

# Białka ulegające separacji faz u roślin i metody ich badań

## STRESZCZENIE

**A**by różnorodne procesy biochemiczne mogły sprawnie zachodzić w tej samej komórce, niezbędne jest istnienie w niej wyodrębnionych obszarów. Oprócz obłonionych organelli należą do nich kondensaty biocząsteczkowe – nieobłonione, dynamicznie zmieniające się struktury powstające z białek i kwasów nukleinowych. Kondensaty te powstają często na drodze separacji faz ciecz- ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*, LLPS). Liczne doniesienia naukowe z ostatnich lat wskazują, że LLPS stanowi ważny mechanizm pozwalający roślinom identyfikować różne rodzaje stresu biotycznego oraz abiotycznego i reagować na nie. Niniejsza praca zawiera przegląd metod używanych obecnie do badania kondensatów makromolekularnych oraz funkcji białek ulegających LLPS u roślin.

## WPROWADZENIE

Zachodzące w komórce reakcje często wymagają wzajemnie wykluczających się warunków, z czego wynika potrzeba przestrzennego rozdzielania ich. Aby koordynacja w czasie i przestrzeni złożonych i różnorodnych procesów biochemicznych mogła zachodzić w komórce prawidłowo, konieczne jest wydzielenie w jej objętości przedziałów i organelli [1]. Do obłonionych i przez to oddzielonych od otaczającego środowiska organelli u wszystkich eukariontów należy jądro, mitochondria [2], aparat Golgiego [3], lizosomy i peroksyosomy [4], a u roślin dodatkowo chloroplasty [5]. Kontrolowany kontakt ze środowiskiem umożliwia im dyfuzja oraz aktywny transport cząsteczek przez błony.

W komórkach tworzą się również struktury bezbłonowe – kondensaty biocząsteczkowe zbudowane z białek i kwasów nukleinowych. Jako pierwszy z nich, już w XIX wieku, zostało opisane jąderko [6]. Później w jądrach zidentyfikowano cętki jądrowe/splicingowe (ang. *splicing speckles*) [7] i ciała Cajala [8], a w cytoplazmie granule stresowe i ciała P (ang. *Processing bodies*, *P-bodies*). Fakt współlistnienia tych kondensatów prowadzi do pytań o ich funkcje biologiczne, mechanizmy ich powstawania oraz regulację procesów kondensacji i dekonensacji, które tam zachodzą.

Przełomem w badaniach dotyczących właściwości fizykochemicznych oraz funkcji biologicznych kondensatów biocząsteczkowych była obserwacja, że granule P pochodzące z zarodków modelowego nicienia *Caenorhabditis elegans* zachowują się jak krople cieczy, zdolne się łączyć, zmieniać kształt i wymieniać zawartość z cytoplazmą [9]. Dalsze prace wykazały, że również inne nieobłonione kondensaty wykazują takie właściwości, a separacja faz ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*, LLPS) jest ważnym mechanizmem odpowiadającym za tworzenie kondensatów z makrocząsteczek takich jak białka i kwasy nukleinowe [10-12]. Rdzeń kondensatów biomolekularnych stanowią zazwyczaj właśnie białka wiążące RNA lub DNA [13]. Ostatnie lata przynosiły coraz więcej dowodów na powszechność zaangażowania LLPS w procesy związane z kontrolą transkrypcji [14-16] czy z utrzymaniem i przebudową struktury chromatyny [17-19].

W biologii komórki pojęcie separacji faz dotyczy biocząsteczek o wysokim stężeniu w pewnych obszarach komórki tworzących bezbłonowe kondensaty w cytoplazmie lub jądrze i zazwyczaj przejawiających właściwości przypominające ciecz; szczególną formą zjawiska separacji faz jest LLPS, w której ciecz rozdziela się spontanicznie na dwie osobne fazy, zatężoną i rozcieńczoną i fazy te stabilnie współlistniają [13,20,21]. Innego rodzaju separacje faz, w których pojawia się np. równowaga ciecz-ciało stałe, są w komórkach mniej rozpowszechnione. LLPS jest procesem odwracalnym, a równowaga ustalająca się między dwiema fazami jest dynamiczna; zachodzenie LLPS jest zależne od czynników takich jak temperatura i pH [22].

dr Marta Gapińska ✉

Zakład Biologii Systemów, Wydział Biologii,  
Uniwersytet Warszawski

[https://doi.org/10.18388/pb.2017\\_580](https://doi.org/10.18388/pb.2017_580)

✉ autor korespondujący: ma.gapinska@uw.edu.pl

**Słowa kluczowe:** stres biotyczny, stres abiotyczny, kondensaty białkowe, LLPS

**Wykaz skrótów:** IDR – region wewnętrznie nieuporządkowany (ang. *intrinsically disordered region*); LCS – sekwencja o niskiej złożoności (ang. *low complexity sequence*); LLPS – separacja faz ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*); XL-MS – spektrometria mas po sieciowaniu (ang. *chemical cross-linking mass spectrometry*)

**Finansowanie:** Artykuł powstał podczas realizacji projektu OPUS nr 2019/35/B/NZ3/01362 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki

Początkowo badania dotyczące LLPS dotyczyły głównie białek zwierzęcych oraz drożdżowych, ostatnie odkrycia dostarczają jednak coraz więcej dowodów na istotne, odrębne funkcje separacji faz u roślin [23-27]. Poniższa praca przedstawia przegląd obecnej wiedzy na temat zjawiska LLPS, zjawisk i funkcji związanych z tym procesem u roślin oraz najnowszych metod badania go.

## ZNANE I NOWOODKRYWANE ROLE SEPARACJI FAZ U ROŚLIN

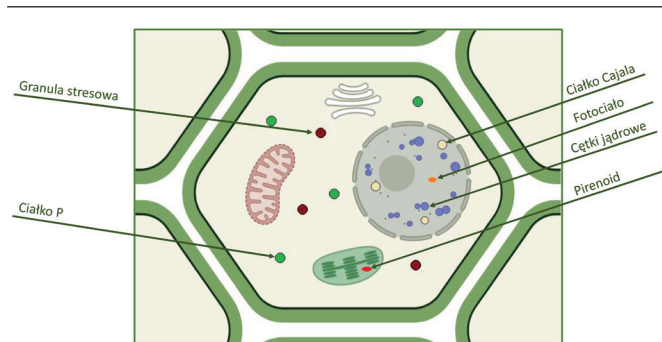
Rośliny w swoim cyklu życiowym narażone są na działanie różnorodnych czynników stresu biotycznego i abiotycznego. Do tych pierwszych należą patogenne wirusy, bakterie i grzyby oraz owady, ale też konkurencja o zasoby z innymi przedstawicielami królestwa roślin, do drugich natomiast należą czynniki chemiczne i fizyczne takie jak nadmiar lub niedobór wody, niedobór substancji odżywczych, zmiany temperatury. Ze względu na niezdolność roślin do ruchu, dynamiczna odpowiedź tych organizmów na zmiany środowiskowe jest kluczowa dla ich przetrwania. W ostatnich latach wśród mechanizmów odporności na te niekorzystne czynniki odkrywanych jest coraz więcej białek, których działanie zależy od ich zdolności do ulegania LLPS.

Wyjątkowość roślin na drzewie życia zaznacza się również w rodzajach bezbłonowych organelli obecnych w ich komórkach. Oprócz jąderka, cętek jądrowych czy ciałek Cajala, rozpowszechnionych wśród eukariontów o bardzo różnym pochodzeniu ewolucyjnym, posiadają one jeszcze organella o funkcjach ściśle związanych z ich sposobem odżywiania się czy gospodarowania składnikami odżywczymi.

### KONDENSATY BIOCZĄSTECZKOWE WSPÓLNE DLA EUKARIONTÓW

Większość znanych rodzajów niebłonionych kondensatów występuje u organizmów eukariotycznych z całego drzewa życia, co wskazuje na ich uniwersalne funkcje. Pierwszym opisanym bezbłonowym kondensatem w komórce było jąderko [6]. Współczesne badania dostarczają argumentów dla postrzegania go jako wielowarstwowego kondensatu biocząsteczkowego, którego powstawanie na drodze LLPS ułatwia m.in. początkowe etapy biogenezy rybosomów [28]. W odpowiedzi na stresy, takie jak ekstremalne temperatury czy zasolenie, jąderka komórek roślinnych ulegają strukturalnym przemianom oraz modulują syntezę i przetwarzanie rRNA [29].

Wśród mniejszych niebłonionych organelli obecnych w jądrze komórkowym można wyróżnić ciała Cajala oraz cętki jądrowe (Ryc. 1). Ciała Cajala to kondensaty o wielkości 0,2–2  $\mu\text{m}$  znajdujące często w okolicy jąderka i zaangażowane w metabolizm RNA oraz tworzenie kompleksów biorących udział w transkrypcji czy splicingu. Przypisuje się im też inne funkcje, związane m.in. z odpowiedzią na stres [30]. Co istotne, ciała Cajala i jąderka mogą również w różny sposób modulować odpowiedź na infekcje wirusowe i kontakt z innymi patogenami [31].



**Rycina 1.** Lokalizacja kondensatów biomolekularnych w komórce roślinnej. Strzałkami zaznaczono lokalizacje kondensatów makromolekularnych powszechnych wśród eukariontów (jąderko, cętki jądrowe, granule stresowe, ciała P) oraz unikatowych dla roślin (pirenoidy i fotociała).

Cętki jądrowe to kondensaty nieregularne w kształcie i o różnej wielkości; zawierają RNA i białka – w tym wiele czynników splicingowych i lokalizują się w centralnej części jądra [32].

Do bezbłonowych kondensatów ulokowanych w cytoplazmie należą granule stresowe oraz ciała P (Ryc. 1). Oba te rodzaje kondensatów powstają na drodze LLPS i charakteryzują się dynamiką składu i funkcji; zawierają białka zaangażowane m.in. w zwijanie białek i translację, a także mRNA, długie niekodujące RNA, wolne nukleotydy i aminokwasy. Granule stresowe, o rozmiarach 0,1–2  $\mu\text{m}$ , tworzą się w komórkach pod wpływem czynników stresowych, takich jak ekspozycja na zbyt wysoką lub niską temperaturę, niedostatek tlenu czy infekcję wirusową; zazwyczaj natomiast zanikają po ustąpieniu tych czynników. Opisano je najpierw w komórkach ssaków, posiadają jednak swoje odpowiedniki wśród różnorodnych organizmów eukariotycznych. Mechanizm w jaki granule stresowe pozwalają komórce na radzenie sobie ze stresem, wciąż jeszcze nie został dobrze poznany; w ostatnich latach pokazano natomiast m.in. ich zdolność do stabilizacji uszkodzonych błon lizosomów [33]. Ciała P (*po polsku pełną nazwą byłyby „ciałka przetwarzające”* od angielskiego „processing bodies”) to zachowane ewolucyjnie w komórkach eukariotycznych granule, zawierające głównie mRNA, których translacja jest zahamowana, oraz białka związane z degradacją mRNA. To sugeruje rolę ciałek P w regulacji potranslacyjnej. W przeciwieństwie do granul stresowych ciała P są obecne w komórce niezależnie od stresu, zmiany warunków środowiskowych mają jednak wpływ na ich dynamikę i mobilność [34]. Opisana dynamika zarówno ciałek P, jak i granul stresowych, świadczy o tym, że kondensaty biocząsteczkowe można traktować jako sensory zmian zachodzących w otoczeniu.

### PIRENOIDY I FOTOCIAŁA – KONDENSATY BIOCZĄSTECZKOWE CHARAKTERYSTYCZNE DLA ROŚLIN

Oprócz opisanych wcześniej niebłonionych organelli powszechnych wśród różnorodnych eukariontów istnieją również takie występujące tylko w roślinach. Należą do nich występujące w chloroplastach pirenoidy (Ryc. 1) – typowe dla jednokomórkowych fototroficznych glonów, ale

obecne też w niektórych wielokomórkowych roślinach lądowych [35] oraz jądrowe fotociała (ang. *photobodies*).

Jednokomórkowe glony *Chlamydomonas reinhardtii* wykorzystują kondensaty nazywane pirenoidami do miejscowego załączenia białek zaangażowanych w wiązanie węgla [36]. Wypełniająca te przedziały macierz pirenoidowa, zbudowana z wiążącego węgla enzymu RuBisCo (ang. *Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase*, karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu) umożliwia glonom gromadzenie dwutlenku węgla w wysokim stężeniu, co z kolei pozwala na wydajne prowadzenie reakcji karboksylacji [37]. Pirenoidy, uważane niegdyś za struktury krystaliczne, okazały się wykazywać typowe właściwości kropli – są kuliste, mogą się łączyć w większe struktury, a składniki w ich wnętrzu wydajnie się mieszają, spełnione są zatem wszystkie podstawowe warunki pozwalające mówić o separacji faz.

Fotociałami nazwano początkowo bezbłonowe przedziały formowane przez fitochromy [38], choć z czasem pojęcie to zaczęło obejmować wszelkie bezbłonowe przedziały reagujące na światło [39]. W ostatnich latach szczególnie intensywnie badany jest fitochrom B (phyB) – roślinny foto- i termosensor reagujący na obecność czerwonego światła oraz zmiany temperatury. W nieobecności czerwonego światła jest on równomiernie rozproszony w nukleoplazmie, jednak ze wzrostem intensywności oświetlenia zaczyna formować ciała jądrowe, zawierające oprócz samego phyB również jego interaktory [40]. Te fotociała dynamicznie łączą się na drodze LLPS i przemieszczają w odpowiedzi na wzrost intensywności oświetlenia, natomiast dzielą się na mniejsze i ponownie rozpraszają wobec braku światła [41]. [42] Fotociała rekrutują czynniki transkrypcyjne, pełniąc funkcję w regulacji transkrypcji genów w odpowiedzi na światło [39].

#### LLPS W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRESY ABIOTYCZNE

Nasiona w stanie uśpienia wykazują dużą odporność na stresy środowiskowe, siewki przeciwnie; są wrażliwe na warunki zewnętrzne, stąd dla przetrwania rośliny kluczowe jest kiełkowanie we właściwym momencie. Zbyt długie oczekiwanie na korzystne warunki grozi jednak między innymi zjedzeniem czy znalezieniem się pod zbyt grubą warstwą gleby. Dla zapoczątkowania procesu kiełkowania kluczowa jest dostępność wody i zdolność rośliny do reakcji na tę dostępność [43].

W roku 2021 scharakteryzowano jako regulator kiełkowania pozbawione odpowiedników poza królestwem roślin białko FLOE1 [44]. FLOE1 posiada dwa różne nieustrukturyzowane regiony o niskiej złożoności, bogate odpowiednio w serynę + kwas asparaginowy (DS-IDR) oraz prolinę, serynę + glutaminę (QPS-IDR). Pełnej długości FLOE1 ulega LLPS i tworzy kondensaty *in vivo* i *in vitro*. Linie *Arabidopsis thaliana* wyrażające warianty FLOE1 skrócone o regiony IDR w warunkach stresu solnego charakteryzowały się wyższym odsetkiem kiełkujących nasion niż rośliny typu dzikiego (ang. *wild type*, wt), podczas gdy w optymalnych warunkach wzrostu procent kiełkujących nasion był porównywalny. To sugeruje, że aktywność FLOE1 wiąże się z inhibicją kiełkowania w warunkach stresowych. Co istotne,

na poziomie molekularnym delekcje regionów nieustrukturyzowanych skutkują dwoma przeciwnymi fenotypami – wariant białka pozbawionego regionu QPS nie jest zdolny do tworzenia kondensatów, z kolei wariant pozbawiony DS-IDR łatwo przechodzi z fazy ciekłej do żelowej.

Innym białkiem ulegającym LLPS i związanym z reakcją rośliny na dostępność wody jest SEUSS. Białko to jest regulatorem transkrypcji i pełni funkcję sensora stłoczenia molekularnego. Stłoczenie to jest wynikiem wzrostu stężenia niereaktywnych cząsteczek w układzie i wpływa na właściwości i oddziaływania makrocząsteczek m. in. prowadząc do wzrostu stałych równowagi reakcji biochemicznych. SEUSS posiada nieustrukturyzowany region IDR1, który w wyniku stłoczenia molekularnego ulega zmianom konformacyjnym, co prowadzi do gwałtownej kondensacji białka. Pokazano, że obecność zdolnego do tworzenia kondensatów SEUSS umożliwia roślinie tolerancję stresu osmotycznego [45].

Kolejnym czynnikiem abiotycznym istotnym dla rozwoju rośliny jest temperatura; podczas gdy liczne szlaki regulacyjne pozwalające roślinom reagować na jej zmiany zostały już zbadane i znane są efekty zmian w ekspresji poszczególnych genów, aspekty związane z LLPS wyrażanych białek pozostają tematem nowym i dynamicznie rozwijającym.

Ekspresję genów związanych z odpowiedzią na wzrost temperatury regulują czynniki transkrypcyjne stresu ciepła (ang. *heat stress transcription factors*, HSFs). Wśród białek związanych z reakcją na wysoką temperaturę znajdują się białka ALBA (ang. *acetylation lowers binding affinity*; białka, u których acetylacja obniża powinowactwo wiązania). Białka te, takie jak ALBA4, ALBA5 i ALBA6, w normalnych warunkach są rozproszone w cytoplazmie. W warunkach podwyższonej temperatury ulegają separacji faz do granul stresowych oraz ciałek P a także wiążą transkrypty kodujące inne białka związane ze stresem cieplnym (m. in. HSF) i rekrutują je do granul cytoplazmatycznych, chroniąc w ten sposób przed degradacją. Pokazano, że proces tworzenia tych granul można zaliczyć do LLPS jako, że jest on dynamiczny i odwracalny, a powstające ciała zachowują opisane wcześniej właściwości cieczy. Rośliny pozbawione wszystkich tych trzech białek ALBA (ale nie pojedyncze i podwójne mutanty) wykazują hiperwrażliwość na wzrost temperatury. Jeśli jednak pozbawione zostaną również egzorybonukleazy 4, która degraduje mRNA w cytoplazmie w kierunku od 5' do 3', ich fenotyp zostaje odwrócony. Wszystko to sugeruje, że funkcje białek ALBA4/5/6 są redundantne, a białka te na drodze LLPS chronią transkrypty czynników transkrypcyjnych stresu cieplnego przed degradacją – wylania się funkcja LLPS jako dodatkowego poziomu regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na ciepło [46].

Separacji faz w odpowiedzi na stres cieplny, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, ulegają również wiążące RNA białka RBGD2 i RBGD4. Ustalono, że kluczowy dla LLPS jest u tych białek region zidentyfikowany w obrębie domeny o niskiej złożoności (ang. *low complexity domain*, LCD) i nazwany przez autorów publikacji [46] TRA (ang. *tyrosine residue array*, macierz reszt tyrozynowych). Mutacje w obszarze TRA upośledzają zdolność tych białek do segregowania się

do granul stresowych, a rośliny pozbawione funkcjonalnych, zdolnych do LLPS RBGD2 i RBGD4 charakteryzują się obniżoną tolerancją stresu wysokiej temperatury [47].

Separacja faz białek roślinnych może zachodzić nie tylko w reakcji na stres związany z podniesieniem temperatury, ale też jej obniżeniem, tak jak ma to miejsce w procesie wernalizacji. Wykazano, że u *Arabidopsis* białko FRIGIDA za pośrednictwem swoich IDR (ang. *intrinsically disordered regions*, regiony wewnątrznie nieuporządkowane) tworzy kondensaty pod wpływem zimna, a wielkość i liczba tych kondensatów zmienia się dynamicznie podczas fluktuacji temperatury. Białko zostaje dzięki temu fizycznie odseparowane od promotora FLOWERING LOCUS C (FLC), co przeciwdziała przedwczesnemu kwitnieniu. Jest to przykład zachodzenia LLPS łączącego zaangażowanie tego zjawiska w odpowiedź na stres abiotyczny z jego rolą w kontroli rozwoju rośliny [48].

Wzrost i rozwój rośliny są często ograniczane przez niedobór składników odżywczych, na przykład azotu [49]. W warunkach niedoboru azotu rośliny uruchamiają złożony mechanizm obejmujący żółknięcie i obumieranie starszych liści oraz przenoszenie azotu do liści młodszych i rozwijających się organów. Czynnikiem transkrypcyjnym kluczowym dla starzenia się indukowanego niedoborem azotu u *Arabidopsis* jest ORESARA1 (ORE1) [50]. Wykazano, że podjednostka 19a kompleksu mediatora u *Arabidopsis* ulega LLPS w obecności niedostatku azotu (lecz nie w optymalnych warunkach), a jej C-końców IDR oddziałuje z ORE1, regulując proces starzenia się rośliny.

#### LLPS W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRESY BIOTYCZNE

Jeden z ważniejszych rodzajów stresu biotycznego na jaki narażone mogą być rośliny jest związany z obecnością innych roślin. Wydzielane przez rośliny kwasy fenolowe, to jest związki zawierające pierścień fenolowy i grupę karboksylową, jak np. kwas salicylowy, hamują wzrost innych roślin w bezpośrednim sąsiedztwie w procesie allelopatii, chroniąc swojego producenta przed narażeniem na stres biotyczny wywołany przegęszczeniem i konkurencją o zasoby. Niedawno zidentyfikowano RBP47B (ang. *RNA Binding Protein 47B*, białko wiążące RNA 47B) jako sensor kwasów fenolowych u *Arabidopsis*. Jego substraty, takie jak kwas salicylowy, 4-hydroksybenzoesowy czy protokatechowy wiążą się do RBP47B, promując jego separację faz i wywołując tworzenie granul stresowych [51].

Na poziomie biotycznym roślinom zagraża jednak nie tylko konkurencja o zasoby ze strony innych roślin, ale przede wszystkim infekcje patogennymi drobnoustrojami. Aby się przed nimi chronić, rośliny wykształciły receptory odpornościowe zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz komórek, a skoordynowane działanie tych dwóch grup pozwala na złożoną i efektywną obronę przed infekcjami drobnoustrojowymi. Porównawcze badania ilościowe wskazują, że receptory selektywnie skierowane przeciw patogenom konkretnego rodzaju lub gatunku są znacznie liczniejsze, niż powierzchniowe PRR o szerszym spektrum działania (ang. *pattern recognition receptors*, receptory rozpoznające wzorce molekularne związane z patogenami) [52]. Recep-

tory NLR (ang. *nucleotide-binding leucine-rich repeat*, wiążące nukleotydy i posiadające powtórzenia bogate w leucyny) pośredniczą precyzyjnemu rozpoznawaniu patogenów specyficznych dla konkretnych szczepów. Najczęściej wykorzystują swoje C-końcowe domeny rejestrujące ligand do zaindukowania aktywności enzymatycznej efektorowej N-końcowej domeny TIR [53]. Działanie domeny TIR prowadzi ostatecznie do obumarcia zainfekowanej komórki, co powstrzymuje infekcję przed rozprzestrzenieniem się na cały organizm. Sam mechanizm aktywacji domen TIR był do niedawna nieznany, dopiero publikacje z roku 2024 pokazują, że zachodzi on za pośrednictwem LLPS - odsłania to nową rolę separacji faz dla odporności roślin [54]. Innym przykładem opartego o mechanizm LLPS regulatora odporności na infekcje mikroorganizmami u roślin jest system wykorzystujący rodzinę roślinnych białek GBPL (enzymy podobne do GTPazy GBP). GBPL1 i GBPL3 należące do tej rodziny są zdolne do ulegania LLPS. W warunkach konkretnych stresów biotycznych GBPL3 oddziałuje z promotorami genów związanych z obroną przed patogenami i rekrutuje podjednostki kompleksu mediatora oraz II polimerazy RNA, promując w ten sposób transkrypcję genów odporności. Dopóki stres nie następuje, GBPL3 jest sekwestrowane przez GBPL1 i przez to nieaktywne [55].

Doświadczalne badania LLPS u roślin dotyczą nie tylko *Arabidopsis*, ale również zbóż istotnych przemysłowo. W ostatnim czasie odkryto zaangażowanie LLPS w mechanizm odporności zbóż na fuzariozę, grzybiczą chorobę wywoływaną przez *F. graminearum*, powodującą pogorszenie plonów i zanieczyszczenia ziaren mykotoksynami. Genem niosącym odporność na fuzariozę jest *taHRC*. Jego ekspresja prowadzi do powstawania białka TaHRC, którego poszczególne warianty odpowiedzialne są za rekrutację konkretnych zestawów białek o różnym potencjale do LLPS [56].

#### KONDENSATY BIOMOLEKULARNE W ROZWOJU ROŚLIN

Ostatnią opisywaną tu grupą białek ulegających separacji faz u roślin będą białka zaangażowane w rozwój. Rośliny w swoim cyklu życiowym nieustannie wytwarzają nowe organy, a procesy związane z rozwojem podlegają ściśle, wielopoziomowej regulacji w całym cyklu życiowym od kiełkowania, poprzez kwitnienie aż po rozwój nowych nasion. S. Field i inni [57] proponują podział kondensatów biocząsteczkowych zaangażowanych w rozwój na trzy grupy. Pierwsza z nich to kondensaty sekwestrujące białka lub ich ligandy uniemożliwiając im oddziaływanie z ich interaktorem. Należą do nich opisane poniżej białka ARF. W drugim przypadku, tworzenie kondensatów wzmacnia, wydłuża lub przyspiesza oddziaływanie między partnerami dzięki utrzymywaniu ich wysokich lokalnych stężeń. Trzecią grupę miałyby stanowić kondensaty biomolekularne mogące wpływać na biofizyczne właściwości komórki.

Dla wzrostu i rozwoju roślin kluczowe znaczenia ma regulacja sygnałów hormonalnych. W ostatnich latach opisano mechanizm działania dwóch czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w szlak sygnałowy auksyny - ARF7 i ARF19 (ang. *auxin response factor*, czynnik odpowiedzi na auksyny). Białka te w wierzchołku korzenia znajdują się w jądrze komórkowym w formie rozproszonej, ale w górnej

części korzenia, gdzie intensywny podział komórek już ustał, tworzą kondensaty o lokalizacji cytoplazmatycznej. Komórki zawierające ARF7 i ARF19 w formie kondensatów wykazują obniżoną responsywność na auksynę, pokazano też, że rośliny wyrażające wariant białka ARF19 o upośledzonej zdolności tworzenia kondensatów wykazują wrażliwość na auksyny w typach komórek, które u typu dzikiego powinny być na nie niewrażliwe. Obserwacje te składają się na model, w którym tworzenie kondensatów przez ARF19 jest niezbędne do regulacji wrażliwości na auksyny [58].

Innym aspektem istotnym dla prawidłowego rozwoju rośliny jest regulacja kształtu i budowy nowopowstających komórek. Białko SOSEKI zaangażowane jest w utrzymywanie polarności komórek w różnych tkankach *Arabidopsis*. Gromadzi się w formie dużych, dynamicznych kondensatów po jednej stronie komórki; jego polimeryzacja jest konieczna do rekrutowania białka ANGUSTIFOLIA, niezbędnego z kolei do prawidłowego rozmieszczenia mikrotubul i w konsekwencji uzyskania właściwego kształtu komórki [59].

Intensywnie badanym w kontekście udziału LLPS etapem cyklu rozwojowego rośliny jest kwitnienie; wśród ulegających separacji faz białek zaangażowanych w kontrolę tego procesu wymienić można TMF (ang. *terminating flower*), VRN1 (ang. *vernalization 1*) oraz omówione już w poprzednim rozdziale FRIGIDA [57].

## MECHANIZM I METODY BADANIA LLPS

Oddziaływania biorące udział w tworzeniu kondensatów makromolekularnych i utrzymywaniu ich dynamiki zachodzą na wielu poziomach. Należą do nich oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów o przeciwnych ładunkach, a także oddziaływania pierścieni aromatycznych z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi (kation- $\pi$ ) i innymi pierścieniami aromatycznymi ( $\pi$ - $\pi$ ) [60]. Rejonami białka niezbędnymi do LLPS, są często IDR, pozbawione stabilnych struktur trzeciorzędowych, lecz dzięki swej elastyczności zdolne przyjmować bardzo różne konformacje [61,62] i funkcje biologiczne [63]. W przeciwieństwie do zwiniętych, ustrukturyzowanych domen białkowych, IDRs charakteryzują się często konkretnym, ograniczonym składem aminokwasowym [62] i sekwencjami o niskiej złożoności (np. powtórzenia arginina-glicyna, glutamina-asparagina, lub tzw. trakt poliglutaminowy) [64]. W niektórych przypadkach do zajęcia LLPS konieczne są też modyfikacje potranslacyjne w obrębie IDRs, takie jak fosforylacja aminokwasów posiadających wolną grupę hydroksylową, metylacja lub cytrulinacja arginin czy acetylacja lizyn [65]. Z perspektywy funkcjonalnej typowe ustrukturyzowane białko katalizuje reakcję chemiczną, wiąże peptyd lub inną małą cząsteczkę, bądź bierze udział w transporcie drobin chemicznej przez błonę, podczas gdy białka nieustrukturyzowane biorą udział w transdukcji sygnału lub regulacji aktywności białek enzymatycznych, często na drodze utworzenia przejściowego kompleksu [66].

Metody badania tworzenia nieobłonionych kondensatów przez białka na drodze LLPS można ogólnie podzielić

na trzy kategorie. Pierwsza z nich to przewidywania bioinformatyczne wykorzystujące podobieństwo do znanych motywów i sekwencji charakterystycznych dla białek ulegających LLPS, a w ostatnim czasie również techniki uczenia maszynowego. Drugie podejście obejmuje badania *in vitro*, pozwalające obserwować wyizolowane, oczyszczone białko metodami mikroskopowymi czy spektroskopowymi; wreszcie trzecia grupa metod to badania *in vivo*, pozwalające obserwować tworzenie się kondensatów w komórkach i tkankach. W tej części pracy zostały opisane metody najpowszechniej obecnie wykorzystywane do przewidywania i analizy bezbłonowych organelli i białek zdolnych do ich tworzenia.

## PRZEWIDYWANIE LLPS *IN SILICO*

Pewne elementy białek pozwalające przewidywać ich zdolność do ulegania LLPS są badane od dawna - należą do nich sekwencje o niskiej złożoności (LCS) oraz modułowe domeny interaktorowe (ang. *modular interacting domains*). Jednak możliwości przewidywania regionów wewnętrznie nieuporządkowanych były długo bardzo ograniczone.

Wielokrotnie wykazywano doświadczalnie, że skrócenie lub usunięcie obszarów nieustrukturyzowanych hamuje zdolność białek do ulegania separacji faz [67,68]. Podobny wpływ mają substytucje naładowanych aminokwasów w IDR [69]. Są to jednak duże zmiany wpływające też na katalityczne funkcje białek, stabilność struktury etc. Stąd też pojawia się pytanie o identyfikację „reszt kluczowych” - jakie substytucje mogą zaburzyć tworzenie LLPS przy jak najmniejszej ingerencji w białka?

W ostatnim czasie zaczęło się pojawiać oprogramowanie służące nie tylko do przewidywania nieustrukturyzowanych regionów białka - jak utworzone wcześniej IUPred [70], DISOPRED [71], PONDR (<http://www.pondr.com/>) czy Protscale (<https://bio.tools/protscale>) - ale ściśle do przewidywania potencjału sekwencji aminokwasowej do uczestniczenia w procesie separacji faz. Pierwsza generacja tych narzędzi opiera się na pojedynczych, poszczególnych cechach i właściwościach białek, uznanych za siły napędowe separacji faz.

I tak LARKS (ang. *Low-complexity Aromatic-Rich Kinked Segments*) [72] wyszukuje bogate w aromatyczne reszty aminokwasowe sekwencje o niskiej złożoności, PLAAC (ang. *Prion-Like Amino Acid Composition*) [73] wykorzystuje skład aminokwasowy zbliżony do znanych prionów, PScore [74] - planarne kontakty między orbitalami  $\pi$  nienależącymi do pierścieni aromatycznych, a algorytm DDX4-like opiera się na sekwencyjnym podobieństwie badanych białek do nieustrukturyzowanych końcowych „ogonów” białka DDX4, znanego ze spontanicznego tworzenia nieobłonionych kondensatów zarówno w komórkach, jak *in vitro* [1]. Wszystkie te metody z sukcesem przewidują zdolność białka do separacji fazowej na podstawie jego sekwencji, jednak opierają się na małych próbkach danych i specyficznych cechach, przez co zakres ich zastosowań jest ograniczony.

Znacząca zmiana w stosowności narzędzi predykcyjnych nadeszła wraz z pojawieniem się nowych baz danych

gromadzących sekwencje białek zdolnych do separacji fazowej, takich jak PhaSepDB [75], PhaSePro [76], DrLLPS [77] oraz LLPSDB [78]. W szczególności LLPSDB zawiera dane zebrane z opublikowanych eksperymentalnych wyników, wskazujących na zachodzenie LLPS białka o konkretnej sekwencji w konkretnych warunkach.

Najnowsze narzędzia wykorzystują metody uczenia maszynowego, a treningowe zbiory danych zaczerpnięte są z nowo powstałych baz danych białek zdolnych do separacji faz; integrują one wiele aspektów i właściwości białek, a wielkość i różnorodność tych zbiorów pozwala oczekiwać skutecznego przewidywania potencjału do separacji faz. Należą do nich opublikowane w latach 2022 i 2024 PSPHunter oraz PSPredictor.

## METODY BADANIA LLPS IN VIVO

### Metody mikroskopii fluorescencyjnej

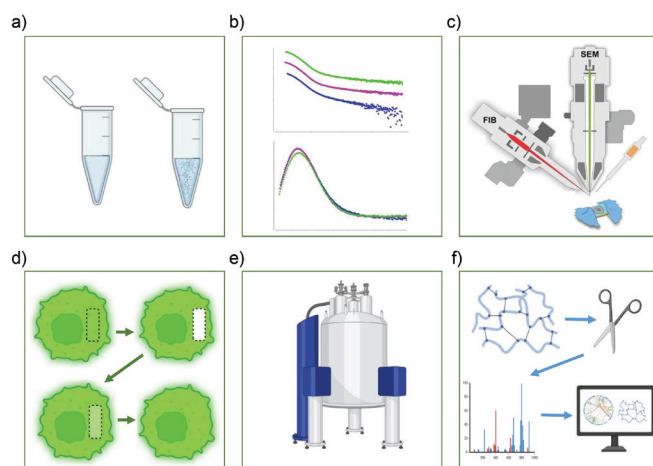
Do obrazowania dynamiki kondensatów używa się technik mikroskopowych pozwalających na detekcję fluoroforów dołączonych do badanych białek. Należą do nich FRAP (ang. *fluorescence recovery after photobleaching*) – odzysk fluorescencji po fotobłaknięciu – i FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*, Försterowski rezonansowy transfer energii). W pierwszej z tych metod fluorescencja kondensatu lub jego składnika jest wygaszana światłem laserowym, a gdy fluoryzujące cząsteczki dyfundują do obszaru wygaszenia, można obserwować odzyskiwanie sygnału fluorescencji.

Metoda FRAP (Ryc. 2d) pozwala analizować dynamikę i mobilność kondensatów, mierzyć czas wymiany materiału między fazami oraz szybkość dyfuzji w ich wnętrzu [62,80]. Wykorzystano ją m. in. w badaniu LLPS tworzonych przez  $\alpha$ -synukleinę, pozwoliła ona też stwierdzić, że roślinny represor kwitnienia UBA2c tworzy kondensaty o charakterze żelu, a nie LLPS [81].

FRET jest techniką opartą o przenoszenie energii między dwoma chromoforami na drodze bezpromienistej. Metoda ta jest wykorzystywana do badania oddziaływań międzybiałkowych, w ostatnim czasie natomiast znajduje zastosowanie w analizie dynamiki i zmian konformacyjnych LLPS. W ten sposób zbadano między innymi zaangażowane w wernalizację białko VRN1; charakteryzuje się ono rejonami nieustrukturyzowanymi o zróżnicowanej długości, a z użyciem FRET wykazano zależność VRN1 do tworzenia kondensatów od długości IDR [82].

### Metody mikroskopii elektronowej

Metody mikroskopii elektronowej można zasadniczo podzielić na skaningowe (ang. *scanning electron microscopy*, SEM) i transmisyjne (ang. *transmission electron microscopy*, TEM). W obu przypadkach obraz próbki uzyskuje się dzięki poddaniu jej działaniu wiązki elektronów; obrazowanie SEM wykorzystuje elektrony rozproszone i odbite przez próbkę, pozwalając na analizę jej powierzchni, TEM natomiast opiera się na elektronach przechodzących przez ultracienką próbkę i oddziałujących z nią; przechodzące elektrony są następnie rejestrowane przez kamerę znajdującą się



**Rycina 2.** Doświadczalne techniki analizy LLPS. a) Test zmętnienia – *turbidity assay* – umożliwia sprawdzenie, czy w roztworze białka pojawiają się kondensaty. b) Eksperyment SAXS pozwala uzyskać krzywą rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (górną), z której można wnioskować o wielkości cząsteczek w roztworze oraz wykres Kratky'ego (dół), dostarczający informacji o ich kształcie. c) Rozwój kriomikroskopii elektronowej pozwala na badanie cienkich warstw kropli biokondensatów z wykorzystaniem techniki cryoFIB. d) Eksperyment FRAP umożliwia obserwację przemieszczania się białek wewnątrz kondensatów. e) Metoda NMR może służyć do badania dynamiki konformacyjnej ruchliwych białek. f) XL-MS daje możliwość badania wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływań w obrębie kropli kondensatu.

dalej w kolumnie elektronowej. TEM od dawna wykorzystywano do obrazowania ultrastruktury komórek [83,84].

## BADANIA LLPS IN VITRO

### Turbidity assays i biofizyczna kontrola jakości

Prostym i powszechnym wstępnym testem na występowanie LLPS są testy pomiaru zmętnienia próbki (ang. *turbidity assays*), rycina 2a. Oczyszczoną, homogeną próbkę białka poddaje się warunkom sprzyjającym LLPS. Może to być np. obniżenie siły jonowej roztworu, dodanie związku skutkującego odpowiednim stłoczeniem molekularnym w próbce lub makromolekularnego partnera znanego z indukcji separacji faz *in vivo* [85]. W warunkach, w których spodziewana jest separacja faz, wykonuje się pomiar absorbancji światła przy określonej długości fali; pojawiające się zmętnienie może świadczyć o zachodzeniu LLPS. Takim eksperymentowi towarzyszą zazwyczaj obserwacje mikroskopowe pozwalające potwierdzić, że w próbce obecne są regularne krople kondensatu, a nie agregaty białkowe. Do oceny wielkości, kształtu i homogenności kropli przydatne są metody MALS (ang. *Multi-Angle Light Scattering*, wielokątowe rozpraszanie światła) i DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*, dynamiczne rozpraszanie światła) [86]. Obie te metody polegają na detekcji rozpraszania skupionej wiązki światła przez cząsteczki lub ich skupiska w roztworze – odpowiednio w sposób statyczny lub dynamiczny, i mogą dostarczać uzupełniających się informacji na temat badanej próbki. DLS umożliwia szybką ocenę rozkładu wielkości cząstek w roztworze, w szczególności pozwala zidentyfikować ewentualne duże i przez to silnie rozpraszające światło skupiska, podczas gdy MALS, w szczególności w połączeniu z filtracją na kolumnie żelowej (ang. *size-exclusion column multi-angle light scattering*, SEC-MALS) pozwala dokładnie wyznaczyć masę molową poszczególnych frakcji białkowych, z której z kolei można wyciągnąć wnioski o stanie oligomerycz-

nym biocząsteczek w próbce. W ostatnim czasie w badaniach LLPS wykorzystywana jest technika fotometrii mas, w której rejestrowane jest rozpraszanie światła przez indywidualne cząsteczki w roztworze w momencie ich adsorpcji do szkiełka mikroskopowego [87,88].

Aby potwierdzić, że powstawanie powstałego na drodze LLPS kondensatu jest odwracalne, używa się m.in. 1,6-heksanodiolu [89], który zaaplikowany w odpowiednio dobranym stężeniu powoduje dekondensację ciekłych kondensatów zarówno *in vitro*, jak *in vivo*, nie wpływając zarazem na kondensaty o charakterze ciał stałych. Należy jednak zauważyć, że alkohol ten oddziałuje z głównie z rejonami IDR i nie wszystkie wymienione we wstępie multiwalentne oddziaływania odpowiadające za separację faz są wrażliwe na jego obecność [90].

Techniki niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego i neutronowego

SAXS (ang. *small-angle X-ray scattering*, niskokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego) jest techniką analizy cząsteczek w roztworze. Stosuje się ją w różnych gałęziach badań chemicznych czy materiałoznawczych, na świecie przybiera jednak układów zaprojektowanych konkretnie na potrzeby analizy makrocząsteczek (bioSAXS). W najprostszym wariantcie eksperymentu SAXS służy po prostu do doświadczalnego potwierdzenia, że mamy do czynienia w roztworze z białkiem wewnątrznie nieuporządkowanym jak zrobiono to w przypadku tworzącego kondensaty roślinnego chaperona RNA PARCL [91]. SAXS pozwala też ustalić ogólny kształt i wielkość cząsteczek obecnych w próbce (Ryc. 2b), a przez to ocenić ewentualne tworzenie kompleksu, oligomeryzację czy duże zmiany konformacyjne. Wszystkie te procesy w bioSAXS można też zbadać w zależności od pH, temperatury czy stężenia soli, co jest szczególnie przydatne w analizie LLPS, zważywszy, że to zmiany wymienionych czynników często indukują separację faz. Technika niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego jest relatywnie niskorozdzielcza – osiąga rozdzielczość sięgającą około 10 Å, nie dostarcza więc danych strukturalnych na poziomie reszt aminokwasowych, ale pozwala dość precyzyjnie obliczyć średnią odległość atomów od środka masy, co przekłada się na wielkość i kształt badanej drobin [92]. Poprawę rozdzielczości danych umożliwia wykorzystywanie silnych, skupionych wiązek promieniowania (BM29 BioSAXS ESRF [93] czy SWING na synchrotronie SOLEIL [94]). Ponieważ SAXS wymaga czystej i jednorodnej próbki, można sprząć tę metodę z kolumną do filtracji żelowej (ang. *size-exclusion chromatography*, SEC). Takie podejście, nazywane SEC-SAXS pozwala wyeliminować ewentualne małe agregaty, zwiększając homogenność próbki, daje też możliwość łatwej wymiany buforu w dość szerokim zakresie składów. W pomiarach SAXS wykazano, że białka o zdolności ulegania LLPS mogą już w formie rozpuszczalnej tworzyć duże oligomery, jak na przykład roślinny termosensor ELF3 (EARLY FLOWERING 3) [95]; otwiera to pytania o procesy oligomeryzacji zachodzące w roztworze i poprzedzające pełną separację faz. Badano też w ten sposób proces nukleacji biokondensatów [96]. Wyniki tych eksperymentów wskazują na nukleację LLPS analogiczną do tej, która poprzedza krystalizację w eksperymentach krystalograficznych, pokazują też, że łączenie się cząsteczek nieuporządkowanego białka ulegającego LLPS jest początkowo, w nanoskali, niekorzystne energetycznie i

dopiero w mezoskali proces zaczyna zachodzić wydajnie i liniowo [97]. Techniką komplementarną do SAXS, polegającą na rejestrowaniu intensywności rozpraszania neutronów przez jądra atomów tworzących badane próbki, jest SANS (ang. *small-angle neutron scattering*) [56].

Metody mikroskopii elektronowej

W obrazowaniu pojedynczych cząsteczek białek i ich kompleksów wykorzystuje się kriogeniczny wariant mikroskopii elektronowej – CryoEM, w której próbki poddane zostają witrifikacji na odpowiednio dobranym podłożu. Od momentu nastąpienia tzw. rewolucji w rozdzielczości mikroskopii elektronowej, której gwałtowny rozwój został nagrodzony Nagrodą Nobla w roku 2017, zarówno klasyczna mikroskopia krio-elektronowa jak i kriotomografia przekraczają kolejne granice rozdzielczości i pozwalają badać coraz mniejsze układy [98], ich użyteczność w badaniu LLPS długo jednak pozostawała ograniczona. W ostatnich latach techniki mikroskopowe zaczęły być wykorzystywane nie tylko do obserwacji biokondensatów, ale też do analizy ich struktury. Technika *cryo-focused beam milling*, w której obserwuje się cienkie warstwy badanych obiektów w warunkach kriogenicznych (Ryc. 2c), pozwala opisywać niejednorodności w powstających kondensatach [99], a wykorzystanie mikroskopii sił atomowych daje możliwość badania ich lepkości i napięcia powierzchniowego oraz zmiany tych właściwości w czasie [100].

Metody spektroskopowe – NMR

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR – Ryc. 2e) – jest trzecią obok technik mikroskopii elektronowej i rentgenowskich najczęściej wykorzystywaną metodą określania struktury białek. Ze zmian w wartości przesunięcia chemicznego atomów poszczególnych reszt aminokwasowych można wnioskować o obecności i położeniu struktur  $\alpha$  i  $\beta$  oraz obszarów nieustrukturyzowanych. NMR pozwala na charakteryzację ruchów układów białkowych z rozdzielczością atomową i wysoką rozdzielczością czasową, dzięki czemu w kontekście LLPS można jej używać do opisu powstawania i dynamiki biokondensatów [101]. Spektroskopia NMR w roztworze stała się wiodącą techniką charakteryzowania układów wewnątrznie nieuporządkowanych, przejściowych interakcji i dynamiki konformacyjnej [56]. Sondowanie tej zmienności pozwala zbliżyć się do zrozumienia działania układów ulegających LLPS a z eksperymentów wyłaniają się wspólne cechy tych układów – ruchliwość ograniczana przez lepkość układu, zachowanie nieuporządkowania również po przejściu fazowym i tendencja do „rozmytych”, przejściowych oddziaływań.

Podejście nazywane przestrzennie selektywnym NMR obejmuje dodanie selektywnego impulsu o konkretnej częstotliwości podczas stosowania gradientu pola magnetycznego. Przestrzennie selektywny NMR umożliwia badanie cienkiego określonego wycinka próbki a przez to charakteryzację przestrzennego rozkładu fazy skondensowanej i nieskondensowanej. Opublikowane badania z użyciem tej metody dotyczą jak dotąd dobrze poznanych „wzorcowych” białek: BSA (ang. *Bovine serum albumin*, albumina surowicy bydlęcej) [102] i białka tau [103].

Relatywnie nowym, ale dynamicznie rozwijającym się podejściem do biologii strukturalnej heterogennych i nieustrukturyzowanych układów jest XL-MS (ang. *in vivo chemical cross-linking mass spectrometry* – Ryc. 2f), gdzie metodą spektrometrii mas bada się próbki białek/kompleksów uprzednio poddane sieciowaniu i trawieniu enzymatycznemu [104]. W kontekście LLPS, XL-MS pozwala badać wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe interakcje w obrębie kondensatu i w białku przed LLPS, a na tej podstawie również wnioskować o kontaktach i zmianach konformacyjnych kluczowych dla zajęcia procesu [105]. W ten sposób przeanalizowano zmiany w strukturze ludzkiej  $\alpha$ -synukleiny [106], a sformułowane przy tym podejście COMPASS (ang. *COMPetitive PAiring StatisticS*) wydaje się obiecujące dla przyszłych analiz LLPS.

## PODSUMOWANIE

Separacja faz okazuje się podstawowym mechanizmem roślin służącym reagowaniu na szereg sygnałów środowiskowych i stresów, w tym stres osmotyczny i cieplny, wahania temperatury, niedobór substancji odżywczych czy wody. Jest też istotna dla prawidłowego wzrostu i rozwoju rośliny na kolejnych etapach jej cyklu życiowego. Mechanizm ten umożliwia roślinom szybką i wydajną kondensację biocząsteczek, pozwalając im przetrwać w trudnych i zmiennych warunkach. Zrozumienie praw opisujących separację faz w biologii roślin wydaje się konieczne dla poprawy odporności upraw i plonów w obliczu zmieniających się warunków środowiskowych.

W dotychczasowych badaniach mających na celu zwiększenie odporności upraw na stresory biotyczne i abiotyczne dominowało poszukiwanie wariantów genetycznych, w których nadekspresja genów odporności nie prowadziła do nadmiernego zmniejszenia plonów lub spowolnienia wzrostu rośliny. Wraz z odkryciem opartych na mechanizmie LLPS sensorów tych stresów otwierają się perspektywy opracowania indukowalnych narzędzi wykorzystujących te sensory; aktywacja mechanizmów obronnych mogłaby aktywować się tylko w odpowiedzi na stres, minimalizując niekorzystne efekty nadekspresji genów odporności.

Do analizy białek ulegających LLPS można używać licznych metod obliczeniowych, obrazowych, biochemicznych i strukturalnych, a równolegle z odkrywaniem kolejnych istotnych funkcji tych białek następuje dynamiczny rozwój różnorodnych podejść do ich badania. Wciąż jednak dynamiczna natura i przestrzenne nieuporządkowanie biokondensatów utrudnia i ogranicza tradycyjną analizę biochemiczną czy strukturalną, wymuszając łączenie i modyfikowanie istniejących metod pomiarowych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Nott IJ, Petsalaki E, Farber P, Jervis D, Fussner E, Plochowitz A (2015) Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Membraneless Organelles. *Mol Cell* 57(5): 936–947
2. Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25(7): 319–324
3. Rios RM, Bornens M (2003) The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr Opin Cell Biol* 15(1): 60–66
4. Ballabio A (2016) The awesome lysosome *EMBO Mol Med* 8(2): 73–76

5. McFadden GI (2001) Chloroplast Origin and Integration. *Plant Physiol* 125(1): 50–53
6. Pederson T (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26(17): 3871–3876
7. Sleeman JE, Trinkle-Mulcahy L (2014) Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Curr Opin Cell Biol* 28: 76–83
8. Gall JG (2000) Cajal Bodies: The First 100 Years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16(1): 273–300
9. Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoeghe C, Gharakhani J (2009) Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science* 324(5935): 1729–1732
10. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(5): 285–298
11. Aumiller WM, Keating CD (2016) Phosphorylation-mediated RNA/peptide complex coacervation as a model for intracellular liquid organelles. *Nat Chem* 8(2): 129–137
12. Lin Y, Protter DSW, Rosen MK, Parker R (2015) Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol Cell* 60(2): 208–219
13. Banani SF, Rice AM, Peeples WB, Lin Y, Jain S, Parker R (2016) Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* 166(3): 651–663
14. Bojja A, Klein IA, Sabari BR, Dall’Agnese A, Coffey EL, Zamudio A V (2018) Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* 175(7): 1842–1855. e16
15. Wagh K, Garcia DA, Upadhyaya A (2021) Phase separation in transcription factor dynamics and chromatin organization. *Curr Opin Struct Biol* 71: 148–155
16. Wang N, Liu C (2019) Implications of liquid–liquid phase separation in plant chromatin organization and transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 55: 59–65
17. Wang L, Gao Y, Zheng X, Liu C, Dong S, Li R (2019) Histone Modifications Regulate Chromatin Compartmentalization by Contributing to a Phase Separation Mechanism. *Mol Cell* 76(4): 646–659. e6
18. Gibson BA, Doolittle LK, Schneider MWG, Jensen LE, Gamarra N, Henry L (2019) Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell* 179(2): 470–484. e21
19. Wei C, Jia L, Huang X, Tan J, Wang M, Niu J (2022) CTCF organizes inter-A compartment interactions through RYBP-dependent phase separation. *Cell Res* 32(8): 744–760
20. Xu X, Zheng C, Lu D, Song C, Zhang L (2021) Phase separation in plants: New insights into cellular compartmentalization. *J Integr Plant Biol* 2021 63(11): 1835–1855
21. Hyman AA, Brangwynne CP (2011) Beyond Stereospecificity: Liquids and Mesoscale Organization of Cytoplasm. *Dev Cell* 21(1): 14–16
22. Langdon EM, Gladfelter AS (2018) A New Lens for RNA Localization: Liquid-Liquid Phase Separation. *Annu Rev Microbiol* 72(1): 255–271
23. Kim J, Lee H, Lee HG, Seo PJ (2021) Get closer and make hotspots: liquid–liquid phase separation in plants. *EMBO Rep* 22(5) e51656
24. Liu X, Zhu JK, Zhao C (2023) Liquid-liquid phase separation as a major mechanism of plant abiotic stress sensing and responses. *Stress Biol* 3(1): 56
25. Liu Q, Liu W, Niu Y, Wang T, Dong J (2024) Liquid-liquid phase separation in plants: Advances and perspectives from model species to crops. *Plant Commun* 5(1): 100663
26. Zhang Y, Li Z, Chen N, Huang Y, Huang S (2023) Correction: Phase separation of Arabidopsis EMB1579 controls transcription, mRNA splicing, and development. *PLOS Biol* 21(4): e3002095
27. Huang X, Chen S, Li W, Tang L, Zhang Y, Yang N, Zou Y, Zhai X, Xiao N, Liu W, Li P, Xu C (2021) ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. *Nat Chem Biol* 17(5): 549–557



28. Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP (2021) The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(3): 165–182.
29. Lee S, Seo Y, Choi J, Yan X, Kim T, Choi D, Lee JH (2024) Nucleolar actions in plant development and stress responses. *Plant Cell Environ* 47(12): 5189–5204
30. Taliansky ME, Love AJ, Kolowierz-Lubnau A, Smoliński DJ (2023) Cajal bodies: Evolutionarily conserved nuclear biomolecular condensates with properties unique to plants. *Plant Cell* 35(9): 3214–3235
31. Lorković ZJ, Barta A (2008) Role of Cajal Bodies and Nucleolus in the Maturation of the U1 snRNP in Arabidopsis. *PLoS One* 3(12): e3989
32. Faber GP, Nadav-Eliyahu S, Shav-Tal Y (2022) Nuclear speckles – a driving force in gene expression. *J Cell Sci* 135(13): jcs259594
33. Bussi C, Mangiarotti A, Vanhille-Campos C, Aylan B, Pellegrino E, Athanasiadi N, Fearnas A, Rodgers A, Franzmann TM, Šarić A, Dimova R, Gutierrez MG (2023) Stress granules plug and stabilize damaged endolysosomal membranes. *Nature* 623(7989):1062–1069
34. Kearly A, Nelson ADL, Skiryca A, Chodasiewicz M (2024) Composition and function of stress granules and P-bodies in plants. *Semin Cell Dev Biol* 156: 167–175
35. He S, Crans VL, Jonikas MC (2023) The pyrenoid: the eukaryotic CO<sub>2</sub>-concentrating organelle. *Plant Cell* 35(9): 3236–3259
36. Freeman Rosenzweig ES, Xu B, Kuhn Cuellar L, Martinez-Sanchez A, Schaffer M, Strauss M, Cartwright HN, Ronceray P, Plitzko JM, Förster F, Wingreen NS, Engel BD, Mackinder LCM, Jonikas MC (2017) The Eukaryotic CO<sub>2</sub>-Concentrating Organelle Is Liquid-like and Exhibits Dynamic Reorganization. *Cell* 171(1): 148–162.e19
37. Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO<sub>2</sub> CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annu Rev Plant Biol* 56(1): 99–131
38. Chen M, Chory J (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol* 21(11): 664–671
39. Willige BC, Yoo CY, Saldierna Guzmán JP (2024) What is going on inside of phytochrome B photobodies? *Plant Cell* 36(6): 2065–2085
40. Chen M, Schwab R, Chory J (2003) Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci* 100(24): 14493–14498
41. Willige BC, Zander M, Yoo CY, Phan A, Garza RM, Wanamaker SA, He Y, Nery JR, Chen H, Chen M, Ecker JR, Chory J (2023) Author Correction: PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS trigger environmentally responsive chromatin dynamics in plants. *Nat Genet* 55(2):355–355
42. Chen D, Lyu M, Kou X, Li J, Yang Z, Gao L, Li Y, Fan LM, Shi H, Zhong S (2022) Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B. *Mol Cell* 82(16): 3015–3029.e6
43. Penfield S (2017) Seed dormancy and germination. *Curr Biol* 27(17): R874–878
44. Dorone Y, Boeynaems S, Flores E, Jin B, Hateley S, Bossi F, Lazarus E, Pennington JG, Michiels E, De Decker M, Vints K, Baatsen P, Bassel GW, Otegui MS, Holehouse AS, Exposito-Alonso M, Sukenik S, Gitler AD, Rhee SY (2021) A prion-like protein regulator of seed germination undergoes hydration-dependent phase separation. *Cell* 184(16): 4284–4298.e27
45. Wang B, Zhang H, Huai J, Peng F, Wu J, Lin R, Fang X (2022) Condensation of SEUSS promotes hyperosmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Nat Chem* 18(12): 1361–1369
46. Tong J, Ren Z, Sun L, Zhou S, Yuan W, Hui Y, Ci D, Wang W, Fan LM, Wu Z, Qian W (2022) ALBA proteins confer thermotolerance through stabilizing HSF messenger RNAs in cytoplasmic granules. *Nat Plants* 8(7): 778–791
47. Zhu S, Gu J, Yao J, Li Y, Zhang Z, Xia W, Wang Z, Gui X, Li L, Li D, Zhang H, Liu C (2022) Liquid-liquid phase separation of RBGD2/4 is required for heat stress resistance in Arabidopsis. *Dev Cell* 57(5): 583–597.e6
48. Zhu P, Lister C, Dean C (2021) Cold-induced Arabidopsis FRIGIDA nuclear condensates for FLC repression. *Nature* 599(7886): 657–661
49. Sakuraba Y (2022) Molecular basis of nitrogen starvation-induced leaf senescence. *Front Plant Sci* 13, 3729
50. Cheng SLH, Wu H, Xu H, Singh RM, Yao T, Jang IC, Chua NH (2022) Nutrient status regulates MED19a phase separation for ORESARA1-dependent senescence. *New Phytol* 236(5): 1779–95
51. Xie Z, Zhao S, Li Y, Deng Y, Shi Y, Chen X, Li Y, Li H, Chen C, Wang X, Liu E, Tu Y, Shi P, Tong J, Gutierrez-Beltran E, Li J, Bozhkov PV, Qian W, Zhou M, Wang W (2023) Phenolic acid-induced phase separation and translation inhibition mediate plant interspecific competition. *Nat Plants* 9(9): 1481–1499
52. Zhang L, Hua C, Janocha D, Fliegmann J, Nürnberger T (2023) Plant cell surface immune receptors – Novel insights into function and evolution. *Curr Opin Plant Biol* 74: 102384
53. Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323–329
54. Song W, Liu L, Yu D, Bernardy H, Jirschitzka J, Huang S, Jia A, Jemielniak W, Acker J, Laessle H, Wang J, Shen Q, Chen W, Li P, Parker JE, Han Z, Schulze-Lefert P, Chai J (2024) Substrate-induced condensation activates plant TIR domain proteins. *Nature* 627(8005): 847–853
55. Huang S, Zhu S, Kumar P, MacMicking JD (2021) A phase-separated nuclear GBPL circuit controls immunity in plants. *Nature* 594(7863): 424–429
56. He Y, Yang X, Xia X, Wang Y, Dong Y, Wu L (2024) A phase-separated protein hub modulates resistance to Fusarium head blight in wheat. *Cell Host Microbe* 32(5): 710–726.e10
57. Field S, Jang GJ, Dean C, Strader LC, Rhee SY (2023) Plants use molecular mechanisms mediated by biomolecular condensates to integrate environmental cues with development. *Plant Cell* 35(9): 3173–3186
58. Powers SK, Holehouse AS, Korasick DA, Schreiber KH, Clark NM, Jing H, Emenecker R, Han S, Tycksen E, Hwang I, Sozzani R, Jez JM, Pappu RV, Strader LC (2019) Nucleo-cytoplasmic Partitioning of ARF Proteins Controls Auxin Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell* 76(1): 177–190.e5
59. Kim GT, Shoda K, Tsuge T, Cho KH, Uchimiya H, Yokoyama R, Nishitani K, Tsukaya H (2002) The ANGUSTIFOLIA gene of Arabidopsis, a plant CtBP gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of a gene involved in cell-wall formation. *EMBO J* 21(6): 1267–1279
60. Tarczewska A, Wycisk K, Sozańska N, Ozyhar A (2020) Organella bezblonowe a separacja faz ciec-ciecz – metody ich badań. *Postepy Biochem* 27; 66(2): 111–124
61. Jensen MR, Ruijgrok RW, Blackledge M (2013) Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR. *Curr Opin Struct Biol* 23(3): 426–435
62. Das RK, Ruff KM, Pappu R V (2015) Relating sequence encoded information to form and function of intrinsically disordered proteins. *Curr Opin Struct Bio* 32: 102–112
63. Dunker AK, Bondos SE, Huang F, Oldfield CJ (2015) Intrinsically disordered proteins and multicellular organisms. *Semin Cell Dev Biol* 37: 44–55
64. Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, Mirzaei H, Goldsmith EJ, Longgood J, Pei J, Grishin NV, Frantz DE, Schneider JW, Chen S, Li L, Sawaya MR, Eisenberg D, Tycko R, McKnight SL (2012) Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* 149(4): 753–767
65. Owen I, Shewmaker F (2019) The Role of Post-Translational Modifications in the Phase Transitions of Intrinsically Disordered Proteins. *Int J Mol Sci* 20(21): 5501
66. Xie H, Vucetic S, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Dunker AK, Uversky VN (2007) Functional Anthology of Intrinsic Disorder. 1. Biological Processes and Functions of Proteins with Long Disordered Regions. *J Proteome Res* 6(5): 1882–1898
67. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, Mittag T, Taylor JP (2015) Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* 163(1): 123–133

68. Dao TP, Kolaitis RM, Kim HJ, O'Donovan K, Martyniak B, Colicino E, Hehnly H, Taylor JP, Castañeda CA (2018) Ubiquitin Modulates Liquid-Liquid Phase Separation of UBQLN2 *via* Disruption of Multivalent Interactions. *Mol Cell* 69(6): 965-978.e6
69. Wang J, Choi JM, Holehouse AS, Lee HO, Zhang X, Jahnel M, Maharana S, Lemaitre R, Pozniakovsky A, Drechsel D, Poser I, Pappu RV, Alberti S, Hyman AA (2018) A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell* 174(3): 688-699.e16
70. Erdős G, Pajkos M, Dosztányi Z (2021) IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic Acids Res* 2;49(W1):W297-303
71. Jones DT, Cozzetto D (2015) DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics* 31(6): 857-863
72. Hughes MP, Sawaya MR, Boyer DR, Goldschmidt L, Rodriguez JA, Cascio D, Chong L, Gonen T, Eisenberg DS (2018) Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked  $\beta$  sheets that assemble networks. *Science* 359(6376): 698-701
73. Lancaster AK, Nutter-Upham A, Lindquist S, King OD (2014) PLAAC: a web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition. *Bioinformatics* 30(17): 2501-2502
74. Vernon RM, Chong PA, Tsang B, Kim TH, Bah A, Farber P, Lin H, Forman-Kay JD (2018) Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. *Elife* 9;7 :e31486
75. You K, Huang Q, Yu C, Shen B, Sevilla C, Shi M, Hermjakob H, Chen Y, Li T (2020) PhaSepDB: a database of liquid-liquid phase separation related proteins. *Nucleic Acids Res* 48(D1): D354-D359
76. Mészáros B, Erdős G, Szabó B, Schád É, Tantos Á, Abukhairan R, Horváth T, Murvai N, Kovács OP, Kovács M, Tosatto SCE, Tompa P, Dosztányi Z, Pancsa R (2019) PhaSepPro: the database of proteins driving liquid-liquid phase separation. *Nucleic Acids Res* 48(D1):D360-D367
77. Ning W, Guo Y, Lin S, Mei B, Wu Y, Jiang P, Tan X, Zhang W, Chen G, Peng D, Chu L, Xue Y (2020) DrLLPS: a data resource of liquid-liquid phase separation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 48(D1): D288-D295
78. Wang X, Zhou X, Yan Q, Liao S, Tang W, Xu P, Gao Y, Li Q, Dou Z, Yang W, Huang B, Li J, Zhang Z (2022) LLPSDB v2.0: an updated database of proteins undergoing liquid-liquid phase separation *in vitro*. *Bioinformatics* 38(7): 2010-2014
79. Bracha D, Walls MT, Brangwynne CP (2019) Probing and engineering liquid-phase organelles. *Nat Biotechnol* 37(12): 1435-1445
80. Mekonnen G, Djaja N, Yuan X, Myong S (2023) Advanced imaging techniques for studying protein phase separation in living cells and at single-molecule level. *Curr Opin Chem Biol* 76: 102371
81. Zhao N, Su X, Liu Z, Zhou J, Su Y, Cai X, Chen L, Wu Z, He XJ (2022) The RNA recognition motif-containing protein UBA2c prevents early flowering by promoting transcription of the flowering repressor FLM in *Arabidopsis*. *New Phytol* 233(2): 751-765
82. Wang Y, Zhou H, Sun X, Huang Q, Li S, Liu Z, Zhang C, Lai L (2021) Charge Segregation in the Intrinsically Disordered Region Governs VRN1 and DNA Liquid-like Phase Separation Robustness. *J Mol Biol* 433(22): 167269
83. Souquere S, Mollet S, Kress M, Dautry F, Pierron G, Weil D (2009) Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci* 122(20): 3619-3626
84. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ (2017) Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res* 45(18): 10350-10368
85. Wang Z, Zhang G, Zhang H (2019) Protocol for analyzing protein liquid-liquid phase separation. *Biophys Reports* 5(1): 1-9
86. Dao TP, Yang Y, Presti MF, Cosgrove MS, Hopkins JB, Ma W, Loh SN, Castañeda CA (2022) Mechanistic insights into enhancement or inhibition of phase separation by different polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 23(8): e55056
87. Ray S, Mason TO, Boyens-Thiele L, Farzadfard A, Larsen JA, Norrild RK, Jahnke N, Buell AK (2023) Mass photometric detection and quantification of nanoscale  $\alpha$ -synuclein phase separation. *Nat Chem* 15(9): 1306-1316
88. Babl L, Giacomelli G, Ramm B, Gelmroth AK, Bramkamp M, Schulle P (2022) CTP-controlled liquid-liquid phase separation of ParB. *J Mol Biol* 34(2): 167401
89. Kroschwald S, Maharana S, Alberti S (2017) Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters*
90. Alberti S, Gladfelter A, Mittag T (2019) Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* 76(3): 419-434
91. Ostendorp A, Ostendorp S, Zhou Y, Chaudron Z, Wolfram L, Rombi K (2022) Intrinsically disordered plant protein PARCL colocalizes with RNA in phase-separated condensates whose formation can be regulated by mutating the PLD. *J Biol Chem* 298(12): 102631
92. Zhang X, Li H, Ma Y, Zhong D, Hou S (2023) Study liquid-liquid phase separation with optical microscopy: A methodology review. *APL Bioeng* 1; 7(2) :021502
93. Tully MD, Kieffer J, Brennich ME, Cohen Aberdam R, Florial JB, Hutin S (2023) BioSAXS at European Synchrotron Radiation Facility - Extremely Brilliant Source: BM29 with an upgraded source, detector, robot, sample environment, data collection and analysis software. *J Synchrotron Radiat* 30(1): 258-266
94. Thureau A, Roblin P, Pérez J (2021) BioSAXS on the SWING beamline at Synchrotron SOLEIL. *J Appl Crystallogr* 54(6): 1698-1710
95. Hutin S, Kumita JR, Strotmann VI, Dolata A, Ling WL, Louafi N (2023) Phase separation and molecular ordering of the prion-like domain of the *Arabidopsis* thermosensory protein EARLY FLOWERING 3. *Proc Natl Acad Sci* 120(28):e2304714120
96. Martin EW, Harmon TS, Hopkins JB, Chakravarthy S, Incicco JJ, Schuck P (2021) A multi-step nucleation process determines the kinetics of prion-like domain phase separation. *Nat Commun* 12(1): 4513
97. Miao Y, Chodasiewicz M, Fang X (2024) Navigating biomolecular condensates in plants from patterns to functions. *Mol Plant* 17(9): 1329-32
98. Nakane T, Kotecha A, Sente A, McMullan G, Masiulis S, Brown PMGE, Grigoras IT, Malinauskaitė L, Malinauskas T, Miehlung J, Uchański T, Yu L, Karia D, Pechnikova EV, de Jong E, Keizer J, Bischoff M, McCormack J, Tiemeijer P, Hardwick SW, Chirgadze DY, Murshudov G, Aricescu AR, Scheres SHW (2020) Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature* 587(7832): 152-156
99. Erdmann PS, Hou Z, Klumpe S, Khavnekar S, Beck F, Wilfling F (2021) In situ cryo-electron tomography reveals gradient organization of ribosome biogenesis in intact nucleoli. *Nat Commun* 12(1): 5364
100. Santamaria A, Hutin S, Doucet CM, Zubieta C, Milhiet PE, Costa L (2024) Quantifying surface tension and viscosity in biomolecular condensates by FRAP-ID. *Biophys J* 123(19): 3366-3374
101. Murthy AC, Fawzi NL (2020) The (un)structural biology of biomolecular liquid-liquid phase separation using NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 295(8): 2375-2384
102. Bramham JE, Golovanov AP (2022) Temporal and spatial characterization of protein liquid-liquid phase separation using NMR spectroscopy. *Nat Commun* 13(1): 1767
103. Pantoja CF, Ibáñez de Opakua A, Cima-Omori M, Zweckstetter M (2023) Determining the Physico-Chemical Composition of Biomolecular Condensates from Spatially-Resolved NMR. *Angew Chemie Int Ed* 62(17) :e202218078
104. Yu C, Huang L (2018) Cross-Linking Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Interactomics and Structural Biology. *Anal Chem* 90(1): 144-165
105. Sahin C, Leppert A, Landreh M (2023) Advances in mass spectrometry to unravel the structure and function of protein condensates. *Nat Protoc* 18(12): 3653-3661
106. Ubbiali D, Fratini M, Piersimoni L, Ihling CH, Kipping M, Heilmann I (2022) Direct Observation of "Elongated" Conformational States in  $\alpha$ -Synuclein upon Liquid-Liquid Phase Separation. *Angew Chemie* 61(46):e202205726

# Phase-separating proteins in plants and methods used to study them

Marta Gapińska✉

Department of Systems Biology, Faculty of Biology, University of Warsaw

✉corresponding Author: ma.gapinska@uw.edu.pl

**Keywords:** biotic stress, abiotic stress, protein condensates, LLPS, non-standard abbreviations: FRAP (fluorescence recovery after photobleaching); IDR (intrinsically disordered region); LCS (low complexity sequence); LLPS (liquid-liquid phase separation); XL-MS (chemical cross-linking mass spectrometry)

## ABSTRACT

In order for a variety of biochemical processes to take place efficiently within the same cell, the existence of discrete areas within the cell is essential. In addition to encapsulated organelles, these include membraneless bio-molecular condensates, dynamically changing structures formed from proteins and nucleic acids. These condensates are often formed by liquid-liquid phase separation (LLPS). Numerous scientific reports in recent years have indicated that liquid-liquid phase separation (LLPS) is an important mechanism allowing plants to identify various biotic and abiotic stresses and respond to them. The following paper reviews the methods currently used to study macromolecular condensates and the function of proteins undergoing LLPS in plants.

