

БИОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНДЕНСАТЫ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ, МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ

©2024 г. Н. А. ГОРШЕНЕВА¹, Ю. В. СОПОВА¹,
В. В. АЗАРОВ¹, А. В. ГРИЗЕЛЬ^{2,*},
А. А. РУБЕЛЬ^{1,*}

¹ Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия;

² School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia, USA

I. Введение. II. Биомолекулярные конденсаты, их роль в клетке. III. Структура биоконденсатов. IV. Особенности белков, образующих биоконденсаты. V. Нуклеиновые кислоты и образование биоконденсатов. VI. Методы изучения биомолекулярных конденсатов VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Один из способов обеспечить высокую скорость и специфичность химических реакций в клетке – компартментализация ферментов и их мишеней. Традиционно, под компартментами эукариотической клетки понимают систему мембранных органелл, сообщающихся друг с другом с помощью везикулярного транспорта [1]. Однако существует и другой способ быстрой, регулируемой, обратимой компартментализации в клетке – образование немембранных органелл [2]. Немембранные органеллы отличаются по локализации, составу

Принятые сокращения: РНП – рибонуклеопротеиновые, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, IDR – неупорядоченные участки (intrinsically disordered regions), iLSA – внутриядерные жидкие сферические аннулы (intranuclear liquid spherical annuli), LCD – домены низкой сложности (low complexity domains), LLPS – разделение фаз на границе двух жидкостей (англ. liquid-liquid phase separation).

* ** Адрес для корреспонденции: a.rubel@spbu.ru; anastasiia.grizel@biosci.gatech.edu

Работа выполнена за счёт средств гранта Российского научного фонда № 20-14-00148-П (А.А. Рубель).

и физико-химическим свойствам, что приводит к сосуществованию различных терминов для их описания: РНК-гранулы, рибонуклеопротеиновые (РНП) тельца, компартменты, безмембранные органеллы [3, 4]. В 2017 г. Салман Банани ввел термин «биомолекулярные конденсаты», отражающий общие черты подобных структур [4]. В данном обзоре обобщены данные об известных на текущий момент биомолекулярных конденсатах эукариот, их структуре и функциях в клетках. Также описаны подходы, применяемые для изучения структуры, динамики и функций биомолекулярных конденсатов и их возможных взаимодействий с другими клеточными компонентами.

II. БИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНДЕНСАТЫ, ИХ РОЛЬ В КЛЕТКЕ

Согласно определению Салмана Банани, биомолекулярные конденсаты (биоконденсаты) – это органеллы клетки, не окруженные мембраной, более плотные, чем цитоплазма, и содержащие белки и нуклеиновые кислоты [4]. Регулируемая и обратимая конденсация обеспечивает пространственное взаимодействие белков, выполняющих одну и ту же функцию. Это способствует повышению скорости и точности химических реакций.

Биоконденсаты образуются в результате сочетания процессов перколяции (просачивание жидкости через пористые/гранулированные материалы) [5] и фазового разделения; эти процессы называют «разделением фаз на границе двух жидкостей» (англ. *Liquid-liquid Phase Separation, LLPS*) [2, 4, 6]. При достижении ключевыми компонентами концентрации насыщения однофазная система разделяется на двухфазную [7]. Образуется более концентрированная фаза, содержащая большее количество определенных белков и нуклеиновых кислот – собственно конденсаты, и менее концентрированная – раствор, цитоплазма или нуклеоплазма (см. обзоры [6, 8]). Обе фазы сосуществуют вместе внутри клетки, обмениваются содержимым, но не смешиваются (рис. 1). Разделение фаз чувствительно к мельчайшим изменениям физико-химических характеристик среды, таким как температура, pH, осмотическое давление и уровень АТФ в клетке (см. обзор [9]). Эти изменения являются следствием текущего состояния метаболизма [10]. Таким образом, образование биомолекулярных конденсатов позволяет клеткам быстро реагировать на изменения окружающей среды.

Многие немембранные органеллы известны уже давно. Например, Р-гранулы были впервые обнаружены в клетках зародышевой линии

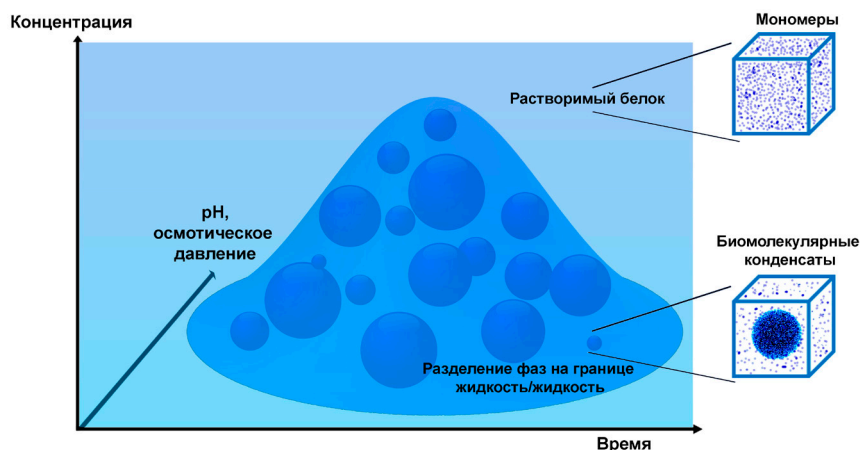


Рис. 1. Образование биоконденсатов в результате разделения фаз на границе двух жидкостей.

Вероятность LLPS зависит от времени, концентрации и других параметров системы. Объяснение в тексте статьи.

Caenorabditis elegans в 1983 году при помощи электронной и флуоресцентной микроскопии [11, 12]. Р-гранулы содержат мРНК и белки и участвуют в посттранскрипционной регуляции материнских мРНК в клетках зародышевой линии [13]. Было показано, что гранулы способны сливаться друг с другом, обмениваться компонентами с цитоплазмой, легко деформируются и обладают вязкостью, что указывает на их жидкую природу [14]. Позже подобные свойства были показаны и для других органелл, таких как ядрышко, стресс-гранулы, Р-тельца и другие [15, 16].

Биоконденсаты выявлены как в цитоплазме, так и в ядерном пространстве. В цитоплазме некоторые биоконденсаты, такие как стресс-гранулы [17–20] и Р-тельца [21–23], играют роль в ответе клетки на стрессовые воздействия. Они формируются в результате фазового разделения мРНК и белков и могут служить для временного хранения и регуляции мРНК в условиях стресса. В ядерном пространстве биоконденсаты, такие как ядрышко [24], тельца Кахала [25–27], спеклы [28, 29], тельца гистонового локуса [30], и другие [3, 4], участвуют в безмембранной компартментализации, временном хранении и активации биомолекул. Конденсация в результате фазового разделения приводит, в том числе, к формированию крупных комплексов, таких как гетерохроматин [31] и суперэнхансеры [32], участвующих в организации хроматина и регуляции транскрипции. Эти комплексы

способствуют созданию специфических микросред для активации или подавления определенных генов. Фазовая сепарация нуклеопоринов способствует селективности ядерного порового комплекса [33], обеспечивая ядерный транспорт.

Спектр возможных немембранных органелл постоянно расширяется за счет исследований, как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, к биоконденсатам относят centrosомы [34], кластеры мембранных белков (Т-клеточный рецептор [35], нефрин [36], активированные комплексы рецепторных тирозин киназ [37]).

Биоконденсаты были обнаружены как у прокариот [38, 39], так и у эукариот, от простейших организмов до высших растений [40] и животных [3, 4, 16]. В Таблице приведены примеры наиболее известных немембранных органелл, относимых к биоконденсатам и образующихся в результате разделения фаз на границе двух жидкостей.

Обобщая роль биоконденсатов в клетке, можно выделить следующие функции (см. рис. 2):

- участие в процессах, связанных с реализацией и воспроизводством генетической информации [41–48, 54, 55];
- быстрый и обратимый ответ на неблагоприятные внешние воздействия, такие как повышение температуры [18], снижение цитоплазматического рН [10, 80, 93], иммунный ответ [94];
- регуляция концентрации белков и нуклеиновых кислот в ядре и цитоплазме [15, 85, 88];
- активация химических реакций [25, 26, 58, 61];
- инактивация молекул [20, 23];
- сортировка и транспорт макромолекул [33, 64, 65];
- формирование ядер нуклеации [34, 86];
- передача сигнала [35, 37, 95].

Образование биоконденсатов может регулироваться как стадиями жизненного цикла клетки (например, ядрышко начинает формироваться в поздней телофазе, разбирается в митозе [24]), так и внешними воздействиями (например, кластеризация рецепторов на мембране [35–37], формирование стресс-гранул, Р-телец [17–20, 96]).

Несвоевременное образование или изменение свойств биоконденсатов может привести к накоплению неправильно свернутых белков и их агрегации, включая образование амилоидных агрегатов [8]. Нарушение образования биоконденсатов связывают с различными заболеваниями, такими как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, отдельные типы рака [97–101].

Таблица. Биомолекулярные конденсаты эукариот

Название	Структурные компоненты	Организм/Тип клеток	Функция биоконденсатов	Ссылка
1	2	3	4	5
Ядерные				
Гетерохроматин	HP1, 53BP1, MeCP2, SAFB, Xist	Культуры клеток млекопитающих, <i>Drosophila melanogaster</i>	Гетерохроматинизация ДНК, инактивация X-хромосомы	[31, 41–44]
Комплексы репарации ДНК	<i>tlincRNK</i> ; γ H2AX, 53BP1, MRNIP	Культуры клеток человека	Репарация ДНК	[45–48]
Параспеклы	NEAT1 lnc РНК, PSP1, PSF, NONO	Культуры клеток млекопитающих	Процессинг при-микроРНК	[49–51]
Перинуклеарный компартмент	PTB, CUG-BP, KSRP, RAVR1/2, транскрипты РНК полимеразы III, белки цитоскелета	Трансформированные клетки млекопитающих	Регуляция транскрипции РНК-полимеразы III	[52–53]
Пре-репликационный комплекс	Orc1, Cdt1, Cdc6, MCM-геликаза	<i>D. melanogaster</i> ; <i>in vitro</i>	Сборка комплекса репликации	[54–56]
Спеклы /кластеры интерхроматиновых гранул	SON, SRRM2, факторы сплайсинга мРНК, USP42	Культуры клеток человека	Сплайсинг мРНК	[28, 29, 57]
Суперэнхансеры	BRD4, MED1, факторы транскрипции	Культуры клеток млекопитающих	Активация транскрипции	[32, 58, 59]
Теломеры	TRF1/2, участки теломерных повторов ДНК	Культура клеток человека	Структурная организация теломер	[60]
Тельца гистонового локуса (HLB)	NPAT, FLASH; U7 мяРНК	Ооциты амфибий и птиц	Процессинг пре-мРНК гистонов	[30, 25]

Продолжение таблицы см. на ст. стр.

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
Тельца Кахала	колин, scaРНК	Ооциты амфибий и птиц, растения	Созревание мЯРНК, сборка мЯРНК-субъединиц сплайсосом	[25, 26, 61]
Тельца Gems	SMN	Культуры клеток млекопитающих	Биогенез мЯРНК	[62, 63]
Ядерный поровый комплекс	Nup358, нуклеопорины	<i>S. cerevisiae</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>X. laevis</i> , культуры клеток человека	Ядерный транспорт	[33, 64, 65]
Ядрышко	рДНК, рРНК, РНК-полимераза I, фибрилларин, нуклеофизин, и др.	<i>Xenopus laevis</i> , Эукариоты	Биогенез рибосом	[15, 24, 66]
Орт-домены	Ost-1, PTF, 53BP1	Культуры клеток млекопитающих	Регуляция транскрипции, ответ на репликационный стресс	[67, 68]
РсG тельца (гельца группы Polysomb)	Ph, PRC1, CBX2	Культуры клеток человека, <i>D. melanogaster</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	Репрессия транскрипции	[69-71]
PML тельца	Ядерный домен 10 (ND10), PML	Культуры клеток млекопитающих и птиц	Регуляция организации хроматина	[72-74]

Продолжение таблицы см. на сл. стр.

Окончание таблицы

1	2	3	4	5
Цитоплазматические				
Кластеры мембранных рецепторов	Нефрин, Nck, N-WASP	Культура клеток человека (HeLa)	Клубочковый фильтративный барьер	[36, 75, 76]
Стресс-гранулы	мРНК, G3BP, TIA1 (млекопитающие), Pab1, Pub1, Sup35 (<i>S. cerevisiae</i>), и другие	<i>S. cerevisiae</i> , культуры клеток млекопитающих и человека, растения	Остановка трансляции во время стрессовых воздействий, хранение мРНК	[17–20, 77–81]
Тельца Бальбиани*	Xvelo (<i>X. laevis</i>), Visc (<i>Danio rerio</i>)	Ооциты насекомых, позвоночных	Сегрегация герминальной плазмы	[4, 82, 83]
Тельца нюаж	DDx4, Vasa, малые некодирующие пиРНК	Мейотические клетки млекопитающих	Сайленсинг транспозонов	[84]
Транспортные РНК-гранулы	Staufen1, Staufen2, FMRP, ZBP1, hnRNPА2, CPEB, Pura, SMN	Нейроны млекопитающих	Транспорт и хранение мРНК	[85]
Центросома	SPD-5, XMAP215, TPX2	<i>C. elegans (in vitro)</i>	Нуклеация микротрубочек, сборка веретена деления клетки	[34, 86]
GW-тельца	GW182/Gw	Эмбрионы, <i>D. melanogaster</i>	Репозиторий транскрипционно не активных материнских мРНК	[87]
P-гранулы	Материнские мРНК, CAR-1, LAF-1, MEG-3, PGL-1, PGL-3	<i>C. elegans</i>	Регуляция трансляции мРНК в клетках зародышевой линии	[13, 14, 88, 89]
P-тельца	Der, Edc, Upf, Cst4/Pop2/Not	<i>S. cerevisiae</i> , <i>D. melanogaster</i> ; культуры клеток человека, растения	Хранение мРНК, возможно деградация мРНК, инактивация ферментов деградации мРНК	[20–23, 79]
U-тельца	SMN, мяРПП	<i>D. melanogaster</i>	Сборка и хранение мяРПП	[63, 90–92]

* Тельца Бальбиани относят к амиллоидоподобным агрегатам [83], однако есть данные, подтверждающие, что молодые тельца Бальбиани образуются в результате LLPS [82].

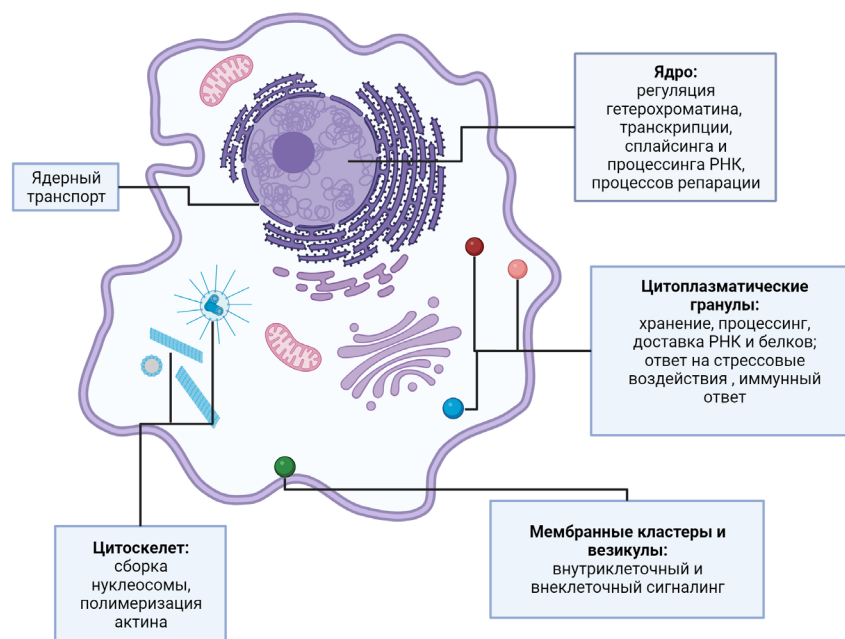


Рис. 2. Основные функции биомолекулярных конденсатов.

Пояснение в тексте.

III. СТРУКТУРА БИОКОНДЕНСАТОВ

Большинство биоконденсатов представляют собой «жидкие капли» округлой формы, способные сливаться между собой. Молекулы внутри капель и на границе капля/окружающая среда свободно диффундируют. Это было показано для Р-гранул, ядрышка, стресс-гранул и других органелл [2, 13, 16, 98]. Кроме того, биоконденсаты также могут образовывать «комплексные жидкости», такие как гели и жидкие кристаллы [2].

Гели представляют собой сеть полимеров, связанных слабыми межмолекулярными связями. Они обладают упругостью (способностью сохранять форму) в течение короткого периода воздействия и вязкостью при длительном воздействии [2]. Примером геля в биологических структурах являются биоконденсаты, формируемые белком внеклеточного матрикса эластином [102, 103]. Образование гелеподобной структуры в результате разделения фаз было показано

для митотических хромосом клеток млекопитающих, подвергшихся гиперосмотическому шоку [104].

Одной из разновидностей гелей являются гидрогели. Гидрогели содержат большое количество воды и отличаются растворимостью в воде большинства компонентов. При увеличении концентрации воды они могут «разбухать». Примером гидрогелей являются нуклеопорины – белки, образующие селективный фильтр ядерного порового комплекса [105]. В исследованиях *in vitro* было показано, что при увеличении концентрации некоторых РНК-связывающих белков, содержащих неструктурированные участки, например, FUS, TAF15, hnRNP, EWS, CIRBP, образуются твердые гидрогели, имеющие структурное сходство с амилоидными фибриллами. Однако эти гидрогели, в отличие от амилоидов, могут растворяться и деполимеризоваться [106, 107].

Ещё одной формой «комплексных жидкостей» являются жидкие кристаллы – жидкая субстанция, в которой компоненты упорядочены в одном направлении. Эта упорядоченность может быть достигнута благодаря различным механизмам и структурным элементам. Например, мейотическое веретено деления упорядочено благодаря ориентации микротрубочек [108]. Они создают ось, вдоль которой происходит упорядоченное движение хромосом и обеспечивается точное разделение генетического материала при мейозе. Структуру жидкого кристалла имеет и синаптонемный комплекс: каркасные белки упорядочены вдоль оси синаптонемного комплекса [109].

Структура и свойства биоконденсатов могут изменяться при изменении внешних параметров, таких как pH, температура, концентрация, время. В исследованиях *in vitro* было показано, что жидкие капли могут со временем превращаться в твердые структурированные агрегаты под влиянием термодинамических и кинетических процессов. Например, белки FUS, hnRNPA1, Whi3, фибрилларин, Sup35, содержащие неструктурированные домены, сначала образуют жидкие капли. Со временем, в условиях *in vitro*, биомолекулярные конденсаты данных белков начинают демонстрировать признаки геля или твердой фазы [93, 98, 105, 106].

В исследованиях *in vivo* подобное было также показано для стресс-гранул клеток млекопитающих. В образовании стресс-гранул млекопитающих ключевую роль играет фазовое разделение белка G3BP в результате взаимодействия с мРНК [110]. В ходе своего жизненного цикла стресс-гранулы могут накапливать aberrантные, неправильно свернутые белки (SOD1, РНК-связывающие белки), что приводит к образованию патологических, твердых стресс-гранул,

ассоциированных с различными заболеваниями, такими как боковой амиотрофический склероз, болезни Альцгеймера и Хантингтона, диабет 2 типа [8].

Структура биоконденсатов может быть гетерогенной. Например, ядрышко, РНК-тельца и стресс-гранулы имеют сложную организацию, в которой различные слои отличаются плотностью, составом и физико-химическими свойствами (подробнее см. [66, 111, 112]). На Рисунке 3 представлены варианты возможных структур биоконденсатов.

Гетерогенность структуры биоконденсатов и возможность изменения их свойств со временем – «старение биоконденсатов» – приводят к вопросу: может ли образование биоконденсатов способствовать образованию высокоупорядоченных белковых агрегатов с межмолекулярной кросс-бета структурой (амилоидов)?

Данные, полученные *in vitro*, позволяют утвердительно ответить на данный вопрос. Так, например, белок FUS образует жидкие компартменты *in vivo* на участках репарации ДНК, а также в цитоплазме в результате стрессовых воздействий. Авинаш Патель с коллегами показали, что «старение» жидких капель FUS *in vitro* приводит к образованию белком FUS амилоидоподобных фибрилл. Интересно, что мутации в последовательности белка FUS, ассоциированные с развитием болезни Альцгеймера, ускоряют образование фибрилл [98]. В работе М. Като, также выполненной *in vitro*, сверхпродукция прионоподобных доменов белков FUS и hnRNPA2, слитых с репортерным белком mCherry, приводила к образованию гидрогелей с кросс-бета структурой (что было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа), морфологически неотличимых от амилоидных агрегатов. Однако, в отличие от амилоидных агрегатов, полученные гидрогели могли растворяться и деполимеризоваться [106, 107].

На данный момент, прямые доказательства перехода биомолекулярных конденсатов в амилоидные агрегаты *in vivo* практически отсутствуют.

Фазовая сепарация белков FUS, G3BP, Pab1 и Sup35 в клетках при физиологической концентрации в ответ на стрессовые воздействия является частью ответа организма на стрессовые воздействия и способствует его выживанию [18, 93, 98, 120]. В то же время, мутации в этих белках могут способствовать агрегации и приводить к различным патологиям и заболеваниям [8, 98]. В связи с этим, Симон Альберти предложил разграничить термины «конденсаты» и «агрегаты» с учетом функциональной значимости образуемых скоплений и их дальнейшей судьбы в клетке [8]. Термин «конденсаты» он предложил использовать для описания динамической обратимой сборки молекул,

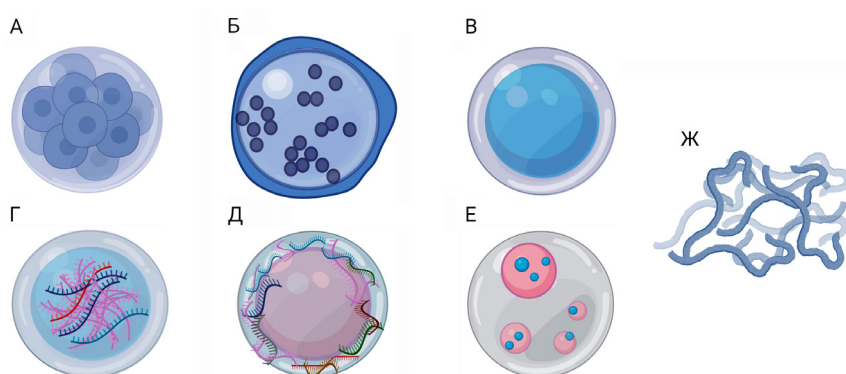


Рис. 3. Варианты архитектуры биомолекулярных конденсатов (по [112], с модификациями).

А – твердое ядро, жидкая оболочка. Конденсаты формируются из многочисленных гранул, которые объединяются в более крупные (стресс-гранулы).

Б – жидкое ядро, твердая оболочка. Жидкое ядро окружено гелеобразной белковой оболочкой (Р-гранулы *C. elegans*).

В – жидкая оболочка, жидкое ядро, оболочка и ядро композиционно отличаются (конденсаты iLSA).

Г – РНК-ядро, жидкая белковая оболочка (L-тельца *X. laevis*).

Д – РНК-оболочка (5' и 3' концы РНК *NEAT1*, параспеклы).

Е – «вложенные капли» (ядрышко). Ядрышко имеет трехуровневую организацию, в которой гелеобразные фибриллярный центр и плотный фибриллярный компонент окружены жидким гранулярным компонентом.

Ж – конденсаты неправильной формы (конденсаты TIS11B, образующие сеть в районе ЭПР).

которые можно растворить и повторно использовать. В свою очередь, термин «агрегаты» использовать для патологических белковых образований, в которых компоненты необратимо повреждены и часто предназначены для уничтожения [8]. При этом стоит отметить, что предложенное С. Альберти определение, по сути, не учитывает функциональные амилоидные агрегаты [113–115].

Мы считаем, что более точным будет разграничить термины «биомолекулярные конденсаты» и «агрегаты» на основе структурных особенностей исследуемых объектов вне зависимости от того, являются ли агрегаты функциональными, нейтральными или патологическими в изучаемых организмах (см. рис. 4).

Обобщая данные о структуре и свойствах биоконденсатов, можно выделить следующие характерные особенности:

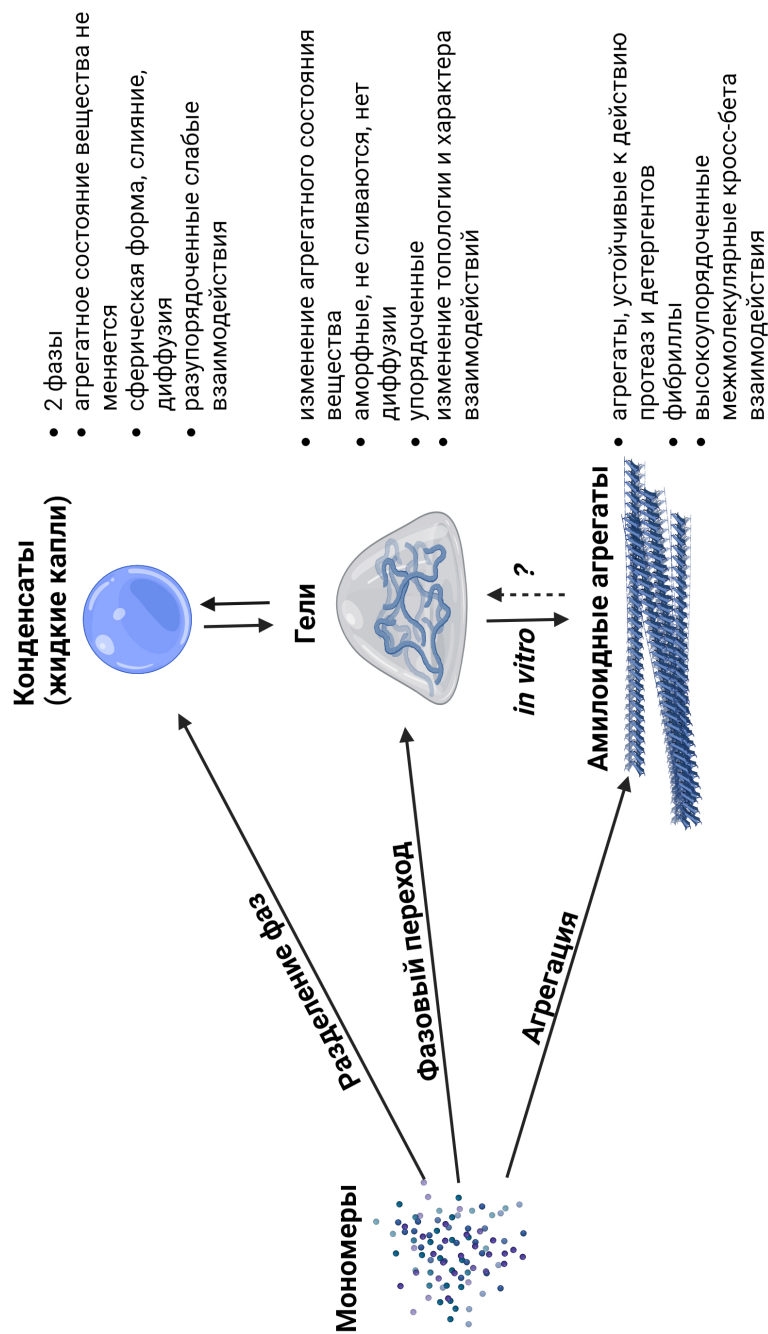


Рис. 4. Разграничение терминов «конденсаты» и «агрегаты». Пояснения в тексте.

- в основе образования биоконденсатов лежит разделение фаз на границе двух жидкостей;
- биоконденсаты обладают обратимостью, то есть могут образовываться и диссоциировать;
- в структуре биоконденсатов присутствуют как гомотипические (между однотипными молекулами), так и гетеротипические (между разными типами молекул) взаимодействия;
- молекулы в биоконденсатах связаны между собой слабыми, неупорядоченными взаимодействиями;
- большинство биоконденсатов имеют структуру жидких капель.

IV. ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВ, ОБРАЗУЮЩИХ БИОКОНДЕНСАТЫ

Одним из структурообразующих компонентов биоконденсатов являются белки. В структуре биоконденсатов выделяют два типа белков: каркасные (scaffold) белки и белки-клиенты. Каркасные белки необходимы для структурной целостности конденсатов [116, 117], в то время как белки-клиенты связываются каркасными белками и присутствуют в конденсатах при определенных условиях [118, 119]. Белки, составляющие биоконденсаты, часто являются мультивалентными молекулами, то есть содержат множество элементов (мотивы, домены, структуры), которые обеспечивают внутри- и межмолекулярные взаимодействия. При смешивании этих молекул они собираются в олигомеры или полимеры, что уменьшает их растворимость и способствует разделению фаз [4]. Мультивалентность достигается за счет нескольких факторов.

Во-первых, мультивалентность обусловлена наличием мультидоменных структур, которые обеспечивают межбелковые взаимодействия. Например, белок Nck содержит SH3 домены, которые способствуют кластеризации белков нефрина, Nck и NWASP при реорганизации актинового цитоскелета [4, 75, 76].

Во-вторых, мультивалентность достигается благодаря неупорядоченным участкам (англ. intrinsically disordered regions, IDR). Белки с IDR не имеют определенной третичной структуры и обладают высокой конформационной гибкостью. Участки IDR часто содержат большое количество повторяющихся аминокислотных остатков, которые обеспечивают основу для слабых межмолекулярных взаимодействий [120]. Наличие IDR часто является необходимым и достаточным условием для разделения фаз [84, 90, 121]. Примерами белков с участками IDR являются FUS, hnRNPA1, hnRNPA2, TDP-43 [122], Pab1 [18] у человека и Sup35 у дрожжей [123, 124].

В-третьих, мультивалентность достигается за счет вырожденных последовательностей или доменов низкой сложности (англ., low-complexity domains, LCD) [4]. Домены LCD содержат повторы определенных аминокислотных остатков, таких как глицин, пролин, глутамин и другие [125]. Это делает их подверженными образованию аморфных агрегатов и склонными к неспецифическому связыванию с другими молекулами. Такие последовательности могут играть важную роль в формировании белковых комплексов, взаимодействиях с ДНК или РНК, а также в регуляции биологических процессов.

Кроме того, мультивалентность может достигаться за счет присутствия РНК-связывающих доменов, которые участвуют во взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами [126].

Наличие различных взаимодействующих доменов обуславливает типы связей между белками и их партнерами для фазового разделения. При образовании биоконденсатов между молекулами могут возникать как гомотипические (между идентичными участками одного и того же белка), так и гетеротипические (между различными участками белка или между разными белками) взаимодействия [127, 128]. Исследование, проведенное Ю. Озавой с коллегами *in silico*, показало, что доля белков с неструктурированными участками (IDR) достоверно выше для белков, вступающих в гомотипические взаимодействия, чем для белков, вступающих в гетеротипические взаимодействия [127]. Интересно, что гомотипические взаимодействия между IDR играют ключевую роль в образовании и амилоидных агрегатов [127, 129]. С другой стороны, белки, вступающие в гетеротипические взаимодействия с другими белками, содержат домены межбелкового взаимодействия (SH2, SH3, анкириновые повторы), а белки, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами, содержат ДНК/РНК-связывающие домены [127].

Некоторые исследователи указывают, что в конденсатах IDR в большей степени остаются неструктурированными; при этом взаимодействие обеспечивается через короткие «липкие» участки (англ. «stickers») [122]. Основная модель, описывающая взаимодействия в биоконденсатах – это модель «липких участков и спейсеров» (англ. *stickers and spacers*) [126, 130, 131]. Согласно этой модели, «липкие участки» взаимодействуют друг с другом, образуя связи между молекулами. Сальватационные характеристики «спейсеров» (расположенных между липкими участками) определяют, будет ли взаимодействие сопровождаться фазовым разделением. Например, повторяющиеся мотивы SYGQ в белке FUS играют важную роль в фазовом разделении, где тирозин и глутамин являются ключевыми

аминокислотами [132]. Валентность «липких участков» (количество взаимодействующих участков на молекулу) обратно пропорциональна концентрации насыщения: чем выше валентность, тем ниже концентрация насыщения и легче образование биоконденсатов [122].

Какие же элементы первичной последовательности белка способствуют разделению фаз? Если говорить о влиянии отдельных аминокислот на образование биоконденсатов [128, 133, 134], можно выделить следующее:

- Разделению фаз способствуют кластеры положительно (аргинин, гистидин, лизин) и отрицательно (аспартат, глутамат) заряженных кислот, за счет взаимодействия с участками, несущими противоположный заряд [84, 98, 135]. Наличие аргининовых трактов приводит к более быстрой конденсации, большей вязкости и большей склонности к агрегации, по сравнению с лизинowymi трактами [135].
- Важную роль в разделении фаз играют ароматические аминокислоты, особенно тирозин и фенилаланин, равномерно распределенные по длине всего участка [5, 128, 136]. Считается, что ароматические аминокислоты могут играть роль «липких участков» за счет катионных- π взаимодействий с остатками аргинина [126], а также взаимодействий, обусловленных наличием системы сопряженных π -связей [4, 137].
- Боковые цепи полярных аминокислот (глутамин, аспарагин, серин), а также остов глицина могут принимать участие в π - π взаимодействиях [125, 137], и диполь-дипольных взаимодействиях [138]. Также разделению фаз может способствовать взаимодействие полярных аминокислот с ароматическими аминокислотами [125, 139].

Пост-трансляционные модификации аминокислотной последовательности белка также могут играть регуляторную роль в образовании биоконденсатов [140]. Из них наиболее частыми являются фосфорилирование, метилирование, сумоилирование и о-гликозилирование [75, 117, 118, 141–148]. Показано, что они могут влиять на формирование различных структур, таких как Р-гранулы, стресс-гранулы, ядерные спеклы и другие.

V. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ОБРАЗОВАНИЕ БИОКОНДЕНСАТОВ

В процессе образования биоконденсатов, помимо белков, также участвуют нуклеиновые кислоты [148]. С одной стороны, нуклеиновые кислоты, особенно РНК, могут играть структурную роль в формировании биоконденсатов. Например, длинная некодирующая РНК *NEAT1* участвует в образовании параспеклов [49]; мРНК, которая высвобождается из полисом при стрессовых воздействиях, участвует в формировании стресс-гранул [150, 151], материнские мРНК участвуют в образовании Р-гранул [152]. С другой стороны, разделение фаз на границе двух жидкостей играет важную роль в процессах, связанных с реализацией генетической информации, в частности, в биогенезе рибосом, регуляции транскрипции и трансляции [15, 59, 77, 79].

Исследование транскриптомов конденсатов, например стресс-гранул, Р-телец, Р-гранул, позволяет выявить особенности и специфику РНК, участвующих в формировании определенных видов конденсатов. В первую очередь, это элементы последовательности РНК, связанные с регуляцией транскрипции и трансляции [153–155]. Например, обнаружено, что к аккумуляции в стресс-гранулах склонны мРНК с более длинными кодирующими и 5'-нетранслируемыми областями [153]. Это подтверждает гипотезу о стягивании в стресс-гранулы молекул, которые временно не транслируются. Состав стресс-гранул может различаться в зависимости от вида стрессовых воздействий. Так, при накоплении большого количества неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) в стресс-гранулах преобладают транскрипты мРНК белков, связанных с пролиферацией клеток. Данные транскрипты содержат AU-богатые регионы [156]. Также стоит отметить, что уровень транскрипции РНК может оказывать влияние на формирование биоконденсатов, например, ядрышек [149, 157].

В ряде работ были получены данные, подтверждающие непосредственное влияние первичной последовательности РНК на образование биоконденсатов. Так, в работе, выполненной С. Бойнемсом с коллегами в условиях *in vitro*, было показано, что состав гомополимеров РНК может определять их физические свойства. Нуклеотиды поли-А/С/У, смешанные с пептидами, состоящими из пролина и аргинина, конденсировались по типу «жидкие капли», в то время как нуклеотиды поли-Г (способные к формированию G-квадруплексов) формировали твердые гелеобразные агрегаты, устойчивые к денатурации в растворах с высоким содержанием

соли [158]. На свойства конденсатов также может влиять наличие повторов в последовательности РНК. Например, при некоторых нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Хантингтона и др.) в ядре образуются аберрантные скопления, содержащие гуанин-богатые транскрипты РНК с вырожденными повторами. Увеличение количества повторов выше критического количества способствует переходу РНК из состояния золь в гель *in vitro* и формированию аберрантных скоплений в культурах клеток человека [159].

Изменение первичной последовательности мРНК также может приводить и к изменениям или нарушениям сплайсинга белков. Например, различные изоформы белка FXR1 отличаются по наличию неструктурированных участков, что влияет на свойства конденсатов FXR1 [160]. Пост-транскрипционные модификации мРНК, такие как присоединение N⁶-метиладенозина, могут также влиять на фазовую сепарацию путем изменения РНК–белок и РНК–РНК взаимодействий [161].

На разделение фаз может также повлиять изменение вторичной структуры мРНК. Например, взаимодействие с РНК-связывающим доменом белка Whi3 приводит к изменению вторичной структуры мРНК *CLN3* и *BN11*. Авторы предполагают, что элементы вторичной структуры открывают/маскируют участки, которые определяют способность мРНК вступать в гомо- и гетеротипические взаимодействия и, таким образом, участвовать в образовании конденсатов [162].

VI. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНДЕНСАТОВ

Методы изучения биоконденсатов можно разделить на три большие группы [163]:

- 1). Методы визуализации и оценки структуры биоконденсатов (масштаб 1 нм – 1 мкм);
- 2). Методы, характеризующие термодинамику, кинетику и взаимодействия структурных элементов в биоконденсатах (масштаб 1 Å – 1 нм);
- 3). Биоинформатические методы.

Для изучения биоконденсатов используют методы работы *in vitro*, *in vivo* и *in silico*. Эксперименты *in vitro* позволяют моделировать концентрацию составляющих белков, концентрацию насыщения, ионную силу буфера, температуру, проверять гипотезы о влиянии конкретных последовательностей, лигандов, пост-трансляционных модификаций

и т.д. на свойства биомолекулярных конденсатов [6, 16, 18, 66, 84, 93]. Кроме того, часто они позволяют расширить класс изучаемых объектов, например, фазовая сепарация для кластеров мембранных белков была сначала показана в исследованиях *in vitro* [35–37]. Однако, результаты, полученные *in vitro*, не всегда подтверждаются данными, полученными *in vivo* [36, 75, 76].

С другой стороны, при исследовании конденсатов *in vivo* возникают сложности с возможностью контролировать условия, вызывающие образование биоконденсатов, а также проблемы, связанные с валидацией фазового состояния агрегатов, таких как жидкие капли, твердые гелеобразные или необратимые амилоидные агрегаты, в живой клетке [16].

Выбор методов зависит как от набора доступных инструментов, так и от предположений о структуре конденсатов. Одни и те же методы можно использовать как для качественной, так и количественной оценки характеристик конденсатов. До последнего времени отмечалось преобладание качественных характеристик над количественными, а также результатов, полученных *in vitro*, над результатами *in vivo* [16].

МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОКОНДЕНСАТОВ

Биоконденсаты могут быть визуализированы как *in vitro*, так и *in vivo* с помощью белков, слитых с флуорохромами, например, GFP (зелёный флуоресцентный белок) [6, 18, 80, 93, 164] и последующего анализа при помощи флуоресцентной микроскопии или флуориметрии. Использование живых клеток, продуцирующих белки, слитые с флуорофорами, позволяет наблюдать за разделением фаз в клетке в режиме реального времени. При этом, как правило, более высокий уровень экспрессии гетерологичных генов по сравнению с нормой может приводить к повышению концентрации исследуемого белка и стимулировать LLPS [163]. Для визуализации биоконденсатов также используют методы иммуноокрашивания. В этом случае получают фиксированные препараты клеток или тканей. Преимуществом такого подхода является отсутствие дополнительной продукции исследуемого белка. В то же время, фиксация образца может нарушать слабые межмолекулярные взаимодействия [163].

Чтобы показать, что конденсаты являются «жидкими каплями», исследуют их форму, наблюдают за конденсатами в режиме реального времени (жидкие капли «обтекают» препятствия, сливаются, разделяются, вновь принимая округлую форму) [2, 16]. Для изучения морфологии конденсатов, а также для более точной локализации флуо-

ресцентно окрашенных макромолекул используют конфокальную микроскопию [163, 165].

МЕТОДЫ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ ТЕРМОДИНАМИКУ, КИНЕТИКУ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БИОКОНДЕНСАТОВ

Физические свойства немембранных органелл, такие как вязкость, поверхностное натяжение, размер ячеек и динамика составляющих молекул, могут с большой вероятностью влиять на их биологические функции [163] и часто изменяются при заболеваниях [8].

Для подтверждения жидкой природы биоконденсатов используют количественные исследования, такие как восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP) или потеря флуоресценции после фотообесцвечивания (FLIP), которые позволяют оценить диффузию внутри капли и подтвердить или опровергнуть предположение о ее жидкой природе [16, 93, 166]. При этом важно учитывать, что восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания может зависеть от размера капли, от размера выжигаемого пятна и подвижности конденсатов внутри клетки, что часто не учитывается [6, 167].

Для проверки физической природы конденсатов можно использовать и химические методы. Например, 1,6-гександиол растворяет жидкие капли за счет нарушения слабых гидрофобных взаимодействий [168]. Однако в биоконденсатах могут встречаться не только гидрофобные взаимодействия, но и π - π , катион- π , электростатические взаимодействия, не все из которых чувствительны к гександиолу [6]. Более того, есть данные, что гександиол может изменять проницаемость мембраны и способствовать образованию дополнительных артефактов [168]. Поэтому использование исключительно 1,6-гександиола не может служить доказательством жидкой природы конденсатов.

Для изучения крупных капель и свойств среды используют наночастицы. Исследование траектории движения частиц и/или органелл позволяет определить уровень диффузии в окружающей их среде [10, 69].

Для определения композиционного состава конденсатов используют методы протеомики, такие как фракционирование и масс-спектрометрия [170]. Также можно использовать метод биотинилирования белков-партнеров интересующего нас белка с последующей масс-спектрометрией [171]. Стоит отметить, что идентификация компонентов может быть неполной из-за неустойчивых взаимодействий между компонентами [163].

Отсутствие стабильной вторичной и третичной структуры, а также конформационная динамика затрудняют кристаллизацию молекул и

ограничивают применение рентгеновской кристаллографии для получения структур конденсатов с атомарным разрешением [163]. Тем не менее, рентгеновскую кристаллографию всё же используют для получения структур высокого разрешения ($\sim 1 \text{ \AA}$) отдельных участков конденсатов (например, неструктурированные участки белков FUS, hnRNP A1 и NUP98 образуют скрученные бета-складчатые структуры, пары которых формируют протофиламенты) [172].

В связи с конформационной неоднородностью использование криоэлектронной микроскопии для изучения структуры жидких капель затруднено. При этом её успешно применяют для анализа структуры амилоидных фибрилл, образованных неструктурированными участками в случае нарушения процесса разделения фаз [173]. Для исследования гелеподобных структур, таких как гелеподобные капли, сформированные дрожжевым белком Sup35, используется криоэлектронная томография [93].

Для анализа неструктурированных участков также применяют спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [174].

Для анализа размеров и формы частиц *in vitro* используют методы рассеяния света. Например, метод динамического рассеяния света позволяет определить коэффициент диффузии и гидродинамический радиус частиц, что дает представление об их размерах в растворе [175]. Этот метод также может быть использован для определения концентрации насыщения, критической температуры и концентрации РНК, необходимых для разделения фаз [18, 175]. Для достижения более высокого разрешения используют метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, который позволяет отследить конформационные изменения биомолекул в монокристаллических растворах [18, 163, 177].

Оценка диффузии и конформационной динамики макромолекул в конденсатах может быть затруднена из-за гетерогенности частиц и конформационных состояний молекул. В таких случаях используют флуоресцентную спектроскопию единичных молекул, в которой молекула интереса связана с флуоресцентной меткой с использованием химических или генетических методов [66, 163, 178]. В подобных исследованиях преимущественно используются два направления спектроскопии единичных молекул – флуоресцентный (Фёрстеровский) резонансный перенос энергии (FRET) и флуоресцентная корреляционная спектроскопия [163]. FRET используют для выявления непосредственного взаимодействия или доменов взаимодействия белков, составляющих конденсаты [179–181]. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия позволяет количест-

венно оценить диффузию молекул за счет изменения интенсивности флуоресценции меченых молекул в небольших объемах [182]. Это помогает сделать вывод об образовании супрамолекулярных комплексов в тех случаях, когда разрешения конфокальной или микроскопии высокого разрешения недостаточно [167].

Несмотря на все возрастающее разрешение биофизических и флуоресцентных методов в изучении биомолекулярных конденсатов, они часто все еще недостаточны для выявления отдельных аминокислотных остатков и непосредственных взаимодействий, необходимых и достаточных для фазового разделения. В таких случаях используют биоинформатические методы.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Анализ первичной последовательности белка и предсказание его возможных вторичных структур могут помочь понять механизм фазовой сепарации. В этом процессе можно использовать различные биоинформатические инструменты, которые выявляют особенности последовательностей, связанные с разделением фаз [163]. Например,

- IUPred (<https://iupred.elte.hu/>) [183] – определяет неструктурированные участки;
- CIDER (<http://157.245.85.131:8000/CIDER/>) [184] – анализирует гидрофобность и распределение зарядов;
- LCD-composer (<http://lcd-composer.bmb.colostate.edu:9000/>) [185] – ищет домены низкой сложности (LCD-домены);
- PLAAC (<http://plaac.wi.mit.edu/>) [186] – предсказывает прионоподобные домены на основе анализа последовательностей прионов дрожжей, обогащенных глутамином и аспарагином.

Для уменьшения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, при обнаружении неупорядоченных участков используют метапредсказатели (интегрируют данные нескольких типов предсказателей) [6], такие как DisMeta (<http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/disorder/>) [187], D²P² (<https://d2p2.pro/>) [188] и MobiDB (<https://mobidb.bio.unipd.it/about>) [189]. При этом стоит отметить, что указанные выше инструменты не оценивают напрямую склонность белка к LLPS.

Кроме того, есть инструменты, которые напрямую оценивают способность белков к фазовой сепарации на основе анализа первичной последовательности. Несмотря на то, что механизмы разделения фаз во многом до сих пор остаются неясными, считается, что мультивалентные катион- π , π - π , и электростатические взаимодействия лежат в основе LLPS [135]. В частности, используют:

- Pi–Pi predictor – определяет частоту π – π взаимодействий [137];
- ZipperDB (<https://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/>) – предсказывает участки, способствующие формированию фибрилл [190];
- PSPredictor (<http://www.pkumdl.cn:8000/PSPredictor/>) – предсказывает склонность к разделению фаз на основе особенностей последовательности и использует алгоритмы машинного обучения [191];
- deePhase (<https://deephase.ch.cam.ac.uk/>) – использует несколько признаков последовательности для предсказания (неупорядоченность, сниженную гидрофобность, баланс полярных и гидрофобных аминокислотных остатков) и использует алгоритмы машинного обучения;
- LLPhyScore – основан на алгоритмах машинного обучения, использует восемь пар признаков, ассоциированных с разделением фаз (разупорядоченность, наличие водородных связей, π – π контакты, возможные электростатические взаимодействия и другие) [192];
- PhaSePred (<http://predict.phaser.pro/>) – метапредсказатель второго поколения, интегрирует результаты предсказателей как неструктурированных участков, так и фазовой сепарации [191].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биомолекулярные конденсаты представляют собой динамические структуры, которые играют важную роль во многих аспектах клеточной биологии. Они обеспечивают организацию клеточного пространства, участвуют в регуляции экспрессии генов и синтеза белков, регулируют клеточный сигналинг, иммунный и стрессовый ответ, влияют на взаимодействие различных молекул в клетке.

Одной из особенностей биомолекулярных конденсатов является их способность к фазовому разделению, что позволяет им образовывать микроскопические компартменты в клетке. Это явление играет важную роль в организации клеточного пространства и в то же время может быть связано с различными патологическими состояниями, такими как нейродегенеративные заболевания и некоторые типы рака. Поэтому изучение биомолекулярных конденсатов может предложить новые подходы к диагностике и лечению этих заболеваний.

Понимание структуры, функции и взаимодействия биомолекулярных конденсатов является важным шагом в нашем стремлении к пониманию жизненных процессов в клетке. Дальнейшие исследования в этой области могут привести к новым открытиям в клеточной биологии и медицине, а также к разработке инновационных методов лечения различных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нельсон, Д., Кокс М. (2012) Основы биохимии Ленинджера. Том 1. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний; 694 с.
2. Hyman, A.A., Weber, C.A., Jülicher, F. (2014) Liquid-Liquid Phase Separation in Biology, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **30**, 39–58.
3. Боголюбов Д.С. (2019) Безмембранные органеллы эукариотической клетки: основные понятия и принципы формирования. *Цитология*, **61**, 683–703.
4. Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., Rosen, M.K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **18**, 285–298.
5. Martin, E.W., Holehouse, A.S., Peran, I., Farag, M., Incicco, J.J., Bremer, A. (1979) Valence and patterning of aromatic residues determine the phase behavior of prion-like domains, *Science*, **367**, 694–699.
6. Alberti, S., Gladfelter, A., Mittag, T. (2019) Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates, *Cell*, **176**, 419–434.
7. Harmon, T.S., Holehouse, A.S., Rosen, M.K., Pappu, R.V. (2017) Intrinsically disordered linkers determine the interplay between phase separation and gelation in multivalent proteins, *Elife*, **6**, e30294.
8. Alberti, S., Hyman, A.A. (2021) Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **22**, 196–213.
9. Brangwynne, C.P. (2013) Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles. *Journal of Cell Biology*, **203**, 875–681.
10. Munder, M.C., Midtvedt, D., Franzmann, T., Nüske, E., Otto, O., Herbig, M. (2016) A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid- to a solid-like state promotes entry into dormancy, *Elife*, **5**, e09347.
11. Wolf, N., Priess, J., Hirsh, D. (1983) Segregation of germline granules in early embryos of *Caenorhabditis elegans*: an electron microscopic analysis, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **73**, 297–306.

ВКЛАД АВТОРОВ. Н.А. Горшенёва – написание основного коря текста статьи; В.В. Азаров, А.В. Гризель, А.А. Рубель – написание и редактирование текста статьи, Ю.В. Сопова – редактирование текста статьи, подготовка иллюстраций.

БЛАГОДАРНОСТИ. Авторы благодарят М.С. Рубель, К.Ю. Куличихина и Ю.О. Чернова за обсуждение и ценные замечания. Авторы также благодарят за поддержку Санкт-Петербургский государственный университет (проект ID 95444727) и РЦ «Хромас» Научного парка СПбГУ за техническую поддержку.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

12. Strome, S., Wood, W.B. (1983) Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in early *C. elegans* embryos, *Cell*, **35**, 15–25.
13. Updike, D., Strome, S. (2010) P Granule Assembly and Function in *Caenorhabditis elegans* Germ Cells, *Journal of Andrology*, **31**, 53–60.
14. Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J. (2009) Germ-line P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation, *Science*, **324**, 1729–1732.
15. Brangwynne, C.P., Mitchison, T.J., Hyman, A.A. (2011) Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 4334–4339.
16. McSwiggen, D.T., Mir, M., Darzacq, X., Tjian, R. (2019) Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences, *Genes and Development*, **33**, 1619–1634.
17. Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R.M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U. (2020) G3BP1 Is a Tunable Switch that Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules, *Cell*, **181**, 325–345.e28.
18. Riback, J.A., Katanski, C.D., Kear-Scott, J.L., Pilipenko, E. V., Rojek, A.E., Sosnick, T.R. (2017), Stress-Triggered Phase Separation Is an Adaptive, Evolutionarily Tuned Response, *Cell*, **168**, 1028–1040.e19.
19. Kroschwald, S., Munder, M.C., Maharana, S., Franzmann, T.M., Richter, D., Ruer, M. (2018) Different Material States of Pub1 Condensates Define Distinct Modes of Stress Adaptation and Recovery, *Cell Reports*, **23**, 3327–3339.
20. Ivanov, P., Kedersha, N., Anderson, P. (2019) Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **11**, a032813.
21. Kroschwald, S., Maharana, S., Mateju, D., Malinowska, L., Nüske, E., Poser, I. (2015) Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules, *Elife*, **4**, e06807.
22. Rao, B.S., Parker, R. (2017) Numerous interactions act redundantly to assemble a tunable size of P bodies in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, E9569–E9578.
23. Luo, Y., Na, Z., Slavoff, S.A. (2018) P-Bodies: Composition, Properties, and Functions, *Biochemistry*, **57**, 2424–2431.
24. Latonen, L. (2019) Phase-to-Phase With Nucleoli – Stress Responses, Protein Aggregation and Novel Roles of RNA, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **13**, 151.
25. Ходюченко Т.А., Красикова А.В. (2014) Тельца Кахала и тельца гистонового локуса: молекулярный состав и функции, *Онтогенез*, **45**, 363–379.
26. Sawyer, I.A., Bartek, J., Dundr, M. (2019) Phase separated microenvironments inside the cell nucleus are linked to disease and regulate epigenetic state, transcription and RNA processing, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **90**, 94–103.
27. Taliensky, M.E., Love, A.J., Kołwierz-Lubnau, A., Smoliński, D.J (2023) Cajal bodies: Evolutionarily conserved nuclear biomolecular condensates with properties unique to plants, *Plant Cell*, **35**, 3214–3235.
28. Ilik, Í.A., Malszycki, M., Lübke, A.K., Schade, C., Meierhofer, D., Aktaş, T. (2020) SON and SRRM2 are essential for nuclear speckle formation, *Elife*, **9**, e60579.
29. Dion, W., Balance, H., Lee, J., Pan, Y., Irfan, S., Edwards, C. (2022) Four-dimensional nuclear speckle

- phase separation dynamics regulate proteostasis, *Science advances*, **8**, eabl4150.
30. Hur, W., Kemp, J.P., Tarzia, M., Deneke, V.E., Marzluff, W.F., Duronio, R.J. (2020) CDK-Regulated Phase Separation Seeded by Histone Genes Ensures Precise Growth and Function of Histone Locus Bodies, *Developmental Cell*, **54**, 379–394.e6.
 31. Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L. (2017) Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin, *Nature*, **547**, 236–240.
 32. Tang, S.C., Vijayakumar, U., Zhang, Y., Fullwood, M.J. (2022) Super-Enhancers, Phase-Separated Condensates, and 3D Genome Organization in Cancer, *Cancers (Basel)*, **14**, 2866.
 33. Nag, N., Sasidharan, S., Uversky, V.N., Saudagar, P., Tripathi, T. (2022) Phase separation of FG-nucleoporins in nuclear pore complexes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, **1869**, 119205.
 34. Woodruff, J.B., Ferreira Gomes, B., Widlund, P.O., Mahamid, J., Honigsmann, A., Hyman, A.A. (2017) The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin, *Cell*, **169**, 1066–1077.e10.
 35. Su, X., Ditlev, J.A., Hui, E., Xing, W., Banjade, S., Okrut, J. (2016) Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction, *Science*, **352**, 595–599.
 36. Case, L.B., Ditlev, J.A., Rosen, M.K. (2019) Regulation of Transmembrane Signaling by Phase Separation, *Annual Review of Biophysics*, **48**, 465–494.
 37. Lin, C.C., Suen, K.M., Jeffrey, P.A., Wieteska, L., Lidster, J.A., Bao, P. (2022). Receptor tyrosine kinases regulate signal transduction through a liquid-liquid phase separated state, *Molecular Cell*, **82**, 1089–1106.e12.
 38. Sołtys, K., Tarczewska, A., Bystranowska, D., Sozańska, N. (2022) Getting Closer to Decrypting the Phase Transitions of Bacterial Biomolecules, *Biomolecules*, **12**, 907.
 39. Yeong, V., Werth, E.G., Brown, L.M., Obermeyer, A.C. (2020) Formation of Biomolecular Condensates in Bacteria by Tuning Protein Electrostatics, *ACS Central Science*, **6**, 2301–2310.
 40. Emenecker, R.J., Holehouse, A.S., Strader, L.C. (2020) Emerging Roles for Phase Separation in Plants, *Developmental Cell*, **55**, 69–83.
 41. Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D. V., Darzacq, X., Karpen, G.H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation, *Nature*, **547**, 241–245.
 42. Zhang, L., Geng, X., Wang, F., Tang, J., Ichida, Y., Sharma, A. (2022) 53BP1 regulates heterochromatin through liquid phase separation, *Nature Communications*, **13**, 1088.
 43. Wang, L., Hu, M., Zuo, M.Q., Zhao, J., Wu, D., Huang, L. (2020) Rett syndrome-causing mutations compromise MeCP2-mediated liquid–liquid phase separation of chromatin, *Cell Research*, **30**, 393–407.
 44. Pandya-Jones, A., Markaki, Y., Serizay, J., Chitiashvili, T., Mancia Leon, W.R., Damianov, A. (2020). A protein assembly mediates Xist localization and gene silencing, *Nature*, **587**, 145–51.
 45. Wang, Y.L., Zhao, W.W., Bai, S.M., Feng, L.L., Bie, S.Y., Gong, L. (2022) MRNIP condensates promote DNA double-strand break sensing and end resection, *Nature Communications*, **13**, 2638.
 46. Pessina, F., Giavazzi, F., Yin, Y., Gioia, U., Vitelli, V., Galbiati, A. (2019) Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors, *Nature Cell Biology*, **21**, 1286–1299.

47. Dall'Agnese, G., Dall'Agnese, A., Banani, S.F., Codrich, M., Malfatti, M.C., Antoniali, G. (2023) Role of condensates in modulating DNA repair pathways and its implication for chemoresistance, *Journal of Biological Chemistry*, **299**, 104800.
48. Spegg, V., Altmeyer, M. (2021). Biomolecular condensates at sites of DNA damage: More than just a phase, *DNA Repair (Amst)*, **106**, 103179.
49. Jiang, L., Shao, C., Wu, Q.J., Chen, G., Zhou, J., Yang, B. (2017) NEAT1 scaffolds RNA-binding proteins and the Microprocessor to globally enhance pri-miRNA processing, *Nature Structural and Molecular Biology*, **24**, 816–824.
50. Fox, A.H., Nakagawa, S., Hirose, T., Bond, C.S. (2018) Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation, *Trends in Biochemical Sciences*, **43**, 124–135.
51. West, J.A., Mito, M., Kurosaka, S., Takumi, T., Tanegashima, C., Chujo, T. (2016) Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization, *Journal of Cell Biology*, **214**, 817–830.
52. Pollock, C., Huang, S. (2010). The Perinucleolar Compartment, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, a000679–a000679.
53. do Amaral, M.J., de Andrade Rosa, I., Andrade, S.A., Fang, X., Andrade, L.R., Costa, M.L. (2022) The perinuclear region concentrates disordered proteins with predicted phase separation distributed in a 3D network of cytoskeletal filaments and organelles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, **1869**, 119161.
54. Nathanailidou, P., Taraviras, S., Lygerou, Z. (2020) DNA Replication Control: Liquid-liquid Phase Separation Comes Into Play, *Journal of Molecular Biochemistry*, **9**, 54–56.
55. Parker, M.W., Bell, M., Mir, M., Kao, J.A., Darzacq, X., Botchan, M.R. (2019) A new class of disordered elements controls DNA replication through initiator self-assembly, *Elife*, **8**, e48562.
56. Parker, M.W., Kao, J.A., Huang, A., Berger, J.M., Botchan, M.R. (2021) Molecular determinants of phase separation for Drosophila DNA replication licensing factors, *Elife*, **10**, e70535.
57. Liu, S., Wang, T., Shi, Y., Bai, L., Wang, S., Guo, D. (2021) USP42 drives nuclear speckle mRNA splicing via directing dynamic phase separation to promote tumorigenesis, *Cell Death and Differentiation*, **28**, 2482–2498.
58. Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control, *Science*, **361**, eaar3958.
59. Coffey, E.L. (2021) Biomolecular Condensates in Transcriptional Regulation: Ph.D. Thesis: Massachusetts Institute of Technology, p. 125.
60. Jack, A., Kim, Y., Strom, A.R., Lee, D.S.W., Williams, B., Schaub, J.M. (2022) Compartmentalization of telomeres through DNA-scaffolded phase separation, *Developmental Cell*, **57**, 277–290.e9.
61. Taliansky, M.E., Love, A.J., Kolozerzo-Lubnau, A., Smoliński, D.J. (2023) Cajal bodies: Evolutionarily conserved nuclear biomolecular condensates with properties unique to plants, *The Plant Cell*, **35**, 3214–3235.
62. Navascues, J., Berciano M. T., Tucker K. E., Lafarga, M., Matera, A.G. (2004) Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis, *Chromosoma*, **112**, 398–409.
63. Nesterov, S. V., Ilyinsky, N.S., Uversky, V.N. (2021) Liquid-liquid phase separation as a common organizing principle of intracellular space and biomembranes providing dynamic adaptive responses, *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, **1868**, 119102.
64. Hampoelz, B., Schwarz, A., Ronchi, P., Bragulat-Teixidor, H., Tischer, C., Gaspar, I. (2019) Nuclear Pores Assemble from Nucleoporin Condensates During Oogenesis, *Cell*, **179**, 671–686.e17.
65. Yoshizawa, T., Guo, L. (2021) Karyopherin- β s play a key role as a phase separation regulator, *The Journal of Biochemistry*, **170**, 15–23.
66. Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M (2016) Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments, *Cell*, **165**, 1686–1697.
67. Pombo, A. (1998) Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle, *The EMBO Journal*, **17**, 1768–1778.
68. Harrigan, J.A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R. (2011) Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells, *Journal of Cell Biology*, **193**, 97–108.
69. Seif, E., Kang, J.J., Sasseville, C., Senkovich, O., Kaltashov, A., Boulter, E.L. (2020). Phase separation by the polyhomeotic sterile alpha motif compartmentalizes Polycomb Group proteins and enhances their activity, *Nature Communications*, **11**, 5609.
70. Guo, Y., Zhao, S., Wang, G.G. (2021) Polycomb Gene Silencing Mechanisms: PRC2 Chromatin Targeting, H3K27me3 «Readout», and Phase Separation-Based Compaction, *Trends in Genetics*, **37**, 547–565.
71. Guo, Y., Wang, G.G. (2022) Modulation of the high-order chromatin structure by Polycomb complexes, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, 1021658.
72. Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P. (2020) PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can!, *Nucleic Acids Research*, **48**, 11890–11912.
73. Wu, W., Tan, Y., Yin, H., Jiang, M., Jiang, Y., Ma, X. (2023) Phase separation is required for PML nuclear body biogenesis and function, *The FASEB Journal*, **37**, e22986.
74. Lallemand-Breitenbach, V., de The, H. (2010) PML Nuclear Bodies, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, a000661.
75. Kim, S., Kalappurakkal, J.M., Mayor, S., Rosen, M.K. (2019) Phosphorylation of nephrin induces phase separated domains that move through actomyosin contraction, *Molecular Biology of the Cell*, **30**, 2996–3012.
76. Banjade, S., Rosen, M.K. (2014) Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors, *Elife*, **3**, e04123.
77. Baymiller, M., Moon, S.L. (2023) Stress Granules as Causes and Consequences of Translation Suppression, *Antioxidants and Redox Signaling*, **39**, 390–409.
78. Grousl, T., Vojtova, J., Hasek, J., Vomastek, T. (2022) Yeast stress granules at a glance, *Yeast*, **39**, 247–261.
79. Decker, C.J. Parker, R. (2012) P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**, a012286–a012286.
80. Grimes, B., Jacob, W., Liberman, A.R., Kim, N., Zhao, X., Masison, D.C (2023) The Properties and Domain Requirements for Phase Separation of the Sup35 Prion Protein In Vivo, *Biomolecules*, **13**, 1370.
81. Nunes, C., Mestre, I., Marcelo, A., Koppenol, R., Matos, C.A., Nóbrega, C. (2019) MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules, *Database (Oxford)*, **2019**, baz031.

82. Deis, R., Elkouby, Y.M. (2022) Microtubules control B α c Phase separation and Balbiani body condensation in zebrafish oocyte polarity, *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2022.03.11.484019.
83. Boke, E., Ruer, M., Wühr, M., Coughlin, M., Lemaitre, R., Gygi, S. P., Alberti, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., & Mitchison, T. J. (2016) Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment, *Cell*, **166**, 637–650.
84. Nott, T.J., Petsalaki, E., Farber, P., Jervis, D., Fussner, E., Plochowitz, A. (2015) Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Membraneless Organelles, *Molecular Cell*, **57**, 936–47.
85. Pushpalatha, K.V., Besse, F. (2019) Local Translation in Axons: When Membraneless RNP Granules Meet Membrane-Bound Organelles, *Frontiers in molecular biosciences*, **6**, 129.
86. Zwicker, D., Decker, M., Jaensch, S., Hyman, A.A., Jülicher, F. (2014) Centrosomes are autocatalytic droplets of pericentriolar material organized by centrioles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, E2636–E2645.
87. Patel, P.H., Barbee, S.A., Blankenship, J.T. (2016) GW-Bodies and P-Bodies Constitute Two Separate Pools of Sequestered Non-Translating RNAs, *PLoS One*, **11**, e0150291.
88. Putnam, A., Cassani, M., Smith, J., Seydoux, G. (2019) A gel phase promotes condensation of liquid P granules in *Caenorhabditis elegans* embryos, *Nature Structural and Molecular Biology*, **26**, 220–226.
89. Smith, J., Calidas, D., Schmidt, H., Lu, T., Rasoloson, D., Seydoux, G. (2016) Spatial patterning of P granules by RNA-induced phase separation of the intrinsically-disordered protein MEG-3, *Elife*, **5**, e21337.
90. Buckingham, M., Liu, J.L. (2011) U bodies respond to nutrient stress in *Drosophila*, *Experimental Cell Research*, **317**, 2835–2844.
91. Liu, J.L., Gall, J.G.. (2007) U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 11655–11659.
92. Tsalikis, J., Tattoli, I., Ling, A., Sorbara, M.T., Croitoru, D.O., Philpott, D.J. (2015) Intracellular Bacterial Pathogens Trigger the Formation of U Small Nuclear RNA Bodies (U Bodies) through Metabolic Stress Induction, *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 20904–20918.
93. Franzmann, T.M., Jahnel, M., Pozniakovsky, A., Mahamid, J., Holehouse, A.S., Nüske, E. (2018) Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness, *Science*, **359**, eaao5654.
94. Du, M., Chen, Z.J. (2018) DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling, *Science*, **361**, 704–709.
95. Ladbury, J.E., Lin, C.C., Suen, K.M. (2023) Phase separation enhances probability of receptor signalling and drug targeting, *Trends in Biochemical Sciences*, **48**, 428–436.
96. Jaliha, A.P., Schmidt, A., Gao, G., Little, S.R., Pitchiaya, S., Walter, N.G. (2021) Hyperosmotic phase separation: Condensates beyond inclusions, granules and organelles, *Journal of Biological Chemistry*, **296**, 100044.
97. Ambadipudi, S., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E, Zweckstetter, M. (2017) Liquid–liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau, *Nature Communications*, **8**, 275.
98. Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y. (2015) A Liquid-to-Solid Phase

- Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation, *Cell*, **162**, 1066–1077.
99. Conicella, A.E., Zerze, G.H., Mittal, J., Fawzi, N.L. (2016) ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain, *Structure*, **24**, 1537–1549.
100. Peskett, T.R., Rau, F., O'Driscoll, J., Patani, R., Lowe, A.R., Saibil, H.R. (2018) A Liquid to Solid Phase Transition Underlying Pathological Huntingtin Exon1 Aggregation, *Molecular Cell*, **70**, 588–601.e6.
101. Mehta, S., Zhang, J. (2022) Liquid–liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer, *Nature Reviews Cancer*, **22**, 239–252.
102. Roberts, S., Dzuricky, M., Chilkoti, A. (2015) Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins, *FEBS letters*, **589**, 2477–2486.
103. Vrhovski, B., Weiss, A.S. (1998) Biochemistry of tropoelastin, *European journal of biochemistry*, **258**, 1–18.
104. Olins, A.L., Gould, T.J., Boyd, L., Sarg, B., Olins, D.E. (2020) Hyperosmotic stress: in situ chromatin phase separation, *Nucleus*, **11**, 1–18.
105. Frey, S., Görlich, D. (2007) A Saturated FG-Repeat Hydrogel Can Reproduce the Permeability Properties of Nuclear Pore Complexes, *Cell*, **130**, 512–523.
106. Kato, M., McKnight, S.L. (2017) Cross- β Polymerization of Low Complexity Sequence Domains, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **9**, a023598.
107. Kato, M., Han, T.W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L.C. (2012) Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels, *Cell*, **149**, 753–767.
108. Shimamoto, Y., Maeda, Y.T., Ishiwata, S., Libchaber, A.J., Kapoor, T.M. (2011) Insights into the Micromechanical Properties of the Metaphase Spindle, *Cell*, **145**, 1062–1074.
109. Rog, O., Köhler, S., Dernburg, A.F. (2017) The synaptonemal complex has liquid crystalline properties and spatially regulates meiotic recombination factors, *Elife*, **6**, e21455.
110. Guillén-Boixet, J., Kopach, A., Holehouse, A.S., Wittmann, S., Jahnel, M., Schlübler, R. (2020) RNA-Induced Conformational Switching and Clustering of G3BP Drive Stress Granule Assembly by Condensation, *Cell*, **181**, 346–361.e17.
111. Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A. (2010) Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies, *Journal of Cell Science*, **123**, 392–400.
112. Fare, C.M., Villani, A., Drake, L.E., Shorter, J. (2021) Higher-order organization of biomolecular condensates, *Open biology*, **11**, 210137.
113. Otzen, D., Riek, R. (2019) Functional Amyloids, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **11**, a033860.
114. Sergeeva, A.V., Galkin, A.P. (2020) Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance, *Current Genetics*, **66**, 849–866.
115. Rubel, M.S., Fedotov, S.A., Grizel, A.V., Sopova, J. V., Malikova, O.A., Chernoff, Y.O., Rubel, A.A. (2020) Functional Mammalian Amyloids and Amyloid-Like Proteins, *Life*, **10**, 156.
116. Hanazawa, M., Yonetani, M., Sugimoto, A. (2011) PGL proteins self associate and bind RNPs to mediate germ granule assembly in *C. elegans*, *Journal of Cell Biology*, **192**, 929–937.

117. Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T. (1999) Pml Is Critical for Nd10 Formation and Recruits the Pml-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by Sumo-1, *Journal of Cell Biology*, **147**, 221–234.
118. Groušl, T., Ivanov, P., Frydlová, I., Vašicová, P., Janda, F., Vojtová, J. (2009) Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Cell Science*, **122**, 2078–2088.
119. Buchan, J.R., Parker, R. (2009) Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation, *Molecular Cell*, **36**, 932–341.
120. Mittag, T., Parker, R. (2018). Multiple Modes of Protein–Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly, *Journal of Molecular Biology*, **430**, 4636–4649.
121. Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A.P., Kim, H.J. (2015) Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrilization, *Cell*, **163**, 123–133.
122. Peran, I., Mittag, T. (2020) Molecular structure in biomolecular condensates, *Current Opinion in Structural Biology*, **60**, 17–26.
123. Grizel, A. V., Rubel, A.A., Chernoff, Y.O. (2016) Strain conformation controls the specificity of cross-species prion transmission in the yeast model, *Prion*, **10**, 269–282.
124. Chernoff, Y.O., Grizel, A.V., Rubel, A.A., Zelinsky, A.A., Chandramowlishwaran, P., Chernova, T.A. (2020) Application of yeast to studying amyloid and prion diseases, *Advances in genetics*, **105**, 293–380.
125. Martin, E.W., Mittag, T. (2018) Relationship of Sequence and Phase Separation in Protein Low-Complexity Regions, *Biochemistry*, **57**, 2478–2487.
126. Wang, J., Choi, J.M., Holehouse, A.S., Lee, H.O., Zhang, X., Jahnel, M. (2018) A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins, *Cell*, **174**, 688–699.e16.
127. Ozawa, Y., Anbo, H., Ota, M., Fukushima, S. (2023) Classification of proteins inducing liquid–liquid phase separation: sequential, structural and functional characterization, *The Journal of Biochemistry*, **173**, 255–264.
128. Fomicheva, A., Ross, E. (2021) From Prions to Stress Granules: Defining the Compositional Features of Prion-Like Domains That Promote Different Types of Assemblies, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 1251.
129. Kulichikhin, K.Y., Malikova, O.A., Zobnina, A.E., Zalutskaya, N.M., Rubel, A.A. (2023) Interaction of Proteins Involved in Neuronal Proteinopathies. *Life*. **13**(10):1954.
130. Semenov, A.N., Rubinstein, M. (1998) Thermoreversible Gelation in Solutions of Associative Polymers. 1. Statics, *Macromolecules*, **31**, 1373–1385.
131. Ginell, G.M., Holehouse, A.S. (2023) An Introduction to the Stickers-and-Spacers Framework as Applied to Biomolecular Condensates, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2563**, 95–116.
132. Murthy, A.C., Dignon, G.L., Kan, Y., Zerze, G.H., Parekh, S.H., Mittal, J. (2019). Molecular interactions underlying liquid–liquid phase separation of the FUS low-complexity domain, *Nature Structural and Molecular Biology*, **26**, 637–648.

133. Saar, K.L., Morgunov, A.S., Qi, R., Arter, W.E., Krainer, G., Lee, A.A. (2021) Learning the molecular grammar of protein condensates from sequence determinants and embeddings, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **118**, e2019053118.
134. Devarajan, D.S., Wang, J., Nikoubashman, A., Kim, Y.C., Mittal, J. (2023) Sequence-Dependent Material Properties of Biomolecular Condensates, *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2023.05.09.540038.
135. Fisher, R.S., Elbaum-Garfinkel, S. (2020) Tunable multiphase dynamics of arginine and lysine liquid condensates, *Nature Communications*, **11**, 4628.
136. De Sancho, D. (2022) Phase separation in amino acid mixtures is governed by composition, *Biophysical Journal*, **121**, 4119–4127.
137. Vernon, R.M., Chong, P.A., Tsang, B., Kim, T.H., Bah, A., Farber, P. (2018) Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation, *eLife*, **7**, e31486.
138. Crick, S.L., Ruff, K.M., Garai, K., Frieden, C., Pappu, R. V. Unmasking the roles of N- and C-terminal flanking sequences from exon 1 of huntingtin as modulators of polyglutamine aggregation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 20075–20080.
139. Nomoto, A., Nishinami, S., Shiraki, K. (2021) Solubility Parameters of Amino Acids on Liquid–Liquid Phase Separation and Aggregation of Proteins, *Frontiers in cell and developmental biology*, **9**, 691052.
140. Li, J., Zhang, M., Ma, W., Yang, B., Lu, H., Zhou, F. (2022) Post-translational modifications in liquid-liquid phase separation: a comprehensive review, *Molecular Biomedicine*, **3**, 13.
141. Wang, J.T., Smith, J., Chen, B.C., Schmidt, H., Rasoloson, D., Paix, A. (2014) Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically disordered proteins in *C. elegans*, *Elife*, **3**, e04591.
142. López-Palacios, T.P., Andersen, J.L. (2023) Kinase regulation by liquid–liquid phase separation, *Trends in Cell Biology*, **33**, 649–666.
143. Qamar, S., Wang, G., Randle, S.J., Ruggeri, F.S., Varela, J.A., Lin, J.Q. (2018) FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation- π Interactions, *Cell*, **173**, 720–734.e15.
144. Zhang, H., Romero, H., Schmidt, A., Gagova, K., Qin, W., Bertulat, B. (2022) MeCP2-induced heterochromatin organization is driven by oligomerization-based liquid–liquid phase separation and restricted by DNA methylation, *Nucleus*, **13**, 1–34.
145. Cheng, X. (2023) Protein SUMOylation and phase separation: partners in stress?, *Trends in Biochemical Sciences*, **48**, 417–419.
146. Keiten-Schmitz, J., Röder, L., Hornstein, E., Müller-McNicoll, M., Müller, S. (2021) SUMO: Glue or Solvent for Phase-Separated Ribonucleoprotein Complexes and Molecular Condensates?, *Frontiers in molecular biosciences*, **8**, 673038.
147. Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F. (2014) Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *Journal of Cell Biology*, **204**, 931–945.

148. Li, X., Pinou, Iv., Du, Y., Chen, X., Liu, C. (2023) Emerging roles of O-glycosylation in regulating protein aggregation, phase separation, and functions, *Current Opinion in Chemical Biology*, **75**, 102314.
149. Roden, C., Gladfelter, A.S. (2021) RNA contributions to the form and function of biomolecular condensates, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **22**, 183–195.
150. Bounedjah, O., Desforges, B., Wu, T.D., Pioche-Durieu, C., Marco, S., Hamon, L., (2014) Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress granules, *Nucleic Acids Research*, **42**, 8678–8691.
151. Van Treeck, B., Protter, D., Matheny, T., Khong, A., Link, C.D., Parker, R. (2018) RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 2734–2739.
152. Smith, J., Calidas, D., Schmidt, H., Lu, T., Rasoloson, D., Seydoux, G. (2016) Spatial patterning of P granules by RNA-induced phase separation of the intrinsically-disordered protein MEG-3, *eLife*, **5**, e21337.
153. Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S.F., Wheeler, J.R., Parker, R. (2017) The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules, *Molecular Cell*, **68**, 808–820.e5.
154. Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., (2017) P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons, *Molecular Cell*, **68**, 144–157.e5.
155. Schisa, J., Pitt, N. J., Priess, R.J. (2001) Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults, *Development*, **128**, 1287–1298.
156. Namkoong, S., Ho, A., Woo, Y.M., Kwak, H., Lee, J.H. (2018) Systematic Characterization of Stress-Induced RNA Granulation, *Molecular Cell*, **70**, 175–187.e8.
157. Berry, J., Weber, S.C., Vaidya, N., Haataja, M., Brangwynne, C.P. (2015) RNA transcription modulates phase transition-driven nuclear body assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, E5237–E5245.
158. Boeynaems, S., Holehouse, A.S., Weinhardt, V., Kovacs, D., Van Lindt, J., Larabell, C. (2019) Spontaneous driving forces give rise to protein–RNA condensates with coexisting phases and complex material properties, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 7889–7898.
159. Jain, A., Vale, R.D. (2017) RNA phase transitions in repeat expansion disorders, *Nature*, **546**, 243–247.
160. Smith, J.A., Curry, E.G., Blue, R.E., Roden, C., Dundon, S., Rodríguez-Vargas, A., (2020) FXR1 splicing is important for muscle development and biomolecular condensates in muscle cells, *Journal of Cell Biology*, **219**, e201911129.
161. Su, Y., Maimaitiyiming, Y., Wang, L., Cheng, X., Hsu, C (2021) Modulation of Phase Separation by RNA: A Glimpse on N6-Methyladenosine Modification, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 786454.
162. Langdon, E.M., Qiu, Y., Ghanbari Niaki, A., McLaughlin, G.A., Weidmann, C.A., Gerbich, T.M. (2018) mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation, *Science*, **360**, 922–927.

163. Mitrea, D.M., Chandra, B., Ferrolino, M.C., Gibbs, E.B., Tolbert, M., White, M.R. (2018) Methods for Physical Characterization of Phase-Separated Bodies and Membraneless Organelles, *Journal of molecular biology*, **430**, 4773–4805.
164. Molenaar, C., Weeks, K.L. (2018) Nucleocytoplasmic shuttling: The ins and outs of quantitative imaging, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **45**, 1087–1094.
165. Jonkman, J., Brown, C.M. (2015) Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques, *Journal of biomolecular techniques: JBT*, **26**, 54–65.
166. Watanabe, K., Morishita, K., Zhou, X., Shiizaki, S., Uchiyama, Y., Koike, M. (2021) Cells recognize osmotic stress through liquid–liquid phase separation lubricated with poly(ADP-ribose), *Nature Communications*, **12**, 1353.
167. Khan, T., Kandola, T.S., Wu, J., Venkatesan, S., Ketter, E., Lange, J.J. (2018) Quantifying Nucleation In Vivo Reveals the Physical Basis of Prion-like Phase Behavior, *Molecular Cell*, **71**, 155–168.e7.
168. Kroschwald, S., Maharana, S., Alberti, S. (2017) Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membraneless compartments, *Matters*, **3**, e201702000010.
169. Weihs, D., Mason, T.G., Teitell, M.A. (2006) Bio-Microrheology: A Frontier in Microrheology, *Biophysical Journal*, **91**, 4296–4305.
170. Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A., Lam, Y.W., Steen, H. (2002) Directed Proteomic Analysis of the Human Nucleolus, *Current Biology*, **12**, 1–11.
171. Youn, J.Y., Dunham, W.H., Hong, S.J., Knight, J.D.R., Bashkurov, M., Chen, G.I. (2018) High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies, *Molecular Cell*, **69**, 517–532.e11.
172. Hughes, M.P., Sawaya, M.R., Boyer, D.R., Goldschmidt, L., Rodriguez, J.A., Cascio, D. (2018) Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked β sheets that assemble networks, *Science*, **359**, 698–701.
173. Sun, Y., Zhang, S., Hu, J., Tao, Y., Xia, W., Gu, J. (2022) Molecular structure of an amyloid fibril formed by FUS low-complexity domain, *iScience*, **25**, 103701.
174. Gibbs, E.B., Cook, E.C., Showalter, S.A. (2017) Application of NMR to studies of intrinsically disordered proteins, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **628**, 57–70.
175. Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R. (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophysical Reviews*, **8**, 409–427.
176. Li, P., Banjade, S., Cheng, H.C., Kim, S., Chen, B., Guo, L. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins, *Nature*, **483**, 336–340.
177. Kikhney, A.G., Svergun, D.I. (2015) A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins, *FEBS Letters*, **589**, 2570–2577.
178. Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D.K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I. (2018) RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins, *Science*, **360**, 918–921.
179. Mahato, J., Ray, S., Maji, S.K., Chowdhury, A. (2023) Spectrally Resolved FRET Microscopy of α -Synuclein Phase-Separated Liquid Droplets, *Methods in Molecular Biology*, **2551**, 425–447.
180. Ray, S., Singh, N., Patel, K., Krishnamoorthy, G., Maji, S.K. (2023) FRAP and FRET Investigation

- of α -Synuclein Fibrillization via Liquid-Liquid Phase Separation In Vitro and in HeLa Cells, *Methods in Molecular Biology*, **2551**, 395–423.
181. Ganser, L.R., Myong, S. (2020) Methods to Study Phase-Separated Condensates and the Underlying Molecular Interactions, *Trends in Biochemical Sciences*, **45**, 1004–1005.
182. Elson, E.L. (2011) Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future, *Biophysical Journal*, **101**, 2855–2870.
183. Erdős, G., Pajkos, M., Dosztányi, Z. (2021) IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation, *Nucleic Acids Research*, **49**, W297–W303.
184. Holehouse, A.S., Das, R.K., Ahad, J.N., Richardson, M.G., Pappu, R. (2017) CIDER: Resources to Analyze Sequence-Ensemble Relationships of Intrinsically Disordered Proteins, *Biophysical Journal*, **112**, 16–21.
185. Cascarina, S.M., Ross, E.D. (2022) The LCD-Composer webserver: high-specificity identification and functional analysis of low-complexity domains in proteins, *Bioinformatics*, **38**, 5446–5448.
186. Lancaster, A.K., Nutter-Upham, A., Lindquist, S., King, O.D. (2014) PLAAC: a web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition, *Bioinformatics*, **30**, 2501–2502.
187. Huang, Y.J., Acton, T.B., Montelione, G.T. (2014) DisMeta: A Meta Server for Construct Design and Optimization, *Methods in Molecular Biology*, **1091**, 3–16.
188. Oates, M.E., Romero, P., Ishida, T., Ghalwash, M., Mizianty, M.J., Xue, B. (2012) D2P2: database of disordered protein predictions. *Nucleic Acids Research*, **41**, D508–D516.
189. Piovesan, D., Del Conte, A., Clementel, D., Monzon, A.M., Bevilacqua, M., Aspromonte, M.C. (2023) MobiDB: 10 years of intrinsically disordered proteins, *Nucleic Acids Research*, **51**, D438–D444.
190. Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., Eisenberg, D. (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 3487–3492.
191. Chen, Z., Hou, C., Wang, L., Yu, C., Chen, T., Shen, B. (2022) Screening membraneless organelle participants with machine-learning models that integrate multimodal features, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2115369119.
192. Cai, H., Vernon, R.M., Forman-Kay, J.D. (2022) An Interpretable Machine-Learning Algorithm to Predict Disordered Protein Phase Separation Based on Biophysical Interactions, *Biomolecules*, **12**, 1131.