

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Hudcovic

Úloha fenoménu oddělení fází v kompartmentalizaci RNA polymerázy II v buněčném
jádře

The role of phase separation phenomenon in RNA polymerase II compartmentalization
in the cell nucleus

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Martin Sztacho, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

V první řadě děkuji svému školiteli, Martinu Sztachovi, za cenné připomínky k práci a za trpělivost. Dále děkuji svým rodičům i přátelům za nepřetržitou podporu ve studiu i životě. Jmenovitě děkuji paní Haně Kozákové a Pavlu Cínovi.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. 12. 2024

Tomáš Hudcovic

Abstrakt

Transkripce RNA Pol II neprobíhá rovnoměrně v buněčném jádře, ale je koncentrována do klastrů. Tyto klastry byly pojmenovány jako transkripční továrny. Byly považovány za statické struktury trvale přítomné v jádře, do nichž se přesouvají aktivované geny, aby mohly být přepsány.

Tento pohled doznal změny s rozvojem super-rezoluční mikroskopie, která ukázala, že nejen RNA Pol II, ale i její důležité koaktivátory jako je mediátor nebo protein BRD4 tvoří v jádře klastry, které vznikají a zanikají v časové škále desítek sekund.

Řada proteinů účastnících se transkripce, včetně RNA Pol II, má ve své struktuře vnitřně neuspořádané oblasti, o kterých se předpokládá, že jsou schopné toto klastrování zprostředkovat prostřednictvím fenoménu fázové separace (liquid-liquid phase separation, LLPS). Koncepce fázové separace se v poslední dekádě prosadila v buněčné biologii jako mechanismus tvorby řady tzv. nemembránových organel jako je jadérko, stresová granula a další.

Diskutuji její základní fyzikální principy i poslední vývoj, který se snaží přizpůsobit teorie vzniklé pro relativně jednoduché systémy polymerní chemie pro komplexní prostředí buňky. Mezi tyto modely, které pomáhají k lepšímu porozumění transkripci, patří fázová separace spojená s perkolací a mikrofázová separace.

Klíčová slova: transkripční továrna, transkripční kondenzát, fázová separace, RNA polymeráza II

Abstract

Transcription of RNA Pol II does not occur uniformly in the cell nucleus but is concentrated in clusters. These clusters have been called transcription factories. They were thought to be static structures permanently present in the nucleus into which activated genes move to be transcribed.

This view changed with the development of super-resolution microscopy, which showed that not only RNA Pol II but also its important coactivators such as mediator or BRD4 protein make clusters in the nucleus that form and dissolve on a timescale of tens of seconds.

A number of proteins involved in transcription, including RNA Pol II itself, have intrinsically disordered regions as part of their structure. These are thought to be able to mediate the clustering through the phenomenon of liquid-liquid phase separation (LLPS). The concept of phase separation has gained traction in cell biology in the last decade as a mechanism for the formation of a number of Non-membranous Organelles such as the nucleolus, stress granules and others.

I discuss its basic principles rooted in physics and recent developments that attempt to adapt theories developed for relatively simple polymer chemistry systems to the complex environment of the cell. These models, which help to better understand transcription, include phase separation coupled to percolation and microphase separation.

Keywords: transcription factory, transcription condensate, liquid-liquid phase separation, RNA polymerase II

Obsah

1 Úvod	1
2 Transkripce	2
2.1 RNA Pol II a význam její C-terminální domény.....	2
2.2 Iniclace a jadrový promotor.....	2
2.2.1 Enhancery.....	4
2.3 Elongace.....	6
2.4 Terminace.....	6
3 Kompartimentalizace transkripce	7
3.1 Model transkripčních továren.....	7
3.1.1 Struktura transkripční továrny.....	8
3.1.2 Továrny soustředí několik aktivních genů.....	9
3.2 Dynamické klastry RNA Pol II.....	10
3.2.1 Vlastnosti klastrů RNA Pol II a mediátoru.....	10
4 Mechanismy vedoucí ke kompartmentalizaci transkripce	12
4.1 Imobilizace RNA Pol II na jaderné matrix.....	12
4.2 Klastrování RNA Pol II prostřednictvím oddělení fází.....	14
4.2.1 Fyzikální aspekty oddělení fází v kapalném skupenství.....	14
4.2.2 P granula – prototypická nemembránová organela.....	16
4.2.3 Mezimolekulové interakce klíčové pro oddělení fází.....	17
4.2.4 Role solvatace.....	19
4.2.5 Role RNA.....	21
4.2.6 Fázová separace spojená s perkolací.....	22
4.2.7 Vícesložkové kondenzáty.....	23
5 Závěr	26
6 Seznam použité literatury	27

1 Úvod

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o kompartmentalizaci aktivně transkribující RNA polymeráza II (RNA Pol II) a vybraných transkripčních faktorů (mediátor) v jádře eukaryotických buněk. Tyto poznatky byly shromážděny především s využitím mikroskopických technik. Zpočátku především konfokální a elektronové mikroskopie; značného pokroku však bylo dosaženo až s rozvojem super-rezolučních metod a metod sledujících jednotlivé molekuly (*single molecule tracking*, SMT).

Nejprve se věnuji staršímu modelu tzv. „transkripčních továren“ (*transcription factories*). Tento model předpokládá stabilně ukotvené RNA Pol II okolo proteinového jádra, které obsahuje potřebné transkripční faktory. Předpokládá se, že právě díky zvýšené koncentraci transkripčních faktorů dochází v továrnách k efektivnímu přepisu.

Výše zmíněný rozvoj na poli mikroskopických metod, včetně přípravy nových fluoroforů, pomohl odhalit mnohem větší dynamičnost klastrování RNA Pol II a jejich transkripčních faktorů během fáze iniciace transkripce, než předpokládal model statických transkripčních továren. Toto lze vysvětlit pomocí fenoménu fázové separace (*liquid–liquid phase separation*, LLPS), který je známý z fyziky tzv. *soft-matter*. materiállové vědy s jehož pomocí se biologové v posledních letech snaží vysvětlit vznik celé řady tzv. nemembránových organel v buňkách. Kromě LLPS se však v buňkách pravděpodobně uplatňují i další modality oddělení fází. Popsat jak a do jaké míry se oddělení fází, potažmo LLPS, uplatňuje při organizaci transkripce je dalším cílem této práce.

2 Transkripce

Transkripce se tradičně rozděluje do tří fází, iniciace, elongace a terminace. Mezi iniciací a elongací ještě navíc dochází k zastavení RNA Pol II v blízkosti promotoru a čekání na regulační signál pro elongaci (*proximal promoter pausing*). Tato pauza má regulační význam; často zde dojde k předčasné terminaci (Krebs et al., 2017). Přejechy mezi fázemi jsou komplexně regulovány velkým počtem faktorů. V následujícím odstavci stručně popisují ty, nutné pro efektivní přepis většiny genů transkribovaných RNA Pol II, což jsou především protein kódující geny, ale i některé nekódující RNA jako lncRNA (long non-coding RNA) (Girbig et al., 2022), miRNA (micro RNA) (Lee et al., 2004) a většina snRNA (small nuclear RNA) (James Faresse et al., 2012).

2.1 RNA Pol II a význam její C-terminální domény

Eukaryotická RNA Pol II je vysoce procesivní enzymatický komplex skládající se z 12 podjednotek, z nichž za pozornost stojí ta největší, RPB1. RPB1 má flexibilní nestrukturovanou doménu na svém C-konci (C-terminální doména RNA Pol II, značím Pol II^{CTD}). V lidských buňkách je tato doména složena z 52 repetitivních konsenzuálních sekvencí Tyr 1-Ser 2-Pro 3-Thr 4-Ser 5-Pro 6-Ser 7. Post-translační modifikace Pol II^{CTD} mají jednak regulační význam, podílí se na přechodu mezi fázemi transkripce, jednak pomáhají rekrutovat komplexy upravující nascentní RNA. U savců je tato sekvence silně konzervována v proximální části Pol II^{CTD} (blíže ke katalytické doméně), naopak v distální části dochází k odchylkám od kanonické sekvence, což dále rozšiřuje repertoár možných modifikací a tedy i komplexitu regulací (shrnuto v Harlen & Churchman, 2017). Typickou modifikací je fosforylace; Pol II^{CTD} polymerázy nasedající na promotor je hypofosforylovaná, při uvolnění z promotoru je fosforylován Ser 5 (dále značím jako pSer, phospho-serine apod.), elongující Pol II je charakteristická pSer 2 (Komarnitsky et al., 2000).

2.2 Iniciace a jádrový promotor

Takzvaný jádrový promotor (core promoter) je úsek DNA na začátku genu na kterém se vazbou obecných transkripčních faktorů (GTFs) vytváří preiniciační komplex (PIC), který orientuje a aktivuje RNA Pol II. *In vitro* je jádrový promotor dostačující k zajištění bazální úrovně transkripce v přítomnosti GTFs a RNA Pol II. Sestává z počátku transkripce (transcription start site, TSS) a kombinace různých sekvenčních elementů jako jsou TATA box, iniciátor (Inr), BRE (TFIIB recognition element), DCE (downstream core elements), DPE (downstream promoter element) a řada dalších (Haberle & Stark, 2018). Nejhojněji

zastoupeným elementem v promotorech lidských buněk je Inr, jehož součástí bývá počátek transkripce (Vo ngoc et al., 2017). Každý z výše uvedených sekvenčních elementů se vyskytuje v některých, ale ne ve všech jádrových promotorech; nejspíš tedy neexistují elementy univerzální pro všechny promotory (Butler & Kadonaga, 2002).

Promotory lze rozdělit podle toho, jak přesně definovaný počátek transkripce obsahují na „zhuštěné“ (*focused*) a „rozptýlené“ (*dispersed*) (Haberle & Stark, 2018). Zhuštěné zpravidla obsahují pouze jeden TSS, kdežto rozptýlené celou řadu na relativně dlouhém úseku DNA. Zhuštěné promotory mívají jasně definovaný, silný TATA box a často kontrolují vývojově důležité geny, kdežto rozptýlené promotory bývají bez TATA boxu, bývají bohaté na ostrovy CpG a kontrolují spíše konstitutivně exprimované *housekeeping* geny (Haberle & Stark, 2018).

Sestavení PIC na jádrovém promotoru podle klasického modelu předpokládá postupnou vazbu jednotlivých GTFs v následujícím pořadí: TBP už asociovaný s TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF asociovaný s RNA Pol II a pak TFIIE a TFIIH (Sainsbury et al., 2015).

TBP se váže na promotor jako součást TFIID bez ohledu na přítomnost TATA boxu, zatímco jiné podjednotky TFIID interagují s Inr elementem a DPE (Patel et al., 2020). Vazba ostatních obecných transkripčních faktorů má spíše stabilizační funkci. Až na poslední faktor TFIIH, který je při dokončení sestavení PIC stimulován mediátorem k fosforylaci Ser 5 na Pol II^{CTD} (kinázová podjednotka CDK7) a rozvinutí promotorové DNA pomocí dvou helikázových podjednotek XPB a XPD. Tyto děje umožní RNA Pol II tzv. uniknout z promotoru a zahájit elongaci.

pSer 5 na Pol II^{CTD} mimo jiné rekrutuje komplex čepičkových enzymů, který opatří 5' konec pre-mRNA m⁷G čepičkou.

Kromě několika GTFs je eukaryotická transkripce regulována plejádami transkripčních faktorů (TF) specifických pro určité skupiny genů. Nedávná analýza určila počet lidských TF na více než 1600 (Lambert et al., 2018). Mezi další způsoby regulace transkripce patří remodelace nukleozomů, modifikace histonů, tvorba chromatinových smyček a působení nekódujících RNA i dalších proteinů jako jsou koaktivátory, korepresory, vazba CTCF na inzulátory a v neposlední řadě i klastrování či tvorba kondenzátů, které jsou předmětem této práce.

Regulační *cis*-elementy (*cis*-regulatory elements, CREs) rozpoznávané TF se nachází v různých sekvenčních vzdálenostech od promotoru. Ve starší literatuře jsou právě z hlediska lineární vzdálenosti regulační elementy děleny na k promotoru proximální, distální (řádově stovky až tisíce bp upstream od promotoru) a enhancery (řádově desítky tisíc bp od

promotoru) (Dolores Delgado & León, 2006). Moderní genomické přístupy využívají k hledání potenciálních regulačních *cis*-elementů kombinaci přístupnosti oblasti pro DNázu I a přítomnosti histonových modifikací (ENCODE Project Consortium et al., 2020). Na základě těchto vlastností byly popsány, kromě „promotoru podobným oblastem“ kolem počátků transkripce, také proximální (do vzdálenosti dvou tisíc bp od TSS) a distální „enhanceru podobné elementy“ (ENCODE Project Consortium et al., 2020).

Efektivní iniciace vyžaduje úsek DNA bez nukleozomů (NDR – *nucleosome depleted region*), aby byl promotor přístupný pro transkripční faktory i RNA Pol II. NDRs mívají na obou svých hranicích nukleozomy se specifickými modifikacemi (někdy označované jako +1, resp. –1 nukleozomy). Jde o modifikace na histonu H3 a to o acetylaci lysinu 27 (H3K27ac) v kombinaci s trimetylací lysinu 4 (H3K4me3) (Zhao et al., 2021). Na obou hranicích NDR mohou být přítomny aktivní jádrové promotory v protilehlé orientaci, z nichž jeden řídí tvorbu mRNA a z druhého se tvoří krátké nekódující RNA (uaRNA – *upstream antisense RNA*) (Duttke et al., 2015). Tyto antisense transkripty jsou velmi brzy degradovány v jaderném RNA exosomu; studie vybraných čtyř uaRNA v myších embryonálních kmenových buňkách (mESC) stanovila průměrný poločas jejich rozpadu na 18 min (Flynn et al., 2011).

2.2.1 Enhancery

Klíčovými *cis*-regulačními elementy pro stimulaci transkripce *in vivo* jsou už zmíněné enhancery. Původně byly popsány jako krátké regulační sekvence, které stimulují transkripci svého příslušného genu bez ohledu na pozici, orientaci a vzdálenosti vůči němu (Banerji et al., 1981). Mohou se nacházet i v blízkosti promotoru, často jsou však od vzdáleny desítky nebo i stovky tisíc bp ve smyslu lineární sekvence. V prostoru jádra se však dostávají do blízkosti promotoru, například prostřednictvím chromatinových smyček, a regulují transkripci např. vazbou přes mediátor.

Aktivní enhancery jsou charakteristické specifickými modifikacemi histonů, jmenovitě jde o monometylaci lysinu 4 (H3K4me1) a acetylaci lysinu 27 na histonu H3 (H3K27ac) (Creyghton et al., 2010). Podobně jako u promotorů byla též na aktivních enhancerech identifikována oboustranná transkripce (Kim et al., 2010). Touto transkripcí vznikají krátké enhancerové RNA (eRNA) o střední délce okolo 1000 bp (Schwalb et al., 2016).

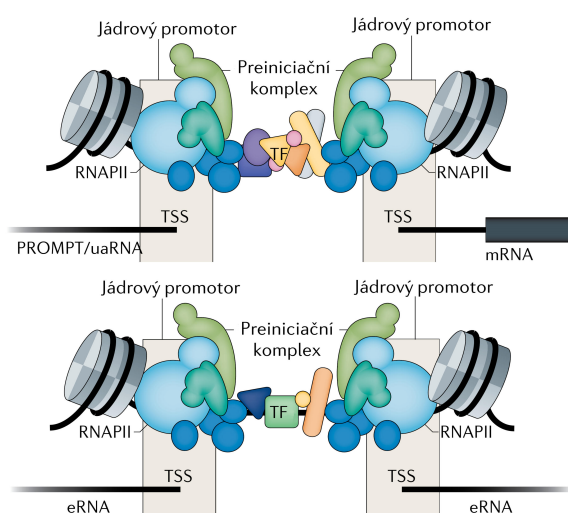
Jako super-enhancery se označují klastry několika enhancerů charakteristické neobvykle vysokou koncentrací transkripčních faktorů, v důsledku čehož stimulují transkripci silněji než typické enhancery. V myších embryonálních kmenových buňkách (mESC) se enhancery i super-enhancery vyznačují vazbou pěti transkripčních faktorů OCT4 (octamer-binding

transcription factor 4), SOX2 (sex determining region Y box 2), NANOG (Homeobox protein Nanog), KLF4 (Krüppel-like factor 4) a ESRRB (Estrogen-related receptor beta), super-enhancery jsou pak zvláště nabohacené o KLF4 a ESRRB (Whyte et al., 2013). Tyto faktory mají zásadní podíl na udržování pluripotence kmenových buněk. Je také zajímavé, že geny těchto faktorů jsou samy aktivovány super-enhancery.

V rakovinných buňkách je součástí komplexů enhancerů transkripční koaktivátor BRD4 (*Bromodomain-containing protein 4*) (Lovén et al., 2013).

Vazbu mezi TF na enhancerech a preiniciačním komplexem na promotoru zprostředkovává proteinový komplex zvaný mediátor, který zde figuruje v roli transkripčního koaktivátoru. Lidský mediátor je obrovský (cca 1,4 MDa) proteinový komplex složený z 26 podjednotek, z nichž několik zahrnuje polypeptidové úseky, které nezaujmají stabilní prostorovou konformaci (*intrinsically disordered regions*, IDRs), což se také označuje jako vysoká míra vnitřní neuspořádanosti (Richter et al., 2022). Množství mediátoru navázaného na super-enhancerech je o řád vyšší než u běžných enhancerů (Whyte et al., 2013).

Vazba mediátoru do PIC stimuluje kinázovou podjednotku TFIIF (cyklin-dependentní kináza 7, CDK7) k fosforylaci Pol II^{CTD}, což vede k úniku RNA Pol II z promotoru (Kim et al., 1994). K efektivitě fosforylace přispívá to, že mediátor váže Pol II^{CTD} tak, že se dostává do blízkosti CDK7 (Chen et al., 2021). Kromě toho mediátor také pravděpodobně stabilizuje TFIIF v takové pozici, že to helikáze XPB (xeroderma pigmentosum typ B) umožní rozvinout DNA promotoru (Chen et al., 2021).



Obrázek 1: Schematické znázornění aktuální představy uspořádání transkripčního aparátu na promotorech a enhancerech. Zdůrazňuje podobnosti mezi promotory a enhancery. Mezi rozdíly pak patří například modifikace histonů (více v textu).

Převzato a upraveno z (Andersson & Sandelin, 2020)

2.3 Elongace

V savčích buňkách se RNA Pol II po úniku z promotoru typicky zastaví po přepsání několika desítek nukleotidů a čeká na další regulační signály. Tento stav se označuje jako „čekání v blízkosti promotoru“ (*proximal promotor pausing*) a je nejspíše vyvolán lokálními vlastnostmi sekvence DNA (Imashimizu et al., 2013) a dále stabilizován negativním elongačním faktorem (NELF) a faktorem indukujícím citlivost k 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazolu (DSIF) (Vos et al., 2018). K přechodu do procesivní fáze elongace vyžaduje čekající polymeráza aktivitu pozitivního transkripčně-elongačního faktoru b (P-TEFb). P-TEFb je cyklin-dependentní kináza s kinázovou podjednotkou CDK9, která fosforyluje Pol II^{CTD} na Ser 2 (Mayfield et al., 2019) a také faktory NELF a DSIF. Fosforylace vede k disociaci NELF z komplexu s RNA Pol II a změně aktivity DSIF z neaktivního na pozitivní elongační faktor, který dále zůstává navázaný na elongující RNA Pol II (Yamada et al., 2006).

Je pravděpodobné, že post-translační modifikace Pol II^{CTD} se podílí i na propojení elongace se sestřihem vznikající pre-mRNA. Bylo popsáno propojení mezi RNA Pol II a U2 snRNP, klíčovou komponentou spliceosomu, zprostředkované pSer 2 Pol II^{CTD} a sestřihovým faktorem U2AF (U2 snRNP auxiliary factor) (Gu et al., 2013).

2.4 Terminace

Terminace je spojena s přepsáním sekvence polyadenylačního signálu, následným odštěpením nascentní RNA od polymerázy a syntézou 3' polyA konce.

Tyto procesy zajišťuje proteinový komplex CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) vážící se na polyA signál v sekvenci pre-mRNA. Komplex se skládá ze tří funkčních modulů: nukleázového, polyA polymerázového a fosfatázového (Casañal et al., 2017). První dva jmenované upravují pre-mRNA; třetí defosforyluje pSer 2 a pTyr 1 na Pol II^{CTD}.

V současnosti se terminace popisuje na základě sjednocení dvou starších modelů, alosterického a torpédového (Eaton & West, 2020). Po odštěpení RNA dojde k defosforylaci elongačního faktoru DSIF na jeho regulační podjednotce SPT5 prostřednictvím protein fosfatázy PNUTS-PP1, což alostericky vyvolá konformační změny v RNA Pol II a zpomalí ji. Zbytek RNA, který je stále asociovaný s polymerázou, je štěpen procesivní 5'–3' exoribonukleázou XRN2, o které se někdy hovoří jako o pomyslném „torpédu“, které když dožene zpomalenou polymerázu, způsobí její vyvázání z DNA. (Eaton & West, 2020)

3 Kompartimentalizace transkripce

Intuitivní výchozí nulová hypotéza je pohlížet na transkripci jako na stochastickou událost: aktivovaný transkripční faktor difunduje skrze jádro a náhodně se srazí s příslušnou regulační sekvencí DNA, obdobně se připojí RNA polymerázou, koaktivátory atd., dokud se nesestaví preiniciační komplex. Následně se syntetizující polymeráza začne pohybovat po DNA jako po kolejnici. Tento model odpovídá slavným Millerovým pozorováním aktivně transkribovaných rRNA genů izolovaných z oocytů obojživelníků, na kterých je patrná centrální linie DNA dekorovaná RNA polymerázami s ribonukleoproteinovými vlákny s jedním volným koncem (Miller & Beatty, 1969).

Alternativní model, tedy že RNA Pol II by mohla být imobilizovaná na nějaké stabilní struktuře v jádře a templátová DNA vůči ní pohyblivá, navrhuji v laboratoři Petera R. Cooka v 80. letech. V jejich raném modelu byla jednak upevněná sama polymeráza, ale také předpokládali upevnění obou konců nascentní RNA ke komplexu transkribující polymerázy (Jackson et al., 1981).

3.1 Model transkripčních továren

Termín „transkripční továrna“ pochází z práce Jacksona et al. (1993) jako analogie k dříve popsaným „replikčním továrnám“ – specifickým místům replikace DNA dříve popsaných v HeLa buňkách (Hozák et al., 1993). Termín replikační továrna byl přejat z virologie (Papantonis & Cook, 2013), kdy takto byla nazvána místa replikace viru vakcinie v buněčném jádře (Dales, 1963).

Jackson et al. (1993) pozorovali, že nascentní RNA v jádrech fixovaných HeLa buněk není rozprostřena rovnoměrně, ale ve shlucích. Nascentní RNA značili Br-UTP (bromouridintrifosfát) v buňkách uzavřených v agarózových kuličkách, což zabránilo vysrážení chromatinu a permeabilizovaných ve „fyziologickém pufru“. Toto experimentální uspořádání umožnilo inkorporaci Br-UTP v podmínkách, o nichž autoři předpokládali, že se blíží k podmínkám fyziologickým. Následně byly buňky fixovány a Br-UTP značka byla imunofluorescenčně obarvena. Při pozorování konfokálním mikroskopem autoři odhadli počet RNA shluků mimo jádérko na 300 – 500 na jedno jádro. Na základě analýzy intenzity fluorescence shluků odhadli počet RNA Pol II na ~60 na shluk. Autoři vyslovují domněnku, že tyto shluky by mohly být specializovaná místa transkripce a nazývají je „transkripční továrny“ (Jackson et al., 1993).

Wansink et al. (1993) použili také značení nascentní RNA Br-UTP, ale mikroinjikovali analog báze přímo do buněk lidských kožní fibroblastů. Po 15min. inkubaci, permeabilizaci a

imunoznačení pozorovali v jádře velice jasně oddělené shluky RNA. Jejich přesnou kvantifikaci se nezabývali, ale odhadli jejich počet na více než 100. Stejně jako u Jacksona et al. (1993), ani zde nedocházelo za daných experimentálních podmínek ke značení jádérka. K označení jádérka došlo pouze při mikroinjikaci bázevého analogu společně s α -amanitinem, zároveň ale nebyl pozorován významný příspěvek RNA Pol III transkripce k pozorovanému množství transkriptů (Wansink et al., 1993).

Analýza kolokalizace nascentních RNA transkriptů a RNA Pol II s využitím transmisní elektronové mikroskopie potvrdila, že se shluky transkriptů skutečně nacházejí v těsné blízkosti RNA Pol II (Iborra et al., 1996). Iborra et al. (1996) popsali dvě populace molekul RNA Pol II přítomné v jádře: rozptýlené volné molekuly a molekuly kolokalizující s transkripty. Stereologickými výpočty ze snímků z elektronového mikroskopu určili počty klastrů transkriptů v rozsahu 2 000–2 700 na jádro HeLa buňky. Typický klastr měl průměr 71 nm a jeho součástí byly alespoň 4 polymerázy. Protože po určité době inkubace se už nezvyšoval počet klastrů, pouze počet značek na klastr, usoudili autoři, že se jim zvolenou metodikou podařilo zachytit většinu míst aktivní transkripce (Iborra et al., 1996).

Některé z transkriptů detekovaných v nukleoplazmě v předchozích pracích představují produkty RNA Pol III. V jádrech HeLa buňek bylo stereologickými výpočty z kryořezů analyzovaných elektronovým mikroskopem spočteno ~8000 klastrů RNA produktů Pol II a ~1800 klastrů produktů Pol III (Pombo, 1999).

Z výsledků zde prezentovaných je patrné, že kromě očekávané variability v počtu továren napříč buněčnými typy, existuje i variabilita v závislosti na zobrazovací metodě. Nicméně lze předpokládat, že počty získané elektronovou mikroskopií jsou nejpřesnější, neboť to byla metoda poskytující v té době nejvyšší rozlišení.

3.1.1 Struktura transkripční továrny

Na základě odhadů počtu molekul RNA pol II, počtu a průměru klastrů transkriptů a dalších parametrů byl navržen model, kdy několik polymeráz imobilizovaných na periférii transkripční továrny produkuje RNA směrem dovnitř (Jackson et al., 1998). Tato představa byla záhy korigována pomocí elektronové spektroskopické mikroskopie (*electron spectroscopic imaging*) (Eskiw et al., 2008; Eskiw & Fraser, 2011). Při elektronové spektroskopické mikroskopii je využit transmisní elektronový mikroskop, ale vzorek není značen protilátkami konjugovanými s kovovými částicemi, ale využívá se toho, že odlišné atomy biomolekul různou měrou rozptylují dopadající elektrony (Papantonis & Cook, 2013). Analýzou signálu z těchto rozptýlených elektronů je možné rozlišit atomy fosforu a dusíku ve

vzorku; o oblastech bohatých na dusík se předpokládá, že v nich převažují proteiny; v oblastech bohatých na fosfor zase nukleové kyseliny a nukleozomy vykazují kombinaci obou signálů (Papantonis & Cook, 2013). Touto metodou bylo tedy zjištěno, že jádro transkripční továrny v HeLa buňkách je bohaté na proteiny; v tomto jádře bylo pozorováno několik fosforových granul, která pravděpodobně reprezentují templátovou DNA nebo transkript (Eskiw et al., 2008). Tato zjištění jsou konzistentní s lokalizací aktivních RNA Pol II na okraji továren.

Proteinové jádro transkripčních továren bylo potvrzeno také v myších erytroblastech (Eskiw & Fraser, 2011). Zde byly také pozorovány specializované továrny transkribující geny regulované transkripčním faktorem Krüppel-like faktorem 1 (KLF1). Továrny koncentrovaly tento transkripční faktor a oproti průměru vykazovaly větší velikost (Eskiw & Fraser, 2011).

3.1.2 Továrny soustředí několik aktivních genů

Na základě počtu transkripčních továren RNA Pol II v HeLa buňkách (několik tisíc na jádro) a odhadu počtu transkripčních jednotek se lze domnívat, že několik aktivních genů by mohlo sdílet jednu továrnu (Jackson et al., 1998).

Kolokalizace dvou silně přepisovaných genů pro podjednotky hemoglobinu, globiny α (Hba) a β (Hbb-b1), byla popsána v myších erytroblastech s pomocí elektronové mikroskopie (Eskiw & Fraser, 2011). Eskiw a Fraser (2011) detekovali transkripty těchto dvou genů *in situ* hybridizací oligonukleotidovými sondami, které mohly být sekundárně označeny protilátkami se zlatými částicemi. Továrna, do níž oba transkripty kolokalizovaly, byla určena pouze na základě specifického vyššího obsahu dusíku, jak umožňuje elektronová spektroskopická mikroskopie.

V jedné transkripční továrně spolu mohou kolokalizovat geny na různých chromosomech, což bylo demonstrováno v myších B-lymfocytech, kdy po aktivaci genů skupiny *Myc* na chromosomu 15 tento lokus lokalizoval do továrny, ve které byly transkribovány geny pro těžké řetězce imunoglobulinů (značen transkript *Igh* μ) nacházející se v lokusu na chromosomu 12 (Osborne et al., 2007).

Kolokalizace aktivně přepisovaných genů byla také popsána i v rámci jednoho chromozomu, a to v buňkách izolovaných ze sleziny myší s fenylyhydrazinem indukovanou anémií, kde gen pro globin β kolokalizoval s RNA Pol II a dalším genem na chromozomu 7, genem pro hemoglobin stabilizující protein alfa (*Ahsp*, též značen *Eraf*) (Osborne et al., 2004).

3.2 Dynamické klastry RNA Pol II

Převrat na poli výzkumu uspořádání transkripce v jádrech živých buněk představují super-rezoluční mikroskopické techniky postupně zobrazující jednotlivé molekuly (jako je PALM, *photoactivated localization microscopy* nebo dSTORM, *direct stochastic optical reconstruction microscopy*), které jsou schopné dostatečného prostorového i časového rozlišení, aby zachytily nejen prostorové uspořádání RNA Pol II v jádře, ale i časovou dynamiku tohoto uspořádání.

První takové využití zmíněných technik v kontextu transkripce bylo popsání nečekaně rychlého klastrování endogenně exprimované RNA Pol II značené fluorescenčním proteinem Dendra2 v osteosarkomových buňkách U2OS (Cisse et al., 2013). Průměrný odhadovaný poloměr klastrů v těchto buňkách byl 220 (± 17) nm a jejich průměrná doba života byla 5,1 ($\pm 0,4$) s, kdy její horní hranice nepřesáhla 30 s. Stimulace transkripce sérem vedla ke zvětšení klastrů a zvýšení jejich průměrné doby života o řád na 48 (± 9) s, což ukazuje na vztah mezi transkripční aktivitou a chováním klastrů. Takto rychle zanikající klastry jsou v rozporu s představou polymeráz imobilizovaných v transkripčních továrnách, o nichž se předpokládalo, že jde o struktury trvale přítomné v jádře (Papantonis & Cook, 2013).

Zde poznamenávám, že použitá technika PALM v živých buňkách detekuje vždy pouze frakci cílových molekul a tedy nevypovídá o celkových počtech, ale spíše o dynamice pozorovaných molekul (Cisse et al., 2013).

Navazující studie v myších embryonálních fibroblastech potvrdila jednak relativně krátkou dobu života klastrů RNA Pol II a jednak souvislost s prodloužením jejich doby života v závislosti na transkripční aktivitě (Cho et al., 2016). V této studii byla kromě klastrů RNA Pol II sledována také produkce pre-mRNA β -aktinového genu pomocí MS2 reportérového systému. Při stimulaci sérem vzrostla průměrná doba života klastrů RNA Pol II z $\sim 6,9$ s na 24 s, nezměnila se však ani velikost klastrů, ani frekvence jejich tvorby. Zvýšení doby života klastrů RNA Pol II koreluje se zvýšením počtu transkriptů (Cho et al., 2016).

3.2.1 Vlastnosti klastrů RNA Pol II a mediátoru

Kromě klastrů RNA Pol II byly v myších embryonálních kmenových buňkách popsány klastry mediátoru (Cho et al., 2018). Jak mediátor, tak RNA Pol II tvořily dvě populace klastrů: malé (~ 100 nm) a nestabilní (doba života řádově ~ 10 s) a velké (> 300 nm) a stabilní přítomné během celé doby akvizice snímků. Velké klastry RNA Pol II a mediátoru vzájemně kolokalizovaly.

Inhibice CDK9, tedy zablokování přechodu do elongace, vedlo k přechodnému vymizení stabilních klastrů RNA Pol II, po odmytí inhibitoru se klastry opět objevily; klastry mediátoru nebyly tímto ovlivněny (Cho et al., 2018). Tyto výsledky opět nepřímou naznačují, že klastry představují polymerázu ve fázi iniciace.

Cho et al. (2018) také získali několik nepřímých důkazů, že klastry RNA Pol II i mediátoru mají vlastnosti svědčící o jejich kapalném charakteru. Jmenovitě pozorovali koalescenci klastrů v jádrech živých buněk, jejich rozpuštění působením 1,6-hexandiolu a rychlou obnovu velké části molekul ve FRAP experimentu – 60 % molekul mediátorového klastru a 90 % klastru polymerázy bylo obnoveno během ~10 s (Cho et al., 2018).

1,6-hexandiol je alifatický alkohol, který rozpouští kapalně kondenzáty. Předpokládá se, že narušuje nespecifické interakce mezi IDRs proteinů v kondenzátu a jedná se o rozšířený test toho, zda určitý klastr vzniká prostřednictvím oddělení kapalných fází (Kroschwald et al., 2017). Jeho použití v *in vitro* systémech je nejspíše bezproblémové, nicméně při použití na živé buňky má vedlejší účinky: mění morfologii buněčných membrán (Kroschwald et al., 2017), zvyšuje propustnost jaderné membrány, protože FG repetice uvnitř jaderných pórů také tvoří oddělenou kapalnou fázi (Shulga & Goldfarb, 2003; Patel et al., 2007), výrazně snižuje kinázovou aktivitu CDK9 (Düster et al., 2021) a snižuje pohyblivost a zvyšuje lokální kompaktnost chromatinu (Itoh et al., 2021).

Někteří autoři zdůrazňují, že experimenty využívající FRAP vypovídají především o pohyblivosti sledovaných molekul a považují ho za nedostatečný nástroj k určení kapalně povahy klastru v buňce, nicméně jde o v literatuře rozšířený test LLPS (McSwiggen et al., 2019).

Delší doba života klastrů RNA Pol II, která zjevně koresponduje s transkripčně permisivním stavem genu je konzistentní s poznatkem, že RNA Pol II elongují blízko za sebou v tzv. „konvojích“ na HIV-1 promotoru (Tantale et al., 2016). Dynamika tvorby konvojů je ovlivněna mediátorem: při knock-outu mediátoru bylo méně polymeráz v konvoji a s většími rozestupy (Tantale et al., 2016).

Domnívám se, že výše popsané klastry RNA Pol II představují iniciační kondenzáty, které jsou stabilizovány na k transkripci permisivních genech a během své doby života umožňují kontinuální sestavování preiniciačních komplexů, což se následně projevuje v podobě konvojů polymeráz.

4 Mechanismy vedoucí ke kompartmentalizaci transkripce

V této sekci představuji vybrané mechanismy, které byly navrženy jako ty, jež se podílejí na kompartmentalizaci procesu transkripce. Měly by tedy být schopné vysvětlit pozorování popsána v předchozí sekci „3 Kompartmentalizace transkripce“. Většina z nich uplatňuje fyzikální princip tzv. oddělení kapalných fází v kapalině (jako synonymum budu používat i označení „fázová separace“ či angl. zkratku LLPS – *liquid-liquid phase separation*). V úvodu však popisují i starší modely, které předpokládaly uchycení aktivně transkribujícího komplexu v jádře na stabilní matici.

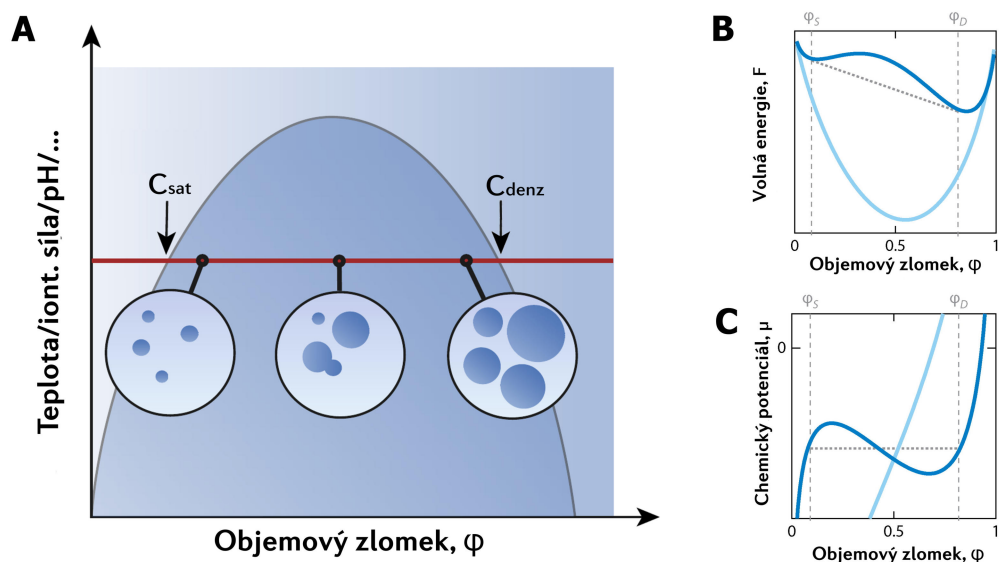
4.1 Imobilizace RNA Pol II na jaderné matrix

V raných studiích popisující transkripční továrny se předpokládá, že RNA Pol II je spolu s transkripčními faktory uchycena na proteinové „substrukturu“, kterou označují jako jaderná matrix (Jackson et al., 1981, 1993). O matrix se předpokládalo, že jde o jakési rozvětvené lešení, které je stabilně přítomno v jádře a zprostředkovává jeho kompartmentalizaci.

Od počátku byl termín „jaderná matrix“ používán pro reziduální frakci přítomnou v buněčných jádrech po extrakci chromatinu (Berezney & Coffey, 1974). Připadá tak v úvahu možnost, že se jedná o artefakt izolačních metod, jako je působení DNázy I či podmínek podporující srážení jaderného materiálu, jako je vysoká koncentrace solí (Berezney & Coffey, 1974; Pederson, 2000).

Jaderná matrix je bohatá na proteiny a RNA; obsahuje zbytková jádérka, laminu a jaderné póry (Davie, 1997). Jako součást matrix byla popsána vlákna citlivá k RNáze A (He et al., 1990), mohlo by tak jít o vlákna tvořená ribonukleoproteiny jako jsou proteiny jádérka, ribozomální podjednotky a primární transkripty (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, hnRNPs) (Bihani et al., 2023). Jiný model předpokládal, že strukturní materiál matrix tvoří „kanály“ od jaderného póru dovnitř, skrze chromatin (Razin & Gromova, 1995). Takový kanál měl usnadnit difuzi ribonukleoproteinů ven z jádra a při podmínkách izolace by se strukturní elementy vysrážely společně s ribonukleoproteiny do síťovité struktury.

Skutečnost, že jaderná matrix nebyla vizualizována *in vivo* a na snímcích z elektronové mikroskopie nebyla pozorována v neextrahovaných jádrech, přispívá k přesvědčení, že se skutečně jednalo o artefakt (Pederson, 2000).



Obrázek 2: (A) Schematické znázornění fázového diagramu pro binární směs rozpouštěné (bio)makromolekuly a rozpouštědla. Na vodorovné ose je znázorněno složení směsi, zde objemovým zlomkem, na svislé ose je vynesena některá ze stavových veličin, např. teplota. Šedá křivka vyznačující tmavší plochu představuje koexistenční neboli binodální křivku. Platí předpoklad, že systém je v termodynamické rovnováze, proto sledujeme chování při konstantní zvolené stavové veličině, to je znázorněné červenou vodorovnou čarou. Na této linii leží tzv. konoda (angl. tie line), úsečka, protínající oblast dvoufázového režimu, jejíž krajní body leží na koexistenční křivce (není explicitně znázorněna, leží na červené linii, jejími krajními body jsou C_{sat} a C_{denz}). Kruhové výřešky znázorňují nárůst objemu denzní fáze při zvýšení celkové koncentrace makromolekuly v systému.

C_{sat} – saturační koncentrace, koncentrace ve zředěné fázi; C_{denz} – koncentrace v denzní fázi.

(B) Schematické znázornění průběhu volné energie systému v závislosti na objemovém zlomku rozpouštěné makromolekuly. Světle modrá křivka popisuje systém bez interakcí mezi makromolekulami a má unimodální průběh. Tmavě modrá křivka popisuje systém v němž dochází k fázové separaci v důsledku příznivějších interakcí mezi makromolekulami, než mezi makromolekulami a rozpouštědlem. Minima odpovídají dvěma odděleným, stabilním fázím.

φ_S – saturační koncentrace vyjádřená objem. zlomkem; φ_D – koncentrace v denzní fázi vyjádřená objem. zlomkem; φ_S a φ_D korespondují C_{sat} a C_{denz} na grafu (A).

(C) Schematické znázornění průběhu chemického potenciálu rozpouštěné makromolekuly.

Tmavě modrá křivka opět popisuje systém s příznivějšími homotypickými interakcemi. Chemický potenciál zde má nemonotónní průběh, a tedy existují dvě různé koncentrace se stejným chem. potenciálem. Tyto odpovídají zředěné a denzní fázi. Světle modrá křivka popisuje systém bez interakcí mezi makromolekulami.

φ_S – saturační koncentrace vyjádřená objem. zlomkem; φ_D – koncentrace v denzní fázi vyjádřená objem. zlomkem.

Převzato a upraveno z (Hyman et al., 2014; Fierz, 2022)

Dnes se zdá, že se i při kompartmentaci chromatinu uplatňují fyzikální principy oddělení různých typů fází (Erdel & Rippe, 2018). Principy oddělení kapalných fází diskutují dále v kontextu transkripce RNA Pol II.

V recentně publikovaném preprintu však byla s pomocí superrezoluční mikroskopie v živých buňkách kolorektálního karcinomu pozorována struktura podobná „lešení“ jaderné matrix tvořená proteinem SAF-A/hnRNPU (scaffold attachment factor A/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U) (Park et al., 2022). Pozorované uspořádání SAF-A nápadně

připomínalo snímky jaderné matrix z elektronového mikroskopu. Mutovaný SAF-A bez RNA vazebné domény nebyl schopen takovou strukturu tvořit, mohlo by tak jít o příklad matrixového ribonukleoproteinu (Park et al., 2022). Již dříve byly pomocí mikroskopie zobrazující jednotlivé molekuly (SMLM, *single-molecule localization microscopy*) popsány propojené klastry proteinu SAF-A v jádrech živých immortalizovaných epiteliálních buněk lidské sítnice (hTERT RPE1) (Marenda et al., 2021).

4.2 Klastrování RNA Pol II prostřednictvím oddělení fází

4.2.1 Fyzikální aspekty oddělení fází v kapalném skupenství

Základní fyzikální principy oddělení kapalných fází v kapalině popíší v jednoduchém binárním systému o dvou složkách: rozpouštěné (bio)makromolekuly jednoho druhu a rozpouštědlo (voda). V tomto systému existují homotypické interakce, tj. mezi molekulami stejného druhu (makromolekula–makromolekula, rozpouštědlo–rozpouštědlo) a heterotypické interakce (makromolekula–rozpouštědlo).

Pokud jsou vlastnosti molekul takové, že makromolekuly preferují heterotypické interakce s rozpouštědlem, budou makromolekuly rozpuštěné v jedné uniformní fázi. Pokud jsou však jejich vlastnosti takové, že energeticky preferovanější jsou interakce homotypické, makromolekuly se stávají omezeně rozpustné a při daných termodynamických podmínkách bude v systému existovat tzv. saturační koncentrace (c_{sat} , někdy označovaná jako kritická koncentrace). To bude taková koncentrace makromolekul, při jejímž dosažení dojde k vytvoření oddělených fází, protože právě převládnu homotypické interakce kompenzující snížení entropie spojené s oddělením fází. (Mittag & Pappu, 2022) Nicméně celková volná energie systému je samozřejmě snížena, což je znázorněno na Obrázku 2B. Jde o schéma grafu znázorňující volnu energii binárního systému v závislosti na koncentraci makromolekuly (zde vyjádřena objemovým zlomkem). Výše popsaná situace, kdy dochází k oddělení fází v důsledku energeticky příznivých homotypických interakcí je znázorněna tmavě modrou křivkou. Její průběh je multimodální se dvěma minimy, která odpovídají energii makromolekuly ve dvou oddělených fázích. Systém bez interakcí, v němž nemůže dojít k oddělení fází, je na Obrázku 2B popsán světle modrou křivkou jejíž průběh je unimodální, má jedno minimum (Banani et al., 2017). Toto minimum, odpovídající dobře promísené směsi o daném složení, představuje stav s maximální entropií, čemuž odpovídá nejmenší možná volná energie při daných podmínkách (Dill & Bromberg, 2011).

Podmínky při nichž v binárním systému dochází k fázové separaci znázorňuje fázový diagram (Obrázek 2A). Na vodorovné ose je vyneseno složení směsi, zde vyjádřeno

objemovým zlomkem, rozpouštěné makromolekuly, ale v zásadě zde může být jakékoli veličina koncentrace. Na svislé ose je vynesena některá ze stavových veličin, typicky teplota. Šedá křivka vyznačující tmavší plochu představuje koexistenční neboli binodální křivku. Ta ohraničuje nejzazší podmínky při nichž v systému ještě dojde k oddělení fází a vyznačuje tak oblast dvoufázového režimu systému (tmavší plochu uvnitř). Pokud koncentrace makromolekuly za daných podmínek překročí saturační koncentraci a dostane se do oblasti dvoufázového režimu, vytvoří se v systému dvě fáze – denzní a zředěná.

V denzní fázi jsou makromolekuly ve větší koncentraci, než v rozpouštěné fázi. Z denzní fáze je také vytěsněna část rozpouštědla; lze říci, že denzní fáze je složena z makromolekul nasycených rozpouštědlem a zředěná z rozpouštědla nasyceného makromolekulami (Dill & Bromberg, 2011). Konkrétní koncentrace makromolekul v obou fázích lze odečíst z fázového diagramu, a to jako krajní body tzv. konody (angl. *tie line*). Konoda je úsečka, ležící v oblasti dvoufázového režimu, jejíž krajní body leží na koexistenční křivce (na Obrázku 2A není explicitně znázorněna, ale šlo by o úsečku na červené linii uvnitř oblasti dvoufázového režimu, krajní body jsou c_{sat} a c_{denz}). Saturační koncentrace (c_{sat}) nadále zůstává ve zředěné fázi, zatímco v denzní fázi je vyšší koncentrace c_{denz} . Pokud by do systému byly přidávány další makromolekuly (= pohyb po konodě doprava), nebudou se ve fázích měnit koncentrace, ale bude narůstat objem denzní fáze na úkor zředěné fáze (znázorněno v kruhových výsečích na Obrázku 2A) (Dill & Bromberg, 2011).

Zředěná a denzní fáze jsou tedy v dynamické rovnováze, tj. probíhá mezi nimi výměna makromolekul, ale v souhrnu nedochází k difuznímu toku (Banani et al., 2017). Tato situace nastává proto, že v systémech umožňujících fázovou separaci má chemický potenciál rozpouštěné makromolekuly nemonotonní průběh (tmavá křivka na Obrázku 2C). Je patrné, že v takovém systému mohou existovat dvě různé koncentrace se stejným chemickým potenciálem, což odpovídá rozdělení makromolekul do dvou fází (denzní a zředěná). (Banani et al., 2017)

Rovnost chem. potenciálů však nastává, až když se systém dostane do rovnováhy. Před jejím dosažením se v systému může nacházet vícero kapének denzní fáze s různými objemy. Rozdílné objemy mají za následek i rozdílné Laplaceovy tlaky na jejich rozhraních. V důsledku čehož se liší i chemické potenciály makromolekul v různých kapénkách a dochází k jejich difuznímu toku z menších kapének do větších (Hyman et al., 2014). A to až do vytvoření jedné velké kapénky v rovnováze s okolní zředěnou fází. Tento proces se nazývá Ostwaldovo zrání (angl. *Ostwald ripening*) a je jedním z mechanismů tzv. hrubnutí (angl. *coarsening*) tj. právě zanikání menších kapének a vytváření větších (Zwicker et al., 2015).

Dalším mechanismem hrubnutí je koalescence. Jedná se o spojování kapének, ke kterému může dojít při jejich vzájemné srážce v důsledku Brownova pohybu zředěnou fází (Zwicker et al., 2015). Při přiblížení dvou kapének je postupně okolní roztok zředěné fáze vytlačován z prostoru mezi nimi, až zůstanou jejich povrchy odděleny pouze tenkým filmem. Pokud není film kapaliny dostatečně stabilní, dojde k jeho přerušení a kapénky splynou do jedné větší (A. Van Aken, 2003).

4.2.2 P granula – prototypická nemembránová organela

Oddělení fází jakožto možný mechanismus tvorby nemembránových organel byl poprvé navržen pro P granula – ribonukleoproteinové inkluze nacházející se v zygotě *C. elegans* (Brangwynne et al., 2009). Tato granula, charakteristická pro pohlavní buňky háďátka, jsou složena z asi 50 proteinů a řady RNA (Sundby et al., 2021). P granula jsou zpočátku v celém objemu cytoplazmy, před prvním rozdělením zygoty se však shromáždí pouze u jednoho pólu buňky a dostávají se tak pouze do té části buněk z nichž později vzniknou buňky pohlavní (Brangwynne et al., 2009). Tato segregace však neurčuje pohlavní buněčnou linii – mutanti u kterých se P granula rozdělila rovnoměrně byli za normálních podmínek fertilní (Gallo et al., 2010). P granula tedy zřejmě nezprostředkovávají určení zárodečné linie. Bylo např. navrženo, že jejich zformování je pouze vedlejším produktem zablokované translace, díky čemuž je v cytoplasmě nahromaděná vyšší koncentrace mRNA. P granula by pak představovala pasivní zásobárny mRNA (Lee et al., 2020; Putnam et al., 2023).

Brangwynne et al. (2009) popsali viskoelastické vlastnosti P granul a navrhli LLPS jako možný mechanismus jejich lokalizace v cytoplasmě zygoty. Dále charakterizovali následující vlastnosti, které se staly klíčovými i pro „diagnostiku“ fázové separace u jiných nemembránových organel:

- sférický tvar P granul,
- tečení, rozdělování a koalescence při vystavení smykovému napětí,
- přisedání na povrch jádra připomínající smáčení povrchu kapalinou,
- rychlá obnova fluorescence po „vybělení“ laserem (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*) – zde charakterizovali časové konstanty τ ¹⁾ pro několik stavebních proteinů P granul; pohybovaly se v řádu jednotek sekund (Brangwynne et al., 2009).

1) Vztah mezi časovou konstantou a „poločasem obnovy“ $t_{1/2}$ udává vzorec: $\tau = t_{1/2}/\ln(2)$ (Fritzsche & Charras, 2015). Z definice plyne, že v čase rovném 1τ je obnovena intenzita fluorescence o něco vyšší než 50 % jako v případě $t_{1/2}$; v zásadě se ale jedná o srovnatelné hodnoty. Pro podrobnější diskuzi FRAPu viz Ishikawa-Ankerhold et al., 2014.

Fyzikální podstata procesu utváření P granul byla později ještě podpořena pozorováním jejich opakovaného rozpouštění a opětovné kondenzace při cyklických změnách teploty a to přímo *in situ* v embryích háďátka (Fritsch et al., 2021). Tato teplotní závislost kondenzace P granul byla dobře popsána modelem založeným na termodynamické rovnováze, což naznačuje, že na škále odpovídající velikosti a dynamice P granul panuje v buňce lokální termodynamická rovnováha i přes to, že je buňka jako celek termodynamicky otevřený systém vzdálený od rovnováhy. Je třeba podotknout, že byl fluorescenčně označen a sledován pouze jeden protein, PGL-1. Při delecí jiného strukturního proteinu, PGL-3, došlo i ke změně průběhu fázového digramu pro PGL-1 (Fritsch et al., 2021). Tato skutečnost naznačuje vliv heterotypických interakcí mezi PGL-1 a PGL-3 při kondenzaci P granul a ukazuje neúplnost použitého modelu.

4.2.3 Mezimolekulové interakce klíčové pro oddělení fází

Výše zmíněné interakce vedoucí k oddělení kapalně fáze biopolymerů mohou být realizovány řadou interakcí různých typů mezi aminokyselinovými zbytky nebo proteinovými doménami. Některé konkrétní příklady diskutuji níže. Klíčovou vlastností je však multivalence separujících makromolekul. Multivalence v tomto kontextu znamená především přítomnost několika interakčních prvků pravidelně rozmístěných po délce flexibilní molekuly polymeru. V případě proteinů se takovými vlastnostmi vyznačují především tzv. vnitřně neuspořádané oblasti. Jde o úseky proteinů, které nezaujmají jednu stabilní 3D konformaci s nejnižší volnou energií, ale velice rychle přechází mezi velkým množstvím konformací a vyznačují se vysokou flexibilitou, díky čemuž dokáží promiskuitně interagovat samy se sebou nebo s jinými makromolekulami (Dunker et al., 2013). Set konformací, který je energeticky dovolený pro konkrétní IDR se označuje jako ansámbl konformací (Holehouse & Kragelund, 2023). Vlastnosti ansámblu jsou určeny jeho aminokyselinovou sekvencí (podobně jako 3D struktura klasických proteinů) a popsány specifickými parametry charakterizujícími jeho průměrné rozměry a dynamiku, např. vzdálenost konců nebo asfericita (Holehouse & Kragelund, 2023).

Aminokyselinové sekvence IDRs také typicky vykazují nízkou hydrofobicitu, což snižuje jejich tendenci se sbalovat, a častější přítomnost nabitých a polárních zbytků, které vzájemnou elektrostatickou repulzí dále přispívají k absenci stabilní konformace (Uversky et al., 2000).

Zobecněním a zjednodušením reálné interakční komplexity je tzv. “model oddělených nálepek” (angl. *stickers-and-spacers model*) (Ginell & Holehouse, 2023). Tento model ve své

nejjednodušší podobě postuluje, že každé části biopolymeru může být přiřazena buď funkce “nálepky“, nebo “oddělovače“. Nálepky zprostředkovávají přitažlivé interakce mezi sebou a v rámci modelu je jedno, zda jde o jednotlivé aminokyselinové zbytky, celé strukturované domény nebo vazebná místa na RNA fungující jako nálepky pro ribonukleoproteiny. Oddělovače jsou pak, často flexibilní, úseky biopolymeru mezi nálepkami, které se neúčastní interakcí s ostatními biopolymery. Model implicitně předpokládá, že energetický příspěvek všech nálepek na konkrétní makromolekule je srovnatelný, kdyby byly některé nálepky výrazně silnější pak z definice vyplývá, že slabší nálepky by měly být považovány za součást oddělovačů (Ginell & Holehouse, 2023).

Z definice nálepek vyplývá, že jejich odstranění např. mutací by mělo významně narušit schopnost upravené makromolekuly vytvářet oddělenou fázi. To bylo skutečně demonstrováno na modelovém kondenzátu proteinu FUS (fused in sarcoma), kde jako hlavní determinanty separace fungují arginin (nabohacený v RNA vazebné doméně) a tyrosin (nabohacený v doméně s nízkou komplexitou) (Wang et al., 2018). Jak po náhradě tyrosinu za serin, tak argininu za glycin nebyla detekována žádná oddělená fáze ani při 15x vyšší celkové koncentraci upraveného FUS, než je c_{sat} normálního proteinu (Wang et al., 2018). Kromě výše zmíněné kationt- π interakce obecně významně přispívají k oddělení fází v roztocích proteinů elektrostatické interakce mezi nabitými aminokyselinami nebo dipóly polárních aminokyselin a patrové interakce mezi aromatickými aminokyselinami a také hydrofobní efekt (Niu et al., 2023). Vnitřně nestrukturované úseky proteinů jsou typicky nabohacené o polární a nabitě zbytky (Radivojac et al., 2007). Hydrofobní efekt je například významnou hnací silou shlukování tropoelastinu na povrchu buněk při tvorbě elastinových fibril v extracelulární hmotě (Yeo et al., 2011). Interakce mezi aromatickými aminokyselinami (v tomto sestupném pořadí podle významnosti příspěvku: Tyr–Tyr, Tyr–Phe, Phe–Phe) pohání oddělení fází domény s nízkou komplexitou heterogenního jaderného ribonukleoproteinu A1 (PLCD hnRNPA1) *in vitro* (Bremer et al., 2022).

Simulace, ve které není předem určeno, které zbytky mají vystupovat jako nálepky a které jako oddělovače, a namísto toho simulují reálné fyzikální interakce mezi zbytky, ukázala, že jistý podíl na fázové separaci má většina zbytků (Rekhi et al., 2024). Nicméně i tato analýza přisoudila největší význam tryptofanu, tyrosinu, aspartátu a argininu, tedy klasickým nálepkám (Rekhi et al., 2024).

4.2.4 Role solvatace

Hydrofobní efekt má zásadní podíl na interakcích biomakromolekul; uplatňuje se např. při skládání proteinů, ale i při oddělení fází v buňce, jak popisují níže.

Přítomnost hydrofobních aminokyselin v proteinu narušuje strukturu vodíkových vazeb mezi molekulami okolní vody a nutí je k entropicky nevýhodné větší strukturovanosti (Sun, 2017). Změna v konformaci polypeptidu v důsledku hydrofobního efektu je tak z velké části entropického charakteru a je spojena s přechodem rozpouštědla do entropicky příznivějšího stavu (Daidone et al., 2012). IDRs se sice nesbalují, avšak jsou v závislosti na sekvenci rozdílně solvatovány: zjednodušeně lze říci, že čím více polypeptid preferuje interakce s vodou, tím bude jeho ansámbl konformací více extendovaný; pokud výrazně převládají interakce v rámci polypeptidu je ansámbl kompaktní až globulární (Mao et al., 2013). Vztah mezi sekvencí a podobou ansámblu lze zjednodušeně modelovat celkovým podílem nabitých aminokyselin v daném IDR: čím více, ať už kladně nebo záporně, nabitých aminokyselin, tím extendovanější ansámbl (Das et al., 2015). Vzhledem k tomu, že IDRs neustále přechází mezi nestabilními konformacemi, tak v případě, kdy je ovlivněn tvar ansámblu, jde spíše o změnu tvaru „prostoru konformací“, který je konkrétnímu nestrukturovanému polypeptidu dostupný.

Důsledkem hydrofobního efektu při procesu oddělení fází je změna v míře solvatace IDRs při přechodu z roztoku do denzní fáze (Ribeiro et al., 2019). Tento přechod je totiž spojen s uvolněním části molekul vody z hydratačního obalu okolo proteinu. Při přechodu do kondenzátu je část interakcí mezi polypeptidem a vodou nahrazena interakcemi mezi polypeptidy. Část molekul vody z hydratačních obalů IDRs je tak uvolněna mezi okolní volné molekuly vody, což představuje entropicky příznivý příspěvek k energetice procesu oddělení kapalných fází podobně, jako při sbalování strukturovaných proteinů (Ribeiro et al., 2019).

Simulace molekulární dynamiky modelového kondenzátu proteinu FUS dokonce ukázala, že tento entropický příspěvek spojený se změnou uspořádání vody je skoro stejně velký jako příspěvek interakcí mezi proteiny (Mukherjee & Schäfer, 2023). Autoři studie však podotýkají, že z důvodu relativně vysoké koncentrace dalších makromolekul i mimo kondenzát nelze v buňce očekávat, že by příspěvek solvatace dosahoval takové velikosti, stále však bude významný. Simulace dále ukázala, že z kondenzátu je uvolněna pouze menší část molekul vody (~25 %) a IDRs tak zůstávají i v prostředí kondenzátu dobře solvatované, což kondenzátům propůjčuje tekutost (Ribeiro et al., 2019). Lze tak hovořit o dvou „populacích“ molekul vody, které solvatují nestrukturované úseky proteinů: 1) voda, která solvatuje hydrofobní zbytky a při kondenzaci se uvolní do zředěné fáze a 2) voda, která solvatuje

hydrofilní zbytky a zůstává v kondenzátu (Pezzotti et al., 2023). Tyto dvě populace molekul vody je možné rozlišit infračervenou spektroskopií při *in vitro* kondenzaci proteinu FUS (Ahlers et al., 2021).

Výše popsáný efekt solvatace se kromě nabitých aminokyselin, které typicky vystupují jako nálepky, týká sekvence celého polypeptidu a představuje tak mechanismus prostřednictvím něhož ovlivňují oddělení fází i oddělovače, resp. sekvence jako celek. Tento fakt ukazuje na zjednodušení, kterého se model oddělených nálepek dopouští, když předpokládá, že oddělovače jsou v procesu oddělení fází pasivní.

Rozdíly v solvataci různých vnitřně nestrukturovaných úseků proteinů mají několik důsledků pro dynamiku i architekturu kondenzátů:

Simulace v *coarse-grained* modelu naznačila, že tvar ansámblu konformací oddělovačů, který odráží míru jejich solvatace, ovlivňuje lokalizaci proteinu v rámci kondenzátu (periferie vs. centrum) (Harmon et al., 2018). V modelu figurovaly dva typy nálepek zprostředkující přitažlivé interakce mezi sebou a dva typy oddělovačů reprezentující dobře (extendovaný tvar) a špatně (zkolabovaný tvar) solvatované polypeptidy. K vytvoření kondenzátu s vnitřním „jádreem“ a vnější „slupkou“ došlo pokud byly v simulaci přítomny dvě populace polypeptidu s prvním typem nálepky, ovšem část byla oddělena špatně solvatovaným oddělovačem a část dobře solvatovaným. Populace se špatně solvatovaným oddělovačem byla lokalizována uvnitř kondenzátu, kdežto dobře solvatovaná ve slupce. Peptid s druhým typem nálepky měl pouze špatně solvatovaný oddělovač a byl přítomen jak v jádru, tak ve slupce a vystupoval tedy jako lešení (tzv. *scaffold*, viz dále) (Harmon et al., 2018).

Tentýž model již dříve demonstroval, že při systematickém zvyšování solvatace oddělovačů (jako proxy ve studii slouží tzv. efektivní solvatační objem) dochází ke zvýšení saturační koncentrace a v důsledku k potlačení oddělení fází (Harmon et al., 2017). Míra solvatace oddělovačů moduluje souhru oddělení fází a tzv. perkolačního přechodu (ve studii označený synonymem *gelation transition*), při jehož dosažení dochází k propojení polymerů do sítě skrze nálepky. Protože je perkolace fenomén, který se pravděpodobně odehrává ve většině biomolekulárních kondenzátů, věnuji mu samostatný odstavec níže (Harmon et al., 2017).

Podíl hydrofobních zbytků na složení nestrukturovaného polypeptidu a tedy i množství vody zadržené v oddělené fázi zřejmě ovlivňují i to, zda bude konkrétní IDR separovat do kapalných kondenzátů (*liquid–liquid phase separation*, LLPS), nebo do nerozpustných pevných agregátů (*liquid–solid phase separation*, LSPS). To bylo demonstrováno v

experimentu s N-koncovou částí prionového proteinu PrP (major prion protein), u které byly nahrazeny nabitě aminokyseliny ve dvou bazických regionech alaninem. Takto mutovaný protein tvoří pevné agregáty, které vykazovaly méně vázané vody a právě absence těchto molekul vody podmiňuje tuto nevratnou agregaci (Ramos et al., 2023).

4.2.5 Role RNA

Nemembránové orgány jsou často složeny z kombinace proteinů a RNA a na jejich stavbě se tudíž podílí určitá kombinace interakcí zprostředkovaná oběma typy makromolekul (Chujo et al., 2016; Banani et al., 2017). Interakcí vedoucí k oddělení fází je schopná i samotná RNA bez přítomnosti dalších proteinů. Například izolovaná celková kvasinková RNA tvoří *in vitro* kapénkové kondenzáty v přítomnosti činidla vytvářejícího podmínky makromolekulárního „crowdingu“ (polyethylenglykol), nebo v přítomnosti polyaminů (sperminu + spermidinu), tedy v podmínkách snažící se napodobit cytoplazmu (Van Treeck et al., 2018).

Mezi různými molekulami RNA se v buňce tvoří duplexy, kdy jedna sekvence může mít i několik alternativních sekvencí se kterými je schopna ho utvořit (Lu et al., 2016). Působení 1,6-hexandiolu vede k disociaci proteinu NONO z paraspeckles, zatímco shluky RNA NEAT1 zůstaly detekovatelné, což naznačuje význam RNA–RNA interakcí nezávislých na proteinech při tvorbě paraspeckles (Yamazaki et al., 2018). Přímé interakce mezi molekulami RNA se tak nejspíš uplatňují v architektuře řady nemembránových organel v buňce (Van Treeck & Parker, 2018).

Nicméně zatímco nízká koncentrace RNA může vést ke zformování kondenzátu, její další hromadění v denzní fázi a v důsledku zvýšení její koncentrace v poměru ku proteinům vede k rozpuštění kondenzátu (Milin & Deniz, 2018). Takové chování odpovídá typu fázové separace, která je dominantně zprostředkována interakcí opačně nabitých makromolekul, komplexní koacervaci (Sing & Perry, 2020). Toto bylo demonstrováno v *in vitro* modelovém systému složeném ze syntetických peptidů bohatých na arginin (polykationt) a homopolymerní polyU RNA (polyaniont) (Banerjee et al., 2017). Při poměru koncentrací RNA/peptidu ≈ 1 byl pozorován vznik kapének denzní fáze, ale další zvýšení poměru ve prospěch RNA vedlo k opětovnému přechodu do jednofázového režimu. K rozpouštění kapének peptidů a polyU RNA docházelo i v experimentu, při kterém byla další RNA dodávána prostřednictvím *in vitro* transkripce polymerázou fága T7 (Banerjee et al., 2017).

Podobným způsobem, který odpovídá modelu komplexní koacervace, se choval i realističtější modelový systém: kondenzáty prionu podobných proteinů (FUS, EWSR1,

TAF15, hnRNPA1, TDP43) a celkové RNA (Maharana et al., 2018). U všech kondenzátů došlo k rozpuštění při vysokých koncentracích RNA.

Právě to, že nahromadění RNA v kondenzátu může vést k jeho rozpuštění by mohlo představovat zpětnovazební mechanismus, který by mohl napomáhat přechodu RNA Pol II z iniciace do elongace (Henninger et al., 2021). I zde vedlo nízké množství RNA k formování kondenzátů.

Nascentní transkripty by také mohly hrát důležitou roli v organizaci euchromatinu do „transkripčních kapes“, mikrodomén v nichž probíhá aktivní transkripce (Hilbert et al., 2021). Na modelu pluripotentních buněk *Dania reria* ukazují, že akumulace nové RNA a s ní asociovaných ribonukleoproteinů má schopnost lokálně vytěsnit neaktivní euchromatin do samostatné fáze. Úplné fázové separaci brání to, že RNA zůstává skrze aktivní polymerázu připojena k chromatinu, polymeráze tak v tomto systému plní úlohu amfifilního propojení mezi oddělenými fázemi (Hilbert et al., 2021).

4.2.6 Fázová separace spojená s perkolací

Oddělení fází je ve své podstatě hustotní přechod – toto je zjevné při kondenzaci páry, kde se kapalná a plynná fáze liší pouze průměrnou hustotou částic, tento rozdíl v hustotách však platí také pro vícesložkové systémy: denzní fáze vždy koncentruje molekuly (Mittag & Pappu, 2022). Výše diskutované interakce však kromě oddělení fází mohou způsobit, při překročení určité koncentrace, i zesíťování makromolekul, tedy strukturní přechod, tzv. perkolační přechod. Zatímco oddělení fází je poháněno souhrnem všech interakcí mezi makromolekulou a rozpouštědlem, které ovlivňují její rozpustnost, je perkolace dána interakcemi konkrétních prvků (např. aminokyselinových zbytků, obecně nálepek) na konkrétních místech makromolekuly, kterými se vzájemně propojí. Podobně jako je oddělení fází charakterizované saturační koncentrací, je perkolace charakterizována perkolační koncentrací, c_{perk} . Pokud v systému dochází pouze k perkolaci, způsobí dosažení c_{perk} zesíťování všech makromolekul napříč celým systémem. Perkolační přechod však také může být spojen s oddělením fází, a to v případě, kdy $c_{\text{sat}} < c_{\text{perk}} < c_{\text{dense}}$. Pokud tedy v systému s takto nastavenou posloupností přechodů postupně navyšujeme koncentraci makromolekuly, dochází nejprve k oddělení fází v podobě kapének a následně k zesíťování makromolekul pouze uvnitř kapének (Mittag & Pappu, 2022). Toto zesíťování však neznamená vytvoření/vysrážení nějakého proteinového agregátu či sraženiny, interakce mezi proteiny nadále zůstávají dynamické zesíťování se projevuje tak, že každý protein interaguje s několika dalšími. Kombinací fluorescenční korelační spektroskopie a simulací molekulární dynamiky

bylo v modelovém kondenzátu (koacervát histonu H1 a prothymozinu α) ukázáno, že jednotlivé AK zbytky rapidně střídají interakční partnery, proteiny zůstávají dobře solvatované i přesto, že celková viskozita denzní fáze je násobně vyšší než viskozita vody a translační difuze proteinů uvnitř denzní fáze je zpomalena (Galvanetto et al., 2023).

Pozoruhodnou vlastností polymerů, které jsou schopné perkolačního přechodu je tvorba klastrů už při koncentracích nižších než je jejich saturační koncentrace ($c < c_{\text{sat}}$) v daných podmínkách, tzv. preperkolačních klastrů (Mittag & Pappu, 2022; Pappu et al., 2023). Formování těchto klastrů není podmíněno překročením jasně definované saturační koncentrace, namísto toho se rozdělení jejich velikostí posouvá k větším velikostem v závislosti na celkové koncentraci proteinu v roztoku i když tato zůstává pod hodnotou c_{sat} . Velikost preperkolačních klastrů v roztoku proteinu FUS se pohybuje okolo 150 nm, v klastrech nebylo lokalizováno více než ~ 1 % molekul FUS v roztoku (Kar et al., 2022). Přítomnost preperkolačních klastrů při subsaturačních koncentracích indikuje to, že dané molekuly jsou schopné perkolačního přechodu ať už bez oddělení fází nebo uvnitř fázově oddělené kapénky při dosažení příslušných kritických koncentrací (Kar et al., 2022).

Preperkolační klastry byly popsány také v živých buňkách (Lan et al., 2023). Při stresových podmínkách, vyvolaných např. působením oxidu arsenitého, tvoří transkripční regulátor NELF v jádře kapalně kondenzáty, což je spojeno s utlumením transkripce (Rawat et al., 2021). Tato kondenzace mj. závisí na aktivitě MAP kinázy p38 (Lan et al., 2023). S využitím HILO (*highly inclined and laminated optical sheet*) mikroskopie však byla pozorována polydisperzní populace klastrů NELF i za normálních podmínek, bez stresového stimulu (Lan et al., 2023). Při stresových podmínkách pak dochází ke koalescenci těchto klastrů do fázově separovaných kondenzátů, kdy ovšem ve zředěné fázi zůstává část proteinů v klastrech. Při inhibici MAP kinázy p38 dochází k destabilizaci velkých kondenzátů, klastry však nejsou ovlivněny (Lan et al., 2023). NELF klastry jsou tak s velkou pravděpodobností preperkolační klastry (Pappu et al., 2023).

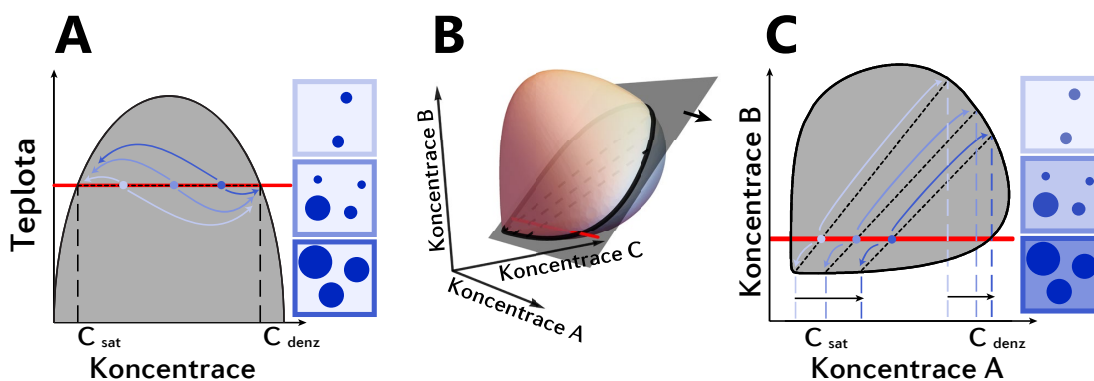
Domnívám se, že populace malých klastrů RNA Pol II i mediátoru, které popsali Cho et al. (2018) by mohla představovat právě preperkolační klastry. Pokud by se skutečně jednalo o preperkolační klastry, šlo by o další důkaz toho, že RNA Pol II i mediátor mohou tvořit kapané klastry, pokud dosáhnou saturační koncentrace.

4.2.7 Vícesložkové kondenzáty

Výše popsaný binární systém (makromolekula A + rozpouštědlo) je charakteristický především jednou jasně definovanou saturační koncentrací, nicméně biomolekulární

kondenzáty vyskytující se v živých buňkách představují vícesložkové systémy typicky složené ze směsi multivalentních proteinů a nukleových kyselin (Chattaraj et al., 2021). Předpokládá se, že jejich složky nejsou ve fixních stechiometrických poměrech (Mittag & Pappu, 2022) a mohou i tvořit několik vzájemně koexistujících fází, příkladem mohou být tři regiony jádérka: vnitřní fibrilární centrum obklopené denzní fibrilární složkou a vnější granulární složka (King et al., 2024). Oddělení fází je v těchto systémech zapříčiněno souhrou homotypických interakcí mezi makromolekulami stejného druhu a plejádou heterotypických interakcí mezi všemi makromolekulárními složkami různých druhů, ale i mezi makromolekulami a rozpouštědlem. Fázové přechody v těchto systémech jsou popisovány vícerozměrnými fázovými diagramy, kdy každá z os odpovídá koncentraci jedné komponenty (viz Obrázek 3B) (Jacobs & Frenkel, 2017).

Pokud je oddělení fází poháněno kombinací homotypických a heterotypických interakcí, nelze již všeobecně předpokládat, že by koncentrace všech makromolekulárních komponent zůstávaly ve zředěné fázi neměnné jako v případě binárního systému (Mittag & Pappu, 2022). Uvažujme nejjednodušší vícesložkový systém, ternární systém, složený z makromolekul dvou druhů A a B a rozpouštědla. Denzní fáze se skládá z makromolekul A i B. Pokud je energetický příspěvek heterotypických interakcí mezi A a B pro oddělení fází významný, bude docházet k posunu koncentrací ve zředěné fázi obou složek jak je znázorněno na Obrázku 3C.



Obrázek 3: Schematické znázornění fázových diagramů pro oddělení fází v jednosložkových (A) a vícesložkových (B, C) systémech.

(A) Konoda splývá s červenou linií vyznačující konstantní teplotu. Pokud se počáteční koncentrace makromolekuly nachází v oblasti dvoufázového režimu, při konstantních podmínkách (teplotě), má výsledná zředěná i denzní fáze stále stejné koncentrace bez ohledu na počáteční koncentraci makromolekuly; mění se pouze objemy fází, což vyjadřují modré výseče. C_{sat} a C_{denz} lze odečíst na průsečíku konody s koexistenční křivkou.

Tento panel odpovídá panelu A na Obr. 2.

(B) Fázový diagram pro systém se třemi složkami. Panel C je výřezem z tohoto grafu zvýrazněný šedou rovinou.

(C) V případě, že fázová separace molekul A, alespoň do jisté míry závisí na heterotypických interakcích s molekulami B, neplatí již předpoklad neměnnosti koncentrace [A] ve zředěné fázi. Při zvyšování [A] při fixní [B] dochází, jak ke změnám objemů fází, tak i ke zvyšování [A] ve zředěné i denzní fázi.

Převzato a upraveno z (Riback et al., 2020)

Tento fenomén posunu koncentrací je důležitý pro diskuzi o určování, zda se konkrétní kondenzát v živé buňce vytvořil procesem oddělení fází. (Mittag & Pappu, 2022)

Makromolekulární složky takovýchto kondenzátů se rozdělují na „scaffolds“ (strukturální) a „clients“ (klientské). U strukturálních složek se předpokládá, že především na jejich koncentraci závisí oddělení fází a vznik určitého kondenzátu, zatímco klientské molekuly už pouze preferenčně lokalizují do takto vytvořeného kondenzátu, aniž by se významněji podíleli na procesu LLPS.

Pokud je vytvoření vícesložkového kondenzátu poháněno dominantně homotypickými interakcemi mezi pouze jednou makromolekulou, tak je smysluplné tvrdit, že jeho vznik je závislý na překročení pouze jedné kritické koncentrace (Riback et al., 2020).

Reálné buněčné kondenzáty však spíše vznikají na podkladě souhry heterotypických interakcí mezi různými typy molekul, vznik kondenzátu pak nezávisí pouze na překročení jedné kritické koncentrace. Právě heterotypické interakce mezi RNA a proteiny jsou klíčové pro stabilizaci jaderka, Cajalových tělísek nebo stresových granúl (Riback et al., 2020).

5 Závěr

V této práci jsem se snažil shrnout vývoj výzkumu na poli uspořádání RNA Pol II v buněčném jádře.

Nejprve stručně popisuji proces transkripce, s důrazem na poznatky relevantní pro diskuzi role fázové separace v dalších kapitolách jako je například aktivní transkripce na enhancerech.

Navazující kapitola shrnuje mikroskopické studie, které vedly od konceptu statických transkripčních továren, až k dynamickým transkripčním klastrům.

Čtvrtá kapitola shrnula klíčové poznatky o mechanismech LLPS, včetně úlohy slabých interakcí, posttranslačních modifikací a RNA. Představil jsem dva aktuální modely, které přizpůsobují koncept fázové separace pro komplexní prostředí buňky: fázovou separaci spojenou s perkolací a mikrofázovou separaci.

Výzkum fázové separace se nejspíše bude ubírat směrem k sestavování komplexnějších, vícerozměrných fázových diagramů pro kondenzáty *in vivo*. Takovéto diagramy mají potenciál skutečně určit, kdy organela vzniká fázovou separací.

6 Seznam použité literatury

- A. Van Aken G. 2003. Coalescence Mechanisms in Protein-Stabilized Emulsions. In: Friberg S., Larsson K., & Sjöblom J. (eds), Food Emulsions, CRC Press,
- Ahlers J., Adams E.M., Bader V., Pezzotti S., Winklhofer K.F., Tatzelt J. & Havenith M. 2021. The key role of solvent in condensation: Mapping water in liquid-liquid phase-separated FUS. *Biophysical Journal*. **120**: 1266–1275.
- Andersson R. & Sandelin A. 2020. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nat Rev Genet*. **21**: 71–87.
- Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A. & Rosen M.K. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **18**: 285–298.
- Banerjee P.R., Milin A.N., Moosa M.M., Onuchic P.L. & Deniz A.A. 2017. Reentrant Phase Transition Drives Dynamic Substructure Formation in Ribonucleoprotein Droplets. *Angew Chem Int Ed*. **56**: 11354–11359.
- Banerji J., Rusconi S. & Schaffner W. 1981. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*. **27**: 299–308.
- Berezney R. & Coffey D.S. 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **60**: 1410–1417.
- Bihani A., Avvaru A.K. & Mishra R.K. 2023. Biochemical Deconstruction and Reconstruction of Nuclear Matrix Reveals the Layers of Nuclear Organization. *Molecular & Cellular Proteomics*. **22**: 100671.
- Brangwynne C.P., Eckmann C.R., Courson D.S., Rybarska A., Hoege C., Gharakhani J., Jülicher F. & Hyman A.A. 2009. Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science*. **324**: 1729–1732.
- Bremer A., Farag M., Borchers W.M., Peran I., Martin E.W., Pappu R.V. & Mittag T. 2022. Deciphering how naturally occurring sequence features impact the phase behaviours of disordered prion-like domains. *Nat. Chem*. **14**: 196–207.
- Butler J.E.F. & Kadonaga J.T. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*. **16**: 2583–2592.
- Casañal A., Kumar A., Hill C.H., Easter A.D., Emsley P., Degliesposti G., Gordiyenko Y., Santhanam B., Wolf J., Wiederhold K., Dornan G.L., Skehel M., Robinson C.V. & Passmore L.A. 2017. Architecture of eukaryotic mRNA 3'-end processing machinery. *Science*. **358**: 1056–1059.
- Chattaraj A., Blinov M.L. & Loew L.M. 2021. The solubility product extends the buffering concept to heterotypic biomolecular condensates. *eLife*. **10**: e67176.
- Chen X., Yin X., Li J., Wu Z., Qi Y., Wang X., Liu W. & Xu Y. 2021. Structures of the human Mediator and Mediator-bound preinitiation complex. *Science*. **372**: eabg0635.

- Cho W.-K., Jayanth N., English B.P., Inoue T., Andrews J.O., Conway W., Grimm J.B., Spille J.-H., Lavis L.D., Lionnet T. & Cisse I.I. 2016. RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells. *eLife*. **5**: e13617.
- Cho W.-K., Spille J.-H., Hecht M., Lee C., Li C., Grube V. & Cisse I.I. 2018. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science*. **361**: 412–415.
- Chujo T., Yamazaki T. & Hirose T. 2016. Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. **1859**: 139–146.
- Cisse I.I., Izeddin I., Causse S.Z., Boudarene L., Senecal A., Muresan L., Dugast-Darzacq C., Hajj B., Dahan M. & Darzacq X. 2013. Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science*. **341**: 664–667.
- Creyghton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., Boyer L.A., Young R.A. & Jaenisch R. 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 21931–21936.
- Daidone I., Iacobucci C., McLain S.E. & Smith J.C. 2012. Alteration of Water Structure by Peptide Clusters Revealed by Neutron Scattering in the Small-Angle Region (below 1 Å⁻¹). *Biophysical Journal*. **103**: 1518–1524.
- Dales S. 1963. The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. *The Journal of Cell Biology*. **18**: 51–72.
- Das R.K., Ruff K.M. & Pappu R.V. 2015. Relating sequence encoded information to form and function of intrinsically disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. **32**: 102–112.
- Davie J.R. 1997. Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Molecular Biology Reports*. **24**: 197–207.
- Dill K.A. & Bromberg S. 2011. *Molecular driving forces: statistical thermodynamics in biology, chemistry, physics, and nanoscience*. Garland Science, London ; New York. 756 pp.
- Dolores Delgado M. & León J. 2006. Gene expression regulation and cancer. *Clin Transl Oncol*. **8**: 780–787.
- Dunker A.K., Babu M.M., Barbar E., Blackledge M., Bondos S.E., Dosztányi Z., Dyson H.J., Forman-Kay J., Fuxreiter M., Gsponer J., Han K.-H., Jones D.T., Longhi S., Metallo S.J., Nishikawa K., Nussinov R., Obradovic Z., Pappu R.V., Rost B., Selenko P., Subramaniam V., Sussman J.L., Tompa P. & Uversky V.N. 2013. What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered: Why these proteins are intrinsically disordered. *Intrinsically Disordered Proteins*. **1**: e24157.
- Düster R., Kaltheuner I.H., Schmitz M. & Geyer M. 2021. 1,6-Hexanediol, commonly used to dissolve liquid–liquid phase separated condensates, directly impairs kinase and phosphatase activities. *Journal of Biological Chemistry*. **296**: 100260.

- Duttke S.H.C., Lacadie S.A., Ibrahim M.M., Glass C.K., Corcoran D.L., Benner C., Heinz S., Kadonaga J.T. & Ohler U. 2015. Human Promoters Are Intrinsically Directional. *Molecular Cell*. **57**: 674–684.
- Eaton J.D. & West S. 2020. Termination of Transcription by RNA Polymerase II: BOOM!. *Trends in Genetics*. **36**: 664–675.
- ENCODE Project Consortium, Moore J.E., Purcaro M.J., Pratt H.E., Epstein C.B., Shores N., Adrian J., Kawli T., Davis C.A., Dobin A., Kaul R., Halow J., Van Nostrand E.L., Freese P., Gorkin D.U., Shen Y., He Y., Mackiewicz M., Pauli-Behn F., Williams B.A., Mortazavi A., Keller C.A., Zhang X.-O., Elhajjajy S.I., Huey J., Dickel D.E., Snetkova V., Wei X., Wang X., Rivera-Mulia J.C., Rozowsky J., Zhang J., Chhetri S.B., Zhang J., Victorsen A., White K.P., Visel A., Yeo G.W., Burge C.B., Lécuyer E., Gilbert D.M., Dekker J., Rinn J., Mendenhall E.M., Ecker J.R., Kellis M., Klein R.J., Noble W.S., Kundaje A., Guigó R., Farnham P.J., Cherry J.M., Myers R.M., Ren B., Graveley B.R., Gerstein M.B., Pennacchio L.A., Snyder M.P., Bernstein B.E., Wold B., Hardison R.C., Gingeras T.R., Stamatoyannopoulos J.A. & Weng Z. 2020. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature*. **583**: 699–710.
- Erdel F. & Rippe K. 2018. Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation. *Biophysical Journal*. **114**: 2262–2270.
- Eskiw C.H. & Fraser P. 2011. Ultrastructural study of transcription factories in mouse erythroblasts. *Journal of Cell Science*. **124**: 3676–3683.
- Eskiw C.H., Rapp A., Carter D.R.F. & Cook P.R. 2008. RNA polymerase II activity is located on the surface of protein-rich transcription factories. *Journal of Cell Science*. **121**: 1999–2007.
- Fierz B. 2022. Phase Separation as an Emergent Concept in Genome Organization and Beyond: Medicinal Chemistry and Chemical Biology Highlights. *Chimia*. **76**: 865.
- Flynn R.A., Almada A.E., Zamudio J.R. & Sharp P.A. 2011. Antisense RNA polymerase II divergent transcripts are P-TEFb dependent and substrates for the RNA exosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 10460–10465.
- Fritsch A.W., Diaz-Delgadillo A.F., Adame-Arana O., Hoege C., Mittasch M., Kreysing M., Leaver M., Hyman A.A., Jülicher F. & Weber C.A. 2021. Local thermodynamics govern formation and dissolution of *Caenorhabditis elegans* P granule condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**: e2102772118.
- Fritzsche M. & Charras G. 2015. Dissecting protein reaction dynamics in living cells by fluorescence recovery after photobleaching. *Nat Protoc*. **10**: 660–680.
- Gallo C.M., Wang J.T., Motegi F. & Seydoux G. 2010. Cytoplasmic Partitioning of P Granule Components Is Not Required to Specify the Germline in *C. elegans*. *Science*. **330**: 1685–1689.

- Galvanetto N., Ivanović M.T., Chowdhury A., Sottini A., Nüesch M.F., Nettels D., Best R.B. & Schuler B. 2023. Extreme dynamics in a biomolecular condensate. *Nature*. **619**: 876–883.
- Ginell G.M. & Holehouse A.S. 2023. An Introduction to the Stickers-and-Spacers Framework as Applied to Biomolecular Condensates. pp. 95–116. In: Zhou H.-X., Spille J.-H., & Banerjee P.R. (eds), *Phase-Separated Biomolecular Condensates*, Springer US, New York, NY.
- Girbig M., Misiaszek A.D. & Müller C.W. 2022. Structural insights into nuclear transcription by eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **23**: 603–622.
- Gu B., Eick D. & Bensaude O. 2013. CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II in vivo. *Nucleic Acids Research*. **41**: 1591–1603.
- Haberle V. & Stark A. 2018. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **19**: 621–637.
- Harlen K.M. & Churchman L.S. 2017. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **18**: 263–273.
- Harmon T.S., Holehouse A.S. & Pappu R.V. 2018. Differential solvation of intrinsically disordered linkers drives the formation of spatially organized droplets in ternary systems of linear multivalent proteins. *New J. Phys.* **20**: 045002.
- Harmon T.S., Holehouse A.S., Rosen M.K. & Pappu R.V. 2017. Intrinsically disordered linkers determine the interplay between phase separation and gelation in multivalent proteins. *eLife*. **6**: e30294.
- He D.C., Nickerson J.A. & Penman S. 1990. Core filaments of the nuclear matrix. *The Journal of cell biology*. **110**: 569–580.
- Henninger J.E., Oksuz O., Shrinivas K., Sagi I., LeRoy G., Zheng M.M., Andrews J.O., Zamudio A.V., Lazaris C., Hannett N.M., Lee T.I., Sharp P.A., Cissé I.I., Chakraborty A.K. & Young R.A. 2021. RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell*. **184**: 207-225.e24.
- Hilbert L., Sato Y., Kuznetsova K., Bianucci T., Kimura H., Jülicher F., Honigmann A., Ziburdaev V. & Vastenhouw N.L. 2021. Transcription organizes euchromatin via microphase separation. *Nat Commun*. **12**: 1360.
- Holehouse A.S. & Kragelund B.B. 2023. The molecular basis for cellular function of intrinsically disordered protein regions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. .
- Hozák P., Hassan A.B., Jackson D.A. & Cook P.R. 1993. Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell*. **73**: 361–373.
- Hyman A.A., Weber C.A. & Jülicher F. 2014. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **30**: 39–58.

- Iborra F.J., Pombo A., Jackson D.A. & Cook P.R. 1996. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription ‘factories’ in human nuclei. *Journal of Cell Science*. **109**: 1427–1436.
- Imashimizu M., Kireeva M.L., Lubkowska L., Gotte D., Parks A.R., Strathern J.N. & Kashlev M. 2013. Intrinsic Translocation Barrier as an Initial Step in Pausing by RNA Polymerase II. *Journal of Molecular Biology*. **425**: 697–712.
- Ishikawa-Ankerhold H., Ankerhold R. & Drummen G. 2014. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley,
- Itoh Y., Iida S., Tamura S., Nagashima R., Shiraki K., Goto T., Hibino K., Ide S. & Maeshima K. 2021. 1,6-hexanediol rapidly immobilizes and condenses chromatin in living human cells. *Life Sci. Alliance*. **4**: e202001005.
- Jackson D.A., Hassan A.B., Errington R.J. & Cook P.R. 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *The EMBO Journal*. **12**: 1059–1065.
- Jackson D.A., Iborra F.J., Manders E.M.M. & Cook P.R. 1998. Numbers and Organization of RNA Polymerases, Nascent Transcripts, and Transcription Units in HeLa Nuclei. *MBoC*. **9**: 1523–1536.
- Jackson D.A., McCready S.J. & Cook P.R. 1981. RNA is synthesized at the nuclear cage. *Nature*. **292**: 552–555.
- Jacobs W.M. & Frenkel D. 2017. Phase Transitions in Biological Systems with Many Components. *Biophysical Journal*. **112**: 683–691.
- James Faresse N., Canella D., Praz V., Michaud J., Romascano D. & Hernandez N. 2012. Genomic Study of RNA Polymerase II and III SNAPc-Bound Promoters Reveals a Gene Transcribed by Both Enzymes and a Broad Use of Common Activators. *PLoS Genet*. **8**: e1003028.
- Kar M., Dar F., Welsh T.J., Vogel L.T., Kühnemuth R., Majumdar A., Krainer G., Franzmann T.M., Alberti S., Seidel C.A.M., Knowles T.P.J., Hyman A.A. & Pappu R.V. 2022. Phase-separating RNA-binding proteins form heterogeneous distributions of clusters in subsaturated solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**: e2202222119.
- Kim T.-K., Hemberg M., Gray J.M., Costa A.M., Bear D.M., Wu J., Harmin D.A., Laptewicz M., Barbara-Haley K., Kuersten S., Markenscoff-Papadimitriou E., Kuhl D., Bito H., Worley P.F., Kreiman G. & Greenberg M.E. 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. **465**: 182–187.
- Kim Y.-J., Björklund S., Li Y., Sayre M.H. & Kornberg R.D. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell*. **77**: 599–608.
- King M.R., Ruff K.M. & Pappu R.V. 2024. Emergent microenvironments of nucleoli. *Nucleus*. **15**: 2319957.

- Komarnitsky P., Cho E.-J. & Buratowski S. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* **14**: 2452–2460.
- Krebs A.R., Imanci D., Hoerner L., Gaidatzis D., Burger L. & Schübeler D. 2017. Genome-wide Single-Molecule Footprinting Reveals High RNA Polymerase II Turnover at Paused Promoters. *Molecular Cell.* **67**: 411-422.e4.
- Kroschwald S., Maharana S. & Simon A. 2017. Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters.* .
- Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R. & Weirauch M.T. 2018. The Human Transcription Factors. *Cell.* **172**: 650–665.
- Lan C., Kim J., Ulferts S., Aprile-Garcia F., Weyrauch S., Anandamurugan A., Grosse R., Sawarkar R., Reinhardt A. & Hugel T. 2023. Quantitative real-time in-cell imaging reveals heterogeneous clusters of proteins prior to condensation. *Nat Commun.* **14**: 4831.
- Lee C.-Y.S., Putnam A., Lu T., He S., Ouyang J.P.T. & Seydoux G. 2020. Recruitment of mRNAs to P granules by condensation with intrinsically-disordered proteins. *eLife.* **9**: e52896.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.-H., Lee S., Baek S.H. & Kim V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**: 4051–4060.
- Lovén J., Hoke H.A., Lin C.Y., Lau A., Orlando D.A., Vakoc C.R., Bradner J.E., Lee T.I. & Young R.A. 2013. Selective Inhibition of Tumor Oncogenes by Disruption of Super-Enhancers. *Cell.* **153**: 320–334.
- Lu Z., Zhang Q.C., Lee B., Flynn R.A., Smith M.A., Robinson J.T., Davidovich C., Gooding A.R., Goodrich K.J., Mattick J.S., Mesirov J.P., Cech T.R. & Chang H.Y. 2016. RNA Duplex Map in Living Cells Reveals Higher-Order Transcriptome Structure. *Cell.* **165**: 1267–1279.
- Maharana S., Wang J., Papadopoulos D.K., Richter D., Pozniakovskiy A., Poser I., Bickle M., Rizk S., Guillén-Boixet J., Franzmann T.M., Jahnel M., Marrone L., Chang Y.-T., Sternecker J., Tomancak P., Hyman A.A. & Alberti S. 2018. RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science.* **360**: 918–921.
- Mao A.H., Lyle N. & Pappu R.V. 2013. Describing sequence–ensemble relationships for intrinsically disordered proteins. *Biochemical Journal.* **449**: 307–318.
- Marenda M., Lazarova E., Van De Linde S., Gilbert N. & Michieletto D. 2021. Parameter-free molecular super-structures quantification in single-molecule localization microscopy. *Journal of Cell Biology.* **220**: e202010003.
- Mayfield J.E., Irani S., Escobar E.E., Zhang Z., Burkholder N.T., Robinson M.R., Mehaffey M.R., Sipe S.N., Yang W., Prescott N.A., Kathuria K.R., Liu Z., Brodbelt J.S. & Zhang Y. 2019. Tyr1 phosphorylation promotes phosphorylation of Ser2 on the C-terminal domain of eukaryotic RNA polymerase II by P-TEFb. *eLife.* **8**: e48725.

- McSwiggen D.T., Mir M., Darzacq X. & Tjian R. 2019. Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes Dev.* **33**: 1619–1634.
- Milin A.N. & Deniz A.A. 2018. Reentrant Phase Transitions and Non-Equilibrium Dynamics in Membraneless Organelles. *Biochemistry.* **57**: 2470–2477.
- Miller O.L. & Beatty B.R. 1969. Visualization of Nucleolar Genes. *Science.* **164**: 955–957.
- Mittag T. & Pappu R.V. 2022. A conceptual framework for understanding phase separation and addressing open questions and challenges. *Molecular Cell.* **82**: 2201–2214.
- Mukherjee S. & Schäfer L.V. 2023. Thermodynamic forces from protein and water govern condensate formation of an intrinsically disordered protein domain. *Nat Commun.* **14**: 5892.
- Niu X., Zhang L., Wu Y., Zong Z., Wang B., Liu J., Zhang L. & Zhou F. 2023. Biomolecular condensates: Formation mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. *MedComm.* **4**: e223.
- Osborne C.S., Chakalova L., Brown K.E., Carter D., Horton A., Debrand E., Goyenechea B., Mitchell J.A., Lopes S., Reik W. & Fraser P. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet.* **36**: 1065–1071.
- Osborne C.S., Chakalova L., Mitchell J.A., Horton A., Wood A.L., Bolland D.J., Corcoran A.E. & Fraser P. 2007. Myc Dynamically and Preferentially Relocates to a Transcription Factory Occupied by Igh. *PLoS Biol.* **5**: e192.
- Papantonis A. & Cook P.R. 2013. Transcription Factories: Genome Organization and Gene Regulation. *Chem. Rev.* **113**: 8683–8705.
- Pappu R.V., Cohen S.R., Dar F., Farag M. & Kar M. 2023. Phase Transitions of Associative Biomacromolecules. *Chem. Rev.* [acs.chemrev.2c00814](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00814).
- Park G., Ryu K., Lee J., Kim G., Park T.L., Shim H., Lee Y., Kim C. & Cho W.-K. 2022. Topology of gene regulatory compartments relative to the nuclear matrix. .
- Patel A.B., Greber B.J. & Nogales E. 2020. Recent insights into the structure of TFIID, its assembly, and its binding to core promoter. *Current Opinion in Structural Biology.* **61**: 17–24.
- Patel S.S., Belmont B.J., Sante J.M. & Rexach M.F. 2007. Natively Unfolded Nucleoporins Gate Protein Diffusion across the Nuclear Pore Complex. *Cell.* **129**: 83–96.
- Pederson T. 2000. Half a Century of “The Nuclear Matrix.” *MBoC.* **11**: 799–805.
- Pezzotti S., König B., Ramos S., Schwaab G. & Havenith M. 2023. Liquid–Liquid Phase Separation? Ask the Water!. *J. Phys. Chem. Lett.* **14**: 1556–1563.
- Pombo A. 1999. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *The EMBO Journal.* **18**: 2241–2253.
- Putnam A., Thomas L. & Seydoux G. 2023. RNA granules: functional compartments or incidental condensates?. *Genes Dev.* **37**: 354–376.

- Radivojac P., Iakoucheva L.M., Oldfield C.J., Obradovic Z., Uversky V.N. & Dunker A.K. 2007. Intrinsic Disorder and Functional Proteomics. *Biophysical Journal*. **92**: 1439–1456.
- Ramos S., Kamps J., Pezzotti S., Winklhofer K.F., Tatzelt J. & Havenith M. 2023. Hydration makes a difference! How to tune protein complexes between liquid–liquid and liquid–solid phase separation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **25**: 28063–28069.
- Rawat P., Boehning M., Hummel B., Aprile-Garcia F., Pandit A.S., Eisenhardt N., Khavaran A., Niskanen E., Vos S.M., Palvimo J.J., Pichler A., Cramer P. & Sawarkar R. 2021. Stress-induced nuclear condensation of NELF drives transcriptional downregulation. *Molecular Cell*. **81**: 1013-1026.e11.
- Razin S.V. & Gromova I.I. 1995. The channels model of nuclear matrix structure. *BioEssays*. **17**: 443–450.
- Rekhi S., Garcia C.G., Barai M., Rizuan A., Schuster B.S., Kiick K.L. & Mittal J. 2024. Expanding the molecular language of protein liquid–liquid phase separation. *Nat. Chem.* .
- Riback J.A., Zhu L., Ferrolino M.C., Tolbert M., Mitrea D.M., Sanders D.W., Wei M.-T., Kriwacki R.W. & Brangwynne C.P. 2020. Composition-dependent thermodynamics of intracellular phase separation. *Nature*. **581**: 209–214.
- Ribeiro S.S., Samanta N., Ebbinghaus S. & Marcos J.C. 2019. The synergic effect of water and biomolecules in intracellular phase separation. *Nat Rev Chem*. **3**: 552–561.
- Richter W.F., Nayak S., Iwasa J. & Taatjes D.J. 2022. The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **23**: 732–749.
- Sainsbury S., Bernecky C. & Cramer P. 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **16**: 129–143.
- Schwalb B., Michel M., Zacher B., Frühauf K., Demel C., Tresch A., Gagneur J. & Cramer P. 2016. TT-seq maps the human transient transcriptome. *Science*. **352**: 1225–1228.
- Shulga N. & Goldfarb D.S. 2003. Binding Dynamics of Structural Nucleoporins Govern Nuclear Pore Complex Permeability and May Mediate Channel Gating. *Molecular and Cellular Biology*. **23**: 534–542.
- Sing C.E. & Perry S.L. 2020. Recent progress in the science of complex coacervation. *Soft Matter*. **16**: 2885–2914.
- Sun Q. 2017. The physical origin of hydrophobic effects. *Chemical Physics Letters*. **672**: 21–25.
- Sundby A.E., Molnar R.I. & Claycomb J.M. 2021. Connecting the Dots: Linking *Caenorhabditis elegans* Small RNA Pathways and Germ Granules. *Trends in Cell Biology*. **31**: 387–401.
- Tantale K., Mueller F., Kozulic-Pirher A., Lesne A., Victor J.-M., Robert M.-C., Capozzi S., Chouaib R., Bäcker V., Mateos-Langerak J., Darzacq X., Zimmer C., Basyuk E. &

- Bertrand E. 2016. A single-molecule view of transcription reveals convoys of RNA polymerases and multi-scale bursting. *Nat Commun.* **7**: 12248.
- Uversky V.N., Gillespie J.R. & Fink A.L. 2000. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins.* **41**: 415–427.
- Van Treeck B. & Parker R. 2018. Emerging Roles for Intermolecular RNA-RNA Interactions in RNP Assemblies. *Cell.* **174**: 791–802.
- Van Treeck B., Protter D.S.W., Matheny T., Khong A., Link C.D. & Parker R. 2018. RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**: 2734–2739.
- Vo ngoc L., Cassidy C.J., Huang C.Y., Duttke S.H.C. & Kadonaga J.T. 2017. The human initiator is a distinct and abundant element that is precisely positioned in focused core promoters. *Genes Dev.* **31**: 6–11.
- Vos S.M., Farnung L., Urlaub H. & Cramer P. 2018. Structure of paused transcription complex Pol II–DSIF–NELF. *Nature.* **560**: 601–606.
- Wang J., Choi J.-M., Holehouse A.S., Lee H.O., Zhang X., Jahnel M., Maharana S., Lemaitre R., Pozniakovsky A., Drechsel D., Poser I., Pappu R.V., Alberti S. & Hyman A.A. 2018. A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell.* **174**: 688-699.e16.
- Wansink D., Schul W., Van Der Kraan I., Van Steensel B., Van Driel R. & De Jong L. 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *The Journal of cell biology.* **122**: 283–293.
- 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**: 307–319.
- Yamada T., Yamaguchi Y., Inukai N., Okamoto S., Mura T. & Handa H. 2006. P-TEFb-Mediated Phosphorylation of hSpt5 C-Terminal Repeats Is Critical for Processive Transcription Elongation. *Molecular Cell.* **21**: 227–237.
- Yamazaki T., Souquere S., Chujo T., Kobelke S., Chong Y.S., Fox A.H., Bond C.S., Nakagawa S., Pierron G. & Hirose T. 2018. Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Molecular Cell.* **70**: 1038-1053.e7.
- Yeo G.C., Keeley F.W. & Weiss A.S. 2011. Coacervation of tropoelastin. *Advances in Colloid and Interface Science.* **167**: 94–103.
- Zhao W., Xu Y., Wang Y., Gao D., King J., Xu Y. & Liang F.-S. 2021. Investigating crosstalk between H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation in CRISPR/dCas-based epigenome editing and gene activation. *Sci Rep.* **11**: 15912.
- Zwicker D., Hyman A.A. & Jülicher F. 2015. Suppression of Ostwald ripening in active emulsions. *Phys. Rev. E.* **92**: 012317.