ANDRZEJ ANTONI SZCZEPANKIEWICZ

*Pracownia Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej
Pracownia Mikroskopii Elektronowej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: a.szczepankiewicz@nencki.edu.pl*

CĘTKI JĄDROWE JAKO MODELOWE CIAŁKA JĄDROWE. CĘTKI JĄDROWE W UKŁADZIE NERWOWYM

WSTĘP: ARCHITEKTURA JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Jądra komórkowe pierwszy zaobserwował Antoni van Leeuwenhoek pod koniec XVII w. Od momentu kiedy ten holenderski przyrodnik zamieścił o nich wzmiankę w jednym z listów do Towarzystwa Królewskiego w Londynie (LEEUVENHOEK 1682), minęło prawie trzy stulecia nim zrozumiano jaką pełnią funkcję. Przechowywanie i kopiowanie informacji zawartej w materiale genetycznym oraz kontrolowanie prawie wszystkich funkcji komórki przez regulację ekspresji tej informacji, możliwe jest dzięki złożonym molekularnym procesom powiązanim z przestrzenną strukturą jądra. Dzięki rozwojowi technik obrazowania mikroskopowego oraz technik biochemicznych poznano zróżnicowanie budowy wewnętrznej jądra na poziomie strukturalnym i procesów w nim zachodzących na poziomie molekularnym. Jądro komórkowe bowiem, choć pozbawione wewnętrznych przedziałów błonowych, nie jest organellą o jednorodnej organizacji. Elementy strukturalne jądra to chromatyna, czyli kompleks DNA i białek histonowych, oraz położone w przestrzeni międzychromatynowej, znacznie mniejsze struktury, zwane ciałkami jądrowymi (ang. nuclear bodies) lub domenami jądrowymi (ang. nuclear domains). Są one kompleksami białek lub białek i niekodującego RNA (BRASCH i OCHS 1992). Najbardziej wyrazistym i najwcześniej zauważonym, jest jąderko (WAGNER 1835). Niektóre ciałka jądrowe widoczne są tylko w mikroskopii fluorescencyjnej po zastosowaniu specyficznego

znakowania, inne z kolei, dzięki charakterystycznej strukturze, mają swoje odpowiedniki na poziomie ultrastrukturalnym w mikroskopii elektronowej. Wyjątkowe jest tutaj właśnie jąderko, które dzięki dużej gęstości widoczne jest zarówno w zwykłym mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym. Do tej pory opisano kilkanaście typów ciałek jądrowych. Nie wszystkie mają ustalone nazwy w języku polskim. Do ważniejszych należą: wspomniane już jąderko będące miejscem syntezy rRNA i niektórych etapów składania rybosomów, ciałka Cajala zaangażowane na pewne etapy modyfikacji i wewnątrzjądrowy transport małych jądrowych rybonukleoprotein (snRNPs) oraz małych jąderkowych rybonukleoprotein (snoRNPs) (MORRIS 2008, MACHYNA i współaut. 2013), ciałka PML uczestniczące w odpowiedzi na czynniki stresowe, regulację stabilności genomu, naprawę DNA poprzez sekwestrację, modyfikowanie i degradację białkowych partnerów (LALLEMAND-BREITENBACH i DE THE 2010), ciałka Polycomb będące wielobiałkowym kompleksem, który u *Drosophila* zaangażowany jest w represję genów homeotycznych, a u ssaków w regulację ekspresji genów *Hox* (PIRROTTA i LI 2012), „cleavage bodies” zawierające kilka czynników uczestniczących w cięciu i poliadenylacji końca 3' mRNA (LI i współaut. 2006), jądrowe ciałka stresowe (ang. nuclear stress bodies) uczestniczące w regulacji i przeprogramowaniu transkrypcji w warunkach stresowych (BIAMONTI i VOURECH 2010), „paraspeckles” biorące udział w regulacji ekspresji niektórych genów przez

Słowa kluczowe: ciałka jądrowe, cętki, dojrzewanie mRNA, jądro komórkowe, metabolizm mRNA, składanie mRNA, splicing, transkrypcja, transport mRNA

retencję pewnych rodzajów RNA (FOX i LAMOND 2010, NAKAGAWA i HIROSE 2012) oraz „nuclear speckles” uważane za miejsce przechowywania i modyfikacji czynników składania mRNA: małych jądrowych rybonukleoprotein (snRNP), białek SR i innych białek metabolizmu RNA. Ta kompartmentalizacja przestrzeni jądra, tworzona przez ciała jądrowe, umożliwia odpowiednią koncentrację makrocząstek, prowadzącą do podwyższenia częstości koniecznych oddziaływań między nimi w jednym miejscu i/lub obniżenia niepożądanych w innym (GALGANSKI i współaut. 2017). Ułatwia również sprawniejszą kontrolę ich retencji lub uwalniania do nukleoplazmy (HANDWERGER i GALL 2006).

CĘTKI JĄDROWE: NAZEWNICTWO I POCZĄTKI BADAŃ

Obecnie w literaturze anglojęzycznej stosuje się równolegle kilka terminów na określenie cętek jądrowych. Najczęściej spotykany termin angielski „nuclear speckles” (nie mający oficjalnego odpowiednika w języku polskim, a znaczący mniej więcej tyle co plamki lub cętki jądrowe), używany jest głównie w kontekście obrazowania w mikroskopii immunofluorescencyjnej. „Interchromatin granule clusters” (IGCs) stosowany jest w badaniach mikroskopii elektronowej (SPECTOR i LAMOND 2011). Ten ostatni termin spotykany w literaturze polskojęzycznej, np. w pierwszej polskiej pracy przeglądowej dotyczącej tych struktur (ZBOREK 1987), tłumaczony jest jako skupiska ziaren interchromatynowych. Ponadto, w pracach prezentujących wyniki immunofluorescencyjne spotyka się, lecz znacznie rzadziej, inne, dodatkowe terminy: „splicing speckles”, „SC35 domains” oraz „splicing factor compartments” (GALGANSKI i współaut. 2017). To różne nazewnictwo w dwóch różnych typach mikroskopii wynika z niezależnego opisanie tych struktur. W 1959 r. Hewson Swift zaobserwował w mikroskopie elektronowym ziarnistości, które w nukleoplazmie tworzą skupiska („chmury”) i nazwał je ziarnami interchromatynowymi. Równocześnie stwierdził, że zawierają one RNA (SWIFT 1959). Następnie opisał je Nicole Granboulan i Wilhelm Bernhard (GRANBOULAN i BERNHARD 1961). Opracowana przez Bernharda metoda regresywnego barwienia z użyciem EDTA, pozwalająca zachować wysoki kontrast rybonukleoprotein przy wyblakłej chromatynie sugerowała, że ziarna interchromatynowe zawierają jakiś rodzaj rybonukleoprotein (MONNERON i BERNHARD 1969). Natomiast termin „speckles” został po raz pierwszy użyty przez J. Swensona Becka, który w 1961 r. opisał w hepatocytach szczyrzych cętkowaty wzór barwienia jądra,

po wyznakowaniu materiału surowicą pochodzącą od pacjentów chorych na choroby autoimmunologiczne: zespół Sjögrena i toczeń rumieniowaty układowy (BECK 1961). Kilka lat później antygen odpowiedzialny za powstanie takiego wzoru barwienia został nazwany antygenem Sm, od nazwiska pacjentki Stephanie Smith, chorej na toczeń rumieniowaty układowy, u której również zostały wykryte przeciwciała przeciwjądrowe (TAN 1967, TAN i KUNKEL 1966). Produkcja tego typu przeciwciał jest charakterystyczną cechą chorób autoimmunologicznych, co bywa wykorzystywane w ich diagnostyce (KUMAR i współaut. 2009). Jednak dopiero w 1979 r. potwierdzono, że antygen Sm jest częścią kompleksu cząstek snRNP (LERNER i STEITZ 1979). Na początku lat 80. pojawiły się pierwsze prace lokalizujące snRNP na poziomie ultrastrukturalnym, z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał (metoda immunogold) w IGC (SPECTOR i współaut. 1983, FAKAN i współaut. 1984, PUVION i współaut. 1984). Od tego momentu stało się oczywiste, że speckles i skupiska ziaren interchromatynowych to te same struktury, choć jeszcze przez wiele lat autorzy niechętnie stawiali obie nazwy obok siebie. Jednak, tak naprawdę, pierwszy opisał speckles już w 1910 r. Santiago Ramón y Cajal, hiszpański neurobiolog, laureat Nagrody Nobla z 1906 r., odkrywca wspomnianych wcześniej ciałek Cajala. Ramón y Cajal wykazał w jądrze komórkowym neuronów obecność nieregularnych struktur, które nie barwią się kwaśną aniliną i pozostają jaśniejsze w stosunku do otoczenia, stąd użyta przez Ramona y Cajala nazwa grumos hialinos („prze-

Ryc. 1. „Prześwitujące skupiska” (hiszp. grumos hialinos) czyli cętki w komórkach piramidalnych kory mózgowej królika.

Oryginalny rysunek wykonany przez Romóna y Cajala. A: cętki (a) oraz jąderko (b) uwidocznione metodą z wykorzystaniem azotanu srebra po utrwaleniu w formalinie i moczniku. B: Negatywne barwienie cętek (a) i jąderka (b) azotanem srebra po utrwaleniu w formalinie i kwasie octowym. Pozytywnie barwią się „ziarna neutrofilów” (hiszp. granos netrófilos) (c). Reprodukowane z CAJAL (1910).

świtujące skupiska”) (CAJAL 1910). Użycie przez tego badacza opracowanej przez siebie wcześniej metody barwienia azotanem srebra, pozwoliło selektywnie wyznakować opisane struktury (Ryc. 1). Późniejsza adaptacja tej metody do mikroskopii elektronowej potwierdziła, że obserwowane przez Ramona y Cajala struktury są ekwiwalentem skupisk ziaren interchromatynowych, a tym samym speckles obserwowanych w mikroskopii immunofluorescencyjnej (LAFARGA i współaut. 2009). Ani J. Swenson Beck, ani tym bardziej Hewson Swift nie wiedzieli, że przedstawiają struktury opisane wcześniej przez Ramóna y Cajala. Uważanie Ramóna y Cajala za odkrywcę nuclear speckles jest obecnie powszechne, choć gdy sięgnąć do oryginalnego tekstu, Cajal wspomina, że struktury te były obserwowane także przez innych autorów (nie podaje przez kogo), choć nie poświęcono im większej uwagi (CAJAL 1910).

Mimo tylu lat opisywania w literaturze naukowej, struktury te nie doczekały się jeszcze polskiej nazwy, gdy chodzi o badania immunofluorescencyjne. Wspomniana, jedyna praca przeglądowa w języku polskim z 1987 r., odnosi się jedynie do badań w mikroskopii elektronowej i posługuje się terminem „ziarnistości interchromatynowe” (ZBOREK 1987). Termin „domeny SC35” jest wygodny, lecz dość nieścisły, gdyż struktury te zawierają wiele innych białek. Z kolei nazwa „kompartmenty czynników składania mRNA” (ang. splicing factor compartments) wydaje się zbyt długa i niezgrabna. Istnieje więc potrzeba utworzenia odpowiedniej polskiej nazwy. Dlatego, w niniejszej pracy, proponuję termin „cętki jądrowe”, będący właściwie dosłownym tłumaczeniem angielskiego terminu nuclear speckles, i taki termin będzie używany w poniższym tekście. Analogicznie w przypadku paraspeckles używany będzie termin „paracętki”. W miejscu, w którym będą omawiane wyniki prac mikroskopii elektronowej zostanie użyty termin IGC/cętki.

ORGANIZACJA I LOKALIZACJA CĘTEK JĄDROWYCH

Cętki obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym mają kształt mniej lub bardziej regularnych plamek o średnicy 0,5-3 μm , położonych w przestrzeni międzychromatynowej (Ryc. 2). W jednym jądrze może być ich zwykle od 10 do 50, gdzie zajmują 5-10% objętości nukleoplazmy.

W mikroskopii elektronowej, jak już wspomniałem, odpowiednikami cętek są skupiska ziaren interchromatynowych (IGC). Tworzą je 20-25 nanometrowej średnicy elektronowo gęste ziarna połączone cienkimi

Ryc. 2. Cętki w mikroskopii fluorescencyjnej, w neuronach hodowli pierwotnej pochodzenia hipokampalnego (kolor czerwony).

Na niebiesko wybarwiono specyficzne dla neuronów białko MAP2, wykorzystywane jako ich znacznik. Na szaro wyznakowano DNA. Znacznik skali 6 μm . Z badań własnych autora.

włóknkami. Jedno takie skupisko odpowiada jednej „cętkie” w mikroskopii świetlnej (Ryc. 3) (GALGANSKI i współaut. 2017, SPECTOR i LAMOND 2011, HALL i współaut. 2006). Ze względu na charakterystyczną strukturę, IGC/cętki mogą być obserwowane bez użycia przeciwciał, choć korzystne jest zastosowanie technik zwiększających ich kontrast względem innych składników jądra, np. barwienie bizmutem, zastosowane po raz pierwszy przez LOCKEA i HUIEA (1977), lub zmniejszających kontrast heterochromatyny, jak wspomniana wcześniej technika regresywnego barwienia EDTA (BERNHARD 1969).

Większość prac badających cętki dotyczy komórek ssaczych, jednak podobne struktury obserwowano w oocytach płazów, gdzie nazywane są snurposomami B (GALL i współaut. 1999) i w embrionach *Drosophila melanogaster* (SEGALAT i LEPESANT 1992), lecz nie u drożdży (POTASHKIN i współaut. 1990). Cętki występują także w jądrach komórek roślinnych i były badane m.in. u *Arabidopsis thaliana* (FANG i współaut. 2004), *Allium cepa* i *Lupinus luteus* (NIEDOJADLO i współaut. 2012).

BIAŁKOWE SKŁADNIKI CĘTEK JĄDROWYCH

Metodami immunolokalizacji oraz spektrometrią mas izolowanych frakcji IGC/cętek

Ryc. 3. Skupiska ziaren interchromatynowych tj. cętek w mikroskopii elektronowej w komórkach nerwowych hipokampalnej hodowli organotypowej.

A: mikrofotografia elektronowa fragmentu jądra komórki nerwowej. H – heterochromatyna, IGC – skupiska ziaren interchromatynowych (ang. interchromatin granule clusters), OJ – otoczka jądrowa, Jd – jąderko. Znacznik skali 1 μm . B: jedno z IGC z Ryc. 3A w większym powiększeniu. Znacznik skali 330 nm. Kontrast IGC wzmocniony solami bizmutu. Z badań własnych autora.

ustalono względnie dokładnie skład białkowy tych ciałek w hepatocytach. Podstawowym ich składnikiem są dwie grupy czynników uczestniczących w składaniu (splicingu) mRNA: małe jądrowe rybonukleoproteiny (ang. small nuclear ribonucleoprotein, snRNP) oraz białka SR (ang. serine-arginine rich proteins). Jako pierwsze w cętkach opisane zostały czynniki snRNP (por. rozdział „Cetki jądrowe: nazewnictwo i początki badań”). Czynniki te wchodziły w skład spliceosomu, czyli wieloskładnikowego kompleksu białkowo-rybonukleoproteinowego, usuwającego introny podczas składania mRNA. Każda cząstka snRNP jest kompleksem składającym się z snRNA, czyli niskocząsteczkowego RNA charakteryzującego się wysoką zawartością grup urydylowych, wspólnego zestawu siedmiu tzw. białek rdzeniowych zwanych kompleksem Sm (B/B', D3, D2, D1, E, F oraz G) oraz białek unikatowych dla poszczególnych cząstek. Występują cztery podstawowe rodzaje snRNP: U1, U2, U4/U6 i U5 snRNP. Wszystkie rybonukleoproteiny snRNP oraz wszystkie białka Sm, a także wiele spośród białek unikatowych są wykrywane w obrębie cętek jądrowych (NYMAN i współaut. 1986, SAITOH i współaut. 2004). W ich biogenezie, jak już nadmieniono wyżej, uczestniczą ciała Cajala (KISS 2004).

Drugą ważną grupą białek obecną w cętkach są białka SR. Jest to rodzina białek bogata w serynowo-argininowe powtórzenia, stąd nazwa (S to skrót aminokwasu seryny, R argininy). Białka SR na końcu aminowym mają jedną lub dwie domeny wiążące RNA: RRM (ang. RNA recognition motif) oraz nieco odmienną domenę homologiczną RRMH (ang. RRM homolog), natomiast na końcu karboksylowym różnej długości domenę RS z wielokrotnymi dwupeptydowymi powtórzeniami arginina-seryna. Domena ta, podlegająca fosforylacji na resztach seryny, odpowiedzialna jest za interakcje z innymi białkami, w tym z transportyną-SR przenoszącą białka SR przez pory jądrowe. Znanych jest siedem klasycznych białek SR oraz kilkanaście dodatkowych, szczegółowo przedstawionych w kilku pracach przeglądowych (LONG i CACERES 2009, SHEPARD i HERTEL 2009, TWYFFELS i współaut. 2011). Wszystkie klasyczne oraz spora część dodatkowych wykrywana jest w cętkach hepatocytów (SAITOH i współaut. 2004). Za lokalizację białek SR w cętkach odpowiada domena RS (CACERES i współaut. 1997). Białka SR pełnią funkcję czynników regulatorowych w konstytutywnym i alternatywnym składaniu mRNA: rozpoznają regulatorowe sekwencje wzmacniające ESEs (ang. exonic splicing enhancers) i wiążą się z nimi, przez co promują rekrutację komponentów spliceosomu w miejsca składa-

nia. Jednak funkcje białek SR nie ograniczają się tylko do kontrolowania składania mRNA. Białka te mają swój udział także w poprzedzającej składanie transkrypcji, a także w eksporcie mRNA do cytoplazmy oraz w translacji (LONG i CACERES 2009). Dwa najlepiej poznane białka tego typu obecne w cętkach to SF2/ASF (ang. splicing factor 2/alternative splicing factor) i SC35 (ang. spliceosomal component 35), według nowszej nomenklatury, próbującej ujednolicić nazewnictwo w tej grupie białek, nazywane są odpowiednio: SRSF1 i SRSF2 (ang. serine/arginine-rich splicing factor). Białko SC35 (SRSF2) jest powszechnie uznawanym (ale nie jedynym) znacznikiem cętek w różnych technikach obrazowania.

Cetki jądrowe zawierają niektóre z tzw. białek podobnych do białek SR (ang. SR-like lub SR-related protein). Są to białka, które także pełnią funkcje czynników składania pre-mRNA lub uczestniczą w innych procesach metabolizmu mRNA, ale mają pewne odmienne cechy budowy, np. brak u nich domeny RRM (LONG i CACERES 2009). W cętkach zlokalizowano także kilka kinaz i fosfataz, które fosforylują lub defosforylują czynniki uczestniczące w składaniu RNA, np. specyficzne dla jąder: CLK1 (ang. CDC-like kinase 1), PRP4K (ang. serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog) oraz obecne również w PSK-H1 (ang. protein serine kinase H1), SRPK1 (ang. SRSF protein kinase 1) (COLWILL i współaut. 1996, KO i współaut. 2001, BREDE i współaut. 2002, DELLAIRE i współaut. 2002) i fosfatazę PP1 (ang. protein phosphatase-1) (TRINKLE-MULCAHY 1999).

Ponadto wykazano w cętkach obecność wielu białek związanych z innymi etapami metabolizmu mRNA, w tym z samą transkrypcją. Oprócz kilku czynników transkrypcyjnych (FBI-1, Skip, Tho2), ciała te zawierają dużą podjednostkę polimerazy RNAII (BREGMAN i współaut. 1995, MORTILLARO 1996, XIE i współaut. 2006), a także inne podjednostki jej kompleksu (SAITOH i współaut. 2004). Ponadto w cętkach znaleziono: czynniki dojrzewania końca 3' RNA jak PABPN1 (KRAUSE i współaut. 1994) oraz polimerazę PAP (SCHUL i współaut. 1998), białka uczestniczące w metylacji reszt A mRNA w pozycji N6, tj. METTL14 i METTL3 (PING i współaut. 2014), białka zaangażowane w transport mRNA do cytoplazmy: Aly/REF i NXF1 (ZHOU i współaut. 2000), białka uczestniczące w procesie NMD (ang. nonsense-mediated mRNA decay), tj. degradacji wadliwych mRNA niosących przedwczesny kodon stop jak Magoh i Y14. Dwie ostatnie grupy białek są częścią EJC (ang. exon junction complex), białkowego kompleksu formującego się na mRNA podczas skła-

Ryc. 4. Klasyfikacja funkcji molekularnych białek obecnych w cętkach jądrowych.

IGC/cętki izolowane z mysich hepatocytów. Wykres sporządzono na podstawie 146 białek zidentyfikowanych przy wykorzystaniu spektrometrii mas przez SAITOH i współaut. (2004).

dania, mającego wpływ na potranskrypcyjną regulację jego losów (LE HIR i współaut. 2001, SCHMIDT i współaut. 2006).

W cętkach stwierdzono również obecność wielu rodzajów białek z grupy hnRNP (ang. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, heterogenne jądrowe RNP) (SAITOH i współaut. 2004). Jest to duża rodzina białek wiążących RNA. Białka te (wraz z czynnikami opisanymi wcześniej) uczestniczą w regulacji transkrypcji, alternatywnym składaniu mRNA, odpowiadają za stabilizację mRNA i jego transport (GEUENS i współaut. 2016). Jednocześnie, w cętkach wykazano obecność białek cytoskieletu: aktyny (NAKAYASU i UEDA 1984, BELIN i współaut. 2013), profiliny (SKARE i współaut. 2003) i laminy A/C (JAGATHEESAN 1999).

Niektóre białka obecne w cętkach występują również w innych ciałkach. snRNAP są składane w ciałkach Cajala zanim trafiają do cętek (MAO i współaut. 2011b). Charakterystyczne białka paracetek: PSF i PSP2, występują również w cętkach (SAITOH i współaut. 2004), a Pat1b w cętkach i ciałkach PML (MARNEF i współaut. 2012).

Proteomiczna analiza jądrowej frakcji bogatej w cętki, izolowanej z hepatocytów, o której wspominałem na początku tego rozdziału, wykazała występowanie w cętkach 360 białek, w tym 146 (41%), które określono jako „zidentyfikowane” białka IGC. Zaliczono tutaj białka najczęściej się pojawiające, o wcześniej potwierdzonej lokalizacji w cętkach i o funkcji zbliżonej do funkcji dobrze scharakteryzowanych białek cętek. Pozostałe stanowiły „potencjalne” białka IGC, a także białka, które określono jako „nowi kandydaci” oraz białka „nieoczekiwane”, będące

być może zanieczyszczeniem frakcji. Rycina 4 prezentuje funkcje tych 146 zidentyfikowanych białek: 81% z nich powiązanych jest z metabolizmem pre-mRNA/mRNA i w dużej części pokrywa się z białkami znajduwanymi w spliceosomach (SAITOH i współaut. 2004). Najnowsza praca przeglądowa podaje listę 457 znanych białek obecnych w cętkach (GALGANSKI i współaut. 2017).

RNA W CĘTKACH JĄDROWYCH

Prócz białek, cętki jądrowe zawierają dwa typy RNA: poli(A)⁺ RNA (CARTER i współaut. 1991) oraz *MALAT1* (ang. metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), nazywany też *NEAT2* (ang. nuclear-enriched abundant transcript 2), należący do grupy długich niekodujących RNA (lncRNAs, ang. long non-coding RNAs) (HUTCHINSON i współaut. 2007). Przez wiele lat kwestią dyskusyjną było czy obecne w cętkach poli(A)⁺ RNA reprezentuje nowopowstałe mRNA (jako, że fragment poli(A)⁺ RNA jest dodawany do końca 3' w procesie jego dojrzewania), czy też jest odrębną populacją niekodującego RNA. Niektóre prace pokazują, że poli(A)⁺ RNA pozostaje w cętkach po zablokowaniu transkrypcji, pomimo że mRNA jest w tym czasie transportowane do cytoplazmy. Na tej podstawie wnioskowano, że cętki zawierają stabilną populację poli(A)⁺ RNA która może pełnić jakieś funkcje regulatorowe w jądrze (HUANG i współaut. 1994).

MALAT1 o długości około 7500 par zasad posiada krótki fragment podobny do poli(A), wchodzący w skład konserwatywnej potrójnej helisy stabilizującej transkrypt. *MALAT1* ulega silnej nadekspresji w pewnych typach nowotworów (JI i współaut. 2003). Doświadczenia na liniach komórkowych wykazały, że *MALAT1* oddziałuje z kilkoma białkami SR (m.in. SRSF1, SRSF2 i SRSF3) i jest potrzebny do ich lokalizacji w cętkach (TRIPATHI i współaut. 2010), a także z innymi białkami cętek: RNPS1, SRm160 oraz IBP160, od których z kolei zależy lokalizacja *MALAT1* w cętkach (MIYAGAWA i współaut. 2012). W hodowlach mysich neuronów hipokampalnych, *MALAT1* moduluje synaptogenezę poprzez regulację ekspresji genów (BERNARD i współaut. 2010). Jądra komórek niektórych linii nowotworowych po deplecji *MALAT1* zawierają zwiększony poziom defosforylowanych białek SR, które jednocześnie wykazują bardziej homogenną dystrybucję w nukleoplazmie (TRIPATHI i współaut. 2010). Jednak badania *in vivo*, na myszach pozbawianych genu *Malat1* wykazały, że transkrypt *MALAT1* nie jest konieczny w ich pre- i postnatalnym rozwoju. Myszy te posiadają typowe cętki jądrowe, a brak *MALAT1* nie wpływa

na wzór jądrowej lokalizacji białek SRSF1 i SRSF2, poziom fosforylacji białek SR, proliferację komórek, apoptozę, ogólny poziom transkrypcji czy tempo składania mRNA. Jedynym obserwowanym efektem jest zmiana poziomu ekspresji kilku genów położonych w pobliżu *Malat1*, w tym genu *Neat1*, którego transkrypt jest składnikiem paracetek. O ile jednak niektórzy badacze obserwują zwiększoną ekspresję transkryptu *Neat1* w korze mózgowej i wątrobie myszy z wyciszonym genem *Malat1* (ZHANG i współaut. 2012), inni zauważają zmniejszoną jego ekspresję w nabłonku jelita i fibroblastach (NAKAGAWA i współaut. 2012).

Białka i RNA w cętkach nie są rozmieszczone homogenicznie, ale tworzą dwie warstwy: środek cetek zajmowany jest częściej przez białka, a MALAT1 i niektóre rybonukleoproteiny występują bardziej na zewnątrz (FEI i współaut. 2017). Granice pomiędzy tymi warstwami nie są jednak ostre i w strukturze obserwowanej w mikroskopii elektro nowej to zróżnicowanie nie jest widoczne (Ryc. 3).

FOSFOLIPIDY INOZYTOŁOWE W CĘTKACH JĄDROWYCH

Pochodne fosfoinozytydów (PI), będące czynnikami sygnałowymi wielu cytoplazmatycznych szlaków, obecne są także w jądrze komórkowym, gdzie uczestniczą w procesach regulacji modyfikacji chromatyny, dojrzewania mRNA i jego eksporcie. BORONENKOV i współaut. (1998) wykazali obecność w cętkach jądrowych fosfatydyloinozytolów bisfosforanu (PIP2) oraz dwu kinaz: fosfatydylo-4-fosforanu 5 typu I i typu II odpowiedzialnych za ich metabolizm. Obecnie znanych jest ponad 20 białek uczestniczących w sygnalizacji z udziałem PI, których obecność stwierdza się w cętkach (GALGANSKI i współaut. 2017). Przykładem może być „niekanoniczna” polimeraza Star-PAP (ang. speckle targeted PIP5K1 α -regulated poly(A) polymerase), przeprowadzająca poliadenylację końca 3' specyficznego zbioru pre-mRNA w sposób zależny od PI (MELLMAN i współaut. 2008). Te i inne okoliczności zawarte w pracy przeglądowej GALGANSKIEGO i współaut. (2017) dowodzą zdaniem autorów, że cętki są jądrowym centrum wytwarzania i transdukcji sygnału z udziałem PI.

FORMOWANIE SIĘ CETEK I MOBILNOŚĆ ICH SKŁADNIKÓW

Obecnie uważa się, że jądrowe i cytoplazmatyczne ciała pozbawione błon oddzielających je od otoczenia, swym zachowaniem i strukturą przypominają krople płynu zawie-

szone w innym roztworze. Ich powstawanie ma być oparte na zjawisku separacji faz w układzie dwu cieczy (ang. liquid-liquid phase separation, LLPS). LLPS jest procesem, w którym roztwory spontanicznie rozdzielają się na niezmieszane fazy zawieszone jedna w drugiej. W przypadku ciałek obecnych w komórkach, jedną ciecz stanowi cytoplazma lub nukleoplazma, a drugą skoncentrowana „zawiesina” białek lub białek i RNA. Rozdzielanie się jest wynikiem wielowartościowych (wielopunktowych), przejściowych oddziaływań białko-białko i białko-RNA. Biorą w nich udział specyficzne domeny białek ułatwiających czy wręcz promujących agregację tzw. domen inhereentnie nieuporządkowane (ang. intrinsically disordered regions), będące rejonami pozbawionymi struktury trzeciorzędowej, a więc nieulegające zwijaniu i nie przyjmujące form globularnych, najczęściej w wyniku braku hydrofobowych aminokwasów. Rodzajem tych domen są low-complexity regions, czyli regiony o niskiej złożoności, które w białkach obecnych w cętkach i innych ciałkach, występują wyjątkowo często. Są to rejony, które zawierają nadreprezentację jakiegoś konkretnego zestawu aminokwasów w strukturze pierwszorzędowej. Taką definicję niewątpliwie spełniają białka SR z domeną RRM oraz RS i tak też zostały one sklasyfikowane (VAN DER LEE i współaut. 2014). Kiedy lokalne stężenie tego typu białek lub białek i specyficznego RNA osiągnie odpowiedni próg, zainicjowane zostaje gromadzenie się tych molekuł (zgodnie z fizyko-chemią zjawiska LLPS) w większe struktury, tworzące ciała. Zjawisko LLPS, w kontekście organelli pozbawionych błony jądrowej, zostało wyczerpująco opisane w kilku pracach przeglądowych (HYMAN i współaut. 2014, COURCHAINE i współaut. 2016, SAWYER i współaut. 2019).

„Płynne” cętki są strukturami dynamicznymi, ich rozmiar, kształt i liczba mogą się zmieniać w zależności od typu komórki, cyklu komórkowego, poziomu ekspresji genów czy nasilenia procesu składania mRNA, a ich składniki są w ciągłym ruchu (PHAIR i MISTELI 2000). Małe cętki mogą ulegać fuzji z większymi (ZHANG i współaut. 2016). Analiza ruchu cetek w komórkach CHO (ang. Chinese hamster ovary cell, komórki jajnika chomika chińskiego) pokazuje, że po zablokowaniu transkrypcji wzrasta mobilność cetek: przemieszczają się one w kierunku drugich na dystansie do 4 μm i z prędkością 0,2-1,5 $\mu\text{m}/\text{min}$, co kończy się ich połączeniem. Trzy lub cztery cętki mogą poruszać się tą samą ścieżką, a na tej ścieżce mogą powstawać nowe cętki podążające za poprzednimi. Ruchy te są niezależne od aktyny i odbywają się „kanałami” wolnymi od

chromatyny, a bogatymi w składniki obecne w cętkach. Podobne przemieszczanie się całych cętek, autorzy obserwują po zastosowaniu szoku cieplnego, metali ciężkich i podczas późniejszej fazy G2 i wczesnej profazy (KIM i współaut. 2019). Te ostatnie badania potwierdzają starsze obserwacje pokazujące, że zablokowanie transkrypcji w wyniku użycia specyficznych inhibitorów, np. α -amanityny (HUANG i współaut. 1994), lub w wyniku szoku cieplnego (SPECTOR i współaut. 1991), powoduje akumulację czynników składania mRNA w cętkach, co z kolei prowadzi do ich powiększania się i przyjmowania bardziej zaokrąglonych i wyraźniejszych granic. Podobny efekt obserwowano po zablokowaniu składania pre-mRNA, w następstwie mikroiniekcji oligonukleotydów blokujących niektóre U snRNA (O'KEEFE i współaut. 1994) oraz przy użyciu inhibitora spliceostatyny A. Powiększone cętki zawierają nie tylko zwiększoną liczbę czynników uczestniczących w składaniu mRNA, ale również poli(A)⁺ RNA oraz białko PABPN1 (KAIDA i współaut. 2007, HETT i WEST 2014). Kiedy wzrasta ekspresja genów, a więc także rośnie poziom składania mRNA, czynniki składania zgromadzone w cętkach są uwalniane, zaś cętki przyjmują bardziej nieregularne kształty o słabiej zarysowanych granicach. Zjawisko takie obserwowano po indukcji określonych genów (HUANG i SPECTOR 1991), jak i grup genów w wyniku wywołanej infekcji wirusowej (BRIDGE 1995).

Ruch czynników składania mRNA z i do cętek był badany przy zastosowaniu różnych technik fluorescencyjnych. Wykorzystując białko fuzyjne GFP-SF2/ASF obserwowano redystrybucję czynników składania z sąsiednich cętek do miejsc transkrypcji aktywowanych genów, gdzie ma miejsce kotranskrypcyjne składanie mRNA (MISTELI i współaut. 1997). Z kolei użycie techniki FRAP (ang. fluorescence recovery after photobleaching) pokazało, że całkowite przywrócenie fluorescencji po fotobłaknięciu w przypadku białka GFP-AF2/ASF następuje po 30 sekundach, a połowiczne jest mniejsze niż 5 sekund. Maksymalny czas przebywania białka GFP-SF2/ASF w cętkach to około 50 sekund. Choć tempo wymiany składników cętek jest szybkie, rozmiar cętek podczas interfazy pozostaje względnie stały (PHAIR i MISTELI 2000).

Regulacja wymiany białkowych składników cętek następuje w głównej mierze na drodze fosforylacji i defosforylacji. Fosforylacja domeny RS jest konieczna do uwolnienia białek SR z cętek i ich przemieszczenia do miejsc transkrypcji i składania mRNA (MISTELI 1998) oraz formowania spliceosomu (MERMOUD i współaut. 1994). Jak odno-

towano wyżej, kilka kinaz, które mogą brać udział w tych procesach, zlokalizowano w cętkach. Nadekspresja kinazy CLK1 lub dodanie kinazy SRPK1 do permeabilizowanych komórek skutkuje ucieczką czynników składania mRNA z cętek i zwiększeniem ich nukleoplazmatycznej puli. Dotyczy to nie tylko białek SR fosforylowanych przez tę kinazę, ale także innych białkowych składników cętek nie posiadających domeny RS (np. komponentów U2 snRNP, pininy, aktyny i lamininy A), a nawet populacji poli(A)⁺ RNA (GUI i współaut. 1994, SACCO-BUBULYA i SPECTOR 2002). Nie tylko fosforylacja, ale także metylacja, koniugacja z PI (OKADA i współaut. 2008) czy z SUMO-1 (CHEN i współaut. 2004) są modyfikacjami potranslacyjnymi, które regulują napływ czynników do cętek.

CĘTKI JĄDROWE W CYKLU KOMÓRKOWYM I ICH BIOGENEZA

Po wejściu komórki w mitozę i rozpadzie otoczki jądrowej, białka cętek ulegają rozproszeniu w cytoplazmie. W metafazie białka te zaczynają gromadzić się i tworzyć struktury nazwane mitotic interchromatin granules (MIGs), istniejące do telofazy i będące mitotycznym odpowiednikiem IGC/ cętek (FERREIRA i współaut. 1994, REUTER i współaut. 1985, LESER i współaut. 1989). W anafazie i wczesnej telofazie wzrasta wielkość i liczba MIGs, a podczas odbudowy otoczki jądrowej w środkowej i późnej telofazie czynniki składania mRNA zgromadzone w cytoplazmatycznych MIGs zaczynają wnikać do tworzących się jąder siostrzanych. Różne komponenty MIGs są uwalniane w różnym czasie: białko ASF/SF2 i większość innych czynników opuszcza MIGs właśnie w telofazie, zaś białko SC35 i forma elongacyjna polimerazy II RNA fosforylowana na Ser-2 (także obecna w cętkach), pozostają w nich do początku fazy G1 (forma inicjacyjna, fosforylowana na Ser-5, pojawia się w jądrach siostrzanych jako pierwsza, jeszcze przed czynnikami składania mRNA) (PRASANTH i współaut. 2003). Zanim jednak wnikające białka SR utworzą cętki, przez 15-20 min przejściowo przebywają wokół transkrypcyjnie aktywnych organizatorów jąderka (ang. nucleolar organizing regions, NORs), gdzie tworzą zagęszczony obszar nazwany przez odkrywców zjawiska NAPS (ang. NOR-associated patches) (BUBULYA i współaut. 2004). Z kolei snRNPs lokalizują się w biegunowych rejonach jąder siostrzanych razem z koiliną p80, charakterystycznym białkiem ciała Cajala. Białka SR w NAPS-ach są hiperfosforylowane. W strukturach tych obecna jest także kinaza CLK1, a zablokowanie transkrypcji powoduje, że białka SR zostają

zatrzymane w NAPs-ach na dłużej. Oznacza to najprawdopodobniej, że fosforylacja uwalnia białka SR z NAPS-ów, zaś pierwszym miejscem docelowym, dokąd one zmierzają i formują pierwsze cętki, są miejsca aktywne transkrypcyjnie (BUBULYA i współaut. 2004). Ponieważ zainicjowanie transkrypcji w telofazie poprzedza uformowanie się cętek, sugeruje się, że nabór czynników składania RNA do nowopowstałych transkryptów zapoczątkowuje zarodkowanie nowych cętek w pobliżu miejsc aktywnych transkrypcyjnie. Tezę tą wspiera fakt, że transkrypty mRNA w postaci eksperymentalnie wprowadzonych do jądra konstruktów, mogą wywołać zarodkowanie cętek *de novo* (SHEVTSOV i DUNDR 2011).

FUNKCJE CĘTEK JĄDROWYCH; CĘTKI A GENY

Początkowo cętki uznawano jedynie za miejsce magazynowania i modyfikacji czynników składania mRNA, z których są te czynniki wysyłane do miejsc, gdzie odbywa się transkrypcja i składania jej produktów. Za taką bierną rolę cętek przemawia fakt, że na ich terenie nie jest wykrywalna transkrypcja metodami inkorporacji znakowanych nukleotydów (PUVION i PUVION-DUTILLEUL 1996, IBORRA i współaut. 1998, CMARKO 1999). Praca CMARKO (1999) sugeruje także, że nowopowstałe pre-mRNA obecne jest nie w obszarze cętek, ale we włóknach perychromatynowych, strukturach sąsiadujących z cętkami, obserwowanymi w mikroskopie elektronowym. Jednak liczne późniejsze prace wskazują, że cętki mogą wiązać się z *loci* określonych aktywnych genów. W ludzkich fibroblastach, na obrzeżach cętek, pojawiają się geny kolagenu Iα1 (*COL1A1*) i β-aktyny (*ACTB*), a we wnętrzu cętek transkrypty, tj. mRNA tych genów (XING i współaut. 1995). Umiejscawianiu się (asocjacji) z cętkami ulegają także aktywne geny: białek szoku cieplnego hsp90α i hsp70 ludzkich fibroblastów (JOLLY i współaut. 1999), czynnika transkrypcyjnego E2F4 (*EF2F4*) i laminy A/C otoczki jądrowej (*LMNA*) (SMITH i współaut. 1999a), białka proteolipidowego (lipofiliny, *PLP*) w różnicujących się oligodendrocytach (NIELSEN i współaut. 2002), łańcucha ciężkiego miozyny (*MyHC*) i miogeniny (*Myf-4*) ludzkich mioblastów (MOEN JR i współaut. 2004), receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (*PPARG*), czynnika transkrypcyjnego *SREBF1* oraz białka wiążącego kwasy tłuszczowe (*FABP4*) w różnicujących się adipocytach (SZCZERBAL i BRIDGER 2010). Wykazano także, że zestaw kilku jednocześnie aktywnych i funkcjonal-

nie powiązanych genów może umiejscawiać się przy tej samej cętkie, np. geny α-globiny (*HBA*) i β-globiny (*HBB*) (BROWN i współaut. 2006) czy α-globiny i białka prążka 3 błony erytrocytów (*SLC4A1*) podczas erytropoezy (w tym drugim przypadku obie kopie obydwu genów jednocześnie, Ryc. 5) (BROWN i współaut. 2008).

Rozpad cętek w wyniku nadekspresji kinazy CLK2 fosforylującej białka SR, skutkuje znaczącym zmniejszeniem częstości występowania dwu genów (wiążących się z tą samą cętką) w bliskim sąsiedztwie, co sugeruje, że obecność cętek promuje przestrzenną asocjację genów (RIEDER i współaut. 2014). DNA nie jest w cętkach wykrywalne (THIRY 1995), wykazano jednak, że cętki w mysich spermatydach zawierają histon H2A.B.3, powiązany z silnie rozluźnioną chromatyną, a także obie formy polimerazy RNA II (fosforylowanej na Ser2 i Ser5), a modyfikacje chromatyny związane z jej aktywnością (H4K20me1 i H3K36me3) występują na obrzeżach lub we wnętrzu cętek (SOBOLEVA i współaut. 2017). Regiony chromosomów bogate w geny (prążki R) odnajdywane są w pobliżu cętek częściej niż regiony ubogie w geny (prążki G) (SHOPLAND i współaut. 2003). Umiejscawianie się genów przy cętkach nie jest jednak zjawiskiem masowym i obligatoryjnym, gdyż nie wszystkie geny, nawet te które podlegają intensywnym procesom transkrypcji i składania, lokalizują się przy lub w cętkach (SMITH i współaut. 1999a). Dotyczy to raczej specyficznych genów, w specyficznych warunkach fizjologicznych. To ostatnie stwierdzenie nadal pozostaje aktualne, jednak w ostatnim czasie pojawiają się prace mogące mu zaprzeczyć. Wielkoskalowe badania z wykorzystaniem techniki SPRITE (ang. split-pool recognition of interactions by tag extension), dające wgląd w przestrzenną organizację genomu dowodzą, że rejony bogate w często transkrybowane geny i w modyfikacje chromatyny związane z aktywnością transkrypcyjną, nazwane przez autorów active hub, lokalizują się w pobliżu cętek (QUINODOZ i współaut. 2018). Autorzy tej pracy konkludują, że lokalizacja DNA blisko cętek może zwiększać wydajność potranskrypcyjnej obróbki mRNA w wyniku dużej koncentracji czynników składania i metabolizmu mRNA. Z kolei metodą TSA-Seq, wykorzystującą cytochemiczną metodę barwienia (amplifikację sygnału tyramidu) do mierzenia względnej odległości DNA do znakowanych struktur w jądrze, zidentyfikowano około 5% genomu, które z prawdopodobieństwem bliskim 100% lokalizuje się w odległości <0,32 μm od granicy cętek. Te rejony chromosomowe zostały określone przez autorów jako SPADs

Ryc. 5. Asocjacja aktywnych genów z cętkami. Immuno-FISH dla genów HBA (zielony) i SLC4A1 (czerwony) oraz białka SC35 obecnego w cętkach (niebieski) w erytroblastach podczas erytropoezy.

Znacznik skali 1 μm . Reprodukowano za zgodą z BROWN i współaut. (2008).

(ang. speckle-associated domains) (CHEN i współaut. 2018).

Obecność specyficznego mRNA w cętkach może mieć związek nie z samą transkrypcją, a z dojrzewaniem mRNA i/lub transportem dojrzałych transkryptów do cytoplazmy. W przypadku genu *COL1A1* zaobserwowano, że jego transkrypty podlegają składaniu w pobliżu miejsca transkrypcji, na krawędziach cętek, następnie, bardziej dojrzałe, akumulują się w przyległych cętkach, po czym są transportowane do cytoplazmy. Z kolei mRNA genu *COL1A1*, które uległo błędnemu złożeniu (co ma miejsce we wrodzonej łamliwości kości typu I i jest związane z mutacją w tym genie) jest w cętkach zatrzymywane (JOHNSON 2000). Podobnie, zablokowanie składania mRNA spliceostatyną A, meajamyciną lub pladienolidyną B powoduje odkładanie się transkryptów β -globiny i β -aktyny w cętkach komórek mięsaka kościopochodnego linii U2OS. Są to transkrypty zawierające introny, a więc takie, które nie uległy składaniu (CARVALHO i współaut. 2017). Śledząc w żywych komórkach U2OS mRNA zawierające poli(A)⁺ zaobserwowano, że przed eksportem do cytoplazmy przechodzi ono przez cętki (MOLENAAR i współaut. 2004).

Kilka innych badań wskazuje, że mRNA wielu genów przechodzi przez cętki (SMITH i współaut. 1999b, MELCAK i współaut. 2000, HATTINGER i współaut. 2002, SHOPLAND i współaut. 2002). Znane są także prace świadczące o tym, że w cętkach mogą mieć miejsce niektóre etapy dojrzewania mRNA. Używając konstruktów CMV-DNA i śledząc los ich transkryptów w komórkach HeLa pokazano, że pre-mRNA zawierające funkcjonalne miejsca składania mRNA, odkładane jest w cętkach, podczas gdy transkrypty nie posiadające funkcjonalnych miejsc składania mRNA, są równomiernie rozproszone w nukleoplazmie. Metodą FISH z wykorzystaniem sond wykrywających składanie RNA wykazano, że proces ten może zachodzić w cętkach (DIAS i współaut. 2010). W cętkach wykryto fosforylowaną formę czynnika SF3b155, obecną tylko w katalitycznie aktywnych spliceosomach. Zahamowanie składania mRNA (w wyniku wyciszenia czynnika CDC5L) w komórkach HeLa powoduje akumulację P-SF3b155, tj. spliceosomów, wraz ze składanym mRNA w cętkach, a złagodzenie blokady (w wyniku ekspresji GFP-CDC5L lub mikroiniekcji hPrp19/CDC5L) uwalnia zgromadzone RNA i uruchamia jego eksport (GIRARD

i współaut. 2012). W komórkach gruczołakoraka nabłonka płuc, mRNA M1 wirusa grypy jest odkładane w cętkach gospodarza, gdzie podlega składaniu. Zaburzenie składania w wyniku deplecji białek cętek NS1-BP lub SON powoduje silną akumulację mRNA w cętkach. Taki sam efekt wywołuje deplecja białek Aly/REF i UAP56, które są niezbędne do eksportu mRNA M1 i M2 wirusa do cytoplazmy (MOR i współaut. 2016). Cętki zawierają niewielki, stabilny zasób polimerazy RNA II fosforylowanej na Ser2 C-końcowej domeny, która chociaż jest transkrypcyjnie nieaktywna (co nie wyklucza transkrypcji na obrzeżach cętek), może odgrywać rolę w montażu spliceosomów i składaniu mRNA (XIE i współaut. 2006), wykazano bowiem wcześniej, że ufosforylowana forma polimerazy II promuje taki montaż (ZENG i BERGET 2000) i jest wymagana do zajścia składania (HIROSE i współaut. 1999).

Obecność transkryptów niektórych genów w cętkach może być związana z samym tylko eksportem do cytoplazmy. Wykazano, że w komórkach HeLa, mRNA dla JUND, HSPA1A, RHOB i ZXDB, których geny nie zawierają intronów, przed eksportem do cytoplazmy lokalizuje się w cętkach. Wejście tych transkryptów do cętek jest niezależne od transkrypcji czy obecności ogona poli(A) i jest promowane przez sekwencje ESE i białka SR z nimi się wiążące. Obecność transkryptów w cętkach wzmacnia proces ich transportu do cytoplazmy w wyniku ułatwiania naboru czynników kompleksu TREX (WANG i współaut. 2018).

Wymienione badania były prowadzone w komórkach transformowanych i/lub proliferujących. Dane te, jak również fakt, że w cętkach obecne są czynniki biorące udział w eksporcie mRNA do cytoplazmy oraz w procesie NMD wskazują, że w cętkach może mieć miejsce jeden z punktów „kontroli jakości” mRNA. O ile więc zasadnicza transkrypcja i składanie ma miejsce w nukleoplazmie, to pewne specyficzne geny ulegają ekspresji w bliskim przestrzennym związku z cętkami. Cętki mogą funkcjonować więc jako subjądrowe domeny, na peryferiach których zachodzi transkrypcja i kotranskrypcyjne składanie, a w ich wnętrzu potranskrypcyjna przejściowa akumulacja bardziej dojrzałego mRNA, prawdopodobnie w celu kontroli i dalszego dojrzewania przed eksportem do cytoplazmy (HALL i współaut. 2006).

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, HALL i współaut. (2006) zaproponowali rolę cętek, jako ośrodka przestrzennie łączącego transkrypcję specyficznego mRNA oraz składania i eksportu do cytoplazmy niektórych wysoce aktywnych genów w celu ułatwienia ich efektywnej ekspresji.

CĘTKI JĄDROWE W KOMÓRKACH NERWOWYCH

Jak już wspomniałem, obecność cętek w jądrach komórkowych została po raz pierwszy pokazana właśnie w komórkach nerwowych przez Santiago Romóna y Cajala. Cajal również, jako pierwszy scharakteryzował pod względem morfologii i cech cytochemicznych te struktury. Zauważył mianowicie, że w neuronach piramidalnych kory mózgowej i w motoneuronach rdzenia kręgowego występują okrągłe, rzadziej kanciaste twory, które nie wybarwiają się pod wpływem działania kwasnej aniliny, barwią się srebrem koloidalnym słabiej niż jąderko i ciała Cajala, natomiast przy zastosowaniu azotanu srebra przybierają barwę żółtą, pomarańczową lub czerwoną. W neuronach piramidalnych kory mózgowej kota, psa i królika liczbę cętek określił na 6 do 7, przy średnicy 0,8-1,5 μm . Z kolei w ludzkich neuronach kory, ich liczbę oszacował na 6 do 10 (nie podając wielkości). Zauważył również, że w większych motoneuronach psa i kota, cętki także są większe, osiągając 2-3 μm średnicy (nie podając liczby) (CAJAL 1910).

Przez długi okres rozwoju wiedzy na temat budowy i znaczenia ciałek jądrowych, pomijano badania organizacji cętek w komórkach nerwowych. Dopiero późniejsze badania Miguela Lafargi i jego grupy zmieniły ten stan rzeczy. Badacze ci (PENA i współaut. 2001) analizowali cętki w neuronach czuciowych zwoju trójdzielnego (łac. *ganglion trigeminale*) szczurów. W zwoju tym scharakteryzowali trzy typy neuronów różniące się wielkością i rozmieszczeniem organelli: duże neurony o średnicy ciała 40-75 μm (typ A), średnie o średnicy 20-50 μm (typ B) oraz małe o średnicy poniżej 20 μm (typ C). Autorzy wiązali wielkość neuronów z nasileniem aktywności transkrypcyjnej zakładając, że im większy rozmiar komórki, tym większe tempo transkrypcji. Zaobserwowali również korelację pomiędzy wielkością neuronów a liczbą jąderek, ciałek Cajala oraz wielkością i rozproszeniem IGC/cętek. Stwierdzili, że duże neurony (wysoka aktywność transkrypcyjna) posiadają jedno jąderko, zazwyczaj trzy ciała Cajala oraz małe IGC/cętki i czynniki składania rozproszone w nukleoplazmie, średnie neurony mają dwa jąderka, jedno ciało Cajala oraz kilka dużych IGC/cętek, zaś małe neurony – dwa lub trzy jąderka, jedno ciało Cajala oraz największe IGC/cętki. IGC w neuronach czuciowych zwoju trójdzielnego, podobnie jak w innych komórkach tworzą 20-25 nanometrowej średnicy ziarna w różnym stopniu zagregowania.

NAVASCUES i współaut. (2004) zauważyli zmianę organizacji IGC/cetek w neuronach zwoju trójdzielnego typu A, w odpowiedzi na uszkodzenie zakończeń aksonalnych wywołany miejscowym podaniem 4% formaliny: zwiększenie wymiarów cetek w połączeniu z intensywniejszym znakowaniem U2 snRNP B", co następowało trzy dni po wywołaniu uszkodzenia. Zmiany ustępowały po około 7. dniach od uszkodzenia. Autorzy wiążą te zmiany z mniejszym nasileniem transkrypcji w neuronach z uszkodzonymi zakończeniami, a w konsekwencji zmniejszonym nabo-rem czynników składania do miejsc składania pre-mRNA oraz zwiększoną ilością czynników przechowywanych w cętkach. Znakując miejsca transkrypcyjne poprzez inkorporację 5-FU do nowopowstającego mRNA wykazano, że w tym modelu centrum cetek nie zawiera miejsc aktywnych transkrypcyjnie. Obecność takich miejsc stwierdzono za to na obrzeżach IGC/cetek (CASAFONT i współaut. 2006). Wydaje się więc, że w neuronach IGC/cetki pod względem morfologii, ultrastruktury i ich zmian w reakcji na stopień nasilenia transkrypcji nie różnią się znacząco od IGC/cetek w innych komórkach.

W linii komórkowej neuronów ludzkich pochodzenia nowotworowego (neuroblastoma SH-SY5Y) wykazano, że po zadziałaniu na komórki szokiem cieplnym, białka HSPA1A i HSPA6 gromadzą się przy cętkach. Dodatkowo HSPA6 tworzy kuliste skupienia przy cętkach i pozostaje z nimi zasocjowane po zakończeniu szoku cieplnego. W poprzednim rozdziale opisałem doniesienia dotyczące aktywnych genów asocjujących z cętkami, w tym przedstawiam relację o białkach nie będących składnikami cetek i ich przestrzennej lokalizacji na obrzeżach tych ciałek. Oba zjawiska są zapewne z sobą powiązane. Białka szoku cieplnego to tzw. białka opiekuńcze. Jedną z ich funkcji jest zabezpieczanie innych białek przed niekorzystnym wpływem czynników stresowych (np. przed denaturacją spowodowaną wysoką temperaturą). Wiadomo również, że szok cieplny powoduje zahamowanie transkrypcji (VELICHKO i współaut. 2013). SHORBAGI i BROWN (2016) sugerują, że gromadzenie się białek szoku cieplnego na obrzeżach cetek, a więc w miejscach, gdzie odbywa się transkrypcja niektórych genów, może mieć związek z istnieniem mechanizmu zapewniającego szybki powrót transkrypcji do stanu sprzed jej hamowania spowodowanym zadziałaniem czynnika stresowego. Brak jest danych literaturowych, czy w innych komórkach, w tym w typowych neuronach, zjawisko czasowego gromadzenia się białek szoku cieplnego przy cętkach ma również miejsce.

CĘTKI JĄDROWE W STANACH CHOROBOWYCH

Istnieje niewielka grupa zaburzeń, w przebiegu których udział cetek jądrowych może mieć znaczenie. Należą do niej niektóre z chorób spowodowanych tzw. powtórzeniami trójnukleotydów (ang. trinucleotide repeat expansion disorders, TREDs), rodzajem mutacji dynamicznych. Powtórzenia trójnukleotydów występują naturalnie w genomie, zarówno w rejonach kodujących, jak i niekodujących. Nieprawidłowa i nadmiarowa liczba powtórzeń sekwencji trójek (kodonów) nukleotydów prowadzi do powstania błędnie uformowanego białka zyskującego toksyczne właściwości, transkryptu (mRNA) o toksycznych właściwościach lub po prostu utraty funkcji przez transkrypt lub białko (KRZYŻOSIAK i współaut. 2012).

Jedną z takich chorób jest oczno-gardłowa dystrofia mięśniowa (ang. oculopharyngeal muscular dystrophy, OPMD). Przyczyną OPMD jest mutacja w genie *PABPN1* polegająca na pojawieniu się dodatkowych powtórzeń GCG, tj. kodonu alaniny, wydłużających trakt polialaninowy z 10 do 12-17 powtórzeń aminokwasów (ROBINSON i współaut. 2006). W OPMD nieprawidłowe *PABPN1* tworzy w miocytach wewnątrzjądrowe agregaty, które lokalizują się przy granicy cetek. Agregaty te zawierają także kilka innych białek oraz poly(A) RNA. W takich komórkach ilość białka *PABPN1* w cętkach, gdzie ono normalnie występuje, jest znacznie zmniejszona. W ludzkich mioblastach transfekowanych GFP-*PABPN1*-17ala (konstrukt naśladujący skutki mutacji w OPMD) agregaty białka *PABPN1* także powstają na obrzeżach cetek, zawierają przy tym poly(A) RNA, a ich tworzeniu i zwiększaniu się towarzyszy zmniejszenie się ilości *PABPN1* i poly(A) RNA w cętkach (BENGOCHEA i współaut. 2012). Zdaniem autorów cętki zapewniają optymalne środowisko do agregacji nieprawidłowego białka: są miejscem w jądrze, gdzie koncentracja *PABPN1* i poly(A) RNA jest najwyższa (prawdopodobnie tworzą się kompleksy *PABPN1*/poly(A) RNA), co zwiększa stopień i specyficzność oddziaływań potrzebnych do oligomeryzacji. W dyskusji pracy grupy ROBINSONA i współaut. (2006) pojawia się także teza, że specyficzna lokalizacja agregatów na peryferiach cetek może być związana z organizacją genomu wokół cetek. Jak się wydaje, cętki są formowane w bezpośredniej bliskości pewnych genów, w lokalizacji zapewniającej odpowiednią koncentrację czynników składania, dostępnych nowopowstałym transkryptom (HALL i współaut. 2006, RINO i CARMO-FONSECA 2009). Biorąc to pod uwagę, prace te sugerują, że transkrypty mRNA ak-

tywnych genów położonych w pobliżu cętek inicjują nukleację agregatów w OPMD. Na potwierdzenie tej tezy przytacza się badania pokazujące, że specyficzne transkrypty RNA mogą służyć jako rusztowanie rekrutujące białka oddziałujące z RNA w celu zbudowania takich struktur jądrowych jak cętki, paracętki, histone locus bodies czy jądrowe ciała stresowe (SHEVTSOV i DUNDR 2011, MAO i współaut. 2011a). Jednym z patologicznych skutków obecności agregatów w miocytach może być zaburzenie alternatywnego składania troponiny T typu 3 (TNNT3) (a więc białka specyficznego dla miocytów): agregaty PABPN1 są zdolne „uwięzić” pre-mRNA *TNNT3* tak, że jest ono niedostępne dla SC35, które, jak równocześnie wykazano, jest czynnikiem odpowiedzialnym za alternatywne składanie *TNNT3* (KLEIN i współaut. 2016).

Udział cętek jądrowych jest także obserwowany w dystrofii miotonicznej typu I (ang. myotonic dystrophy type 1, łac. dystrophia myotonica 1, DM1), powodowanej mutacją w genie *DMPK* (ang. dystrophia myotonica protein kinase). Jest to gen kodujący serynowo-treoninową kinazę niezbędną w rozwoju miocytów. Wspomniana mutacja skutkuje ekspansją trójnukleotydu CUG w sekwencji 3'UTR. W normalnych mioblastach aktywny gen *DMPK* lokalizuje się przy granicy cętek, a jego produkt, mRNA *DMPK*, jest okresowo deponowane w cętkach. Tam najprawdopodobniej białka uczestniczące w składaniu są wymieniane na białka uczestniczące w transporcie mRNA do porów jądrowych i dalej do cytoplazmy. W chorobie DM1 transport jądrowy mRNA *DMKP* ulega zaburzeniu: zmutowane transkrypty tego genu choć podlegają składaniu, nie wchodzą do cętek z powodu ich zmienionej struktury oraz zaburzonej interakcji z białkiem MBNL1 (ang. muscleblind-like protein 1), które jest regulatorem alternatywnego składania mRNA (PASCUAL i współaut. 2006). Na granicy cętek tworzą się wtedy agregaty zmutowanych transkryptów genu *DMPK*, białka MBNL1 i prawdopodobnie innych białek, a transport transkryptów do cytoplazmy jest zaburzony (HOLT i współaut. 2007, SMITH i współaut. 2007).

Nieco odmienny charakter ma lokalizacja agregatów RNA powstających w chorobach ekspansji poliglutaminowych [ang. polyglutamine (PolyQ) diseases], gdzie mutacji dynamicznej ulegają sekwencje zawierające powtarzany trinukleotyd CAG kodujący glutaminę. W fibroblastach będących komórkowymi modelami płaswicy Huntingtona (HD), ataksji mózdkowo-rdzeniowych typu 1, 3, 7 (DSC1, DSC3, DSC7), zaniku jądra zębatego, jądra czerwienego, gałki bladej i jądra

niskowzgórzowego (ang. dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA, choroba Naito-Oyanagi), zmutowane mRNA (różnych białek, w zależności od choroby) jest deponowane i zatrzymywane nie przy, ale wewnątrz cętek. Zmutowane transkrypty kolokalizują z wspomnianym w poprzednim akapicie białkiem MBNL1, lecz w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku DM1. Autorzy tłumaczą ten fakt krótszym zmutowanym traktem CAG i mniejszym powinowactwem wiązania MBNL1 do powtórzeń CAG niż do CUG. Mniejszy stopień „zajęcia” powtórzeń CAG przez MBNL1, tłumaczy z kolei dlaczego wchodzą one do cętek i tam dopiero są blokowane, a w przypadku mięśniowego mRNA, *DMPK1* jest zatrzymywane już na obrzeżach cętek (URBANEK i współaut. 2016).

W zespole drżenia i ataksji związanych z łamliwym chromosomem X (ang. fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS), obserwuje się ekspansję powtórzeń CGG w 5'-UTR genu *FMR1*. Gen ten koduje białko FMRP (ang. fragile X mental retardation protein), wiążące RNA i zaangażowane w różne etapy jego metabolizmu, szczególnie w neuronach (D'ANNESSA i współaut. 2019). Zmutowane sekwencje CGG również prowadzą do agregacji nieprawidłowych transkryptów w cętkach (SELLIER i współaut. 2010).

Odkładanie się nieprawidłowego mRNA w cętkach występuje nie tylko w chorobach TRED: we wrodzonej łamliwości kości typu 1 (ang. osteogenesis imperfecta type 1, OI 1), defekt w przebiegu składania genu kolagenu 1 α 1 (*COL1A1*) prowadzi do akumulacji zmutowanego RNA tego genu w cętkach fibroblastów (JOHNSON 2000).

Jak można zauważyć, we wszystkich wymienianych jednostkach chorobowych powtarza się ten sam schemat, w którym nieprawidłowe mRNA tworzy złogi/wtręty/agregaty w cętkach lub na ich obrzeżach. Ta obserwacja wspiera hipotezę, że w przypadku ekspresji niektórych genów, cętki mogą być specyficznym punktem kontrolnym poprawności złożenia i nieobecności mutacji pre-mRNA (MOLENAAR i współaut. 2004, SMITH i współaut. 2007).

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję prof. dr hab. Grzegorzowi Wilczyńskiemu (IBD PAN) za cenne wskazówki oraz prof. dr hab. Andrzejowi Wróblowi za krytyczne uwagi do artykułu.

Streszczenie

Jądro komórkowe oprócz heterochromatyny czyli kompleksu DNA i białek histonowych, zawiera struktury zwane ciałkami jądrowymi (ang. nuclear bodies). Są to niewielkie, zazwyczaj koliste twory „zawieszane” w nukleoplazmie, składające się z białek lub białek i niekodującego RNA. Znanych jest kilkanaście rodzajów takich

struktur. Artykuł przedstawia obecny stan wiedzy na temat ciałek nazywanych w angielskiej literaturze nuclear speckles, czyli cętki jądrowe lub interchromatin granule clusters czyli skupiska ziaren interchromatynowych. Zaobserwowane po raz pierwszy przez Romana y Cajala w neuronach, obecne jednak we wszystkich typach komórek, struktury te uważane są za magazyny i miejsce modyfikacji czynników składania (splicingu) mRNA. Najnowsze badania, prezentowane w artykule pozwalają sądzić, że ich udział w metabolizmie RNA jest bardziej złożony. Świadczą o tym również doniesienia o roli cętek jądrowych w dziedzicznych chorobach powodowanych powtórzeniami trójnukleotydów, w tym tych o skutkach neurologicznych.

LITERATURA

- BECK J. S., 1961. *Variations in the morphological patterns of "autoimmune" nuclear fluorescence.* Lancet 277, 1203-1205.
- BELIN B. J., CIMINI B. A., BLACKBURN E. H., MULINS R. D., 2013. *Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei.* Mol. Biol. Cell 24, 982-994.
- BENGOCHEA R., TAPIA O., CASAFONT I., BERCIAÑO J., LAFARGA M., BERCIAÑO M. T., 2012. *Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy.* Neurobiol. Dis. 46, 118-129.
- BERNARD D., PRASANTH K. V., TRIPATHI V., COLASSE S., NAKAMURA T., XUAN Z., ZHANG M. Q., SEDEL F., JOURDREN L., COULPIER F., TRILLER A., SPECTOR D. L., BESSIS A., 2010. *A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression.* EMBO J. 29, 3082-3093.
- BERNHARD W., 1969. *A new staining procedure for electron microscopical cytology.* J. Ultrastruct. Res. 27, 250-265.
- BIAMONTI G., VOURCH C., 2010. *Nuclear Stress Bodies.* Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2. doi: 10.1101/cshperspect.a000695
- BORONENKOV I. V., LOIJENS J. C., UMEDA M., ANDERSON R. A., 1998. *Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors.* Mol. Biol. Cell 9, 3547-3560.
- BRASCH K., OCHS R. L., 1992. *Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle.* Exp. Cell Res. 202, 211-223.
- BREDE G., SOLHEIM J., PRYDZ H., 2002. *PSKH1, a novel splice factor compartment-associated serine kinase.* Nucleic Acids Res. 30, 5301-5309.
- BREGMAN D. B., DU L., VAN DER ZEE S., WARREN S. L., 1995. *Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains.* J. Cell Biol. 129, 287-298.
- BRIDGE E., 1995. *Dynamic organization of splicing factors in adenovirus-infected cells.* J. Virol. 69, 281-290.
- BROWN J. M., LEACH J., REITTE J. E., ATZBERGER A., LEE-PRUDHOE J., WOOD W. G., HIGGS D. R., IBORRA F. J., BUCKLE V. J., 2006. *Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active.* J. Cell Biol. 172, 177-187.
- BROWN J. M., GREEN J., NEVES R. P. D., WALLACE H. A. C., SMITH A. J. H., HUGHES J., GRAY N., TAYLOR S., WOOD W. G., HIGGS D. R., IBORRA F. J., BUCKLE V. J., 2008. *Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment.* J. Cell Biol. 182, 1083-1097.
- BUBULYA P. A., PRASANTH K. V., DEERINCK T. J., GERLICH D., BEAUDOUIN J., ELLISMAN M. H., ELLENBERG J., SPECTOR D. L., 2004. *Hypophosphorylated SR splicing factors transiently localize around active nucleolar organizing regions in telophase daughter nuclei.* J. Cell Biol. 167, 51-63.
- CACERES J. F., MISTELI T., SCREATION G. R., SPECTOR D. L., KRAINER A. R., 1997. *Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity.* J. Cell Biol. 138, 225-238.
- CAJAL S. R., 1910. *El núcleo de las células piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos.* Trab. Lab. Invest. Biol. 8, 35.
- CARTER K. C., TANEJA K. L., LAWRENCE J. B., 1991. *Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus.* J. Cell Biol. 115, 1191-1202.
- CARVALHO T., MARTINS S., RINO J., MARINHO S., CARMO-FONSECA M., 2017. *Pharmacological inhibition of the spliceosome subunit SF3b triggers exon junction complex-independent nonsense-mediated decay.* J. Cell Sci. 130, 1519-1531.
- CASAFONT I., NAVASCUES J., PENA E., LAFARGA M., BERCIAÑO M. T., 2006. *Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA.* Neuroscience 140, 453-462.
- CHEN W. Y., LEE W. C., HSU N. C., HUANG F., CHUNG B. C., 2004. *SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1).* J. Biol. Chem. 279, 38730-38735.
- CHEN Y., ZHANG Y., WANG Y., ZHANG L., BRINKMAN E. K., ADAM S. A., GOLDMAN R., VAN STEENSEL B., MA J., BELMONT A. S., 2018. *Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler.* J. Cell Biol. 217, 4025-4048.
- CMARKO D., 1999. *Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection.* Mol. Biol. Cell 10, 211-223.
- COLWILL K., PAWSON T., ANDREWS B., PRASAD J., MANLEY J. L., BELL J. C., DUNCAN P. I., 1996. *The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution.* EMBO J. 15, 265-275.
- COURCHANE E. M., LU A., NEUGEBAUER K. M., 2016. *Droplet organelles?* EMBO J. 35, 1603-1612.
- D'ANNESSA I., CICONARDI F., DI MARINO D., 2019. *Handling FMRP and its molecular partners: Structural insights into Fragile X Syndrome.* Prog. Biophys. Mol. Biol. 141, 3-14.
- DELLAIRE G., MAKAROV E. M., COWGER J. J., LONGMAN D., SUTHERLAND H. G., LUHRMANN R., TORCHIA J., BICKMORE W. A., 2002. *Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes.* Mol. Cell Biol. 22, 5141-5156.
- DIAS A. P., DUFU K., LEI H., REED R., 2010. *A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains.* Nat. Commun. 1, 97. doi: 10.1038/ncomms1103
- FAKAN S., LESER G., MARTIN T. E., 1984. *Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins.* J. Cell Biol. 100, 111-121.

- teins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J. Cell Biol.* 98, 358-363.
- FANG Y., HEARN S., SPECTOR D. L., 2004. Tissue-specific expression and dynamic organization of SR splicing factors in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* 15, 2664-2673.
- FEI J., JADALIHA M., HARMON T. S., LI I. T. S., HUA B., HAO Q., HOLEHOUSE A. S., REYER M., SUN Q., FREIER S. M., PAPPU R. V., PRASANTH K. V., HA T., 2017. Quantitative analysis of multilayer organization of proteins and RNA in nuclear speckles at super resolution. *J. Cell Sci.* 130, 4180-4192.
- FERREIRA J. A., CARMO-FONSECA M., LAMOND A. I., 1994. Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. *J. Cell Biol.* 126, 11-23.
- FOX A. H., LAMOND A. I., 2010. Paraspeckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, doi: 10.1101/cshperspect.a000687
- GALGANSKI L., URBANEK M. O., KRZYZOSIAK W. J., 2017. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* 45, 10350-10368.
- GALL J. G., BELINI M., WU Z., MURPHY C., 1999. Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell* 10, 4385-4402.
- GEUENS T., BOUHY D., TIMMERMAN V., 2016. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet.* 135, 851-867.
- GIRARD C., WILL C. L., PENG J., MAKAROV E. M., KASTNER B., LEMM I., URLAUB H., HARTMUTH K., LUHRMANN R., 2012. Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nat. Commun.* 3, 994. doi: 10.1038/ncomms1998
- GRANBOULAN N., BERNHARD W., 1961. Ultrastructural cytochemistry. Exploration of nuclear structures by enzymatic digestion. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 155, 1767-1779.
- GUI J. F., LANE W. S., FU X. D., 1994. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369, 678-682.
- HALL L. L., SMITH K. P., BYRON M., LAWRENCE J. B., 2006. Molecular anatomy of a speckle. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 664-675.
- HANDWERGER K. E., GALL J. G., 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends. Cell Biol.* 16, 19-26.
- HATTINGER C. M., JOCHENSEN A. G., TANKE H. J., DIRKS R. W., 2002. Induction of p21 mRNA synthesis after short-wavelength UV light visualized in individual cells by RNA FISH. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 81-89.
- HETT A., WEST S., 2014. Inhibition of U4 snRNA in Human Cells Causes the Stable Retention of Polyadenylated Pre-mRNA in the Nucleus. *PLoS One* 9, doi: 10.1371/journal.pone.0096174
- HIROSE Y., TACKE R., MANLEY J. L., 1999. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes. Dev.* 13, 1234-1239.
- HOLT I., MITTAL S., FURLING D., BUTLER-BROWNE G. S., BROOK J. D., MORRIS G. E., 2007. Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles. *Genes Cells* 12, 1035-1048.
- HUANG S., SPECTOR D. L., 1991. Nascent pre-mRNA transcripts are associated with nuclear regions enriched in splicing factors. *Genes Dev.* 5, 2288-2302.
- HUANG S., DEERINCK M. H., ELLISMAN M. H., SPECTOR D. L., 1994. *In vivo* analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)⁺ RNA. *J. Cell Biol.* 126, 877-899.
- HUTCHINSON J. N., ENSMINGER A. W., CLEMSON C. M., LYNCH C. R., LAWRENCE J. B., CHESSE A., 2007. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* 8, 39.
- HYMAN A. A., WEBER C. A., JULICHER F., 2014. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 39-58.
- IBORRA F. J., JACKSON D. A., COOK P. R., 1998. The path of transcripts from extra-nucleolar synthetic sites to nuclear pores: transcripts in transit are concentrated in discrete structures containing SR proteins. *J. Cell Sci.* 111, 2269-2282.
- JAGATHEESAN G., 1999. Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. *J. Cell Sci.* 112, 4651-4661.
- JI P., DIEDERICH S., WANG W., BOING S., METZGER R., SCHNEIDER P. M., TIDOW N., BRANDT B., BUERGER H., BULK E., THOMAS M., BERDEL W. E., SERVE H., MULLER-TIDOW C., 2003. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22, 8031-8041.
- JOHNSON C., 2000. Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. Splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J. Cell Biol.* 150, 417-432.
- JOLLY C., VOURC'H C., ROBERT-NICOUD M., MORIMOTO R. I., 1999. Intron-independent association of splicing factors with active genes. *J. Cell Biol.* 145, 1133-1143.
- KAIDA D., MOTOYOSHI H., TASHIRO E., NOJIMA T., HAGIWARA M., ISHIGAMI K., WATANABE H., KITAHARA T., YOSHIDA T., NAKAJIMA H., TANI T., HORINOCHI S., YOSHIDA M., 2007. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat. Chem. Biol.* 3, 576-583.
- KIM J., HAN K. Y., KHANNA N., HA T., BELMONT A. S., 2019. Nuclear speckle fusion via long-range directional motion regulates speckle morphology after transcriptional inhibition. *J. Cell Sci.* 132.
- KISS T., 2004. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J. Cell Sci.* 117, 5949-5951.
- KLEIN P., OLOKO M., ROTH F., MONTEL V., MALERBA A., JARMIN S., GIDARO T., POPPLEWELL L., PERIE S., LACAU ST GUILY J., DE LA GRANGE P., ANTONIOU M. N., DICKSON G., BUTLER-BROWNE G., BASTIDE B., MOULY V., TROLLET C., 2016. Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing. *Nucleic Acids. Res.* 44, 10929-10945.
- KO T. K., KELLY E., PINES J., 2001. CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that localizes with SC35 speckles. *J. Cell Sci.* 114, 2591-2603.
- KRAUSE S., FAKAN S., WEIS K., WAHLE E., 1994. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp. Cell Res.* 214, 75-82.
- KRZYZOSIAK W. J., SOBCZAK K., WOJCIECHOWSKA M., FISZER A., MYKOWSKA A., KOZŁOWSKI P., 2012. Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target. *Nucleic Acids. Res.* 40, 11-26.
- KUMAR Y., BHATIA A., MINZ R. W., 2009. Antinuclear antibodies and their detection methods

- in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn. Pathol.* 4, 1. doi: 10.1186/1746-1596-4-1
- LAFARGA M., CASAFONT I., BENGOCHEA R., TAPIA O., BERCIAÑO M. T., 2009. *Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus.* *Chromosoma* 118, 437-443.
- LALLEMAND-BREITENBACH V., DE THE H., 2010. *PML nuclear bodies.* *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. doi: 10.1101/cshperspect.a000661
- LE HIR H., GATFIELD D., BRAUN I. C., FORLER D., IZAURRALDE E., 2001. *The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization.* *EMBO Rep.* 2, 1119-1124.
- LEEUWENHOEK A. V., 1682. *An account of several very curious discoveries about the internal texture of the flesh of muscles, of strange motions in the fins, and the manner of the production of the shells of oysters, &c. made by Mr. Anthony Leuwenhoek fellow of the Royal Society; sent in a letter to R. H. from Delft, and by him exhibited to the said Society.* *Philosop. Collect.* Royal Soc. London 5, 152-160.
- LERNER M. R., STEITZ J. A., 1979. *Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5495-5499.
- LESER G. P., FAKAN S., MARTIN T. E., 1989. *Ultrastructural distribution of ribonucleoprotein complexes during mitosis. snRNP antigens are contained in mitotic granule clusters.* *Eur. J. Cell Biol.* 50, 376-389.
- LI L., ROY K., KATYAL S., SUN X., BLÉOO S., GODBOUT R., 2006. *Dynamic Nature of Cleavage Bodies and Their Spatial Relationship to DD $\times$ 1 Bodies, Cajal Bodies, and Gems.* *Mol. Biol. Cell* 17, 1126-1140.
- LOCKE M., HUIE P., 1977. *Bismuth staining for light and electron microscopy.* *Tissue Cell* 9, 347-371.
- LONG J. C., CACERES J. F., 2009. *The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression.* *Biochem. J.* 417, 15-27.
- MACHYNA M., HEYN P., NEUGEBAUER K. M., 2013. *Cajal bodies: where form meets function.* *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 17-34.
- MAO Y. S., SUNWOO H., ZHANG B., SPECTOR D. L., 2011a. *Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs.* *Nat. Cell Biol.* 13, 95-101.
- MAO Y. S., ZHANG B., SPECTOR D. L., 2011b. *Bio-genesis and function of nuclear bodies.* *Trends Genet.* 27, 295-306.
- MARNEF A., WEIL D., STANDART N., 2012. *RNA-related nuclear functions of human Pat1b, the P-body mRNA decay factor.* *Mol. Biol. Cell.* 23, 213-224.
- MELCAK I., CERMANOVA S., JIRSOVA K., KOBERNA K., MALINSKY J., RASKA I., 2000. *Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs.* *Mol. Biol. Cell* 11, 497-510.
- MELLMAN D. L., GONZALES M. L., SONG C., BARLOW C. A., WANG P., KENDZIORSKI C., ANDERSON R. A., 2008. *A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs.* *Nature* 451, 1013-1017.
- MERMOUD J. E., COHEN P. T. W., LAMOND A. I., 1994. *Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism.* *EMBO J.* 13, 5679-5688.
- MISTELI T., 1998. *Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo.* *J. Cell Biol.* 143, 297-307.
- MISTELI T., CACERES J. F., SPECTOR D. L., 1997. *The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells.* *Nature* 387, 523-527.
- MİYAGAWA R., TANO K., MIZUNO R., NAKAMURA Y., IJIRI K., RAKWAL R., SHIBATO J., MASUO Y., MAYEDA A., HIROSE T., AKIMITSU N., 2012. *Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles.* *RNA* 18, 738-751.
- MOEN JR P. T., JOHNSON C. V., BYRON M., SHOPLAND L. S., DE LA SERNA I. L., IMBALZANO A. N., LAWRENCE J. B., 2004. *Repositioning of Muscle-specific Genes Relative to the Periphery of SC-35 Domains during Skeletal Myogenesis.* *Mol. Biol. Cell* 15, 197-206.
- MOLENAAR C., ABDULLE A., GENA A., TANKE H. J., DIRKS R. W., 2004. *Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells.* *J. Cell Biol.* 165, 191-202.
- MONNERON A., BERNHARD W., 1969. *Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells.* *J. Ultrastruct. Res.* 27, 266-288.
- MOR A., WHITE A., ZHANG K., THOMPSON M., ESPARZA M., MUNOZ-MORENO R., KOIDE K., LYNCH K. W., GARCIA-SASTRE A., FONTOURA B. M., 2016. *Influenza virus mRNA trafficking through host nuclear speckles.* *Nat. Microbiol.* 1, 16069.
- MORRIS G. E., 2008. *The Cajal body.* *Biochim. Biophys. Acta.* 1783, 2108-2115.
- MORTILLARO M. J., 1996. *A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 8253-8257.
- NAKAGAWA S., HIROSE T., 2012. *Paraspeckle nuclear bodies – useful uselessness?* *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3027-3036.
- NAKAGAWA S., IP J. Y., SHIOI G., TRIPATHI V., ZONG X., HIROSE T., PRASANTH K. V., 2012. *Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice.* *RNA* 18, 1487-1499.
- NAKAYASU H., UEDA K., 1984. *Small nuclear RNA-protein complex anchors on the actin filaments in bovine lymphocyte nuclear matrix.* *Cell Struct. Funct.* 9, 317-325.
- NAVASCUES J., CASAFONT I., VILLAGRA N. T., LAFARGA M., BERCIAÑO M. T., 2004. *Reorganization of nuclear compartments of type A neurons of trigeminal ganglia in response to inflammatory injury of peripheral nerve endings.* *J. Neurocytol.* 33, 393-405.
- NIEDOJADLO J., MIKULSKI Z., DELENKO K., SZMIDT-JAWORSKA A., SMOLINSKI D. J., EPSTEIN A. L., 2012. *The perichromatin region of the plant cell nucleus is the area with the strongest co-localisation of snRNA and SR proteins.* *Planta* 236, 715-726.
- NIELSEN J. A., HUDSON L. D., ARMSTRONG R. C., 2002. *Nuclear organization in differentiating oligodendrocytes.* *J. Cell Sci.* 115, 4071-4079.
- NYMAN U., HALLMAN H., HADLACZYK G., PETERSSON I., SHARP G., RINGERTZ N. R., 1986. *Intra-nuclear localization of snRNP antigens.* *J. Cell Biol.* 102, 137-144.
- O'KEEFE R. T., MAYEDA A., SADOWSKI C. L., KRAINER A. R., SPECTOR D. L., 1994. *Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors.* *J. Cell Biol.* 124, 149-160.
- OKADA M., JANG S. W., YE K., 2008. *Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell pro-*

- liferation activities by ALY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8649-8654.
- PASCUAL M., VICENTE M., MONFERRER L., ARTERO R., 2006. *The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing*. *Differentiation* 74, 65-80.
- PEDERSON T., 2011. *The nucleolus*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3. doi: 10.1101/cshperspect.a000638
- PENA E., BERCIAÑO M. T., FERNÁNDEZ R., OJEDA J. L., LAFARGA M., 2001. *Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons*. *J. Comp. Neurol.* 430, 250-263.
- PHAIR R. D., MISTELI T., 2000. *High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus*. *Nature* 404, 604-609.
- PING X. L., SUN B. F., WANG L., XIAO W., YANG X., WANG W. J., ADHIKARI S., SHI Y., LV Y., CHEN Y. S., ZHAO X., LI A., YANG Y., DAHAL U., LOU X. M., LIU X., HUANG J., YUAN W. P., ZHU X. F., CHENG T., ZHAO Y. L., WANG X., RENDTLEW DANIELSEN J. M., LIU F., YANG Y. G., 2014. *Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase*. *Cell Res.* 24, 177-189.
- PIRROTTA V., LI H. B., 2012. *A view of nuclear Polycomb bodies*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 101-109.
- POTASHKIN J. A., DERBY R. J., SPECTOR D. L., 1990. *Differential distribution of factors involved in pre-mRNA processing in the yeast cell nucleus*. *Mol. Cell. Biochem.* 10, 3524-3534.
- PRASANTH K. V., SACCO-BUBULYA P., PRASANTH S. G., SPECTOR D. L., 2003. *Sequential entry of components of gene expression machinery into daughter nuclei*. *Mol. Biol. Cell* 14, 1043-1057.
- PUVION E., VIRON A., ASSENS C., LEDUC E. H., JEANTEUR P., 1984. *Immunocytochemical identification of nuclear structures containing snRNPs in isolated rat liver cells*. *J. Ultrastruct. Res.* 87, 180-189.
- PUVION E., PUVION-DUTILLEUL F., 1996. *Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules*. *Exp. Cell Res.* 229, 217-225.
- QUINODOZ S. A., OLLIKAINEN N., TABAK B., PALLA A., SCHMIDT J. M., DETMAR E., LAI M. M., SHISHKIN A. A., BHAT P., TAKEI Y., TRINH V., AZNAURYAN E., RUSSELL P., CHENG C., JOVANOVIĆ M., CHOW A., CAI L., McDONEL P., GARNER M., GUTTMAN M., 2018. *Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus*. *Cell* 174, 744-757 e724.
- REUTER R., APPEL B., RINKE J., LUHRMANN R., 1985. *Localization and structure of snRNPs during mitosis. Immunofluorescent and biochemical studies*. *Exp. Cell Res.* 159, 63-79.
- RIEDER D., PLONER C., KROGSDAM A. M., STOCKER G., FISCHER M., SCHEIDELER M., DANI C., AMRI E. Z., MÜLLER W. G., McNALLY J. G., TRAJANOSKI Z., 2014. *Co-expressed genes prepositioned in spatial neighborhoods stochastically associate with SC35 speckles and RNA polymerase II factories*. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1741-1759.
- RINO J., CARMO-FONSECA M., 2009. *The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus?* *Trends Cell Biol.* 19, 375-384.
- ROBINSON D. O., WILLS A. J., HAMMANS S. R., READ S. P., SILLIBOURNE J., 2006. *Oculopharyngeal muscular dystrophy: a point mutation which mimics the effect of the PABPN1 gene triplet repeat expansion mutation*. *J. Med. Genet.* 43, e23.
- SACCO-BUBULYA P., SPECTOR D. L., 2002. *Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing*. *J. Cell Biol.* 156, 425-436.
- SAITOH N., SPAHR C. S., PATTERSON S. D., BUBULYA P., NEUWALD A. F., SPECTOR D. L., 2004. *Proteomic analysis of interchromatin granule clusters*. *Mol. Biol. Cell* 15, 3876-3890.
- SAWYER I. A., STURGILL D., DUNDR M., 2019. *Membraneless nuclear organelles and the search for phases within phases*. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 10, e1514.
- SCHMIDT U., RICHTER K., BERGER A. B., LICHTER P., 2006. *In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains*. *J. Cell Biol.* 172, 373-381.
- SCHUL W., VAN DRIEL R., DE JONG L., 1998. *A subset of poly(A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly(A) RNA*. *Exp. Cell Res.* 238, 1-12.
- SEGALAT L., LEPESANT J. A., 1992. *Spatial distribution of the Sm antigen in Drosophila early embryos*. *Biol. Cell* 75, 181-185.
- SELLIER C., RAU F., LIU Y., TASSONE F., HUKEMA R. K., GATTONI R., SCHNEIDER A., RICHARD S., WILLEMSSEN R., ELLIOTT D. J., HAGERMAN P. J., CHARLET-BERGUERAND N., 2010. *Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients*. *EMBO J.* 29, 1248-1261.
- SHEPARD P. J., HERTEL K. J., 2009. *The SR protein family*. *Genome Biol.* 10, 242.
- SHEVTSOV S. P., DUNDR M., 2011. *Nucleation of nuclear bodies by RNA*. *Nat. Cell Biol.* 13, 167-173.
- SHOPLAND L. S., JOHNSON C. V., LAWRENCE J. B., 2002. *Evidence that all SC-35 domains contain mRNAs and that transcripts can be structurally constrained within these domains*. *J. Struct. Biol.* 140, 131-139.
- SHOPLAND L. S., JOHNSON C. V., BYRON M., MCNEIL J., LAWRENCE J. B., 2003. *Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods*. *J. Cell Biol.* 162, 981-990.
- SHORBAGI S., BROWN I. R., 2016. *Dynamics of the association of heat shock protein HSPA6 (Hsp70B') and HSPA1A (Hsp70-1) with stress-sensitive cytoplasmic and nuclear structures in differentiated human neuronal cells*. *Cell Stress Chaperones* 21, 993-1003.
- SKARE P., KREIVI J. P., BERGSTROM A., KARLSSON R., 2003. *Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing*. *Exp. Cell Res.* 286, 12-21.
- SMITH K. P., BYRON M., JOHNSON C., XING Y., LAWRENCE J. B., 2007. *Defining early steps in mRNA transport: mutant mRNA in myotonic dystrophy type I is blocked at entry into SC-35 domains*. *J. Cell Biol.* 178, 951-964.
- SMITH K. P., MOEN P. T., WYDNER K. L., COLEMAN J. R., LAWRENCE J. B., 1999a. *Processing of endogenous pre-mRNAs in association with SC-35 domains is gene specific*. *J. Cell Biol.* 144, 617-629.
- SMITH K. P., MOEN P. T., WYDNER K. L., COLEMAN J. R., LAWRENCE J. B., 1999b. *Processing of endogenous pre-mRNAs in association with*

- SC-35 domains is gene specific. *J. Cell Biol.* 99, 144, 617-629.
- SOBOLEVA T. A., PARKER B. J., NEKRASOV M., HART-SMITH G., TAY Y. J., TNG W. Q., WILKINS M., RYAN D., TREMETHICK D. J., 2017. A new link between transcriptional initiation and pre-mRNA splicing: The RNA binding histone variant H2A.B. *PLoS Genet* 13, doi: 10.1371/journal.pgen.1006633.
- SPECTOR D. L., LAMOND A. I., 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3. doi: 10.1101/cshperspect.a000646.
- SPECTOR D. L., SCHRIER W. H., BUSCH H., 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol. Cell* 49, 1-10.
- SPECTOR D. L., FU X. D., MANIATIS T., 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10, 3467-3481.
- SWIFT H., 1959. *Studies on nuclear fine structure.* Brookhaven Symp. Biol. 12, 134-152.
- SZCZERBAL I., BRIDGER J. M., 2010. Association of adipogenic genes with SC-35 domains during porcine adipogenesis. *Chromosome Res.* 18, 887-895.
- TAN E. M., 1967. Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 800-812.
- TAN E. M., KUNKEL H. G., 1966. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 96, 464-471.
- THIRY M., 1995. The interchromatin granules. *Histol. Histopathol.* 10, 1035-1045.
- TRINKLE-MULCAHY L., 1999. Nuclear organization of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Sci.* 112, 157-168.
- TRIPATHI V., ELLIS J. D., SHEN Z., SONG D. Y., PAN Q., WATT A. T., FREIER S. M., BENNETT C. F., SHARMA A., BUBULYA P. A., BLENCOWE B. J., PRASANTH S. G., PRASANTH K. V., 2010. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* 39, 925-938.
- TWYFFELS L., GUEYDAN C., KRUYSS V., 2011. Shutting SR proteins: more than splicing factors. *FEBS J.* 278, 3246-3255.
- URBANIEK M. O., JAZUREK M., SWITONSKI P. M., FIGURA G., KRZYZOSIAK W. J., 2016. Nuclear speckles are detention centers for transcripts containing expanded CAG repeats. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 1513-1520.
- VAN DER LEE R., BULJAN M., LANG B., WEATHERITT R. J., DAUGHDRILL G. W., DUNKER A. K., FUXREITER M., GOUGH J., GSPONER J., JONES D. T., KIM P. M., KRIWACKI R. W., OLDFIELD C. J., PAPPU R. V., TOMPA P., UVERSKY V. N., WRIGHT P. E., BABU M. M., 2014. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589-6631.
- VELICHKO A. K., MARKOVA E. N., PETROVA N. V., RAZIN S. V., KANTIDZE O. L., 2013. Mechanisms of heat shock response in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4229-4241.
- WAGNER R., 1835. Einige bemerkungen und fragen über das keimbläschen (vesicular germinativa). *Müller's Archiv. Anat. Physiol. Wissenschaft Med.* 268, 373-377.
- WANG K., WANG L., WANG J., CHEN S., SHI M., CHENG H., 2018. Intronless mRNAs transit through nuclear speckles to gain export competence. *J. Cell Biol.* 217, 3912-3929.
- XIE S. Q., MARTIN S., GUILLOT P. V., BENTLEY D. L., POMBO A., 2006. Splicing speckles are not reservoirs of RNA polymerase II, but contain an inactive form, phosphorylated on serine2 residues of the C-terminal domain. *Mol. Biol. Cell* 17, 1723-1733.
- XING Y., JOHNSON C. V., MOEN P. T., MCNEIL J. A., LAWRENCE J. B., 1995. Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC35 domains. *J. Cell Biol.* 131, 1635-1647.
- ZBOREK A., 1987. Związności interchromatynowe. *Postępy biologii komórki* 14, 327-346.
- ZENG C., BERGET S. M., 2000. Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* 20, 8290-8301.
- ZHANG B., ARUN G., MAO Y. S., LAZAR Z., HUNG G., BHATTACHARJEE G., XIAO X., BOOTH C. J., WU J., ZHANG C., SPECTOR D. L., 2012. The lncRNA Malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult. *Cell Rep.* 2, 111-123.
- ZHANG Q., KOTA K. P., ALAM S. G., NICKERSON J. A., DICKINSON R. B., LELE T. P., 2016. Coordinated Dynamics of RNA Splicing Speckles in the Nucleus. *J. Cell Physiol.* 231, 1269-1275.
- ZHOU Z., LUO M. J., STRAESSER K., KATAHIRA J., HURT E., REED R., 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* 407, 401-405.

KOSMOS Vol. 69, 1, 17–35, 2020

ANDRZEJ ANTONI SZCZEPANKIEWICZ

Laboratory of Molecular and Systemic Neuromorphology, Laboratory of Electron Microscopy, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-093 Warszawa, Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, E-mail: a.szczepankiewicz@nencki.edu.pl

NUCLEAR SPECKLES AS MODEL OF NUCLEAR BODIES. NUCLEAR SPECKLES IN THE NERVOUS SYSTEM

Summary

The cell nucleus, apart from heterochromatin, i.e. a complex of DNA and histone proteins, contains structures called nuclear bodies. These small, usually circular objects, “suspended” in nucleoplasm, consist of proteins or proteins and non-coding RNA. Currently, several types of such structures are known. This article presents current state of knowledge about the bodies called nuclear speckles or interchromatin granule clusters. Observed for the first time by Roman y Cajal in neurons, but present in all types of cells, they are considered as storage and modification sites for mRNA splicing factors. The latest research presented in this article suggests that their participation in RNA metabolism is more complex. This is also evidenced by reports of the role of nuclear speckles in hereditary diseases caused by repetitions of trinucleotides, including those with neurological effects.

Key words: cell nucleus, mRNA maturation, mRNA metabolism, mRNA splicing, mRNA transport, nuclear bodies, nuclear speckles, transcription