

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

Кафедра фізичної і біомедичної електроніки та
комплексних інформаційних технологій

До захисту допущено

Кафедрою фізичної і біомедичної електроніки та
комплексних інформаційних технологій
протокол № _____ від _____

завідувач кафедри _____ Сергій БЕРДНИК
(підпис)

« ____ » _____ 2025 р.

Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

Застосування розрахункових методів молекулярного моделювання
для пошуку стабілізаторів когезину

Спеціальність (спеціалізація) 176 Мікро- та наносистемна техніка

(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма Фізична та біомедична електроніка

(назва освітньої програми)

Виконавець _____ Максим БОЯРИНОВ
(підпис)

Науковий керівник _____ Валентин КОЖЕШКУРТ
(підпис)

Харків – 2025

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається з 58 листків друкованого тексту, 9 рисунків, і налічує 111 джерел використаної літератури.

Мета роботи: молекулярне моделювання білку когезину з метою пошуку стабілізаторів білкового комплексу для перспектив збереження фертильності та зниження ризику анеуплоїдії ембріонів у жінок репродуктивного віку.

Результати: був проведений аналіз відомих pdb структур комплексу субодиниць когезину за можливістю з білками модуляторами та ДНК з подальшим пошуком алостеричних сайтів взаємодій та розробки «молекулярних клеїв» для стабілізації комплексу <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.07.006>

Новизна дослідження: Білки когезинового комплексу (cohesin complex) - це ключові регулятори поділу клітин та стабільності хромосом, а в контексті ембріонального розвитку вони відіграють критичну роль у запобіганні анеуплоїдії.

Когезин – це мультибілковий комплекс, який: утримує сестринські хроматиди разом після реплікації ДНК (під час G2 та раннього мітозу/мейозу); бере участь у коректному розподілі хромосом під час поділу; регулює топологію хроматину, експресію генів та ремонт ДНК.

Під час мейозу (в ооцитах) когезин забезпечує правильну розбіжність гомологічних хромосом. Втрата когезину призводить до нетримання сестринських хроматид, а як наслідок до анеуплоїдії.

У ранньому ембріоні (зигота, морула) когезин стабілізує структуру хромосом після запліднення та під час перших поділів.

Дефекти когезину часто спостерігаються при старінні ооцитів (падіння експресії SMC1B, REC8); помилки реплікації ДНК; порушення мітотичного веретена.

Когезин - не тільки "механічне скріплення" хроматид. Він також регулює тривимірну архітектуру геному та взаємодію енхансерів та промоторів, впливаючи на активацію генів, необхідних для раннього ембріонального диференціювання.

У зв'язку з цим було поставлено за мету стабілізувати взаємодію центральних субодиниць білкового комплексу.

Висновок: в ході виконаної роботи було використано два підходи стабілізації білка – пошук «молекулярного клею» та алостеричного модулятора. Було отримано 12 сполук в ході докінга, які потенційно можуть бути хімічно синтезовані та в подальшому у вигляді ліків посприяти збереженню фертильності та зниження ризику анеуплоїдій ембріонів у жінок репродуктивного віку.

Ключові слова: когезин, анеуплоїдії, стабілізація білка, молекулярний клей, алостеричне зв'язування молекул

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
1. РОЗДІЛ I. ЛІТЕРАТУРНИЙ	
ОГЛЯД.....	8
1.1 Когезин.....	8
1.1.1 Механізм дії та функції.....	8
1.1.2 Структура субодиниць когезину та їх локалізація.....	9
1.2 Стабілізація білка.....	11
1.2.1 Білок-білкові взаємодії за допомогою малих молекул.....	11
1.2.2 Ортостеричне зв'язування модуляторів.....	13
1.2.3 Алостеричне зв'язування молекул.....	14
1.2.4 Димеризація.....	15
1.2.5 Натуральні продукти- стабілізатори білок - білкових взаємодій.....	15
1.2.6 Синтетичні стабілізатори ББВ.....	19
1.2.7 Молекулярний клей та мономерні деградатори.....	20
1.3 Регуляція генів за допомогою транскрипційних факторів.....	25
2. РОЗДІЛ II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	31
3. ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

PSSC – передчасне розділення сестринських хроматид

PPI (ББВ) – білок-білкові взаємодії

VLS – віртуальний скринінг лігандів

FDA – Food and Drug Administration

TPD – цільова деградація білків

UPS – система убіквітин-протеасома

PROTAC – химера, спрямована на протеоліз

AR – андрогенні рецептори

TF (ТФ) – транскрипційні фактори

DBD – ДНК-зв'язувальний домен

LBD – лігандзв'язуючий домен

TSS – сайт початку транскрипції

TAD – топологічно асоційовані домени

SBDD – структурно-орієнтований дизайн ліків

ВСТУП

Віково-залежні зміни в архітектурі хромосом призводять до аномального прикріплення за допомогою веретеноподібних мікротрубочок та помилок сегрегації.

Нормальна сегрегація – біваленти розділяються в анафазі I на дві окремі хромосоми. Тільки одна з них залишається в ооциті, а інша виключається в полярному тілі [1].

Нерозходження – патологія, при якій сегрегація хромосом не вдається в анафазі I, залишаючи весь бівалент або в ооциті, або в полярному тілі.

Передчасне розділення сестринських хроматид (PSSC) – патологія, при якій окрема хроматида неправильно розділяється під час анафази I. Це основна причина анеуплоїдії в ооцитах людини [2].

Когезин – це кільцеподібна структура, яка кріпиться до хромосом в ембріоні. Когезин зв'язує як гомологічні хромосоми, так і сестринські хроматиди разом до анафази. В ооцитах миші, було показано, що комплекси когезину поступово дисоціюють від хромосом з віком. Це може призвести до прогалин між гомологічними хромосомами в ооцитах вікових жінок та збільшення частоти аномальних прикріплень з мікротрубочками веретена поділу [3].

Передчасна дисоціація хромосом та сестринських хроматид перешкоджає точній сегрегації хромосом [4]. У крайніх випадках не тільки сестринські кінетохори можуть розділитися, але й окремі сестринські хроматиди можуть передчасно розділитися в мейозі I. Як розділення сестринських кінетохор, так і сестринських хроматид сильно корелюють з кількістю білка когезину, присутнього на хромосомах [5].

У ооцитах мишей, когезинові комплекси поступово дисоціюють від хромосом під час старіння, що часто призводить до великих проміжків між гомологічними хромосомами, вирівняними на метафазній пластинці мейотичного веретена поділу в ооцитах вікових жінок [6, 7]. Ці помітні проміжки аналогічно спостерігаються в

ооцитах старших жінок. Однак, чи передує цьому втрата когезину з хромосом, як і у мишей, залишається незрозумілим [8,9].

У крайніх випадках бівалентні клітини передчасно розділяються на дві унівалентні клітини, до анафази I [10]. Унівалентні клітини часто вирівнюються на метафазному веретені, а їхні два кінетохори спрямовані до протилежних полюсів веретена. Коли обидві сестринські хроматиди розділяються під час анафази I, це може призвести до зворотної схеми сегрегації – хромосоми розділяються як у мітозі, а не розділяються, як це очікується, в мейозі I. Або ж, якщо лише одна хромосома розділяється на хроматиди, а інша переміщується до одного полюса веретена, це призводить до PSSC, що так же як і зворотна сегрегація корелюють з втратою когезину з хромосом зі збільшенням віку матері [11].

Людські ооцити в мейозі II містять хроматиди, які розділені великою відстанню, але не повністю дисоційовані, але вони часто містять розтягнуті нитки хроматину, що з'єднують хроматиди разом [12]. Ці нитки можуть відповідати ділянкам, де зосереджений залишковий когезин, або потенційно вказувати на існування альтернативних зв'язків між хромосомами, які можуть стати більш важливими, оскільки рівень когезину знижується з віком матері.

РОЗДІЛ І. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Когезин

1.1.1 Механізм дії та функції

Старіння ооцитів також супроводжується поступовою дисоціацією когезину від хромосом. Жінки, які мають мутації в генах, що кодують субодиниці когезину та допоміжні білки когезину, переживають ранню менопаузу [13].

Втрата когезину, пов'язана з віком, підвищує чутливість до пошкодження ДНК та знижує здатність до репарації ДНК у старих ооцитах. Можна зробити висновок, що стійке пошкодження ДНК у старих ооцитах та пов'язана з ним втрата ооцитів, пов'язана з віком, а як наслідок – з погіршенням когезину та змінами в організації, чисельності та реакції механізмів репарації ДНК.

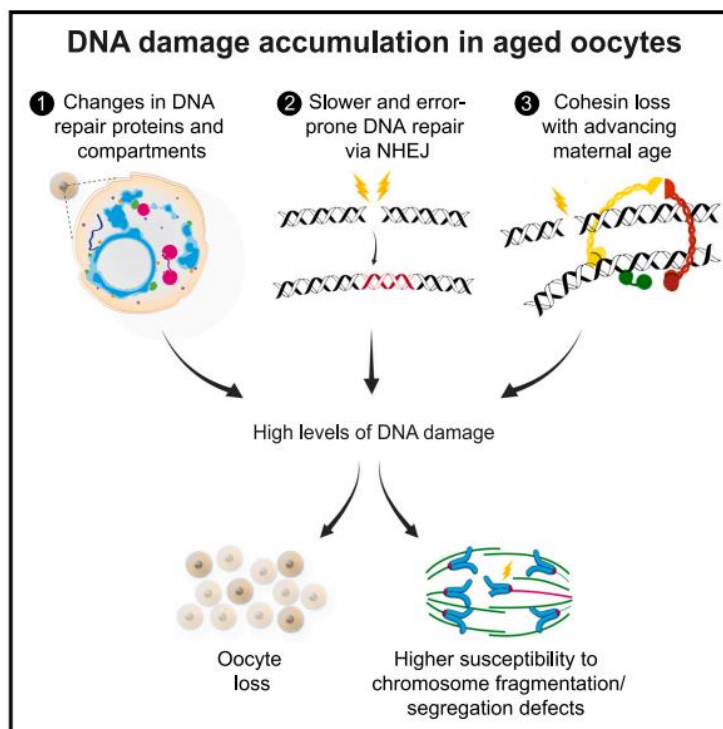


Рис. 1. Схематичне зображення механізму дії когезину на хромосомну фрагментацію. Накопичення пошкоджень ДНК у старіючих ооцитах [14].

На рис. 1 показано процеси, що супроводжують старіння ооцитів, де 1 – зміни у білках та компартментах системи репарації ДНК, 2 – повільніше і більш помилкове відновлення ДНК шляхом NHEJ, 3 – втрата когезину зі зростанням материнського віку. Високий рівень пошкоджень ДНК, як наслідок – втрата ооцитів та підвищена схильність до фрагментації хромосом / порушень сегрегації [14].

Втрата Scc1-когезину в соматичних клітинах збільшує чутливість до пошкодження ДНК та його поширення. Таким чином, пов'язана з віком втрата когезину в ооцитах може зробити старий хроматин більш схильним до накопичення пошкоджень ДНК [15, 16].

Втрата когезину, як у комплексах Scc1-, так і/або Rec8-когезину, призводить до збільшення пошкодження ДНК. Rec8-когезин виконує дві функції, пов'язані з пошкодженням ДНК: по-перше, він зменшує накопичення gH2AX після індукції пошкодження ДНК; по-друге, він необхідний для ефективного відновлення ДНК.

Ядерні рівні білків, що відповідають хроматино-асоційованим тільцям та нуклеофіламентоподібним структурам, FANCI та Rad51 відповідно, значно зростають, як і у старих ооцитах та ембріональних стовбурових клітинах мишей, яким бракує Rec8-когезії. Деякі компартменти репарації ДНК та рівні білків, такі як BRCA1, залишаються незмінними в ооцитах з передчасною втратою когезину, на відміну від зниження у старих ооцитах. Це свідчить про те, що деякі, але не всі, зміни в компартментах репарації ДНК є наслідком вікового зниження когезину. [17].

1.1.2 Структура субодиниць когезину та їх локалізація

Когезин є кільцеподібним мультисубодиничним білковим комплексом, що належить до родини SMC-білків (Structural Maintenance of Chromosomes). Його архітектура пристосована до обхоплення та утримання сестринських хроматид у вигляді гнучкого, але стійкого кільця діаметром приблизно 35–50 нм. Класичний еукаріотичний когезиновий комплекс складається з чотирьох основних білків –

SMC1, SMC3, RAD21 (SCC1) та STAG/SA, – кожен із яких займає строго визначену позицію у тривимірній структурі комплексу (рис. 2).

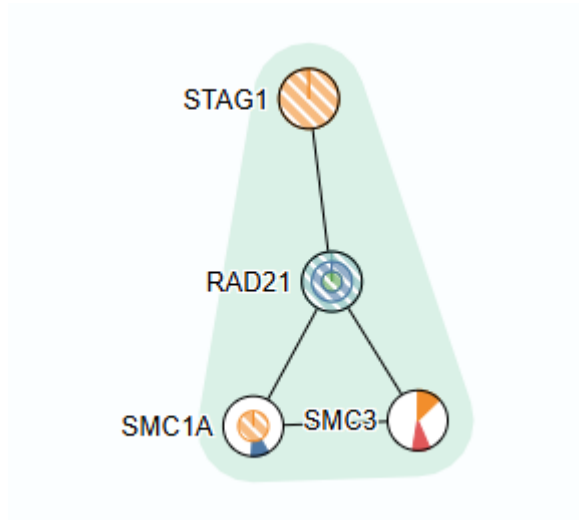


Рис. 2. Схематичне положення субодиниць білкового комплексу когезину [18].

SMC1 і **SMC3** (формування структурного каркаса) є центральними структурними білками комплексу. Кожен із них має подібну модульну організацію:

- N- і С-кінцеві ділянки білка формують АТФазний “head”-домен, характерний для родини АТФаз;
- між ними розташований довгий коіл-коіл домен, що формує вигнуту антипаралельну структуру;
- на протилежному кінці коіл-коіл доменів знаходиться “hinge”-домен, який забезпечує димеризацію SMC1 і SMC3.

Димеризація hinge-доменів створює V-подібну структуру з двома АТФазними “головками” на кінцях. У цьому положенні каркас когезину утворює основу для подальшого замикання кільця [19].

RAD21 (“замок” кільцеподібної структури) – α -кліпсуючий білок – з’єднує АТФазні домени SMC1 і SMC3, утворюючи замкнуте кільце, здатне охоплювати дві сестринські хроматиди.

- N-кінець RAD21 взаємодіє з “головкою” SMC3.
- C-кінець – з АТФазним доменом SMC1.

RAD21 функціонує як “затвор” кільця. Просторова організація RAD21 дозволяє контролювати відкриття/закриття комплексного кільця під час завантаження ДНК та її вивільнення. Розщеплення RAD21 протеазою сепаразою в анафазі відкриває кільце, що дозволяє сестринським хроматидам розійтися [20].

STAG1(SA1) та STAG2(SA2) – регуляторні субодиниці, локалізовані на стороні RAD21. Вони зв’язуються з центральною частиною RAD21 та стабілізують його взаємодію з SMC1/3. Їх розташування дозволяє контролювати взаємодію когезину з регуляторними білками – WAPL, PDS5 та Sororin, що координують динаміку кільця протягом клітинного циклу.

SA-білки визначають тканинну специфічність когезину та його участь у формуванні тривимірної архітектури хроматину, включно з утворенням TAD-доменів і довготривалих хроматинових петель [21].

У найбільш прийнятій моделі когезин має замкнуту кільцеподібну структуру, яку можуть відкривати у двох зонах:

1. АТФазний “вхідний” шлюз між SMC1/SMC3 і RAD21;
2. hinge-доменований “задній” шлюз між SMC1 і SMC3.

Експериментальні роботи свідчать, що саме “вхідний шлюз” **RAD21–SMC3** є основним шляхом захоплення ДНК під час реплікації, тоді як hinge-домен може відкриватися в окремих регуляторних ситуаціях [22].

1.2 Стабілізація білка

1.2.1 Білок-білкові взаємодії за допомогою малих молекул

Механізм дії більшості описаних наразі інгібіторів ББВ базується на прямому зв’язуванні малої молекули з поверхнею взаємодії одного з білкових партнерів, тим самим стерично запобігаючи зв’язуванню з його партнером взаємодії [23].

Тим не менш, існують методи, коли інгібують ББВ алостеричним чином шляхом виключного зв'язування з поверхневою ділянкою одного білкового партнера поза межами самого інтерфейсу взаємодії білка [24]. Маломолекулярні стабілізатори ББВ також демонструють два загальні механізми дії:

- 1) стабілізатор може зв'язуватися з одним білковим партнером, що збільшує взаємну спорідненість зв'язування білкових партнерів алостеричним чином
- 2) стабілізуюча молекула зв'язується з міжфазною поверхнею білкового комплексу і контактує з обома партнерами зв'язування, що також збільшує взаємну спорідненість зв'язування. Відповідно, різні типи надалі будуть називатися алостеричними (один білковий партнер) або прямими (принаймні два білкові партнери) стабілізаторами ББВ.

Подібно до інгібування ББВ, стабілізація димерів або олігомерів може призвести до активації або інгібування біологічної функції. Але стабілізація комплексів ББВ малими сполуками (тобто спрямована на області на або поблизу меж розділу двох або кількох білків) може мати значно вищу специфічність. Той факт, що такі малі молекули не конкурують з жодним з канонічних партнерів (або субстрату при роботі з ферментами), як у випадку з більшістю сучасних препаратів, усуває необхідність мати спорідненість зв'язування в низькому наномольному діапазоні для ініціювання фізіологічного ефекту. ББВ демонструють більшу різноманітність послідовностей, ніж активні центри ферментів, і тому має бути відносно легко отримати вищу специфічність для модуляторів ББВ, ніж для лігандів ферментів. [25] Дослідження порожнин ББВ, що знаходяться на периферії поверхні зв'язування, показало, що вони фізико-хімічно дуже схожі на порожнини, що спостерігаються в класичних лікарських мішенях. [26] Більше того, на відміну від значної кількості ББВ, на які впливають інгібітори, кишені зв'язування, утворені асоціацією двох або кількох партнерів, демонструють більш сприятливий профіль лікарської дії. Враховуючи переваги терапевтичного втручання шляхом модуляції ББВ, спостерігається зростаючий інтерес до стабілізації ББВ природними та

синтетичними сполуками, які ідентифікуються за допомогою віртуального скринінгу лігандів (VLS).

1.2.2 Ортостеричне зв'язування модуляторів

Ортостеричні модулятори зв'язуються поблизу або на поверхні розділу та безпосередньо сприяють стабілізації комплексу (діючи як клей) або інгібуванню (конкуруючи з одним з білкових партнерів) [27].

Опис комплексів модуляторів PPI

Комплекси ББВ можуть бути гетеромерами, гомомерами або квазігомомерами. Квазігомомери - це мультимери, що складаються з гомологічних мономерів, в яких окремі білки виконують ідентичні або дуже схожі функції, такі як мишачий подвійний хвилинний 2/x (MDM2 та MDMX) або с-Мус та Мах. [28] Досі всі гетеромери та квазігомомери з розв'язаними структурами були димерами, тоді як гомомери також демонструють вищу кількість копій білка та різну структурну симетрію. Олігомери ідентичних одиниць або гомологічних білкових одиниць можна категоризувати як ізологічні або гетерологічні зі структурною симетрією. [29,30] Ізологічна асоціація гомомерів характеризується однією ж ділянкою взаємодії від обох партнерів навколо подвійної осі симетрії. І навпаки, гетерологічна асоціація гомомерів використовує різні ділянки взаємодії від різних партнерів, що без замкнутої (циклічної) симетрії може призвести до нескінченної агрегації. [31]

Більшість стабілізованих комплексів ББВ можна описати за допомогою простих структурних ознак. Головною ознакою є природа партнерів та їх симетрія в комплексі. Гомомери (гомодимери та олігомери) здебільшого мають n-кратну симетрію, де n - кількість копій мономеру в комплексі. Другою ознакою є розташування порожнини, в якій зв'язуються стабілізатори. Спостерігалися два типи розташування: периферичні та замкнуті. Периферичні порожнини розташовані на або в безпосередній близькості від поверхні розділу. Вони піддаються впливу

розчинника, тоді як замкнуті порожнини повністю захovanі в ядрі комплексу ББВ. Стехіометрія стабілізатора в комплексах ББВ не використовується як ознака через її непередбачуваність.

Для значної кількості комплексів було виявлено, що більше однієї копії даного стабілізатора зв'язується з білковим комплексом. Це спостерігалось переважно у гомомерах та квазігомомерах. Дві структурні особливості стабілізованих комплексів ББВ у поєднанні зі структурними даними (рентгенівська кристалографія) природно призводять до класифікації всіх стабілізаторів ББВ, які здійснюють свій стабілізуючий ефект через зв'язування на поверхні ББВ або дуже близько до неї. [32]

1.2.3 Алостеричне зв'язування молекул

Алостеричне зв'язування є одним із ключових механізмів регуляції біологічної активності білків у клітині. На відміну від взаємодії лігандів з активним центром, алостеричні молекули приєднуються до спеціалізованих регуляторних ділянок – алостеричних сайтів, що просторово відокремлені від каталізуючого або функціонального центру білка. Це зв'язування спричиняє конформаційні зміни у структурі білка, які опосередковано впливають на його активність, стабільність або здатність взаємодіяти з іншими молекулами.

Залежно від біологічного ефекту розрізняють позитивну та негативну алостерію. Позитивні алостеричні модулятори стабілізують активну конформацію білка, посилюючи його функціонування, тоді як негативні модулятори сприяють переходу білка у менш активний або повністю неактивний стан. Ці механізми можуть мати як гомотропний характер, коли одна й та сама молекула виступає і субстратом, і регулятором, так і гетеротропний, коли регуляторна молекула відрізняється від субстрату. [33]

Молекулярні моделі алостеричної регуляції, зокрема класичні моделі Monod–Wyman–Changeux та Koshland–Némethy–Filmer, пояснюють кооперативний характер

змін активності багатосубодиничних білків. Такі механізми широко представлені у ферментах метаболічних шляхів, рецепторах клітинної сигналізації та структурних білках, забезпечуючи тонке й швидке реагування клітини на зміни внутрішнього та зовнішнього середовища.

Завдяки високій специфічності взаємодій та можливості часткового регулювання функції мішені алостеричні сайти стали важливими об'єктами сучасної фармакології. Алостеричні модулятори дозволяють селективно впливати на активність білків, зменшуючи ризик побічних ефектів, притаманних традиційним ортостеричним інгібіторам. Це робить алостерію перспективним напрямом у створенні лікарських засобів, зокрема для регуляції роботи рецепторів, ферментів та клітинних кіназ. [34]

1.2.4 Димеризація

Індуктори димеризації, також відомі як димеризатори, – це сполуки, які можуть зв'язуватися з двома білками, використовуючи дві різні кишені зв'язування, тим самим наближаючи білки до тісної просторової близькості, не обов'язково змушуючи їх утворювати стабільний димер.

Одним із прикладів є FK506, імуносупресивний препарат, схвалений FDA, який індукує утворення комплексу FKBP12-кальцинейрин. Це інактивує функцію кальцинейрину та пригнічує трансдукцію сигналу в шляху трансдукції Т-лімфоцитів. [35]

Димеризатори розроблені як двовалентні сполуки, з'єднані лінкером та зв'язуються з двома кишнями для лікарських засобів. Їхня конструкція не враховує одну новоутворену кишеню для лікарських засобів.

1.2.5 Натуральні продукти- стабілізатори білок - білкових взаємодій

Постійний розвиток інгібування ББВ як терапевтичної стратегії є великим кроком вперед для галузі медичної хімії, значно збільшуючи геном, що піддається лікуванню. Найбільш переконливим аргументом на користь стабілізації ББВ походить з численних прикладів природних продуктів, які передають свою фізіологічну активність шляхом стабілізації специфічних білкових комплексів. Деякі з них протягом багатьох років використовуються як терапевтичні засоби, такі як імуносупресанти циклоспорин (Sandimmun®, Novartis Pharmaceuticals), FK506 (Prograf®, Astellas Pharma) та рапаміцин (Rapamune®, Pfizer), або протираковий засіб паклітаксел (Taxol®, Bristol Myers Squibb). Інші, такі як брефельдин А, форсколін та дитерпенові глікозиди фузикоқцин А та котиленін А, є надзвичайно корисними біологічними інструментальними сполуками. [36,37,38,39]

Натуральні продукти, що імітують актин-зв'язуючий білок: гелісолін: свінголід А, ризоподин та лобофоролід.

Актин та полімеризація актину є важливими компонентами клітинного цитоскелету. [40,41,42]

Ремоделювання актину часто пов'язане зі злоякісними фенотипами, такими як рак, що робить актин та динаміку актину потенційною мішенню для ліків. [43,44, 45] Багато природних продуктів були ідентифіковані як стабілізатори актину, що має еволюційну роль цих природних продуктів у їхньому організмі-хазяїні як захисних молекул, враховуючи їхню велику кількість та центральну роль, яку відіграє актин у виживанні клітин. [46]

Свінголід А – це цитотоксичний морський макролід, що виробляється морською губкою *Theonella swinhoei*, який порушує актиновий цитоскелет, розриваючи актинові філаменти та стабілізуючи G-актин як нефізіологічний гомодимерний комплекс у стехіометрії 2:1 G-актин-ліганд. [47] 44-членна макроциклічна структура свінголіду А демонструє подвійну вісь симетрії, що є ключовим для механізму дії сполуки.

Структура потрійного комплексу свінголіду А-Г-актин, показує, що хоча два мономеру актину не контактують один з одним, обидві половини ліганду здійснюють одночасні, переважно гідрофобні, контакти з обома мономерами актину. Місце зв'язування свінголіду А на Г-актині перетинається з місцем, на яке спрямовані цитотоксичні макролідні токсини тризоксазолу Кабірамід С та джаспісамід А, які, на відміну від свінголіду А, утворюють комплекс Г-актин-ліганд. [48,49]

С2-симетричний макроциклічний природний продукт, ризоподин, також інгібує полімеризацію актину шляхом стабілізації комплексу Г-актин гомодимер. [50] Подібно до структури свінголіду А-Г-актин, два мономеру актину в структурі ризодопін-гактин мінімально контактують один з одним. Однак, на відміну від комплексу свінголіду А-Г-актин, кожна половина С2-симетричної структури макроциклу ризодопіну контактує з гідрофобною поверхнею лише одного мономера актину.

Цей механізм дії нагадує той, що спостерігається для активатора Roche р53, RO-2443, який діє шляхом стабілізації гомодимерного комплексу MDMX. [51]

Натуральні продукти, що впливають на актинові філаменти: фалоїдин, ясплакнолід та доластатин.

Гептапептидний грибний токсин, фалоїдин, давно зарекомендував себе як стабілізатор актинових філаментів. Фарбування фіксованих клітин міченими барвником похідними фалоїдину є рутинною методикою в клітинній біології для візуалізації актинового цитоскелету за допомогою флуоресцентної мікроскопії, зокрема актинових філаментів. [52,53]

Однак спроби з'ясувати структуру режиму зв'язування фалоїдину з високою роздільною здатністю були ускладнені практичними труднощами роботи з динамічним полімеризуючим актином. Ранні біохімічні та клітинні дослідження показали, що фалоїдин стабілізує актинові філаменти та індукує полімеризацію актину, тоді як пізніші дослідження скануючої просвічувальної електронної

мікроскопії фалоїдину, міченого ундеказолом, та рентгенівський волоконний дифракційний аналіз фалоїдину, міченого родаміном [54], виявили положення та орієнтацію молекули в актинових філаментах, яка знаходиться на межі межі трьох актинових мономерів у стехіометрії 1:1, причому барвник/ундеказолова мітка виступає з щілини зв'язування в розчинник.

Ясплакінолід, циклічний природний продукт змішаного полікетидного/пептидного походження, виділений з морської губки *Jaspis johnstoni*, конкурує за той самий сайт зв'язування на нитчастому актині, що й фалодін. Отже, ясплакінолід стабілізує актинові філаменти *in vitro* та порушує актинові філаменти *in vivo*. [55]

Аналогічні макроциклічні вторинні метаболіти, хондрамід С [56] та долікулід [57], як було показано в біохімічних аналізах, так і в клітинах, взаємодіють з актиновими філаментами подібним чином, як фалоїдин та ясплакінолід. Однак, наразі немає структурних доказів, що підтверджують ці висновки. Морський депсипептид, доластатин 11, стабілізує F-актин *in vitro* однак, на відміну від фалоїдину та ясплакіноліду, доластатин 11, як було показано, рентгенівським волоконним дифракційним аналізом, зв'язується в альтернативному місці до фалоїдину на актинових філаментах, у щілині між двома довгими нитками F-актину. [58]

Натуральні стабілізатори ББВ та відкриття ліків

Існує велика різноманітність молекулярних структур, починаючи від великих макроциклів, таких як циклоспорин А, лобофоролід та устилоксин D, до малих гідрофобних сполук, таких як брефельдин А, і закінчуючи малими високогідрофільними сполуками, наприклад, інозитолтетрафосфатом. Будучи природними продуктами, багато з цих сполук мають терпеноїдну або пептидну природу, часто демонструючи складну тривимірність, що забезпечує високу комплементарність форми з відповідними мішенями.

За винятком таксолу, який виконує свою функцію алостеричним чином, ці природні продукти зв'язуються на межі розділу партнерів по зв'язуванню з білками в комплексі, який вони стабілізують.

Це означає, що комплементарність форми стосується кишені, утвореної двома або більше білковими партнерами, що забезпечує потенціал для дуже високої селективності проти цієї специфічної комбінації білків. Це дійсно ілюструється тим, що рапаміцин є інгібітором виключно кінази mTOR шляхом стабілізації ББВ за допомогою FKBP12. [59]

Натуральні стабілізатори ББВ продемонстрували дійсність цієї стратегії лікування захворювань та потенціал для високої селективності. Подібно до революції після встановлення інгібування ББВ як життєздатної терапевтичної стратегії, здатність стабілізувати специфічні ББВ означатиме величезне збільшення кількості мішеней, що дозволяє розробці ліків втручатися в шляхи або мішені, які раніше не розглядалися при розробці ліків. Однак, незважаючи на ці характеристики та приклади, дослідження, що зосереджені на стабілізації ББВ, є відносно нечисленними.

1.2.6 Синтетичні стабілізатори ББВ

Класифікують різні стабілізатори ББВ залежно від типу комплексу, який вони стабілізують. [60] Однак, з огляду на розробку ліків, розділяються на (I) сполуки, для яких визначення механізму *post hoc* показало, що вони є стабілізаторами ББВ, та (II) сполуки, які були ідентифіковані в дослідженнях, спеціально спрямованих на пошук стабілізаторів ББВ.

Інгібування ББВ часто ускладнюється через велику площу поверхні, яку необхідно враховувати, що часто несумісне з вимогами до перорально біодоступних низькомолекулярних препаратів. Ще одним ускладнюючим фактором для розробки інгібіторів ББВ є те, що відповідний партнер зв'язування в передбачуваному ББВ

часто не ідентифікований, що робить розробку аналізів для оцінки інгібування неможливою без значних зусиль для ідентифікації партнера зв'язування. Як правило, розробка прямих аналізів зв'язування для одного компонента ББВ погано перетворюється на функціональне інгібування ББВ через труднощі у визначенні кишень зв'язування або дійсно відповідної поверхні білка, на яку повинні діяти малі молекули.

З іншого боку, стабілізація ББВ являє собою потенційно сумісний з малими молекулами підхід до модуляції ББВ, оскільки на межі розділу двох білків можуть утворюватися лікарські кишені, зв'язування ліганду з такою кишенею може призвести до стабілізації білок-білкового комплексу та потенційно призвести до цікавих фармакологічних ефектів. Крім того, розробка сполук проти кишені, утвореної двома білковими партнерами, дає потенціал для підвищеної селективності проти цієї специфічної комбінації білкових партнерів, на відміну від інгібіторів ББВ, де будь-яке інше зв'язування білка з цільовою ділянкою порушується. Ця можливість призводить до концептуального відкриття низки мішеней та пов'язаної з ними фармакології, яка раніше вважалася поза сферою відкриття ліків на основі малих молекул.

Кілька сполук здійснюють свою дію через стабілізацію ББВ, але це, як правило, було показано за допомогою механістичного аналізу *post hoc*. Багато бібліотек сполук сильно зміщені до перорально доступного «лікоподібного» хімічного простору, але сполуки природного походження, які становлять основну частину стабілізаторів ББВ, демонструють дуже різні структурні властивості. Це може обмежити успіх скринінгових підходів до стабілізації ББВ. Включення ширшого хімічного простору до наборів для скринінгу стабілізаторів ББВ, наприклад, макроциклів, вторинної структури пептидів або природних продуктів, міметиків або сполук, спеціально збагачених атомами вуглецю sp^3 , може збільшити ймовірність знаходження стабілізаторів ББВ. Однак невідомо, чи вимагають сполуки з різними властивостями також іншої стратегії для ідентифікації та/або оптимізації цих сполук.

1.2.7 Молекулярний клей та мономерні деградатори

Цільова деградація білків (TPD) – це швидкозростаюча стратегія розробки ліків, яка використовує малі молекули для залучення хвороботворних білків для швидкого руйнування, головним чином через убіквітин-протеасомний шлях. Вона демонструє великий потенціал для лікування таких захворювань, як рак та інфекційні, запальні та нейродегенеративні захворювання, особливо для тих, хто має патогенні білкові мішені. Зі зростанням популярності «молекулярного клею» деградаторів білків, які зміцнюють та спрощують з'єднання E3-лігази з хвороботворним білком для убіквітинування та подальшої деградації, розробляються та розробляються нові методи лікування.

Наразі цільова деградація білків (TPD) стала новаторською стратегією у розробці ліків. Цей підхід стає новим терапевтичним методом, спрямованим на лікування таких захворювань, як рак, запальні та імунні захворювання, а також інфекцій, оскільки багато з них зумовлені аберантною експресією патогенного білка. [61,62,63]

Дослідження з використанням TPD зосередилися на залученні хвороботворних білків, які раніше вважалися «непридатними для лікування» через відсутність у них канонічних сайтів зв'язування лігандів для швидкого руйнування та видалення через шлях убіквітин-протеасома.

Система убіквітин-протеасома (UPS) є основним механізмом клітинної деградації білків та підтримки гомеостазу білків, як частини звичайних процесів клітинного ведення життєдіяльності. Таким чином, потенційна широта застосування TPD практично необмежена.

Процес UPS включає каскад ферментів, що призводить до убіквітинування білка (POI). Убіквітинування є основою як протеасомної, так і аутофагійно-

опосередкованої деградації білків, причому E3-лігази є критичними компонентами каскаду убіквітинування. [64,65]

З понад 600 E3-убіквітин-лігаз, кодованих геномом людини, лише деякі з них були використані для цільової деградації білків, наприклад, цереблон (CRBN), VHL, MDM2, DDB1, DCAF15 та SCF β TRCP. Ці субодиниці можуть бути мішенню для деградаторів, які викликають конформаційні зміни, що сприяють утворенню потрійного комплексу з POI. [66,67]

Утворення потрійного комплексу індукує молекулярну близькість між каталітичним сайтом E3-лігази та POI, що спонукає до перенесення убіквітину та подальшої протеасомної деградації POI. Визначення успішних стратегій для виявлення лігандів, що зв'язуються з E3-лігазами, стає привабливою метою дослідження. [68,69]

Порівняно з традиційним фармакологічним інгібуванням цільових білків, деградація білків пропонує дві ключові переваги.

По-перше, цілеспрямована деградація є каталітичним процесом, оскільки деградатори діють через тимчасове зв'язування, а не конкурентне зайняття, та успішно дисоціюють після стимулювання поліубіквітинування хвороботворного білка. [70]

Таким чином, один деградатор може знищити багато копій патогенного білка, тим самим забезпечуючи більшу ефективність при дуже малих дозах.

По-друге, хоча інгібітори білків блокують активний центр патогенного білка, деградатори порушують усі його функції, забезпечуючи вищу чутливість до стійких до ліків мішеней та кращий шанс впливати на неферментативні функції білків. [71,72,73]

Найдавніший відомий опублікований опис концепції химерних деградаторів міститься в патенті, поданому в 1999 році біотехнологічною компанією Proteinix, яка пропонує взяти на себе управління клітинною системою деградації білків.

Концепція використання природної системи деградації білків, керованої убіквітином, для терапевтичних цілей була зосереджена на розробці малих молекул, які залучають E3-лігази для деградації POI. У 2001 році було опубліковано перше дослідження *in vitro* для підтвердження концепції, яке продемонструвало, що пептидна, спрямована на білок химерна молекула Protac-1, яка залучає E3-лігазу β -TRCP, успішно призвела до деградації білка, пов'язаного з раком, MetAP2; таким чином, була введена назва PROTAC (хімера, спрямована на протеоліз). [74]

Пізніше, виявлення пептиду з HIF1 α , який зв'язується з VHL E3-лігазою, призвело до конструювання клітинно-проникних PROTAC, які розкладали різноманітні білки. [75]

PROTAC містили пептидні ліганди для E3-лігази; повідомлення про малу молекулярну PROTAC, деградатор андрогенних рецепторів (AR), що використовує нутлін-3 для рекрутування MDM2, було опубліковано у 2008 році. [76]

Відкриття малих молекулярних міметиків HIF1 α пептиду, [77,78,79] прискорило раціональне проектування малих молекулярних PROTAC. [80]

Створення стратегії PROTAC було ще більше доповнено виявленням сполук-деградаторів, які стали відомими як молекулярні клеї. Молекулярні клеї – це одновалентні малі молекули (<500 Да), які змінюють форму поверхні рецептора E3 лігази, сприяючи новим білок-білковим взаємодіям. На відміну від оригінальних PROTAC, в яких два ліганди з'єднані гнучким лінкером, який може скручуватися та повертатися і дозволяти двом білкам утворювати контакти, молекулярні клеї, як вважалося, більш безпосередньо посилюють утворення комплексу між E3-лігазою та цільовим білком шляхом стискання між білок-білковими інтерфейсами і зазвичай визначаються як малі молекули, які взаємодіють з двома білковими поверхнями, щоб індукувати або посилити спорідненість цих двох білків один до одного. [81]

Термін «*молекулярний клей*» спочатку був введений для опису механізму дії циклоспорину А та FK506, що індукують нові білок-білкові асоціації. [82] Молекулярні деградатори клею, такі як талідомід, були відкриті ретроспективно,

після їх схвалення FDA та подальшого виявлення їхньої імуномодулюючої та протизапальної активності. E3-лігаза цереброн була визначена як мішень талідоміду та його аналогів, леналідоміду та помалідоміду, відомих як імуномодулюючі імідні препарати (IMiD), стосовно терапії раку. [83] Вони є одними з основних прикладів молекулярних клеїв для цілеспрямованої деградації. Фактично, структурні та біофізичні дані показали, що PROTAC можуть функціонувати так само, як і молекулярні клеї, індуючи нео-PPi між E3 лігазою та цільовим білком і таким чином сприяючи утворенню стабільних потрійних комплексів між неосубстратом, PROTAC та E3-лігазою. [84]

Таким чином, різницю між PROTAC та молекулярними клеями стає важко визначити. Прості структурні модифікації можуть легко перетворити справжній деградатор MDM2 PROTAC на молекулярний клей. [85]

Вплив білок-білкової взаємодії при утворенні потрійного комплексу визначається як співвідношення констант дисоціації для взаємодій між лігандом та одним із двох білкових компонентів за відсутності та присутності іншого. Кооперативність молекулярної клейової системи фізично визначається комплементарним інтерфейсом між лігандом та партнером димеризації, що успішно оцінено за допомогою досліджень кристалічної структури. Таким чином, для молекулярних клеїв кооперативність є ключовим параметром, що описує активність сполук, що вказує на компетентність молекулярної клейової сполуки. [86]

Перше раціональне відкриття молекулярних клеїв між лігазою та білком, що цікавить, стосувалося серії сполук, які посилюють взаємодію між онкогенним транскрипційним фактором, β -катеніном, та його спорідненою E3-лігазою, SCF β -TrCP. Ці сполуки сприяють убіквітинувannya β -катеніну за допомогою β -TrCP та індують подальшу деградацію β -катеніну в клітинах. Окрім молекулярних клеїв на основі E3 убіквітинлігази, існують інші, молекулярні клеї, які індують деградацію та/або дисфункцію білка за допомогою різних механізмів дії, включаючи деградацію білка, опосередковану аутофагією, стабілізацію підкомплексу MEK, гальмування

мутанта KRAS, стабілізацію полімеризації α -тубуліну, деградацію білка FK506-зв'язуючого білка 12 (FKBP12). [87]

Структурні та біофізичні дані показали, що PROTAC можуть функціонувати так само, як і молекулярні клеї, індуючи нео-PPi між E3 лігазою та цільовим білком і таким чином сприяючи утворенню стабільних потрійних комплексів між неосубстратом, PROTAC та E3-лігазою. Таким чином, різницю між PROTAC та молекулярними клеями стає важко визначити.

Молекулярні клеї на відміну від PROTAC набагато менші і тому легше відповідають правилу для лікарської відповідності,

- 1) підвищують ймовірність гарної пероральної біодоступності, а отже матимуть вищу мембранну проникність і краще клітинне поглинання;
- 2) краще проходять через гематоенцефалічний бар'єр, що є важливою вимогою для лікування розладів центральної нервової системи (ЦНС) [88]
- 3) здатні перепрограмувати партнерів зв'язування білків каркасу або посилювати ендогенну взаємодію між двома білками.

Навпаки, важливою перевагою PROTAC є їхня універсальність; вони дозволяють модульну конструкцію для швидкого з'єднання одного ферменту з багатьма мішенями. Таким чином, PROTAC відносно легко розробити, а цільові білки передбачувані.

1.3 Регуляція генів за допомогою транскрипційних факторів

Однією з областей, де цілеспрямована стабілізація ББВ може бути трансформаційною у розробці ліків, є модуляція активності факторів транскрипції. Фактори транскрипції беруть участь у розвитку багатьох захворювань [89], а пригнічення їхньої транскрипційної активності (наприклад, за допомогою різних методів нокдауну або за допомогою антитіл) часто призводить до бажаного фенотипу. Фактори транскрипції зазвичай вважаються нелікованими з малими

молекулами, оскільки вони зазвичай проявляють свій клітинний вплив як частина багатокомпонентних білкових комплексів з великими, відносно безликими поверхнями взаємодії.

Ключова роль ТФ полягає в залученні транскрипційного регуляторного апарату до певних геномних локусів для регуляції експресії генів. Таким чином, мінімальний ТФ визначається лише наявністю двох ключових елементів: ДНК-зв'язувального домену (DBD), який розпізнає специфічні послідовності ДНК, та ефекторного домену, який залучає членів механізму активації або репресії транскрипції. ТФ, які діють як транскрипційні активатори, використовують трансактиваційний домен, щоб залучити ферменти ремоделювання хроматину, ферменти, що модифікують гістони, транскрипційні коактиватори, та/або багато загальних ТФ для збільшення доступності, цільових генів, епігенетично мічати їх як активні, та залучити та активувати РНК-полімеразу II (Pol II). [90,91]

І навпаки, ТФ, які діють як транскрипційні репресори, використовують трансрепресійний домен для залучення ферментів ремоделювання хроматину, та епігенетичних, щоб зменшити доступність цільових генів та відмічати їх як неактивні. У деяких випадках прототипні трансактиваційні домени, можуть мати репресивні функції, які контролюються наявністю та/або активністю корепресорів. Завдяки цьому базовому механізму залучення, ТФ діють як директори транскрипційного виходу геному та відіграють ключову роль в широкому спектрі клітинних процесів.[92]

Потенціал високої селективності, можливість отримати доступ до раніше нелікових мішеней, а також методів, необхідних для ідентифікації та розробки провідних структур - стабілізація ББВ стає підходом, який може мати величезну цінність для медичної хімії. [93]

Сучасні універсальні моделі функції ефекторних доменів утворюють неспецифічні динамічні ББВ з транскрипційним апаратом, а також фазово

розділяються з неупорядкованими ділянками коактиваторів/корепресорів для утворення транскрипційних конденсатів. [94]

Окрім двох функціональних доменів транскрипційних факторів (ТФ), що визначають клас, багато ТФ містять додаткові рівні регуляції, які ускладнюють їхню функцію та регуляцію. Наприклад, родина ТФ STAT містить домен SH2, який контролює гомодимеризацію або гетеродимеризацію з іншими ТФ STAT, і таким чином регулює локалізацію ТФ у ядрі. [95] Ядерні рецептори найбільш придатна для лікування родина ТФ, містять лігандзв'язуючий домен (LBD), який зазвичай діє у співпраці з прототиповим неупорядкованим доменом трансактивації для залучення транскрипційного апарату при зв'язуванні з лігандом низької молекули. [96] Інші ТФ, такі як базова родина спіраль-петля-спіраль, потребують димеризації з іншими членами родини для формування компетентних DBD.

Регуляція генів за допомогою транскрипційних факторів (ТФ)

Регуляція генів еукаріотів є надзвичайно складним та динамічним процесом, що сприяє багатьом проявам поведінки. ТФ функціонує у певному сайті зв'язування, в залежності не лише від термодинамічної стабільності комплексу ТФ-ДНК, але й від низки взаємодіючих факторів, включаючи багатовимірну архітектуру ДНК/хроматину, кооперативну дію інших ТФ та коактиваторів у сусідніх або перекриваючихся сайтах та кінетику зв'язування ТФ з самою ДНК. [97,98]

Вплив структури геному на дію ТФ.

Організація геному в кількох вимірах є ключовим фактором, що визначає, чи ген увімкнений, чи вимкнений. ТФ контролюють експресію більшості генів шляхом зв'язування з промоторними та/або енхансерними ділянками ДНК. [92] Промотори характеризуються включенням сайту початку транскрипції (TSS) та послідовності ДНК TATA-box/Inr, яка збирає преініціаційний комплекс та подальшу активацію РНК Pol II. Енхансери, навпаки, не містять функціонального початку транскрипції (TSS) та можуть бути розташовані на відстані до кількох кілобаз від TSS. Натомість енхансери зв'язуються з ТФ та активують транскрипцію, коли вони розміщені в

безпосередній просторовій близькості до промотора. [99] Ця залежність від тривимірної близькості для функції енхансера має багато важливих наслідків, наприклад те, що багато енхансерів функціонують лише на генах, розташованих на великих геномних відстанях (>1 кб), а не в ближчих геномних локусах. [100]

Проривом у розумінні того, як енхансери розміщуються поблизу генів-мішеней, стала ідентифікація хроматинових околиць або топологічно асоційованих доменів (TAD). [101,102,103,104]

TAD – це екструдовані петлі хроматину, які зв'язані білками когезином та CTCF і дозволяють клітинам диктувати тривимірну структуру певних ділянок геному. TAD часто консервуються в межах типів клітин і вважається, що вони розміщують ключові гени клітинної ідентичності під контролем кількох енхансерів для підтримки стійкої експресії. [105] Відповідно, TAD можуть бути реструктуровані після диференціації клітин-попередників як механізм ремоделювання транскрипційних програм клітинної ідентичності. Примітно, що не всі гени в межах TAD обов'язково залежать від TAD для функціонування, що свідчить про додаткові складнощі геномної структури, які можуть бути релевантними для селективного терапевтичного таргетування генів у межах TAD. [106]

Особливо помітним прогресом у фундаментальній біології регуляції генів стало відкриття та характеристика суперенхансерів. Суперенхансери визначаються як розширені кластери енхансерів з особливо підвищеними рівнями зв'язаних TF та коактиваторів, а також епігенетичних міток, пов'язаних з активною транскрипцією (наприклад, H3K27Ac). Завдяки їх високому стійкому рівню транскрипційної активності, суперенхансери часто діють спільно з TAD для контролю експресії ключових генів клітинної ідентичності. [107,108] Наприклад, під час розвитку суперенхансери були виявлені як регулятори основних регуляторних транскрипційних факторів, що контролюють процес і часові рамки диференціації клітин. [109]

Суперенхансери також інактивуються або перепрофілюються протягом розвитку, щоб ініціювати зміни в характеристиках клітин; при раку ці механізми дозволяють злоякісним новоутворенням використовувати суперенхансери для керування онкогенними транскрипційними програмами.

Динаміка дії транскрипційних факторів (ТФ).

Важливим фактом, що лежить в основі еукаріотичної регуляції транскрипції, є те, що це дуже динамічний та нерівноважний процес, що призвело до відкриттів про механізми ТФ з цільовими сайтами *in vivo* та мають корегуляторну функцію. [90]

Класичний погляд на взаємодію ТФ-ДНК полягає в тому, що ТФ знаходяться на ДНК протягом тривалих періодів часу, щоб виконувати свою функцію, але сучасні дослідження візуалізації *in vivo* показали, що час життя ТФ з цільовими сайтами ДНК може бути всього кількома секундами. Вважається, що цей динамізм служить регуляторним механізмом, що запобігає затримці ТФ на неспецифічних сайтах ДНК протягом тривалих періодів часу. Наприклад, відносна частка зв'язування зі специфічними ділянками порівняно з неспецифічними ділянками деяких ядерних рецепторів лише незначно збільшується при активації, але швидка зміна та тривалий час життя в специфічних ділянках сприяють швидкому та значному збільшенню транскрипційного виходу в генах-мішенях. [110]

Динамічне зв'язування ТФ-ДНК також може призвести до режимів кооперативності ТФ. Кооперативна активність кількох ТФ на промоторі або ехансері реалізується зв'язуванням різних ТФ із сусідніми ділянками та стабілізацією зв'язування один одного, також було виявлено, що швидке зв'язування та від'єднання ТФ призводить до кооперативності від зв'язування різних ТФ з однією й тією ж ділянкою. Низький час життя та тривалі періоди часу між зв'язуванням кожного ТФ забезпечують безперешкодний обмін між різними ТФ, що сприяє підтримці відкритої конформації хроматину та залученню окремих членів транскрипційного апарату. [90]

Неочікувана поведінка в транскрипції спостерігалася під час характеристики транскрипційної активації, керованої суперенхансером. Він демонструє помітне збільшення як взаємозалежності, так і динаміки зв'язування та розв'язування транскрипційних факторів (ТФ) та коактиваторів порівняно з типовими енхансерами. Посилена кооперативність у суперенхансерів робить їх особливо чутливими до незначних змін у складі ТФ та корегуляторів.

Це може призвести до того, що інгібітори загальних коактиваторів демонструють виняткову селективність для транскрипції, керованої суперенхансерами. Інгібітори загальних транскрипційних регуляторних ферментів копіюють фенотипи видалення основних регуляторних ТФ у деяких типах клітин.[111]

РОЗДІЛ II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Мета: молекулярне моделювання білку когезину з метою пошуку стабілізаторів білкового комплексу для перспектив збереження фертильності та зниження ризику анеуплоїдії ембріонів у жінок репродуктивного віку.

Задача: молекулярне моделювання комплексу субодиниць когезину за можливістю з білками модуляторами та ДНК та подальший пошук алостеричних сайтів взаємодії для розробки «молекулярних клеїв» та стабілізації комплексу <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.07.006>;

Для виконання поставленої задачі було поставлено та виконано наступні завдання:

- 1) **Перший підготовчий етап.** Провести пошук структур комплексу когезину (Uniprot, PDB – rscb-pdb);
- 2) Обрати робочу структуру (PDB коди 8ROI, 8ROH);
- 3) Зробити аналіз та порівняти обрані структури;
- 4) Використати FTМар для пошуку покетів та обрати метод моделювання;
- 5) **Другий етап.** Докінг. В базі ZINC20 (<https://zinc20.docking.org>) обрати набір з 1600 сполук FDA (<https://zinc20.docking.org/substances/subsets/fda/>) у вигляді буквених позначень (smiles) для кожної сполуки;
- 6) За допомогою python бібліотек RDKit, Molscrub та Meeko отримати 3D структури молекул в різних за електричним зарядом станах. За допомогою python бібліотек cctbx-base та Meeko зробити модель білка та зокрема покета взаємодії з лігандом;
- 7) Здійснити докінг за допомогою Autodock Vina;
- 8) Відбір найбільш перспективних сполук за критеріями:
 - високий (за модулем) docking score,
 - візуальна оцінка, наявність водневих зв'язків (програмне забезпечення UCSF Chimera, яке використовувалося для візуалізації результатів, дозволяє виконувати

пошук водневих зв'язків), відсутність накладень на структуру білка, що спричиняють відштовхування атомів,

- наявність зв'язку з обома домена (для стабілізації білку за допомогою «молекулярного клею»),

- потенційна наявність π - π взаємодій між двома ароматичними структурами, які не знаходяться засобами використаного ПЗ, але можна відстежити за близьким розташуванням циклів.

9) **Третій етап.** Серед результатів докінгу обрано перспективну сполуку з кожного пакету для пошуку в більших за обсягами базах аналогів, кращих за «оригінальну» початково обрану сполуку. Пошук аналогів на базі ZINC20 за Tanimoto similarity (більше ніж 0,4) виконувався з використанням python бібліотеки RDKit, також є вбудований пошук в базі ZINC (https://zinc20.docking.org/substances/?ecfp4_fp-tanimoto-40=20243).

10) Аналогічно попередньому пункту, паралельно з пошуком аналогів серед існуючих сполук, проведено генерування аналогів за допомогою Nvidia molmim (<https://build.nvidia.com/nvidia/molmim-generate>).

11) Підготовка знайдених аналогів для докінгу та проведення докінгу з подальшим аналізом його результатів.

В базі Uniprot знайдено інформацію про білок, а також уніфікований код. Для білка RAD21, що є центральним в комплексі когезину, uniprot код O60216. В базі структур білків Protein Data Bank (rscb.org) шукаємо структуру білка. На PDBe-KB (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pdbe-kb/proteins/O60216/interactions>) ще один сайт з пошуку інформації про білок.

Інструмент для знаходження потенційних пакетів – <https://ftmap.bu.edu/login.php> створює «мапування розчинників/фрагментів», а на

основі цього знаходять регіони, які найімовірніше є функціональними сайтами для зв'язування лігандів.

Когезиновий комплекс SMC3 + RAD21 – центральний для організації 3D-геному, зв'язування хроматину, перегрупування сестринських хроматид, їх зчеплення після реплікації.

Структура PDB **8ROI**. Це структура комплексу SMC3/ RAD21 людини, у конфігурації *apo*, тобто без зв'язаного АДФ або інших лігандів. Як частина когезинового комплексу, бере участь у когезії сестринських хроматид від моменту реплікації ДНК у S-фазі до їх сегрегації в мітозі, функції, яка є важливою для правильної сегрегації хромосом, постреплікативного відновлення ДНК та запобігання неналежній рекомбінації між повторюваними ділянками. В інтерфазі когезини можуть функціонувати в контролі експресії генів шляхом зв'язування з численними ділянками в геномі. Конформація – “відкрита / вільна” форма комплексу.

Структура PDB **8ROH**. Це також структура того ж комплексу SMC3/RAD21, але у АДФ-зв'язаній конформації. Конформація “зв'язана / індукційована” форма, можливо, передуює зміні організації доменів.

Рух між конформаціями (*apo* ↔ *nucleotide-bound*) є критичним для функції АТФ-ази, яка “керує” циклом згортання/розгортання, зв'язування/вивільнення ДНК, змін у комплексі. Тому 8ROH і 8ROI – важливі “інструментальні” структури, які дають змогу дослідити, як Когезин змінює форму при зв'язуванні/гідролізі нуклеотидів.

Методика виявлення покетів за допомогою FTMap:

1. Користувач завантажує в онлайн інструмент FTMap структуру білка (або ДНК/РНК) – через PDB ID або завантажуючи власний PDB-файл.
2. FTMap перед мапуванням видаляє усі наявні ліганди та розчинники та модельно «розбризкує» по поверхні білка велику кількість маленьких

органічних молекул-проб. Таким чином відбувається глобальне сканування – програма розглядає мільярди можливих положень і орієнтацій (poses) цих проб по всій поверхні білка.

3. Кожне положення пробної молекули оцінюється за енергетичною функцією, яка враховує взаємодії з білком. Також враховується солвація (ефект водного середовища) – тобто FTМар моделює, наскільки вигідно буде знаходитися молекулі-фрагменту біля білка з огляду на воду/розчинник.
4. Кластеризація і визначення «консенсусних сайтів» – найпотужніший сайт, який вважається головним кандидатом на реальне зв'язування ліганда, тобто коли багато різних типів проб (різні за формою, хімічними властивостями) наповнюють одне місце – це означає, що ця ділянка білка має властивості, що приваблюють різні молекули.

Переваги методу:

- FTМар оцінює “druggability” сайту, тобто допомагає зрозуміти, чи “дружній” до невеликих лігандів є даний білок;
- Дає змогу виявити потенційні ліганд-зв'язуючі сайти, навіть якщо білок – без ліганду;
- Служить основою для фрагментно-орієнтованого дизайну лігандів можна підбирати молекули, що будуть зв'язуватися в певному сайті;
- Також корисний для аналізу білків, які мають кілька конформацій – наприклад при гнучкості ланцюгів або для різних станів білка, дає змогу розширити простір пошуку з урахуванням гнучкості структури.

Результати досліджень для комплексу SMC3+RAD21 представлено на рис. 3. Виявлено покот на поверхні взаємодії між SMC3 та RAD21 (рис. 3А), що відкриває перспективи використання стратегії «молекулярного клею» для їх зкріплення. Також

з протилежної сторони структури виявлено покет, який непряму не взаємодіє з RAD21 (рис. 3Б), але може за алостеричним механізмом стабілізувати комплекс. Це потребує додаткового дослідження, але може бути використано як одна зі стратегій.

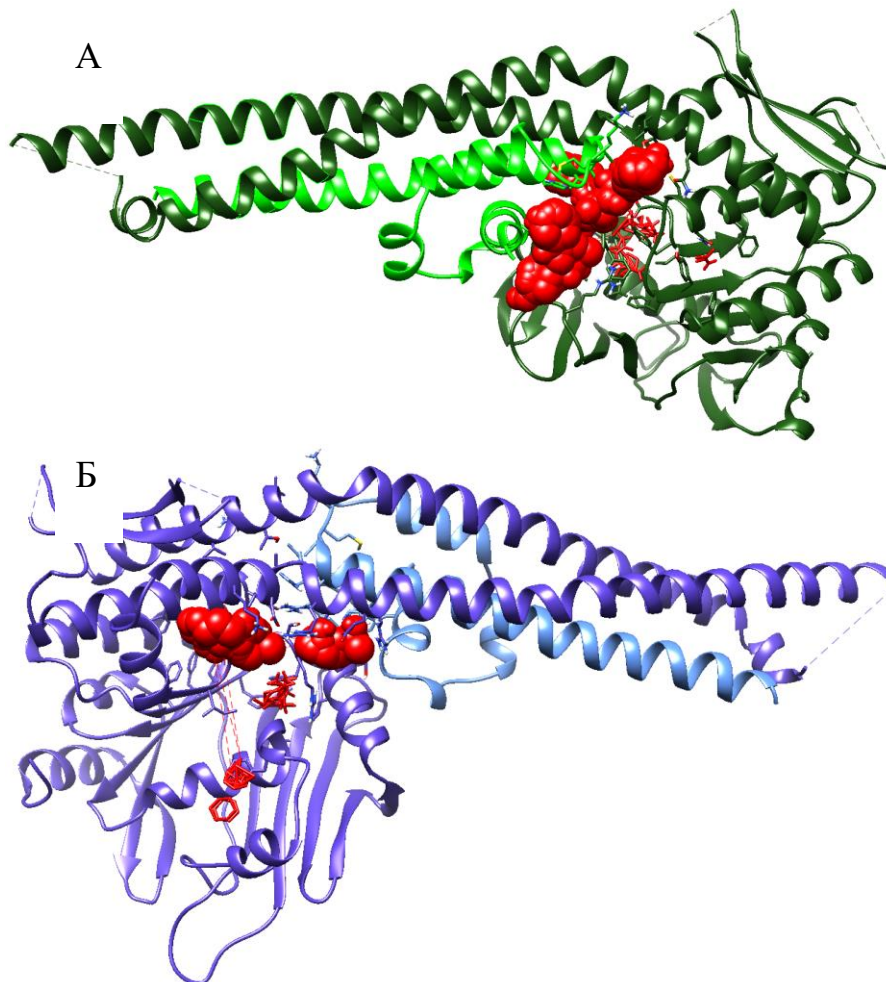


Рис. 3. Покети, виявлені за допомогою FTМар в структурі комплексу SMC3+RAD21 8ROI (А) та 8ROH (Б). На кожному з рисунків розчинники в найбільш перспективних покетах представлено у вигляді куль, а структуру RAD21 виділено світлим кольором.

Алостеричний покет – це сайт, який не співпадає з активним і здатний модифікувати функцію білка через конформаційні зміни.

Вимоги до покету в якості активного зв'язувача структур:

1. Геометричні та структурні

Для того, щоб зв'язування могло викликати перестановку бічних ланцюгів або зміщення доменів, необхідна помірна гнучкість структури. Щоб забезпечити стабільне зв'язування фрагмента необхідна остатня глибина або об'єм.

Наявність «якірних» точок взаємодії (ароматичні залишки, карбоксилати, заряди, полярні донори/акцептори).

2. Енергетичні вимоги

Оптимальний баланс гідрофобного й полярного середовища – більшість алостеричних сайтів мають гідрофобне ядро з кількома ключовими полярними точками. Висока експозиція до розчинника заважає алостеричному контролю.

3. Функціональні вимоги

Кооперативний зв'язок між алостеричним і активним сайтом. Покет повинен бути розташований так, щоб зміни в ньому передавалися до активного центру через: доменні рухи, зсуви спіралей/ β -ланцюгів, перебудову контактів між доменами, зміни динаміки білка.

Стабільна конформаційна мережа – присутність амінокислот, здатних передавати сигнал (Gly/Ala як шарніри, Tyr/Phe як «вимикачі», Lys/Glu як іонні мости).

4. Практичні критерії druggability

Присутність консенсусних hot-spots (визначається інструментами FTMap); досяжність молекулою – розташування не надто глибоко всередині або не заблоковане доменами; можливість індукувати функціонально значиму зміну, а не просто зв'язуватися.

Міждоменний покет формується між двома або більше доменами білка і часто є одним з найцінніших для інгібування.

Вимоги до покету в якості активного зв'язувача доменів:

1. Структурні вимоги

Покет повинен знаходитися на межі двох доменів, де невеликі молекули можуть стабілізувати або дестабілізувати їх взаємне положення. Такі сайти часто

утворюються/зникають залежно від конформаційного стану. Сусідні домени повинні мати просторовий рух, який можна заблокувати чи змінити лігандом.

2. Енергетичні та фізико-хімічні вимоги

Типова архітектура доменної межі це поєднання гідрофобного ядра та полярних країв. Якщо розчинник легко витісняється з pocket interface, сайт, як правило, “druggable”.

3. Функціональні вимоги

Покет має бути здатним впливати на взаємну орієнтацію доменів що змінює: активність ферменту, афінність до ДНК/РНК, димеризацію, взаємодію з ко-факторами.

4. Практичні критерії druggability

- виражені консенсусні hot-spots,
- висока зв'язувальна енергія (часто потужніша, ніж у алостеричних сайтів),
- стабільний об'єм, який існує навіть без ліганду (не індукований сайт),
- роль у регуляції доменної взаємодії, що робить їх особливо привабливими для інгібіторів.

На наступному етапі конвертували робочу структуру білка 8ROI в формат .pdbqt для роботи в Autodock Vina. Перед конвертацією було проведено очищення початкової білкової структури: видалення води, гетероатомів, лігандів та інших небілкових компонентів, що можуть впливати на результати докінгу. Конвертацію проводили за допомогою пакета Meeko (<https://github.com/forlilab/Meeko>), який забезпечує сучасний, валідований механізм підготовки рецепторів для AutoDock Vina. Meeko автоматично додає відсутні гідрогени, коректно призначає часткові заряди та атомні типи AutoDock4. Крім того, застосування Meeko зменшує ймовірність технічних помилок під час формування вхідних файлів та забезпечує узгодженість із вимогами програмного комплексу докінгу. Підготовка лігандів також проводилася за допомогою Meeko, що дозволило автоматично врахувати їхню

протонацію, визначити ротаційні зв'язки та сформувати коректні 3D-конформації, необхідні для докінгу.

Для проведення молекулярного докінгу було використано програмний комплекс AutoDock Vina, який забезпечує високошвидкісний пошук енергетично сприятливих конформацій ліганду в активному центрі рецептора. Методологія докінгу ґрунтується на емпіричній енергетичній функції та генетичних алгоритмах оптимізації, що дозволяє ефективно моделювати взаємодії між малими молекулами та білковими структурами. Використання Vina є доцільним завдяки її відкритості, відтворюваності та широкому застосуванню в структурній біоінформатиці. Для покращення якості структурних даних застосовували інструмент Molscrub (<https://github.com/forlilab/molscrub>), який автоматизує виправлення потенційних структурних артефактів, нормалізує атомні типи та забезпечує коректність хімічних зв'язків. Це дозволило отримати стандартизовану структуру рецептора, придатну для подальшої обробки.

Попередньо усі молекули були стандартизовані методом очистки через Molscrub, що гарантувало хімічну коректність їхніх структур, усунення дубльованих атомів, некоректних валентностей та інших помилок, які можуть вплинути на результат. Після завершення підготовки рецептора та лігандів формувалася конфігураційний файл AutoDock Vina із зазначенням координат пошукової сітки (grid box), параметрів вичерпності (exhaustiveness) та кількості генерованих поз. На основі отриманих моделей визначалися передбачувані енергетично стабільні комплекси, аналізувалися значення енергії зв'язування та просторові особливості взаємодій, що давало змогу оцінити потенційну спорідненість лігандів до досліджуваного рецептора. Загальна схема підготовки лігандів та білка і проведення докінгу показано на рис. 4.

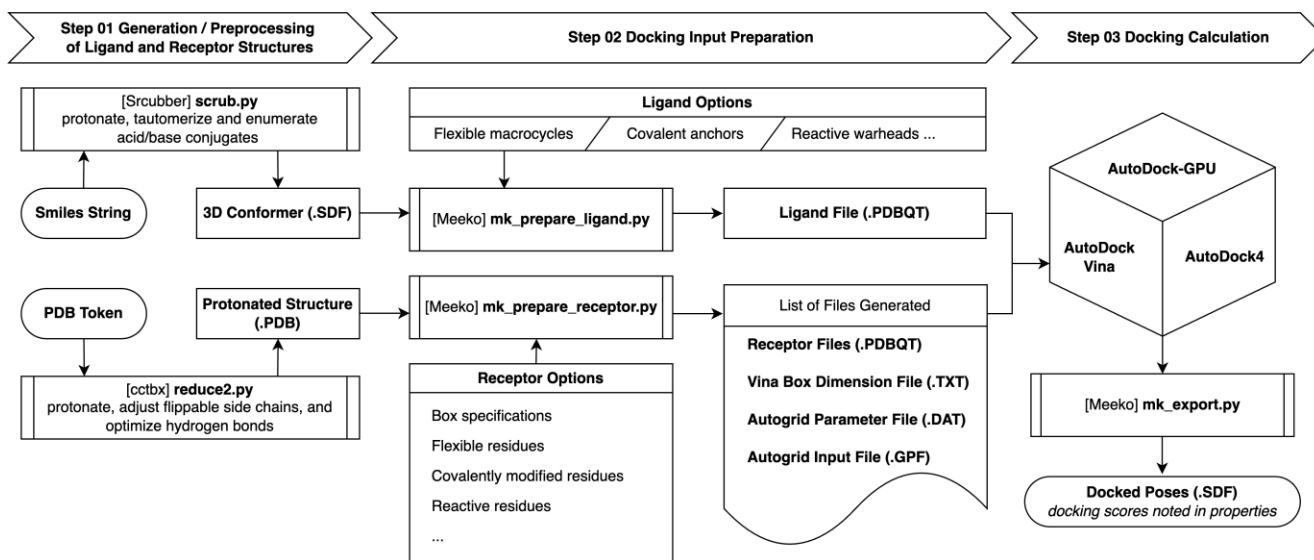


Рис. 4. Загальна схема підготовки лігандів та білка і проведення докінгу за допомогою Autodock Vina.

В стандартній процедурі розробки лікарських засобів проводиться віртуальний скринінг надзвичайно великих хімічних бібліотек, що налічують сотні мільйонів або навіть мільярди структур. Однак виконання подібного повномасштабного скринінгу потребує значних обчислювальних ресурсів, що виходять за межі наших технічних можливостей. Тому в нашому дослідженні стратегія ґрунтувалася на принципі поступової оптимізації: скринінг невеликої бібліотеки (1600 сполук з переліку FDA) та подальша оптимізація отриманих сполук.

Оскільки в переліку FDA наявні зареєстровані ліки, ці сполуки вже заздалегідь не мають проблеми розчинності, біологічної доступності, токсичності та інших, а також цей перелік містить різноманіття типів хімічних сполук, тому скринінг цієї бібліотеки прийнято як оптимальний на початковому етапі.

На рис. 5 показано положення сполук в структурі білка, які були обрані як найбільш перспективні як молекулярний клей в сайті взаємодії SMC3 та RAD21. На рис. 5А, 5Б, 5В показано порівняно великі молекули, кожна з яких має водневі зв'язки з обома субодиницями, що посилює їх взаємодію.

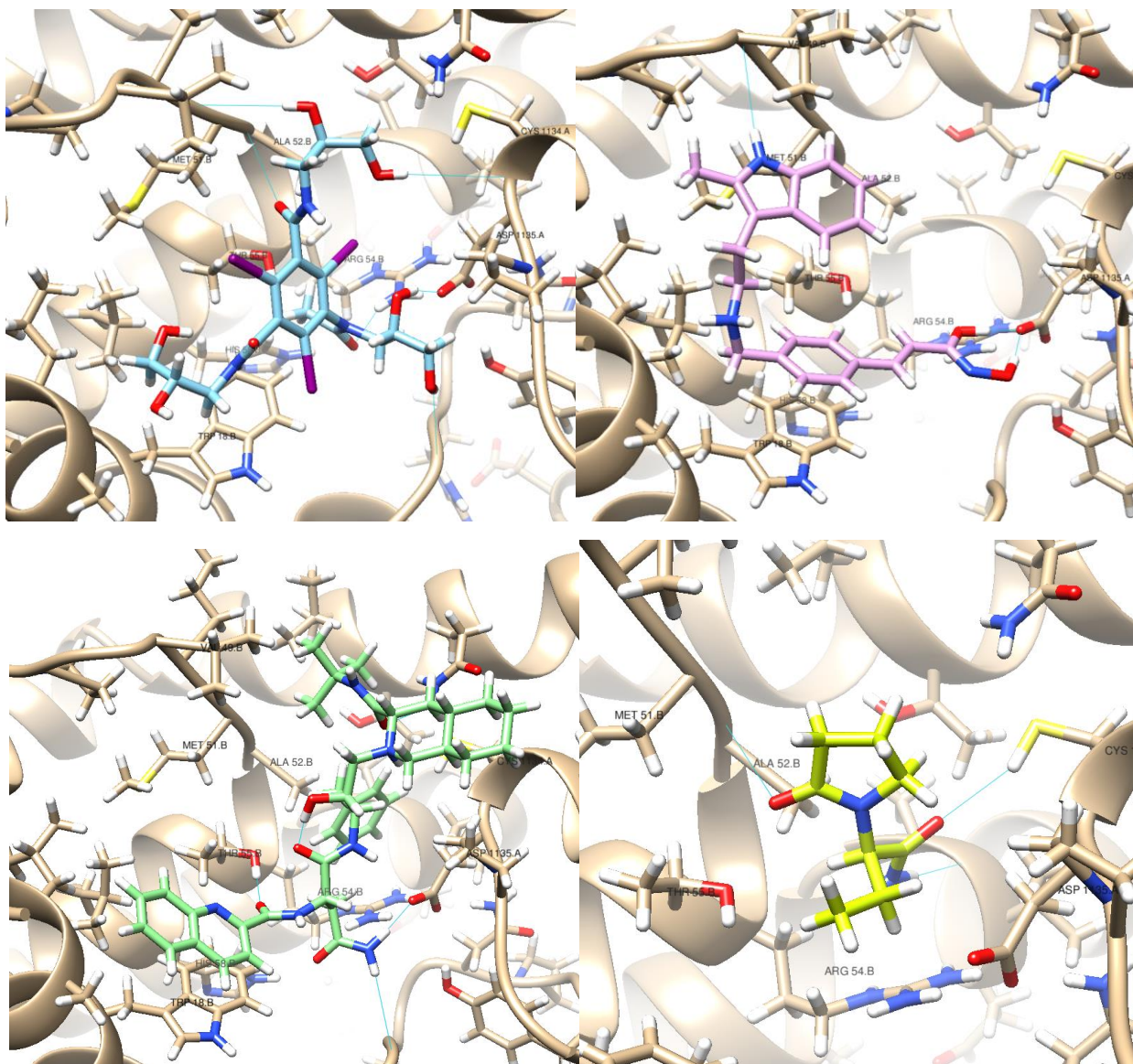


Рис. 5. Приклади молекул, відібраних для міжмолекулярного покету. А) ZINC3830945, docking score -8.604 ккал/моль, Б) ZINC22010649, docking score -7.242 ккал/моль, В) ZINC26664090, docking score -8.609 ккал/моль, Г) ZINC3830990, docking score -6.303 ккал/моль. Водневі зв'язки показано блакитними лініями.

Молекули ZINC22010649 (рис. 5Б) та ZINC26664090 (рис. 5В) додатково до водневих зв'язків мають ароматичні цикли поблизу TRP18 RAD21 і ймовірно утворюють з ним π - π зв'язок.

Окремо обрано сполуку ZINC3830990 (рис. 5Г), яка має менший docking score, що частково пояснюється меншим розміром молекули і як наслідок меншою кількістю зв'язків з білком. Але при цьому ефективна кількість зв'язків на один атом зберігається, є водневий зв'язок із ___ RAD21 і ___ SMC3, тому сполука може бути перспективною. Додатково прості молекули краще підлягають пошуку аналогів, тому ця молекула була обрана для етапу подальшої оптимізації.

На рис. 6 показано положення обраних сполук в структурі білка в алостеричному покеті білка SMC3. Всі три сполуки розташовуються в глибокому покеті (рис. 7Б) та потенційно фіксують структуру білка. Сполуку ZINC6745272 обрано для подальшої оптимізації.

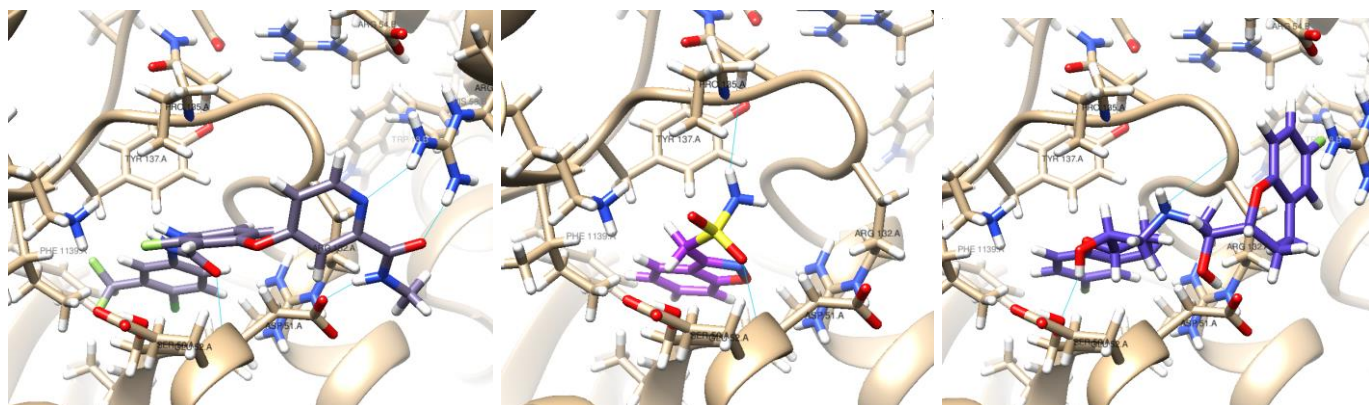


Рис. 6. Приклади молекул, відібраних для алостеричного покету. А) ZINC6745272, docking score -7.880 ккал/моль, Б) ZINC4321, docking score -7.825 ккал/моль, В) ZINC5844788, docking score -8.280 ккал/моль. Водневі зв'язки показано блакитними лініями.

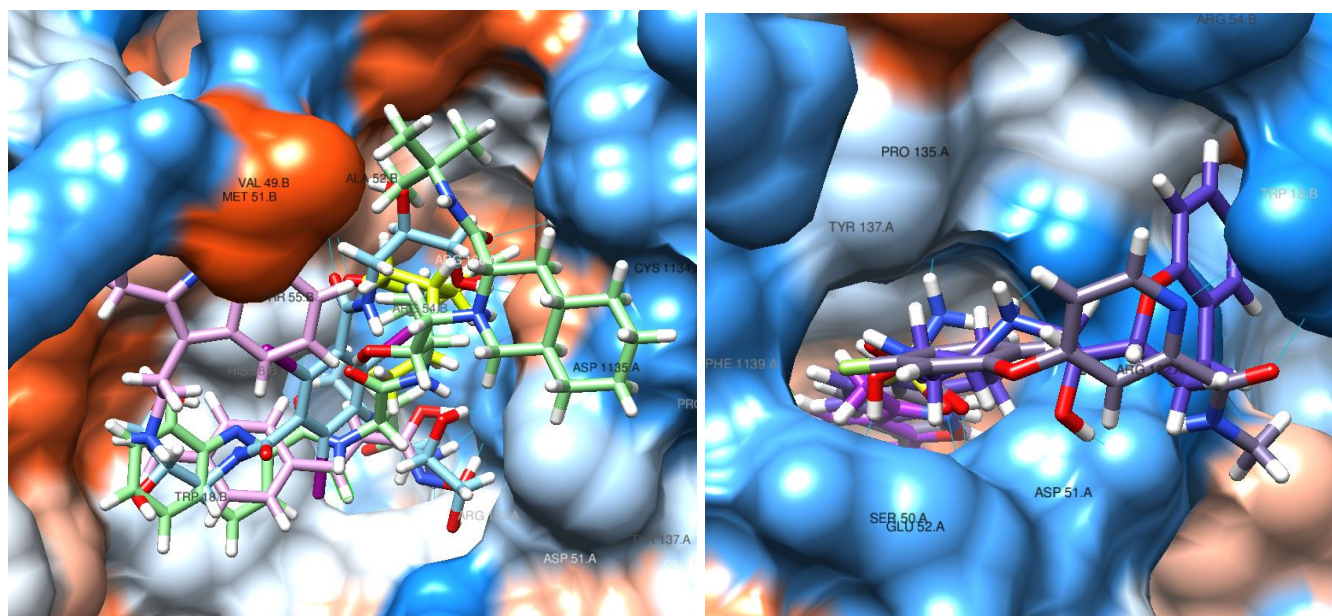


Рис. 7. Накладені структури обраних лігандів у взаємодії з поверхнею білка в міждоменному (А) та алостеричному (Б) покеті. Помаранчевий – гідрофобні ділянки, синій – полярні ділянки).

На першому етапі ми обмежили початковий пошук набором із 1600 клінічно використовуваних молекул, усвідомлюючи, що ймовірність виявлення «ідеального» кандидата в межах цієї вибірки є низькою. Тому наша мета полягала у визначенні найбільш наближених за властивостями молекул, які зможуть слугувати відправною точкою для подальшого розширення хімічного простору. Іншими словами, ми обрали дві найперспективніші сполуки з цієї вибірки (по одній з кожного покету, ZINC3830990 та ZINC6745272), після чого спрямували зусилля на пошук їхніх структурних аналогів серед набагато ширших хімічних бібліотек, очікуючи, що деякі з цих аналогів перевершать вихідні молекули за потенційною активністю.

У межах проведеного дослідження було відібрано по одній найбільш перспективній сполуці для кожного з досліджуваних білкових покетів структури 8ROI із попередньо опрацьованої вибірки з 1600 FDA-схвалених сполук. Було обрано дві стратегії.

Пошук аналогів є обчислювально значно менш затратною процедурою порівняно з повним скринінгом мільярдів структур, що робить такий підхід оптимальним на початкових етапах. Одним із двох обраних напрямів стала ідентифікація вже існуючих аналогів у базі ZINC20 за критерієм Tanimoto similarity $> 0,4$, який застосовується для порівняння молекул за їхніми хімічними відбитками (fingerprints). Значення коефіцієнта понад 0,4 свідчить про помірний рівень структурної подібності, наявність спільних фрагментів і можливу належність молекул до одного хімічного класу. Таким чином, даний етап дозволяє сформувати первинне коло структурно наближених сполук, що можуть бути потенційними покращеними аналогами вихідних lead-кандидатів. Пошук аналогів через розрахунок Tanimoto similarity було реалізовано за допомогою python бібліотеки RDKit.

Друга стратегія була зосереджена на генерації структурних аналогів із використанням методів штучного інтелекту. На відміну від пошуку серед уже існуючих бібліотек, цей підхід дозволяє отримати молекули, які потенційно можуть перевершувати вихідні сполуки за своїми фармакологічними властивостями. Проте застосування генеративних моделей супроводжується низкою обмежень. Зокрема, отримані структури можуть бути хімічно нестабільними або практично непридатними до синтезу, що потребує глибокої експертної оцінки з боку фахівців з органічного синтезу. Крім того, використання таких алгоритмів часто пов'язане зі значною вартістю обчислень та необхідністю синтезу нових сполук.

Подальші етапи роботи в межах цієї стратегії відповідали логіці, застосованій у першому напрямі, а саме: підготовка структурних файлів, фільтрація згенерованих аналогів та їх докінг до вибраних білкових покетів. Однак ключова відмінність полягала в масштабі хімічного простору. Завдяки генеративним алгоритмам ми змогли здійснити віртуальний скринінг серед структур, які було відібрано з потенційно мільярдів можливих варіантів, але попередньо звужених до найбільш релевантних аналогів топових сполук, визначених на першому етапі відбору.

Основною метою цього етапу було ідентифікувати серед згенерованих аналогів такі молекули, які за критеріями зв'язування – зокрема docking score та візуальна оцінка положення у покеті – демонструватимуть кращі показники, ніж референтні сполуки. Таким чином, цей підхід дозволив ефективно розширити хімічний простір пошуку та підвищити ймовірність виявлення перспективних кандидатів для подальшого експериментального підтвердження.

Для міждоменного покету на рис. 8А, 8Б показано приклади сполук, знайдених за стратегією пошуку існуючих аналогів. Вони дійсно є близькими аналогами і їх docking score є принаймні не гіршим за референтну сполуку. На рис. 8В показано приклад сполуки, отриманої за стратегією генерування аналогів за допомогою molmim, яка показала найгірші результати на цьому покеті.

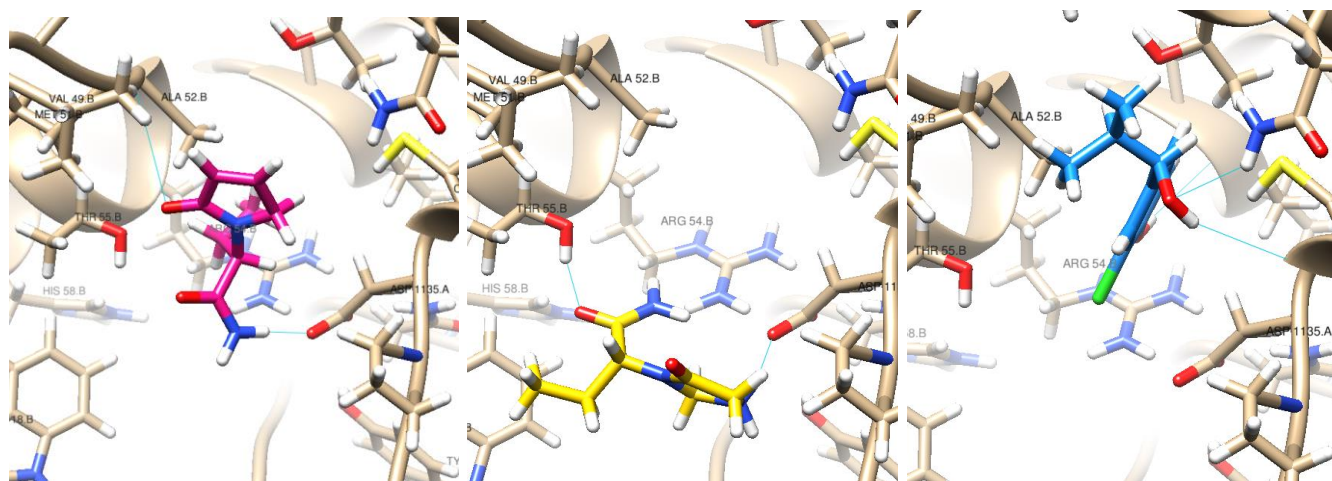


Рис. 8. Приклади молекул, відібраних для міждоменного покету серед аналогів. А) ZINC118660604, docking score -6.361 ккал/моль, Б) ZINC238292707, docking score -5.972 ккал/моль, В) molmim14, docking score -5.781 ккал/моль. Водневі зв'язки показано блакитними лініями.

Аналогічно для алостеричного покету, результати показано на рис. 9. Сполука ZINC113822849 (рис. 9Б) показала покращення docking score порівняно з

референтною ZINC6745272 за рахунок мінімальної зміни структури: відсутність метилової групи на виході з покету біля взаємодії з ARG54.

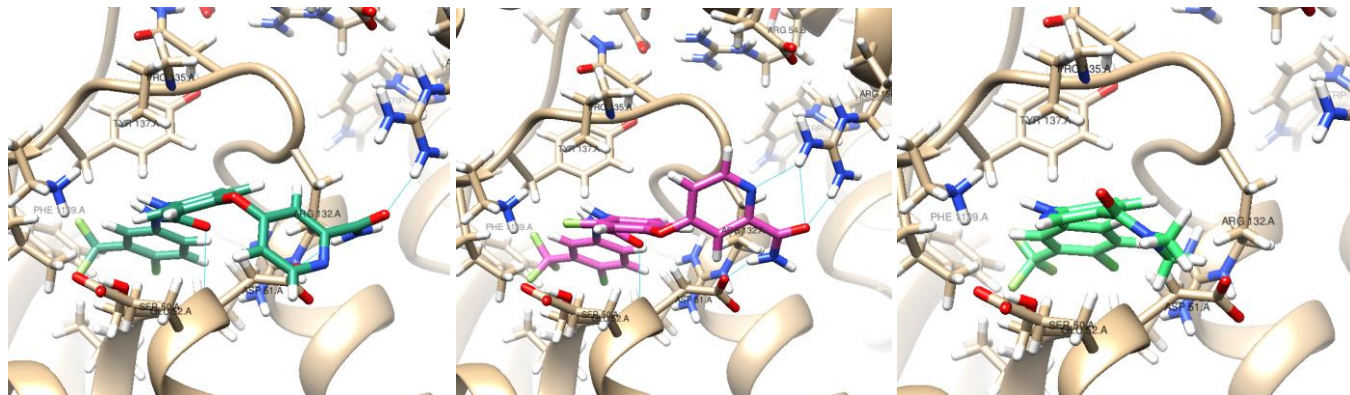


Рис. 9. Приклади молекул, відібраних для алостеричного покету серед аналогів. А) ZINC29127186, docking score -7.810 ккал/моль, Б) ZINC113822849, docking score -7.903 ккал/моль, В) molmim6, docking score -7.254 ккал/моль. Водневі зв'язки показано блакитними лініями.

Таким чином показано перспективність методу поступової оптимізації молекул, і отримані сполуки можуть бути використані для подальшої розробки стабілізаторів когезину.

ВИСНОВКИ

Оцінка фізико-хімічних та фармакокінетичних властивостей змодельованих сполук

Після генерації та первинного докінгу відібрані структурні аналоги піддаються комплексній *in silico* перевірці їхніх фізико-хімічних характеристик і потенційної фармакологічної придатності. Насамперед оцінюють параметри, що визначають хімічну стабільність та придатність молекул як кандидатів у лікарські засоби: молекулярну масу, значення LogP, кількість донорів і акцепторів водневих зв'язків, площу полярної поверхні (TPSA), ступінь ароматичності та наявність реакційноздатних груп. Ці властивості аналізують відповідно до критеріїв Ліпінського, Вебера та інших загальноприйнятих правил для малих біоактивних молекул.

Водорозчинність є важливою для забезпечення абсорбції та транспорту в біологічних системах, оцінюють за допомогою предиктивних алгоритмів, що враховують полярність, стеричну взаємодію та топологічні індикатори. Молекули з низькою прогнозованою розчинністю виключаються з подальшого аналізу.

Також проводиться *in silico* **оцінка токсичності**, включно з прогнозом мутагенності, карциногенності, впливу на ферменти цитохрому P450 та можливих небажаних фармакологічних ефектів. Ці розрахунки «відкидають» сполуки з високим ризиком системних токсичних проявів.

Для попереднього аналізу **бiodоступності** використовують моделі ADMET, які прогнозують пероральну абсорбцію, проникність через мембрани, стабільність у плазмі та можливість перетину гематоенцефалічного бар'єра. Такі параметри дають змогу відібрати лише ті молекули, що демонструють збалансовані фармакокінетичні профілі.

Валідація змодельованих сполук. Після відбору молекул із прийнятним профілем властивостей проведеться багаторівнева валідація для підтвердження їх потенційної активності.

1. Молекулярна динаміка

Метод молекулярної динаміки застосовують для оцінки стабільності комплексу «ліганд–рецептор» у часовому масштабі. Протягом симуляції досліджують зміни конформацій білка та ліганду, енергетичні флуктуації, стійкість ключових водневих зв'язків та π -взаємодій, а також показники RMSD та RMSF. Комплекси, що зберігають стабільність протягом моделювання, розглядаються як перспективні.

2. Підтвердження за допомогою штучного інтелекту

Алгоритми машинного навчання використовують для оцінки передбачуваної активності сполук, їх подібності до відомих біологічно активних структур та виявлення прихованих закономірностей у структурно-активних співвідношеннях (QSAR). Це дозволяє додатково відфільтрувати молекули з низькою ймовірністю терапевтичної ефективності.

3. Boltzmann-based валідація (Boltz2)

Метод Boltz2 застосовують для аналізу розподілу конформаційних станів та оцінки енергетично найвигідніших поз. Такий підхід дозволяє порівняти різні комплекси з точки зору їх конформаційної різноманітності та переважної геометрії зв'язування.

Подальший етап: біологічна перевірка

Після проходження комп'ютерної валідації відібрані молекули рекомендовано до подальшого експериментального тестування. Біологічні дослідження включають *in vitro* перевірку на відповідних клітинних лініях або ферментативних системах, оцінку зв'язування з цільовим білком, визначення IC_{50}/EC_{50} , а також перевірку токсикологічних профілів у лабораторних умовах. Лише поєднання *in silico*, *in vitro* та *in vivo* результатів дозволяє підтвердити реальну активність кандидата та його потенціал як лікарської молекули.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Zielinska, A. P., Holubcova, Z., Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2015). Sister kinetochore splitting and precocious disintegration of bivalents could explain the maternal age effect. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/elife.11389>
2. Sakakibara, Y., Hashimoto, S., Nakaoka, Y., Kouznetsova, A., Höög, C., & Kitajima, T. S. (2015). Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nature Communications*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms8550>
3. Yun, Y., Lane, S. I. R., & Jones, K. T. (2014). Premature dyad separation in meiosis II is the major segregation error with maternal age in mouse oocytes. *Development*, 141(1), 199–208. <https://doi.org/10.1242/dev.100206>
4. Lister, L. M., Kouznetsova, A., Hyslop, L. A., Kalleas, D., Pace, S. L., Barel, J. C., Nathan, A., Floros, V., Adelfalk, C., Watanabe, Y., Jessberger, R., Kirkwood, T. B., Höög, C., & Herbert, M. (2010). Age-Related Meiotic Segregation Errors in Mammalian Oocytes Are Preceded by Depletion of Cohesin and Sgo2. *Current Biology*, 20(17), 1511–1521. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.023>
5. Hodges, C. A., Revenkova, E., Jessberger, R., Hassold, T. J., & Hunt, P. A. (2005). SMC1 β -deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nature Genetics*, 37(12), 1351–1355. <https://doi.org/10.1038/ng1672>
6. Chiang, T., Duncan, F. E., Schindler, K., Schultz, R. M., & Lampson, M. A. (2010). Evidence that Weakened Centromere Cohesion Is a Leading Cause of Age-Related Aneuploidy in Oocytes. *Current Biology*, 20(17), 1522–1528. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.069>
7. Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., van der Weyden, L., Champion, L., Kudo, N. R., Adams, D. J., & Nasmyth, K. (2010). Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes & Development*, 24(22), 2505–2516. <https://doi.org/10.1101/gad.605910>
8. Garcia-Cruz, R., Brieno, M. A., Roig, I., Grossmann, M., Velilla, E., Pujol, A., Cabero, L., Pessarrodona, A., Barbero, J. L., & Garcia Caldes, M. (2010). Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Human Reproduction*, 25(9), 2316–2327. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq180>
9. Tsutsumi, M., Fujiwara, R., Nishizawa, H., Ito, M., Kogo, H., Inagaki, H., Ohye, T., Kato, T., Fujii, T., & Kurahashi, H. (2014). Age-Related Decrease of Meiotic Cohesins in Human Oocytes. *PLoS ONE*, 9(5), e96710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096710>

10. Liu, L., & Keefe, D. L. (2008). Defective cohesin is associated with age-dependent misaligned chromosomes in oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60562-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60562-7)
11. Webster, A., & Schuh, M. (2017). Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends in Cell Biology*, 27(1), 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.002>
12. Gruhn, J. R., Zielinska, A. P., Shukla, V., Blanshard, R., Capalbo, A., Cimadomo, D., Nikiforov, D., Chan, A. C.-H., Newnham, L. J., Vogel, I., Scarica, C., Krapchev, M., Taylor, D., Kristensen, S. G., Cheng, J., Ernst, E., Bjørn, A.-M. B., Colmorn, L. B., Blayney, M., ... Hoffmann, E. R. (2019). Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. *Science*, 365(6460), 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.aav7321>
13. Stolk, L., Perry, J. R. B., Chasman, D. I., He, C., Mangino, M., Sulem, P., Barbalic, M., Broer, L., Byrne, E. M., Ernst, F., Esko, T., Franceschini, N., Gudbjartsson, D. F., Hottenga, J.-J., Kraft, P., McArdle, P. F., Porcu, E., Shin, S.-Y., Smith, A. V., ... Lunetta, K. L. (2012). Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nature Genetics*, 44(3), 260–268. <https://doi.org/10.1038/ng.1051>
14. Sharma, N., Coticchio, G., Borini, A., Tachibana, K., Nasmyth, K. A., & Schuh, M. (2024). Changes in DNA repair compartments and cohesin loss promote DNA damage accumulation in aged oocytes. *Current Biology*, 34(22), 5131-5148.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.09.040>
15. Piazza, A., Bordelet, H., Dumont, A., Thierry, A., Savocco, J., Girard, F., & Koszul, R. (2021). Cohesin regulates homology search during recombinational DNA repair. *Nature Cell Biology*, 23(11), 1176–1186. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00783-x>
16. Heidinger-Pauli, J. M., Ünal, E., Guacci, V., & Koshland, D. (2008). The Kleisin Subunit of Cohesin Dictates Damage-Induced Cohesion. *Molecular Cell*, 31(1), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.005>
17. Zielinska, A. P., Bellou, E., Sharma, N., Frombach, A.-S., Seres, K. B., Gruhn, J. R., Blayney, M., Eckel, H., Moltrecht, R., Elder, K., Hoffmann, E. R., & Schuh, M. (2019). Meiotic Kinetochores Fragment into Multiple Lobes upon Cohesin Loss in Aging Eggs. *Current Biology*, 29(22), 3749-3765.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.006>
18. Zhang, H., Shi, Z., Banigan, E. J., Kim, Y., Yu, H., Bai, X., & Finkelstein, I. J. (2023). CTCF and R-loops are boundaries of cohesin-mediated DNA looping. *Molecular Cell*, 83(16), 2856-2871.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.07.006>

19. Gandhi, R., Gillespie, P. J., & Hirano, T. (2006). Human Wapl Is a Cohesin-Binding Protein that Promotes Sister-Chromatid Resolution in Mitotic Prophase. *Current Biology*, 16(24), 2406–2417. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.061>
20. Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2009). Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 525–558. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134233>
21. Remeseiro, S., Cuadrado, A., Gómez-López, G., Pisano, D. G., & Losada, A. (2012). A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development. *The EMBO Journal*, 31(9), 2090–2102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.60>
22. Gligoris, T., & Löwe, J. (2016). Structural Insights into Ring Formation of Cohesin and Related Smc Complexes. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 680–693. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.002>
23. Wells, J. A., & McClendon, C. L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein–protein interfaces. *Nature*, 450(7172), 1001–1009. <https://doi.org/10.1038/nature06526>
24. Yin, H., & Hamilton, A. D. (2005). Strategien zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit synthetischen Substanzen. *Angewandte Chemie*, 117(27), 4200–4235. <https://doi.org/10.1002/ange.200461786>
25. Thiel, P., Kaiser, M., & Ottmann, C. (2012). Small-Molecule Stabilization of Protein–Protein Interactions: An Underestimated Concept in Drug Discovery? *Angewandte Chemie International Edition*, 51(9), 2012–2018. <https://doi.org/10.1002/anie.201107616>
26. Block, P., Weskamp, N., Wolf, A., & Klebe, G. (2007). Strategies to search and design stabilizers of protein–protein interactions: A feasibility study. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(1), 170–186. <https://doi.org/10.1002/prot.21296>
27. Morelli, X., Bourgeas, R., & Roche, P. (2011). Chemical and structural lessons from recent successes in protein–protein interaction inhibition (2P2I). *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(4), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.024>
28. Giordanetto, F., Schäfer, A., & Ottmann, C. (2014). Stabilization of protein–protein interactions by small molecules. *Drug Discovery Today*, 19(11), 1812–1821. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.08.005>
29. Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1), 88–118. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80285-6)
30. Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2000). Structural Symmetry and Protein Function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29(1), 105–153. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.105>

- 31.Nooren, I. M. A. (2003). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal*, 22(14), 3486–3492. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg359>
- 32.Higueruelo, A. P., Jubb, H., & Blundell, T. L. (2013). TIMBAL v2: update of a database holding small molecules modulating protein–protein interactions. *Database*, 2013. <https://doi.org/10.1093/database/bat039>
- 33.Changeux, J.-P., & Christopoulos, A. (2016). Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell*, 166(5), 1084–1102. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.015>
- 34.Nussinov, R., & Tsai, C.-J. (2013). Allostery in Disease and in Drug Discovery. *Cell*, 153(2), 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.034>
- 35.Siekierka, J. J., Hung, S. H. Y., Poe, M., Lin, C. S., & Sigal, N. H. (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341(6244), 755–757. <https://doi.org/10.1038/341755a0>
- 36.Bier, D., Thiel, P., Briels, J., & Ottmann, C. (2015). Stabilization of Protein–Protein Interactions in chemical biology and drug discovery. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 119(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.05.002>
- 37.Zarzycka, B., Kuenemann, M. A., Miteva, M. A., Nicolaes, G. A. F., Vriend, G., & Sperandio, O. (2016). Stabilization of protein–protein interaction complexes through small molecules. *Drug Discovery Today*, 21(1), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.011>
- 38.Giordanetto, F., Schäfer, A., & Ottmann, C. (2014). Stabilization of protein–protein interactions by small molecules. *Drug Discovery Today*, 19(11), 1812–1821. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.08.005>
- 39.Milroy, L.-G., Grossmann, T. N., Hennig, S., Brunsveld, L., & Ottmann, C. (2014). Modulators of Protein–Protein Interactions. *Chemical Reviews*, 114(9), 4695–4748. <https://doi.org/10.1021/cr400698c>
- 40.Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- 41.Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews*, 94(1), 235–263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- 42.Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>

43. Rao, J., & Li, N. (2004). Microfilament Actin Remodeling as a Potential Target for Cancer Drug Development. *Current Cancer Drug Targets*, 4(4), 345–354. <https://doi.org/10.2174/1568009043332998>
44. Bonello, T., Coombes, J., Schevzov, G., Gunning, P., & Stehn, J. (2012). Therapeutic Targeting of the Actin Cytoskeleton in Cancer. In *Cytoskeleton and Human Disease* (pp. 181–200). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-788-0_10
45. Stehn, J. R., Haass, N. K., Bonello, T., Desouza, M., Kottyan, G., Treutlein, H., Zeng, J., Nascimento, P. R. B. B., Sequeira, V. B., Butler, T. L., Allanson, M., Fath, T., Hill, T. A., McCluskey, A., Schevzov, G., Palmer, S. J., Hardeman, E. C., Winlaw, D., Reeve, V. E., ... Gunning, P. W. (2013). A Novel Class of Anticancer Compounds Targets the Actin Cytoskeleton in Tumor Cells. *Cancer Research*, 73(16), 5169–5182. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-4501>
46. Allingham, J. S., Miles, C. O., & Rayment, I. (2007). A Structural Basis for Regulation of Actin Polymerization by Pectenotoxins. *Journal of Molecular Biology*, 371(4), 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.056>
47. Bubb, M. R., Spector, I., Bershadsky, A. D., & Korn, E. D. (1995). Swinholide A Is a Microfilament Disrupting Marine Toxin That Stabilizes Actin Dimers and Severs Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3463–3466. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3463>
48. Klenchin, V. A., King, R., Tanaka, J., Marriott, G., & Rayment, I. (2005). Structural Basis of Swinholide A Binding to Actin. *Chemistry & Biology*, 12(3), 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.02.011>
49. Tanaka, J., Yan, Y., Choi, J., Bai, J., Klenchin, V. A., Rayment, I., & Marriott, G. (2003). Biomolecular mimicry in the actin cytoskeleton: Mechanisms underlying the cytotoxicity of kabiramide C and related macrolides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13851–13856. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233339100>
50. Hagelueken, G., Albrecht, S. C., Steinmetz, H., Jansen, R., Heinz, D. W., Kalesse, M., & Schubert, W. (2008). The Absolute Configuration of Rhizopodin and Its Inhibition of Actin Polymerization by Dimerization. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(3), 595–598. <https://doi.org/10.1002/anie.200802915>
51. Graves, B., Thompson, T., Xia, M., Janson, C., Lukacs, C., Deo, D., Di Lello, P., Fry, D., Garvie, C., Huang, K.-S., Gao, L., Tovar, C., Lovey, A., Wanner, J., & Vassilev, L. T. (2012). Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11788–11793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203789109>

52. Chazotte, B. (2010). Labeling Cytoskeletal F-Actin with Rhodamine Phalloidin or Fluorescein Phalloidin for Imaging: Figure 1. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(5), pdb.prot4947. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4947>
53. Milroy, L.-G., Rizzo, S., Calderon, A., Ellinger, B., Erdmann, S., Mondry, J., Verveer, P., Bastiaens, P., Waldmann, H., Dehmelt, L., & Arndt, H.-D. (2012). Selective Chemical Imaging of Static Actin in Live Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 134(20), 8480–8486. <https://doi.org/10.1021/ja211708z>
54. Oda, T., Namba, K., & Maéda, Y. (2005). Position and Orientation of Phalloidin in F-Actin Determined by X-Ray Fiber Diffraction Analysis. *Biophysical Journal*, 88(4), 2727–2736. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047753>
55. Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., & Fosen, K. M. (2000). Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5163–5170. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5163>
56. Waldmann, H., Hu, T., Renner, S., Menninger, S., Tannert, R., Oda, T., & Arndt, H. (2008). Total Synthesis of Chondramide C and Its Binding Mode to F-Actin. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(34), 6473–6477. <https://doi.org/10.1002/anie.200801010>
57. Bai, R., Covell, D. G., Liu, C., Ghosh, A. K., & Hamel, E. (2002). (–)-Doliculide, a New Macrocyclic Depsipeptide Enhancer of Actin Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32165–32171. <https://doi.org/10.1074/jbc.m205076200>
58. Oda, T., Crane, Z. D., Dicus, C. W., Sufi, B. A., & Bates, R. B. (2003). Dolastatin 11 Connects Two Long-pitch Strands in F-actin to Stabilize Microfilaments. *Journal of Molecular Biology*, 328(2), 319–324. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00306-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00306-1)
59. Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., & Hall, M. N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(11), 868–880. <https://doi.org/10.1038/nrd3531>
60. Zarzycka, B., Kuenemann, M. A., Miteva, M. A., Nicolaes, G. A. F., Vriend, G., & Sperandio, O. (2016). Stabilization of protein–protein interaction complexes through small molecules. *Drug Discovery Today*, 21(1), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.011>
61. Schapira, M., Calabrese, M. F., Bullock, A. N., & Crews, C. M. (2019). Targeted protein degradation: expanding the toolbox. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(12), 949–963. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0047-y>
62. Chamberlain, P. P., & Hamann, L. G. (2019). Development of targeted protein degradation therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 15(10), 937–944. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0362-y>

63. Li, H., Dong, J., Cai, M., Xu, Z., Cheng, X.-D., & Qin, J.-J. (2021). Protein degradation technology: a strategic paradigm shift in drug discovery. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01146-7>
64. Chen, Y.-J., Wu, H., & Shen, X.-Z. (2016). The ubiquitin–proteasome system and its potential application in hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Letters*, 379(2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.023>
65. Luh, L. M., Scheib, U., Juenemann, K., Wortmann, L., Brands, M., & Cromm, P. M. (2020). Prey for the Proteasome: Targeted Protein Degradation—A Medicinal Chemist’s Perspective. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(36), 15448–15466. <https://doi.org/10.1002/anie.202004310>
66. Békés, M., Langley, D. R., & Crews, C. M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(3), 181–200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
67. Paiva, S.-L., & Crews, C. M. (2019). Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 50, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.02.022>
68. Belcher, B. P., Ward, C. C., & Nomura, D. K. (2021). Ligandability of E3 Ligases for Targeted Protein Degradation Applications. *Biochemistry*, 62(3), 588–600. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00464>
69. Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. *Cell*, 152(6), 1237–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.014>
70. Scheepstra, M., Hekking, K. F. W., van Hijfte, L., & Folmer, R. H. A. (2019). Bivalent Ligands for Protein Degradation in Drug Discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 160–176. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.01.006>
71. Burslem, G. M., Smith, B. E., Lai, A. C., Jaime-Figueroa, S., McQuaid, D. C., Bondeson, D. P., Toure, M., Dong, H., Qian, Y., Wang, J., Crew, A. P., Hines, J., & Crews, C. M. (2018). The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. *Cell Chemical Biology*, 25(1), 67-77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.09.009>
72. Mullard, A. (2021). Targeted protein degraders crowd into the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(4), 247–250. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00052-4>
73. He, M., Lv, W., & Rao, Y. (2021). Opportunities and Challenges of Small Molecule Induced Targeted Protein Degradation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685106>
74. Sakamoto, K. M., Kim, K. B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C. M., & Deshaies, R. J. (2001). Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–

- Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8554–8559. <https://doi.org/10.1073/pnas.141230798>
75. Schneekloth, J. S., Jr., Fonseca, F. N., Koldobskiy, M., Mandal, A., Deshaies, R., Sakamoto, K., & Crews, C. M. (2004). Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation. *Journal of the American Chemical Society*, 126(12), 3748–3754. <https://doi.org/10.1021/ja039025z>
76. Schneekloth, A. R., Pucheault, M., Tae, H. S., & Crews, C. M. (2008). Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(22), 5904–5908. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.114>
77. Buckley, D. L., Van Molle, I., Gareiss, P. C., Tae, H. S., Michel, J., Noblin, D. J., Jorgensen, W. L., Ciulli, A., & Crews, C. M. (2012). Targeting the von Hippel–Lindau E3 Ubiquitin Ligase Using Small Molecules To Disrupt the VHL/HIF-1 α Interaction. *Journal of the American Chemical Society*, 134(10), 4465–4468. <https://doi.org/10.1021/ja209924v>
78. Bondeson, D. P., Mares, A., Smith, I. E. D., Ko, E., Campos, S., Miah, A. H., Mulholland, K. E., Routly, N., Buckley, D. L., Gustafson, J. L., Zinn, N., Grandi, P., Shimamura, S., Bergamini, G., Faeltsh-Savitski, M., Bantscheff, M., Cox, C., Gordon, D. A., Willard, R. R., ... Crews, C. M. (2015). Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nature Chemical Biology*, 11(8), 611–617. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1858>
79. Zengerle, M., Chan, K.-H., & Ciulli, A. (2015). Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chemical Biology*, 10(8), 1770–1777. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00216>
80. Buckley, D. L., Gustafson, J. L., Van Molle, I., Roth, A. G., Tae, H. S., Gareiss, P. C., Jorgensen, W. L., Ciulli, A., & Crews, C. M. (2012). Small-Molecule Inhibitors of the Interaction between the E3 Ligase VHL and HIF1 α . *Angewandte Chemie International Edition*, 51(46), 11463–11467. <https://doi.org/10.1002/anie.201206231>
81. Geiger, T. M., Schäfer, S. C., Dreizler, J. K., Walz, M., & Hausch, F. (2022). Clues to molecular glues. *Current Research in Chemical Biology*, 2, 100018. <https://doi.org/10.1016/j.crchbi.2021.100018>
82. Schreiber, S. L., & Crabtree, G. R. (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today*, 13(4), 136–142. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90111-j](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90111-j)
83. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2010). Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science*, 327(5971), 1345–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1177319>

84. Cowan, A. D., & Ciulli, A. (2022). Driving E3 Ligase Substrate Specificity for Targeted Protein Degradation: Lessons from Nature and the Laboratory. *Annual Review of Biochemistry*, 91(1), 295–319. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-104421>
85. Yang, J., Li, Y., Aguilar, A., Liu, Z., Yang, C.-Y., & Wang, S. (2019). Simple Structural Modifications Converting a Bona fide MDM2 PROTAC Degradator into a Molecular Glue Molecule: A Cautionary Tale in the Design of PROTAC Degraders. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(21), 9471–9487. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00846>
86. Cao, S., Kang, S., Mao, H., Yao, J., Gu, L., & Zheng, N. (2022). Defining molecular glues with a dual-nanobody cannabidiol sensor. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28507-1>
87. Simonetta, K. R., Taygerly, J., Boyle, K., Basham, S. E., Padovani, C., Lou, Y., Cummins, T. J., Yung, S. L., von Soly, S. K., Kayser, F., Kuriyan, J., Rape, M., Cardozo, M., Gallop, M. A., Bence, N. F., Barsanti, P. A., & Saha, A. (2019). Prospective discovery of small molecule enhancers of an E3 ligase-substrate interaction. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09358-9>
88. Yang, N. J., & Hinner, M. J. (2014). Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 29–53). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3
89. Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. *Cell*, 152(6), 1237–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.014>
90. Voss, T. C., & Hager, G. L. (2013). Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 69–81. <https://doi.org/10.1038/nrg3623>
91. Centore, R. C., Sandoval, G. J., Soares, L. M. M., Kadoch, C., & Chan, H. M. (2020). Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes: Emerging Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Trends in Genetics*, 36(12), 936–950. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.07.011>
92. Spitz, F., & Furlong, E. E. M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 613–626. <https://doi.org/10.1038/nrg3207>
93. Andrei, S. A., Sijbesma, E., Hann, M., Davis, J., O’Mahony, G., Perry, M. W. D., Karawajczyk, A., Eickhoff, J., Brunsveld, L., Doveston, R. G., Milroy, L.-G., & Ottmann, C. (2017). Stabilization of protein-protein interactions in drug discovery.

- Expert Opinion on Drug Discovery, 12(9), 925–940.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1346608>
94. Chong, S., Dugast-Darzacq, C., Liu, Z., Dong, P., Dailey, G. M., Cattoglio, C., Heckert, A., Banala, S., Lavis, L., Darzacq, X., & Tjian, R. (2018). Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science*, 361(6400). <https://doi.org/10.1126/science.aar2555>
 95. Loh, C.-Y., Arya, A., Naema, A. F., Wong, W. F., Sethi, G., & Looi, C. Y. (2019). Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00048>
 96. O'Hara, L., & Smith, L. B. (2016). Development and Characterization of Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 219–248). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3724-0_14
 97. Goldstein, I., & Hager, G. L. (2017). Dynamic enhancer function in the chromatin context. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1390>
 98. Beagan, J. A., & Phillips-Cremins, J. E. (2020). On the existence and functionality of topologically associating domains. *Nature Genetics*, 52(1), 8–16. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0561-1>
 99. Schoenfelder, S., & Fraser, P. (2019). Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 20(8), 437–455. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0128-0>
 100. Schilbach, S., Hantsche, M., Tegunov, D., Dienemann, C., Wigge, C., Urlaub, H., & Cramer, P. (2017). Structures of transcription pre-initiation complex with TFIID and Mediator. *Nature*, 551(7679), 204–209. <https://doi.org/10.1038/nature24282>
 101. Szabo, Q., Bantignies, F., & Cavalli, G. (2019). Principles of genome folding into topologically associating domains. *Science Advances*, 5(4). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1668>
 102. Bickmore, W. A. (2013). The Spatial Organization of the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14(1), 67–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153515>
 103. Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews Genetics*, 17(11), 661–678. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.112>
 104. Hnisz, D., Day, D. S., & Young, R. A. (2016). Insulated Neighborhoods: Structural and Functional Units of Mammalian Gene Control. *Cell*, 167(5), 1188–1200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.024>

105. Downen, J. M., Fan, Z. P., Hnisz, D., Ren, G., Abraham, B. J., Zhang, L. N., Weintraub, A. S., Schuijers, J., Lee, T. I., Zhao, K., & Young, R. A. (2014). Control of Cell Identity Genes Occurs in Insulated Neighborhoods in Mammalian Chromosomes. *Cell*, 159(2), 374–387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.030>
106. Ghavi-Helm, Y., Jankowski, A., Meiers, S., Viales, R. R., Korbel, J. O., & Furlong, E. E. M. (2019). Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nature Genetics*, 51(8), 1272–1282. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0462-3>
107. Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A., & Young, R. A. (2013). Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. *Cell*, 155(4), 934–947. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>
108. Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes. *Cell*, 153(2), 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
109. Saint-André, V., Federation, A. J., Lin, C. Y., Abraham, B. J., Reddy, J., Lee, T. I., Bradner, J. E., & Young, R. A. (2016). Models of human core transcriptional regulatory circuitries. *Genome Research*, 26(3), 385–396. <https://doi.org/10.1101/gr.197590.115>
110. Paakinaho, V., Presman, D. M., Ball, D. A., Johnson, T. A., Schiltz, R. L., Levitt, P., Mazza, D., Morisaki, T., Karpova, T. S., & Hager, G. L. (2017). Single-molecule analysis of steroid receptor and cofactor action in living cells. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15896>
111. Richters, A., Doyle, S. K., Freeman, D. B., Lee, C., Leifer, B. S., Jagannathan, S., Kabinger, F., Koren, J. V., Struntz, N. B., Urgiles, J., Stagg, R. A., Curtin, B. H., Chatterjee, D., Mathea, S., Mikochik, P. J., Hopkins, T. D., Gao, H., Branch, J. R., Xin, H., ... Koehler, A. N. (2021). Modulating Androgen Receptor-Driven Transcription in Prostate Cancer with Selective CDK9 Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 28(2), 134-147.e14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.10.001>