNE1</i>	<i>FUS**</i>
<i>GARS</i>	<i>TIA1</i>	<i>hnRNPA1**</i>
<i>GRB14</i>	<i>TUBA4A</i>	<i>hnRNPA2/B1</i>
<i>GRN</i>	<i>UNC13A</i>	<i>TAF15**</i>
<i>HFE</i>	<i>VAPB</i>	
<i>KIFAP3</i>	<i>VDR</i>	
<i>LOX</i>		

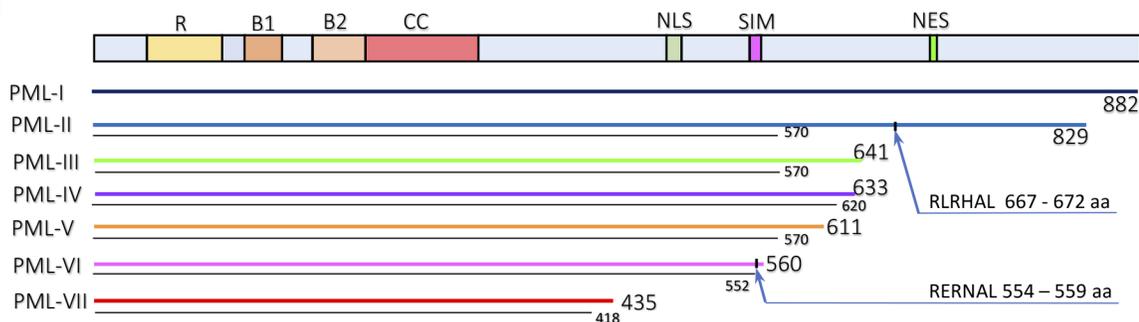
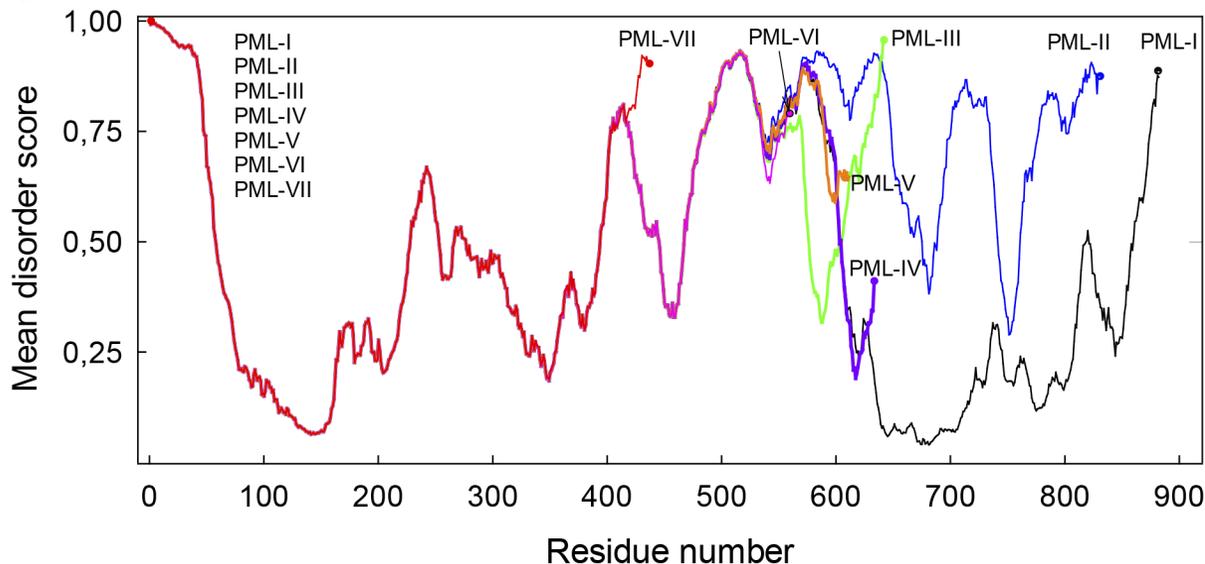
\*\*PAR regulates protein liquid demixing and/or aggregation



# PML-тельца – многофункциональные немембранные органеллы



# Белок PML



Isoform	PML-I	PML-II	PML-III	PML-IV	PML-V	PML-VI	PML-VII
pl C-terminal	5.6	8.1	5.3	3.7	6.1	10.9	8.0
charge at pH 7.0	-3.7	2.3	-2.7	-14.9	-0.8	1.0	0.2

**Анализ аминокислотной последовательности изоформ PML.**

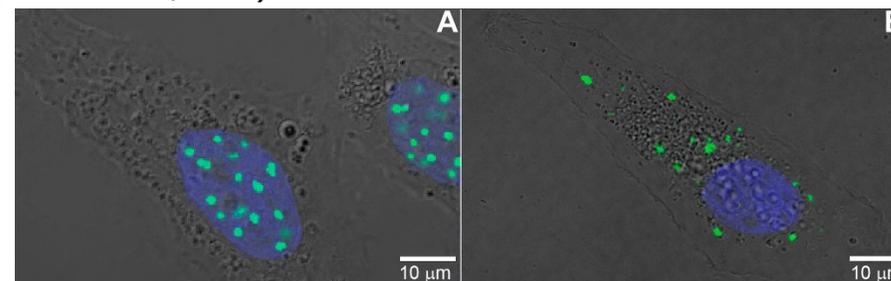
**Оценка неупорядоченности последовательности изоформ PML.**

**Схематичное представление доменной структуры PML.** R – RING домен (45-105 а.о.), (B1 – Beta box1 124-166 а.о.), (B2 – Beta box 2 184-230 а.о.), (CC – Coiled-coil домен, 229-323 а.о.), (NLS - сигнал ядерной локализации, 476-490 а.о.), (SUMOylation sites (SIM – SUMO-interacting motif, 556-562 а.о.), (NES – сигнал ядерного экспорта, ~704-713 а.о., только для изоформы I).

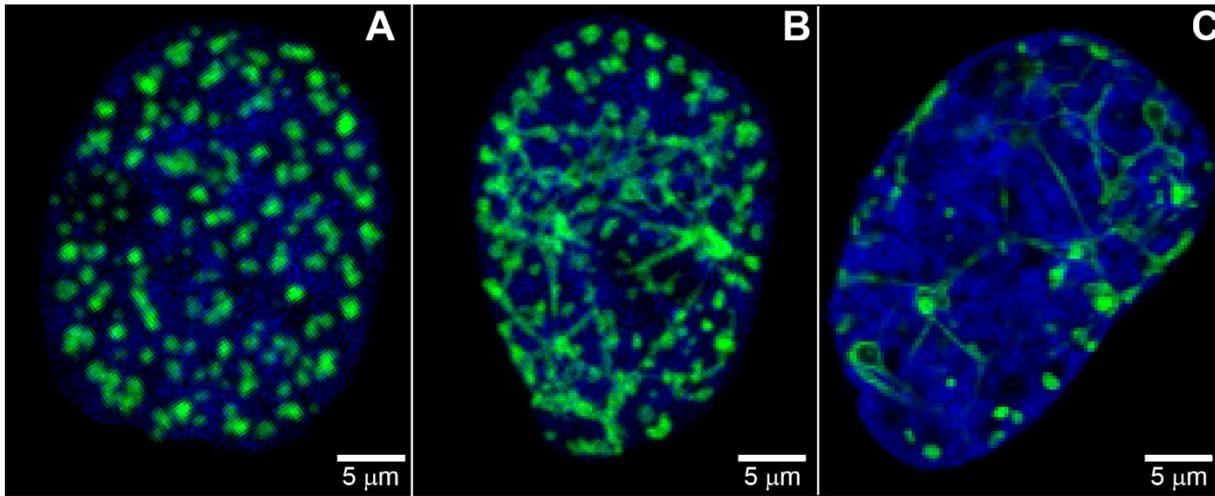
Двойные линии показывают фрагмент белка, совпадающего по составу и длине с изоформой PML-I.

Стрелки указывают положение потенциальных мембран- связывающих доменов (667-672 а.о. в PML-II и 554 а.о. в PML-VI)

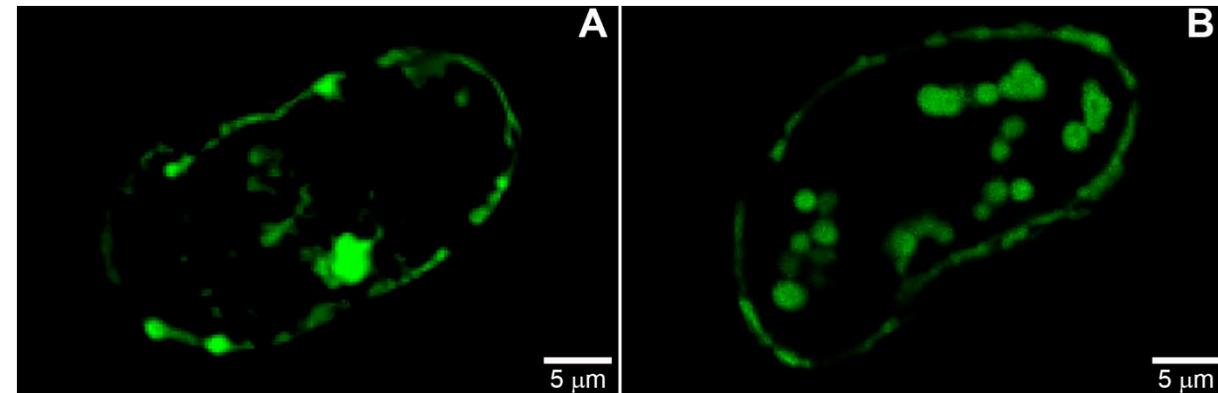
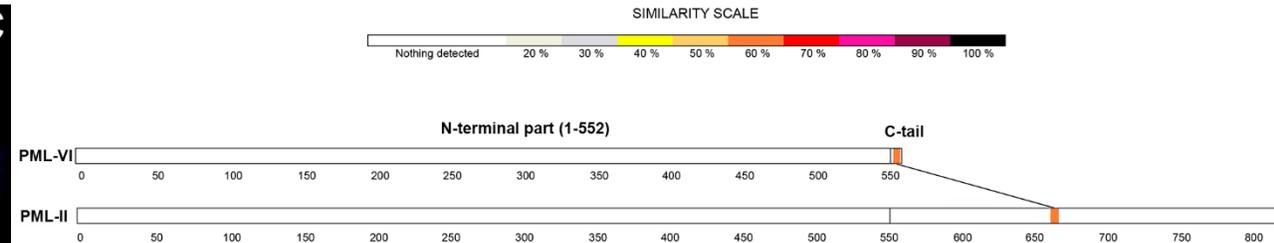
pl of C-концевого участка и заряд при pH 7.0 каждой изоформы. (Fonin et al., 2021)



# Локализация изоформ PML-II и PML-VI в клетках U2OS

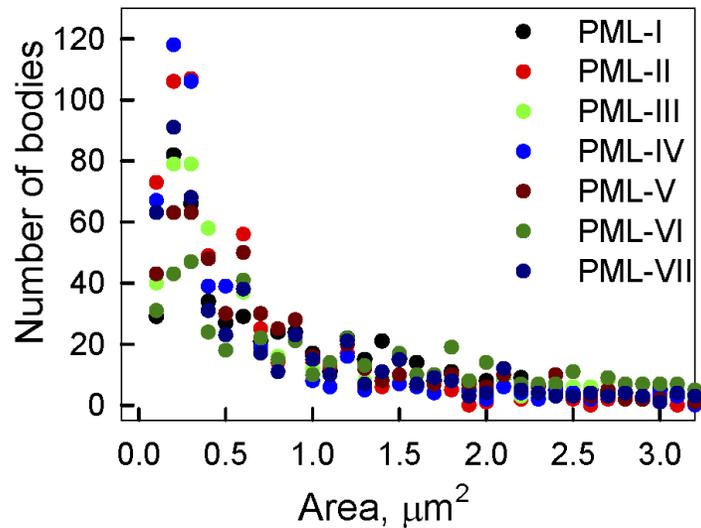


Визуализация перераспределения локализации изоформ EGFP-PML-II от PML-телец к периферии ядра в клетках U2OS с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии EGFP. Ядерная ДНК окрашена красителем DAPI (синий цвет). (Fonin et al., 2021)

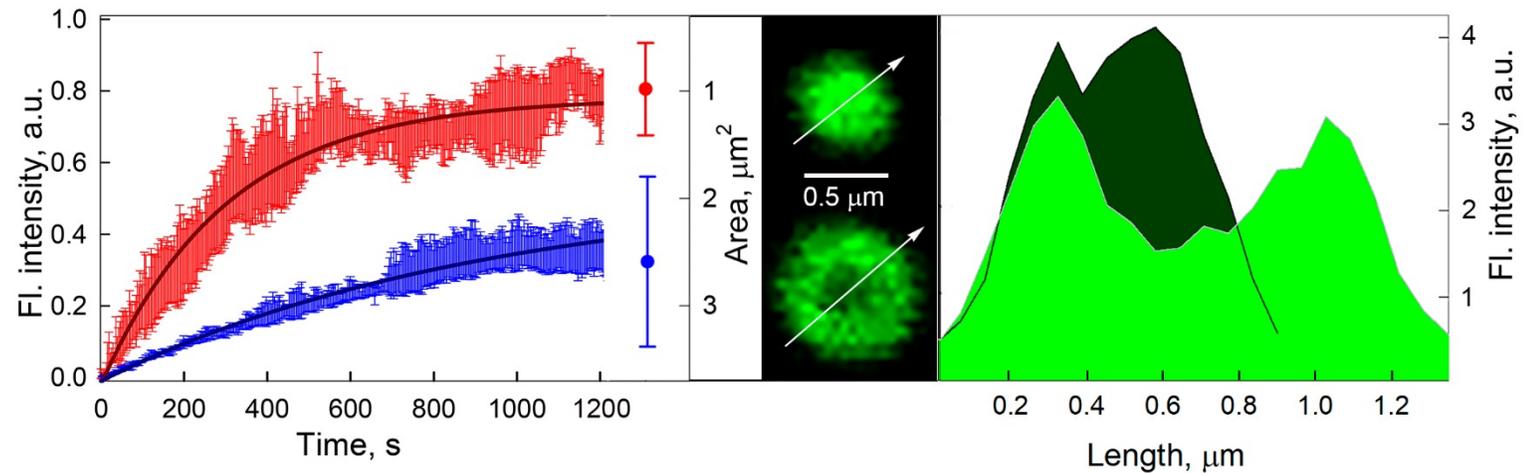


Визуализация я локализации изоформ EGFP-PML-II (A) и PML-VI (B) на периферии ядра в клетках U2OS с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии EGFP. (Fonin et al., 2021)

# PML-тельца не однородны по размеру и топологии и динамике обмена PML с нуклеоплазмой



Распределение PML-телец по размеру в клетках U2OS, определенное с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии каждой из форм PML.  
(Fonin et al., 2021)



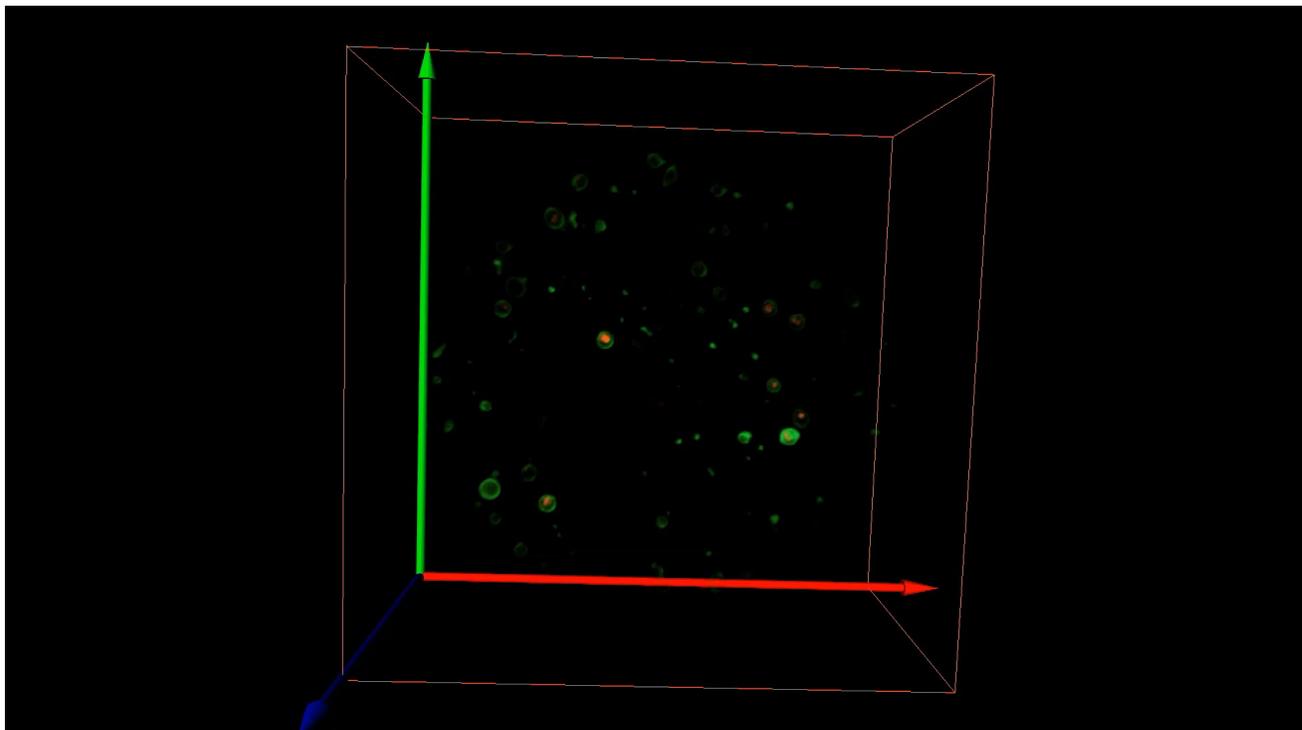
Зависимость морфологии PML-телец от их размера.

Панель А: Распределение PML-телец по размеру в клетках U2OS, определенное с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии.

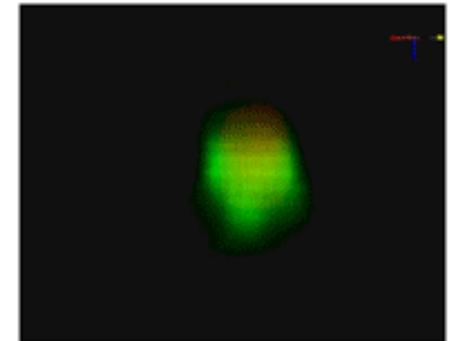
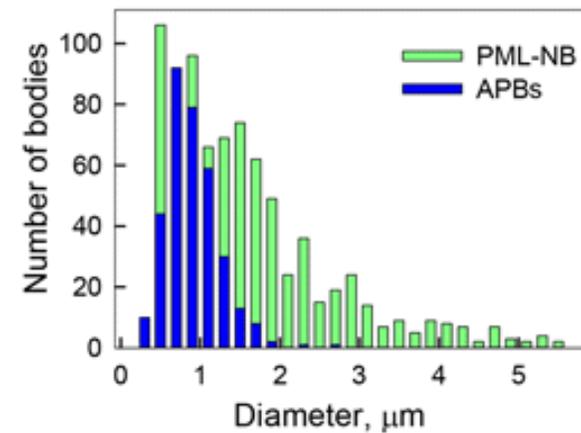
Панель В: Микрофотографии PML-телец сферической и тороидальной топологии

Панель С: Распределение интенсивности флуоресценции EGFP для PML-телец со сферической (темно-зеленый цвет) и тороидальной (зеленый цвет) морфологией, изображение которых представлено на Панели В. (Fonin et al., 2021)

# PML-тельца, ассоциированные с процессом альтернативного удлинения теломер

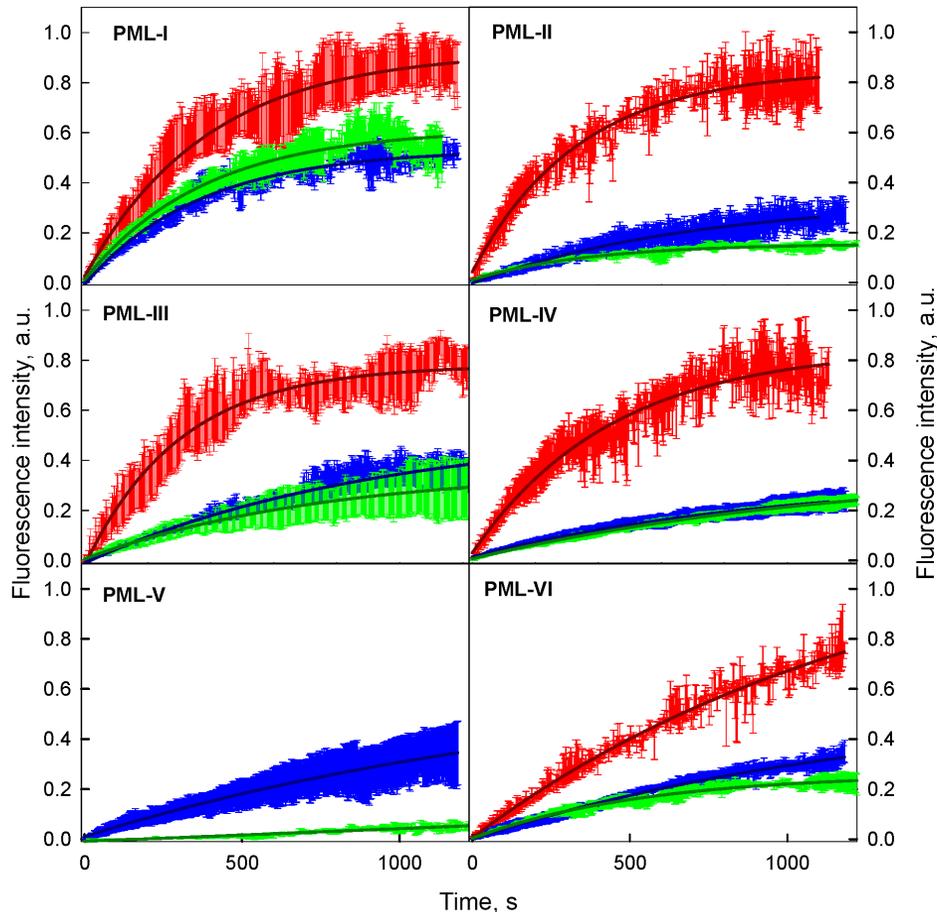


Визуализация распределения PML и TRF1 в клетках U2OS при коэксперсии этих белков использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии EGFP и TagRFP. (Fonin et al., 2021)



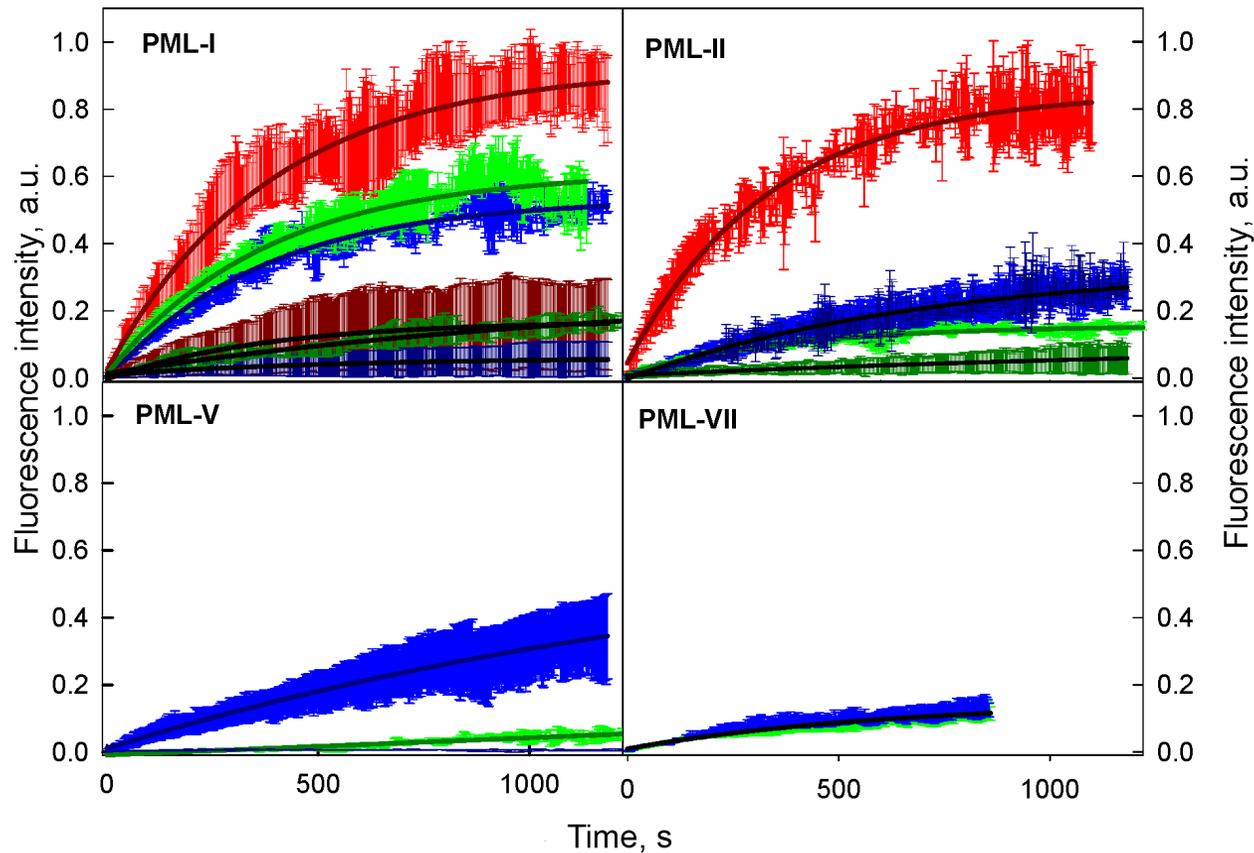
Распределение PML-телец, колокализованных с TRF1 по размеру в клетках U2OS, определенное с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. Визуализация PML-телец, колокализованных с TRF1 в клетках U2OS, определенное с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. (Fonin et al., 2021)

# Какова роль неспецифических взаимодействий в образовании нормальных и патологических PML-телец?



Кривые восстановления флуоресценции EGFP после фотообесцвечивания ядерных изоформ PML в составе PML-телец в клетках U2OS. Красным цветом обозначены кривые фотовосстановления изоформ PML в составе «маленьких» PML-телец, синим – кривые фотовосстановления изоформ PML в составе «крупных» PML-телец, зеленым - кривые фотовосстановления изоформ PML в составе APBs. Сплошными кривыми представлена аппроксимация данных восстановления флуоресценции EGFP после его фотообесцвечивания в рамках моноэкспоненциального приближения. Стандартное отклонение данных представлено «усами» ошибок соответствующего цвета. (Fonin et al., 2021)

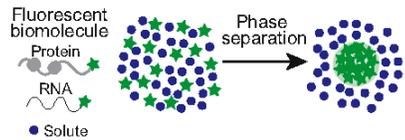
# Роль окислительного стресса в образовании PML-телец



Влияние острого окислительного стресса на динамику обмена изоформ PML с нуклеоплазмой/цитоплазмой в клетках U2OS. Красные, синие и зеленые кривые аналогичны представленным на предыдущем слайде. Темно-красным цветом обозначены кривые фотовосстановления изоформ PML в составе «маленьких» PML-телец в присутствии 500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, темно-синим цветом обозначены кривые фотовосстановления изоформ PML в составе «крупных» PML-телец в присутствии 500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, темно-зеленым - кривые фотовосстановления изоформ PML в составе APBs в присутствии 500 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Сплошными кривыми представлена аппроксимация данных FRAP в рамках моноэкспоненциального приближения. Стандартное отклонение данных представлено «усами» ошибок соответствующего цвета. (Fonin et al., 2021)

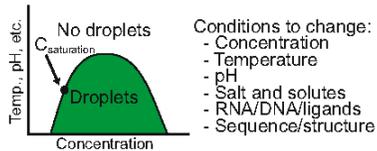
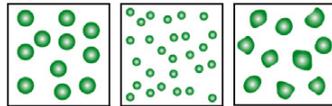
# Методы исследования немембранных органелл

## Phase separation assays

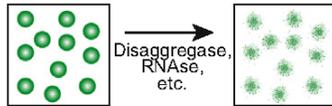


### Droplet properties

Number, size, and morphology

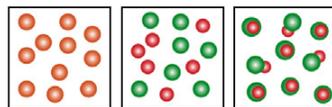


### Dissolution

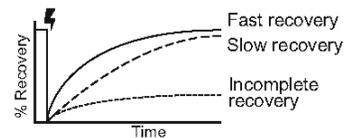
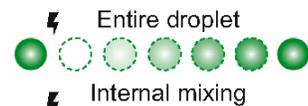


### Multicolor labeling

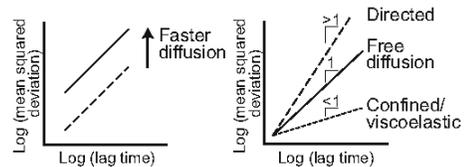
Miscibility, immiscibility, or multiphase architecture



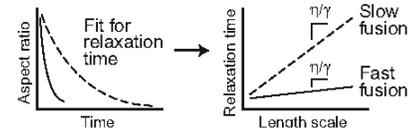
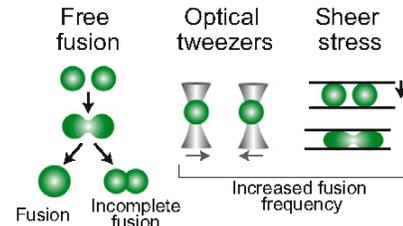
## FRAP



## Microrheology



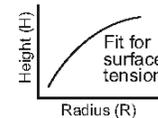
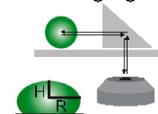
## Droplet fusion



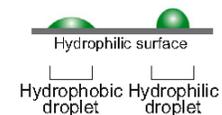
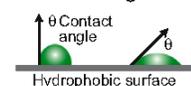
$(\eta/\gamma)$ : inverse capillary velocity (viscosity/surface tension)

## Surface tension

### Right angle imaging



### Surface wetting



Спасибо за внимание

---