

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-150

РОЛЬ СЛАБЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА PML-V В ОБРАЗОВАНИИ ЖИДКО-КАПЕЛЬНЫХ КОНДЕНСАТОВ***THE ROLE OF WEAK NONSPECIFIC INTERACTIONS OF THE C-TERMINAL DOMAIN OF THE PML-V PROTEIN IN THE FORMATION OF LIQUID-DROP CONDENSATES**

Е. М. Неделяев, С. А. Силонов, А. А. Гаврилова, Е. Ю. Смирнов,
Е. А. Шмидт, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, А. В. Фонин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E. M. Nedelyaev, S. A. Silonov, A. A. Gavrilova, E. Y. Smirnov,
E. A. Smidt, I. M. Kusnetsova, K. K. Turoverov, A. V. Fonin

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ nedelyaev99@mail.ru

Аннотация

Исследование PML-телец важно из-за их полифункциональности и связи с удлинением теломер в раковых клетках, что делает их потенциальными мишенями для лечения онкологических заболеваний. В работе изучено фазовое разделение С-концевого домена белка PML-V *in vitro*. Флуоресцентная микроскопия показала, что конденсаты этого белка имеют высокую долю немобильной фракции, а важную роль в их образовании играют слабые неспецифические взаимодействия.

Abstract

The study of PML bodies is important due to their multifunctionality and their association with telomere elongation in cancer cells, making them potential targets for cancer treatment. This work investigates the phase separation of the C-terminal domain of the PML-V protein *in vitro*. Fluorescence microscopy revealed that the condensates of this protein have a high proportion of immobile fraction, and that weak nonspecific interactions play a significant role in their formation.

PML-тельца — ядерные полифункциональные немембранные органеллы, участвующие в регуляции транскрипции, стресс-ответе, клеточной дифференцировке и переходе клеток в сенесцентное состояние. При ряде форм онкологических заболеваний PML-тельца ассоциируются с процессом альтернативного удлинения теломер (ALT-associated PML-Bodies, APB). Укорочение теломер при деассоциации APBs позволяет рассматривать эти немембранные органеллы в качестве потенциальной терапевтической мишени для подавления ALT, а, следовательно, и для борьбы с трудно поддающимися лечению в настоящее время формами онкологических заболеваний.

Каркасный белок PML-телец, белок промиелоцитарного лейкоза (PML), существует в виде семи основных изоформ, различающихся по размеру и аминокислотной последовательности их С-концевого домена. Ранее нами было показано, что благодаря заряженным аминокислотным остаткам и неупорядоченной структуре С-концевые домены, по-видимому, играют определяющую роль в фазовом разделении типа «жидкость — жидкость», которое лежит в основе формирования PML-телец [1–3]. Установлено, что способность к фазовому разделению различных изоформ PML зависит от структуры С-концевого домена.

Целью настоящего исследования было изучение процесса фазового разделения С-концевого домена изоформы PML-V, являющейся одной из наиболее стабильных компонент PML-телец.

Для PML-V было установлено, что его С-конец способствует сборке, поддержанию и структурной стабильности ядерных PML-телец. Было показано, что С-концевые домены PML-V (PML-V_CT) способны к самопроизвольному фазовому разделению в клетках, нокаутных по PML.

Для того, чтобы исследовать механизм этого процесса в настоящей работе было изучено фазовое разделение С-концевого домена PML-V в зависимости от концентрации этого белка различных условиях: при различных pH и ионной силе раствора, при имитации условий краудинга, при наличии в растворе агентов, ингибирующих

* Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 22-15-00429).

электростатические (АТФ) или гидрофобные (1,6-гександиол) взаимодействия. Образование телец регистрировалось по флуоресценции зелёного флуоресцентного белка sfGFP, слитого с целевым белком.

Показано, что С-концевые домены PML-V *in vitro* способны претерпевать фазовое разделение с образованием конденсатов, свойства которых схожи с тельцами, образованные PML-V в клетках. Регистрация восстановления флуоресценции после обесцвечивания (FRAP) показала, что конденсаты, образованные PML-V_СТ, в растворе имеют слабое восстановление интенсивности флуоресценции (10–15 %), что свидетельствует о высокой доле немобильной фракции в образованных конденсатах, также, как и в тельцах, образованных изоформой PML-V в клетке.

Показано, что введение в раствор АТФ, ингибирующего электростатические взаимодействия между молекулами белка, нарушало фазовое разделение PML-V_СТ, что свидетельствует о существенной роли электростатических взаимодействий в фазовом разделении PML-V_СТ.

Условия, имитирующие краудинг (PEG 12000, 200 мг / мл) способствовали фазовому разделению PML-V_СТ: в присутствии PEG конденсаты формировались при концентрации PML-V_СТ в 10 мкМ, а в отсутствие — только при 30 мкМ и нивелировали действие АТФ, что свидетельствует о роли гидрофобных взаимодействий в присутствии краудинг агента. Это было подтверждено в экспериментах с агентом, ингибирующим гидрофобные взаимодействия: введение 1,6-гександиола (5/10 %) препятствовало образованию капель в условиях макромолекулярного краудинга.

Изменение pH (в пределах от 2 до 11) и ионной силы раствора (от 50 до 500 мМ NaCl) не влияло на процесс фазового разделения.

Литература

1. Fonin A. V., Silonov S. A., Shpironok O. G. et al. The Role of Non-Specific Interactions in Canonical and ALT-Associated PML-Bodies Formation and Dynamics // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 2. P. 5821.
2. Fonin A. V., Silonov S. A., Fefilova A. S. et al. New Evidence of the Importance of Weak Interactions in the Formation of PML-Bodies // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. P. 1613.
3. Antifeeva I. A., Fonin A. V., Fefilova A. S. et al. Techniques for the Detection and Analysis of LLPS and MLOs. Droplets Life. 2023. P. 205–231.