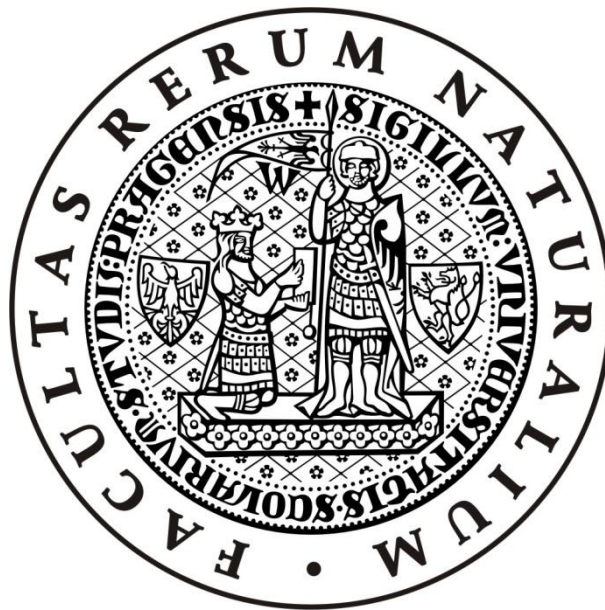


**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismismů



Bakalářská práce

**Faktory důležité pro formování Cajalova tělíčka**

**Factors important for Cajal body formation**

Adriana Roithová

Supervisor: Mgr. David Staněk, Ph.D.

Praha, 2012

Děkuji svému školiteli Mgr. Davidu Štávkovi za trpělivost a cenné rady při vypracování bakalářské práce

### **Prohlášení:**

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

V Praze 9.5.2012

Podpis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abstrakt .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Seznam zkratk .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1. Úvod .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2. Cajalovo tělíčko.....</b>                                    | <b>7</b>  |
| <b>2.1. Cajalova tělíčka v jiných organismech.....</b>             | <b>9</b>  |
| <b>2.1.1. Xenopus laevis .....</b>                                 | <b>9</b>  |
| <b>2.1.2. Drosophila melanogaster.....</b>                         | <b>10</b> |
| <b>2.1.3. Arabidopsis thaliana.....</b>                            | <b>11</b> |
| <b>2.2. Komponenty Cajalova tělíčka.....</b>                       | <b>12</b> |
| <b>2.2.1. Coilin.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>2.2.2. SMN komplex.....</b>                                     | <b>14</b> |
| <b>2.2.3. RNA/RNP komponenty.....</b>                              | <b>15</b> |
| <b>2.2.3.1. snRNA.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>2.2.3.2. telomerázová RNA.....</b>                              | <b>17</b> |
| <b>2.2.4. Fibrillarin.....</b>                                     | <b>18</b> |
| <b>3. Formování Cajalových tělíček.....</b>                        | <b>18</b> |
| <b>3.1. Důležitá faktory pro formování Cajalových tělíček.....</b> | <b>20</b> |
| <b>3.1.1. Transkripční aktivita.....</b>                           | <b>20</b> |
| <b>3.1.2. Coilin a formování Cajalových tělíček.....</b>           | <b>20</b> |
| <b>3.1.2.1. Modifikace coilinu.....</b>                            | <b>21</b> |
| <b>3.1.3. Další faktory důležité pro formování CB.....</b>         | <b>23</b> |
| <b>3.1.4. Regulace formování CB.....</b>                           | <b>24</b> |
| <b>4. Závěr.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>5. Reference.....</b>   | <b>27</b> |

## **Abstrakt:**

Tato práce popisuje strukturu a funkci jaderných domén nazývaných se Cajalova tělíčka (CB). CB obsahují proteiny a faktory, které se účastní uspořádání a modifikace snRNP. Tyto tělíčka se nacházejí u obratlovců i bezobratlých a najdeme je i v rostlinách. Ne všechny typy buněk však obsahují CB. Jejich počet a velikost se odvíjí od transkripční aktivity buňky a fáze buněného cyklu. Tato práce pojednává o faktorech, které mají vliv na formaci CB. Jeden z nejdůležitějších faktorů je hladina snRNP a transkripční aktivita. V poslední době se však ukazuje, že významnou roli ve formaci CB má i fosforylace coilinu a jiných komponent. Jiné studie ukazují na vliv okolního prostředí. Také se zde diskutuje regulace biogeneze CB, která není ještě zcela objasněna.

**Klíová slova:** Cajalova tělíčka, coilin, buněčné jádro, snRNP, pre-mRNA sestih, transkripce

## **Abstract:**

This research describes the structure and function of nuclear domains called Cajal bodies (CB). CB contain proteins and factors involved in assembly and modification of snRNPs. These bodies are found in vertebrates and invertebrates and even plants. Not all cell types contain CB. Their number and size depends on the transcription activity of cell and cell cycle phase. This paper discusses the factors that affect the CB formation. One of the most important factors is the level of snRNPs and transcription activity. Recently shows that an important role in CB formation has coilin and other components phosphorylation. Other works show the influence of the environment. There is also discussion regulation of CB biogenesis, which is not yet fully understood.

**Key words:** Cajal bodies, coilin, cell nucleus, snRNP, pre-mRNA splicing, transcription

## Seznam použitých zkratk:

ATP - adenosintrifosfát

CB ó Cajalovo tělíčko (Cajal bodies)

CBC -protein vázající epikuru (cap binding protein)

Cdk2 ó cyklin dependentní kináza 2

CstF - řezací stimulační faktor (cleavage stimulation factor)

CpsF - řezací polyadenylační stimulační faktor (cleavage polyadenylating stimulation factor)

FLASH - (flice-associated huge protein)

GFP- zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)

hCINAP ó lidský ATPázový protein interagující s coilinem (human coilin interacting nuclear ATPase protein)

HLB ó tělíčka lokalizovaná na histonech (histone locus bodies)

Nopp140 ó jaderný fosfoprotein p140 ( nucleolar phosphoprotein p140)

NPAT - jaderný protein vyskytující se v AT místech (nuclear protein mapped to the AT locus)

PIASy ó proteinový inhibitor aktivovaného STAT (protein inhibitor of activated STAT)

PML bodies ó promyeolitic leukemia tělíčka

Pre-mRNA - pre ó messengerRNA

PRMT ó protein metyl-transferáza

PTF- ó Proximální sekvenční element (PSE) ó vázající transkripční faktor

RPB6 ó RNA polymerázová podjednotka

SMN komplex ó protein motorických neuron (survival of motor neuron)

snoRNA ó malé jadékové RNA (small nucleolar RNA)

scaRNA ó malé RNA asociované s Cajalovými tělísky (small Cajal bodies associated RNA)

STAT ó signální transduktor a aktivátor transkripce (signal transducers and activator of transcription)

snRNA ó malá jaderná ribonukleová kyselina (small nuclear RNA)

snRNP ó malá jaderná ribonukleoproteinová částice (small nuclear RNP)

TBP ó protein vázající TATA box (TATA box binding protein)

TFIIH ó transkripční faktor II H

## **1.Úvod:**

Cajalova tělíčka jsou evolučně velmi konzervované struktury. Byly nalezeny u obratlovců, bezobratlých i v rostlinách. Jsou velmi variabilní ve velikosti i v počtu. Většinou závisí na fázi buněčného cyklu a druhu organismu. Tyto jaderné struktury hrají důležitou roli v transkripci. Jejich funkce je uspořádání a následná modifikace snRNP, které se účastní pre-mRNA sestihu. Tyto struktury byly poprvé objeveny v neuronech v roce 1903 Ramónem y Cajalem, který je nazval jadérková tělíčka (accessory bodies) (Cajal 1903 cit v Gall 2000). Později byly nalezeny i v dalších tkáních. Díky vyvíjejícím se technikám, byly identifikovány komponenty CB, dynamika CB a jejich struktura v živých buňkách. Jsou to pohyblivé struktury, které obvykle asociují s místy histonových genů (Matera a kol. 1999), kde zřejmě fungují v regulaci jejich exprese. V roce 1991 byla identifikována jedna z jeho nejdůležitějších komponent, p80 coilin (Raska a kol. 1991), který se dodnes užívá jako jejich marker. Jeho ortology a homology byly nalezeny i v CB u jiných organismů. Studie ukazují, že jeho modifikace se podílí i na formaci CB. Důležitý protein pro funkci CB je SMN komplex, který cílí snRNP do CB. Mutace v genu pro SMN způsobuje spinální svalovou atrofii (Liu a kol. 1996).

Tato práce nejprve obecně popisuje CB. Ukazuje i srovnání složení CB mezi různými organismy. Druhá část této práce je zaměřena na faktory a podmínky, které jsou důležité pro jejich formaci a účastní se i regulaci jejich biogeneze, která není ještě zcela jasná. Jsou zde diskutovány fosfoproteiny, které se hromadí v CB a přispívají k jejich formaci a celistvosti.

## **2.Cajalova tělíčka:**

CB objevil poprvé Ramón y Cajal, profesor Madridské univerzity, v roce 1903. Objevil malé kruhové struktury uvnitř jádra neuronu, které se nacházely blízko nebo přímo spojené s jadérkem. Proto je nazval druhotná tělíčka neboli accessory bodies (Cajal 1903 cit. V Gall 2000). Po 60 letech byla CB znovu objevena dvojicí Monneronem a Bernhardem. Pozorovali je i mimo neuronální tkáň a pojmenovali je coiled bodies. (Monneron a kol. 1969). Další era CB začala prací Andrade, Raska a kolegů v roce 1991, ve které popisují identifikaci protilátky z lidského autoimunního séra, která reagovaly s novým antigenem v interfázi savčích buněk. Tento 80 kDa antigen nazvali p80 coilin. Vyskytoval se hojně v jaderných coiled bodies a dodnes se užívá jako jejich marker. V roce 1999 se název coiled bodies změnil na Cajalova tělíčka po svém objeviteli (Gall 1999).

CB jsou vysoce konzervované buněčné komponenty nacházející se v jádrech rostlinných i živočišných buněk. Jejich velikost se pohybuje od 0,2  $\mu\text{m}$  až 2  $\mu\text{m}$  v průměru, ale mohou být i větší. Obvyklý počet CB v jádře se pohybuje od 1 do 6. Jejich počet a velikost se mění během buněčného cyklu. Pomocí značení CB protilátkou proti p80-coilinu se zjistilo, že jejich nejvyšší počet je v přechodu z mitózy do G1 fáze buněčného cyklu. V syntetické (S) a G2 fázi byla CB větší a jejich počet se snižoval, což může být způsobeno fúzí menších CB do větších. Z toho vyplývá, že jejich počet a velikost je závislá na transkripční aktivitě buňky a na fázi buněčného cyklu, ve které se buňka právě nachází (Andrade a kol. 1993).

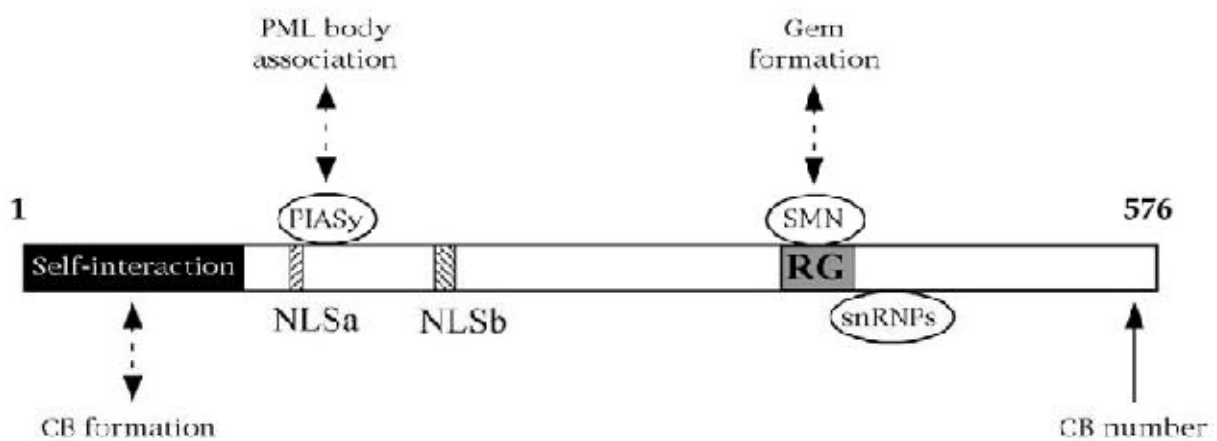
CB se dokáží pohybovat. Spojením p80 coilinu s GFP byly objeveny translokace pohybu přes nukleoplazmu společně i jednotlivě nebo od periferie jádra směrem k jádru. Také byla pozorována separace menších CB (0,2  $\mu\text{m}$ ) od větších ( $\times 0,4$   $\mu\text{m}$ ). Jejich rychlost může dosáhnout až 0,9  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Platani 2000). Ne všechny jsou však pohyblivé souasně. Nejmáloji setrvávají v omezeném jaderném prostoru, pravděpodobně díky interakcím se specifickými regiony chromatinu. Pohyb tělísek je omezený a zahrnuje asociaci s chromatinem a volnou difúzi v interchromatinovém prostoru (Lamond a kol. 2005). Jejich pohyb se zvyšuje po vyčerpání ATP a po inhibici transkripce. Je zřejmé, že asociace CB a chromatinu vyžaduje ATP a aktivní transkripci (Platani, 2002).

Práce Matera (2001) popisuje interakce CB s genovými místy pro U2 snRNA a ukazuje, že asociace s CB závisí na transkripční aktivitě genu a vyžaduje jak přítomnost nascentních U2 snRNA transkriptů, tak i U2 snRNPs v CB. Tato asociace ukazuje na možnost regulační funkce CB v expresi těchto genů. Přítomnost nascentních U2 snRNP může ukazovat spojení mezi asociací se specifickými genovými místy a doručení snRNP pro zpracování a maturaci nascentních RNA transkriptů (Lamond a kol. 2005). Dále byly provedeny studie, které ukazují, že do CB jsou směřovány podjednotky RNA polymerázy II (RPB6 a 9) (Morgan a kol. 2000). Také jiné transkripční faktory jako TBP, TFIIF a PTF- jsou nejprve uspořádány v CB, než jsou transportovány do místa transkripce na chromosomech a v jádru (Gall 2001). Tyto výsledky však nebyly potvrzeny u savčích buněk, ale pouze u buněk *Xenopus laevis*.

V blízkosti CB nalezneme i jiná jaderná tělíška. Například těpící tělíška (cleavage bodies), které byly identifikovány imunofluorescenčním značením pomocí protilátek anti-CstF a anti-CPSF. Oba proteiny se nacházely v jádře a v kombinaci s protilátkou anti-p80 coilin se zjistilo, že jsou koncentrovány v jaderné oblasti blízko CB (Schul a kol. 1996). Dále v jejich



blízkosti nalezneme Gemini of coiled bodies neboli gems, které s nimi mohou i přímo asociovat. Byly objeveny pomocí imunolokalizačních studií, kde ušili protilátky proti SMN proteinu. Mutace v genu pro SMN protein vede ke spinální svalové atrofii. Také u CB nalezneme PML tělíčka, která se účastní různých biologických funkcí včetně kontroly apoptózy, odpovídá na poškození DNA, antivirové odpovědi a transkripční modulaci. PML tělíčka asociovaná s CB se mohou nacházet v snRNA genových místech s CB umístěnými mezi PML tělíčky a snRNA místem. Studie ukazuje, že coilin se přímo váže k PIASy (protein PML tělíček). Tyto interakce ukazují roli CB v organizaci jádra (Sun a kol. 2005).



Obrázek 1: Schématické znázornění coilinu a jeho role v organizaci jádra. Na N-konci se nachází doména dlefitá k samoorganizaci coilinu dlouhá 92 aminokyselin. RG box zajišťuje přímou vazbu s SMN. Je zde také vidět asociace coilinu s PIASy. (Převzato z Journal of Cell Science, Sun a kol. 2005)

## 2.1. Cajalova tělíčka v jiných organismech:

CB jsou evolučně velmi konzervované struktury. Jsou nalezeny v živočišných i rostlinných buňkách (obrázek 2).

### 2.1.1. *Xenopus laevis*:

Analogy CB u *Xenopus laevis* se nazývají sférové organely (sphere organelle). Poprvé tyto struktury popsal v roce 1954 Gall u *Notophthalmus viridescens*. Nejsou obalené membránou

stejn jako CB. Jsou v t-í nejl 10  $\mu\text{m}$  v průměru a jejich počet se pohybuje od 50 do 100. Nachází se hlavn v germinálních vesikulech oocyt . Je to komplex tvořený z 3 částí: jifi zmín né sférické t lísko, C snurposom a jeden nebo více men-ích sférických struktur na povrchu, které nazýváme B snurposomy, které v-ak byly pozorovány jen u v t-ích sférových organel. Ve sférových organelách se nachází protein SPH-1, který má ze 75% podobnou aminokyselinovou sekvenci jako lidský p80 coilin (Tuma a kol. 1993). Díky experiment m vyuffivajících zna ení protilátkami bylo zji-t no, že sférické organely obsahují snRNP hlavn ve snurposomech (Wu a kol. 1991). Souvislost se zpracováním RNA byla u t chto t lísek objevena d íve nejl u CB.

Podobn jako Cajalova t líska obsahují sférické organely u *Xenopus laevis* coilin, respektive SPH-1 (Tuma a kol. 1993), fibrillarin, Nopp140, snoRNAs a faktory pro zpracování 3' konce mRNA (Gall a kol. 1993). Proto se usoudilo, že sférickým organelám lze dát název Cajalova t líska.

Samoz ejm je mezi CB u sav ích bun k a u *Xenopus laevis* rozdíl nejen ve velikosti, kdy u *Xenopus* jsou CB v t-í a jsou ve v t-ím po tu, ale i v n kterých komponentách, které obsahují. Práce Hofmann a kol. (2002) ukázala, že v CB u *Xenopus laevis* je lokalizován symplenkin, cofl je protein, který je zapojen do zpracování mRNA. Váfle se na podjednotky -t píciho (Cstf) a polyadenyla ního specifického faktoru (Cpstf). Oba rovn íl najdeme v CB *Xenopus laevis* (Hofmann a kol. 2002). Tyto faktory se v-ak u sav ích bun k nachází ve -t píciích t lískách (cleavage bodies), které se nachází poblífl CB. Nejsou v-ak lokalizovány v nich. (Schul a kol. 1996). Také se v CB u sav ích bun k nenachází v-echny komponenty polymerázového komplexu jako je tomu u *Xenopus laevis*. Je tedy mořné, že CB u sav ích bun k ztratila b hem evoluce n které funkce, které p evzaly jiné organely, takové jako cleavage bodies, a vytvo ily se jiné mechanismy, které jsou pro sav í bu ku výhodn j-í. Také mohou být CB u *Xenopus laevis* podtypem CB u save , které se zase p izp sobily tak, aby co nejlépe vyhovovaly pořadavk m a prost edí bun k *Xenopus laevis* (Lamond a kol. 2005).

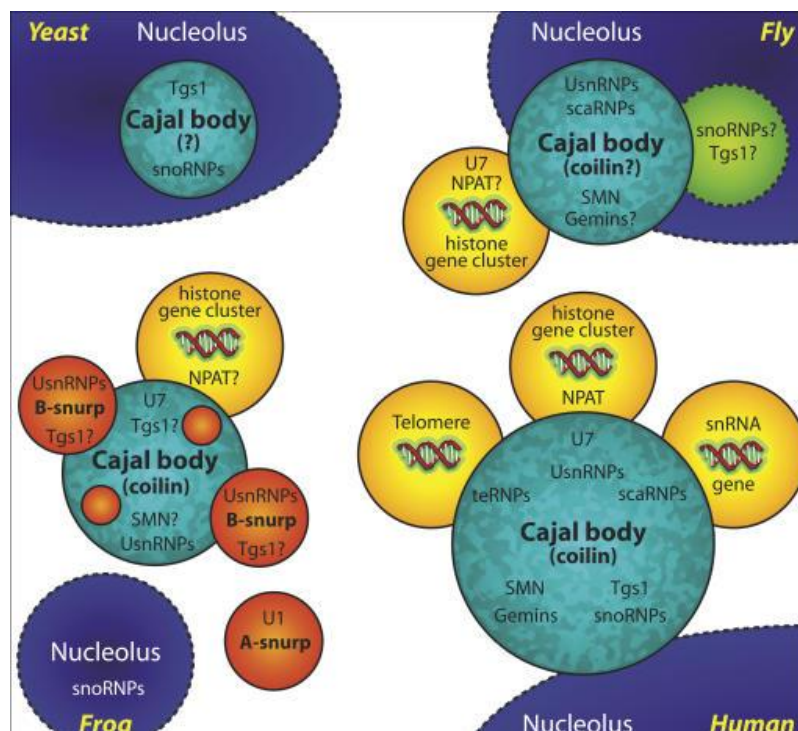
### **2.1.2. *Drosophila melanogaster*:**

Pokusy identifikovat Cajalova t líska v *Drosophila melanogaster* pomocí coilinu byly velmi málo úspěšné. Proto se k jejich lokalizaci pouřívaly jiné molekulární markery jako například

snRNAs, fibrillarin nebo malá CB- specifická (sca)RNA U85 (Liu a kol. 2006). Gen pro coilin CG870 (ortolog coilinu u savích buněk) u *Drosophily melanogaster* byl objeven později. Produkt genu CG870 je dlouhý 634 aminokyselin s molekulární hmotností 70,6 kDa (Liu a kol. 2009). Zjistilo se, že se vyskytuje nejméně ve dvou jaderných tělíčkách. V Cajalových tělíčkách, které obsahují složky potřebné pro sestihu a v jaderných tělíčkách, které byly separované a charakterizované U7 snRNP a jinými faktory vyskytujícími se ve zpracování pre-mRNA v oblastech histonů. Byly nazvány HLB (histone locus body), které mají v průměru kolem 100 μm (Gall kol. 2010). Tato práce Gall (2010) také poukazuje na změnu morfologie a složení jaderných tělíček během oogeneze. Tato zánětlivá somatická typy jaderných tělíček, kde jeden typ obsahuje coilin a druhý typ obsahuje faktory účastnící se ve zpracování histonových transkriptů. Během pozdější fáze oogeneze 1. typ tělíček mizí a místo toho se jaderné tělíčko obsahující coilin asociuje s histonovými geny. Dále se provedly experimenty, které ukázaly, že HLBs obsahují stejně jako u *Xenopus laevis* podjednotky RNA polymerázy II a to nejvíce v S-fázi buněčného cyklu (Gall a kol. 2010). Zde opět můžeme spekulovat, zda tento typ Cajalových tělíček byl původní a savčí typ se během evoluce proměnil. Je zde i odlišná sekvence proteinu coilinu, který nemáme u těchto Cajalových tělíček považovat jako jejich marker, jak je tomu u savců a *Xenopus laevis*. Oba však obsahují konzervované sekvence, které nalezneme u obou typů.

### 2.1.3. *Arabidopsis thaliana*:

CB byla objevena nejen v živočišných buňkách, ale i v buňkách rostlinných. Zjistilo se, že mezi lidskými CB a rostlinnými CB nejsou velké rozdíly. Oboje jsou velmi heterogenní dynamické struktury. V CB u *Arabidopsis* byl nalezen homolog coilinu, který má však velmi malý stupeň podobnosti (Collier a kol. 2006). Jeho gen byl identifikován pomocí fluorescenční mikroskopie. Cajalova tělíčka v *Arabidopsis* jsou sférická a často v asociaci s jádrem. V buňkách hypokotylu jsou jádřka velká a obvykle obsahují 1 Cajalovo tělíčko o průměru 1 μm.



Obrázek . 2: Schéma Cajalových tělíček a jejich vztahu k jádru v kvasince, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* a člověku. Pevzato z Journal of cell biology, Matera 2006

## 2.2. Komponenty Cajalova tělíčka:

CB obsahují faktory, které jsou vyřadovány pro sestihu, ribozomální biogenezi a transkripci. CB není obalené membránou, čímž všechny jeho složky jsou dynamické s relativně rychlým obrátem. Nejdelší dobu zdržení má coilin a SMN komplex. Naproti tomu kratší dobu se v CB zdržují složky snRNP a faktory sdílené s jádrem (Dundr a kol. 2004)

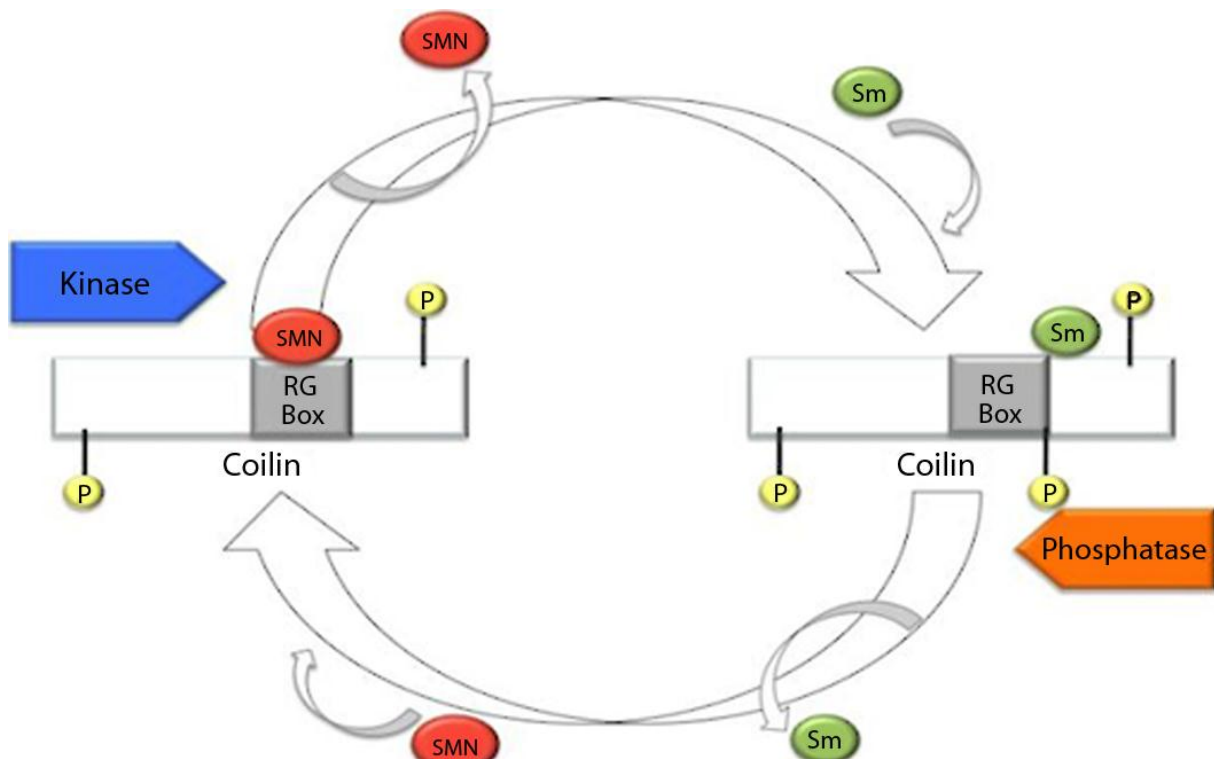
Kromě coilinu byly v CB objeveny další komponenty. Pomocí imunoelektronové mikroskopie a double label imunofluorescence byl identifikován fibrillarin, 34 kDa proteinová složka U3 RNP, dále byl identifikován Sm a U1 RNP antigen, které jsou složkami snRNPs a účastní se pre-mRNA sestihu (Ráka a kol. 1991).

### 2.2.1. Coilin:

Dnes se jako marker pro identifikaci CB užívá p80-coilin, který byl objeven Tanovou skupinou a jeho spolupracovníky v lidském autoimunním séru (Ra-ka a kol. 1991).

Coilin je specifický jaderný fosfoprotein skládající se z 576 aminokyselin, který je modifikován fosforylací serinu (Carmo-Fonseca a kol. 1993) a symetrickou dimethylací argininu. Tyto metylované argininy se nachází poblíž C-konce v oblasti RG box (obrázek . 7), ke kterému se váže SMN komplex (Obrázek . 3). Na svém N-konci obsahuje doménu, pomocí které interaguje sám se sebou a tvoří oligomery (Obrázek . 7). Ukázalo se, že tato doména je nezbytná pro lokalizaci coilinu do CB (Hebert a kol. 2010). Kromě SMN komplexu coilin váže i Sm proteiny a proteiny podobné Sm. Tyto proteiny interagují s C-koncem coilinu přes Sm foldó region, což je vysoce konzervovaný úsek v Sm/Lsm proteinových rodinách. Dále se ukázalo, že coilin interaguje s U4, U5 a U6 snRNPs, avšak ne s U1 a U7 snRNPs (Xu a kol. 2005). U *Xenopus laevis* se však ukázalo, že se coilin k U7 snRNP slabě váže (Gall a kol. 1998) Tyto výsledky jsou tedy odlišné. Obě skupiny také použily odlišné metody pro testování interakce coilinu s U7 snRNP.

Coilin se nachází v celém jaderném prostoru, především se koncentruje do CB, které jsou poté pomocí imunofluorescence viditelné jako zářivá jaderná ohniska (Santama a kol. 2005). Za jeho fosforylací je zodpovědná CDK2/cyclin E a může ho fosforylovat i casein kinasa 2 (CK2), která interaguje hlavně s proteinem Nopp140. Práce Hebert (2010) ukázala, že coilin může být fosforylován pomocí CK2 in vitro. S proteinem Nopp140 interaguje přes svůj N-konec, který slouží jako funkční spoj mezi jadérkem a CB (Isaac a kol. 1998). Pomocí kvasinkové dvouhybridní zkoušky s coilinem byl identifikován protein hCINAP, který s coilinem interaguje. Jedná se o ATP vázající protein o délce 172 aminokyselin a jeho amino-terminální P-smýčka ukazuje podobnost k rodině adenylát kináz (AK6). S coilinem interaguje přes jeho C-konec, který se zdá být nepostradatelný pro interakci. Pomocí imunofluorescence bylo ukázáno, že hCINAP je specifický jaderný protein (Santama a kol. 2005). V této interakci se podílí na stabilitě a formování CB.

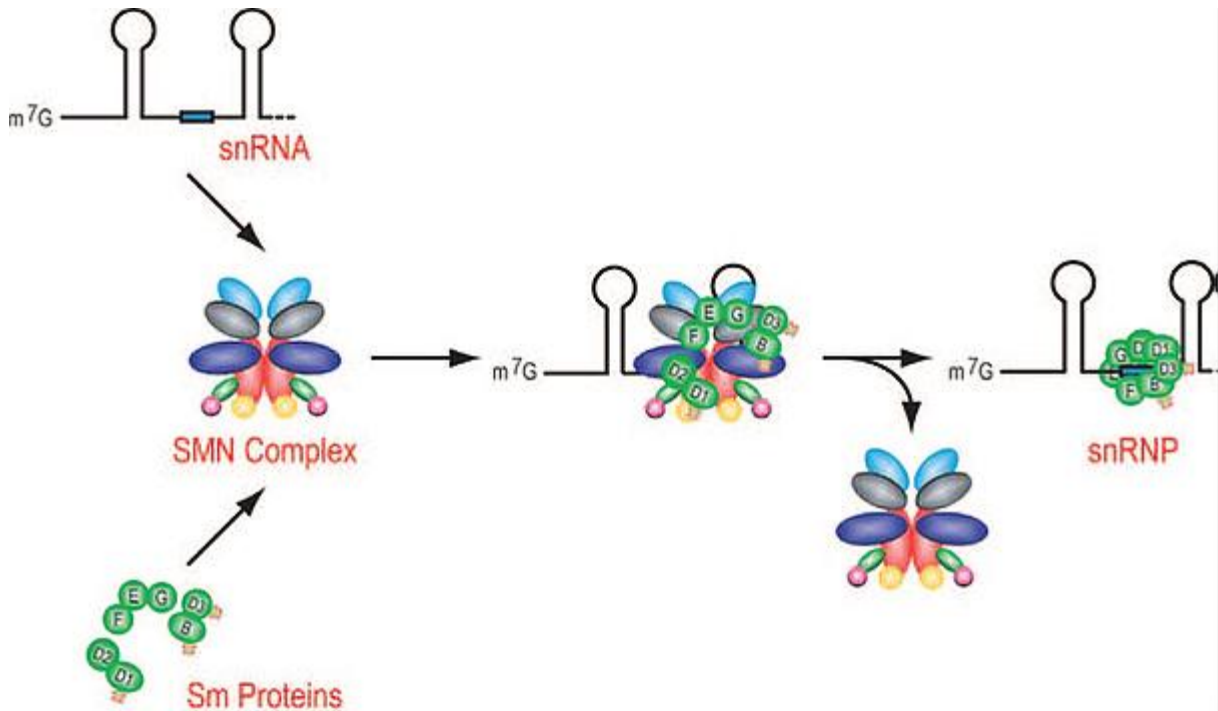


Obrázek . 3 : V CB m fle coilin existovat ve 2 fosfoisoformách, jedna, která obsahuje fosforylované zbytky v míst , kde coilin interaguje s SMN komplexem (v RG boxu) a Sm proteiny. Interakce mezi SMN a fosforylovaným coilinem (vlevo) odd lí snRNPs od SMN komplexu. Uvoln ý snRNP se m flou vázat na hyperfosforylovaný coilin (vpravo), umoíl ující snRNA modifikace. Fosforylace coilinu m fle podporovat uvoln ní SMN z CB a b hem fosfatázové aktivity by se mohly uvol ovat snRNPs. P evzato Hebert 2010

### 2.2.2. SMN komplex:

SMN neboli survival of motor neurons je protein o délce 294 aminokyselin a molekulární hmotností 32 kDa. SMN komplex je tvo en z SMN proteinu a 7 p ídavnými proteiny Gemin 2-8 (Liu a kol. 1996, Baccon a kol. 2002, Pellizzioni a kol. 2002). SMN komplex nalezneme u v-ech metazoí a ve v-ech bun ých typech obratlovc (Kolb a kol. 2007). SMN je p ítomný v cytoplasm i jádru, kde je koncentrován v CB a v jádérku. SMN se také vyskytuje v jaderné struktu e nazývajcí se gems, Gemini of coiled bodies, které byly objeveny pomocí imunofluorescence, kde zjistili, fle se shodují po tem i velikostí s CB (Liu a kol. 1996). Zajímavé je, fle bu ky, které obsahují gems také obsahují CB. SMN komplex je velmi d lefitý pro uspo ádání, metabolismus a transport r zných t íd RNP v etn snRNP. Je

nepostradatelný pro uspořádání Sm proteinů kolem snRNA v cytoplasmu. SMN komplex se přímě váže k Sm proteinům na jejich tudor úseky, kde se nachází symetricky metylované argininy, a na RNA komponenty RNPs (Xu a kol. 2005). Ztráta funkce uspořádání Sm proteinů kolem správných snRNA díky ztrátě SMN komplexu je příčinou spinální svalové atrofie.



Obr. 4: Schéma funkce SMN komplexu v uspořádání snRNP. SMN komplex se přímě váže na SM proteiny i na snRNA a uspořádává Sm proteiny kolem snRNA. Převzato z Journal of child neurology, Kolb a kol. 2007

### 2.2.3. RNA/RNP komponenty:

Maturace a biogeneze snRNAs a snoRNAs je úzce spojena s jejich buněčnou lokalizací. Nově transkribované snRNAs jsou vedeny do cytoplasmy, kde se váží na sadu společných Sm proteinů, které zajistí jejich návrat a cílení do CB (Lamond a kol. 2005). V jádře se snRNPs

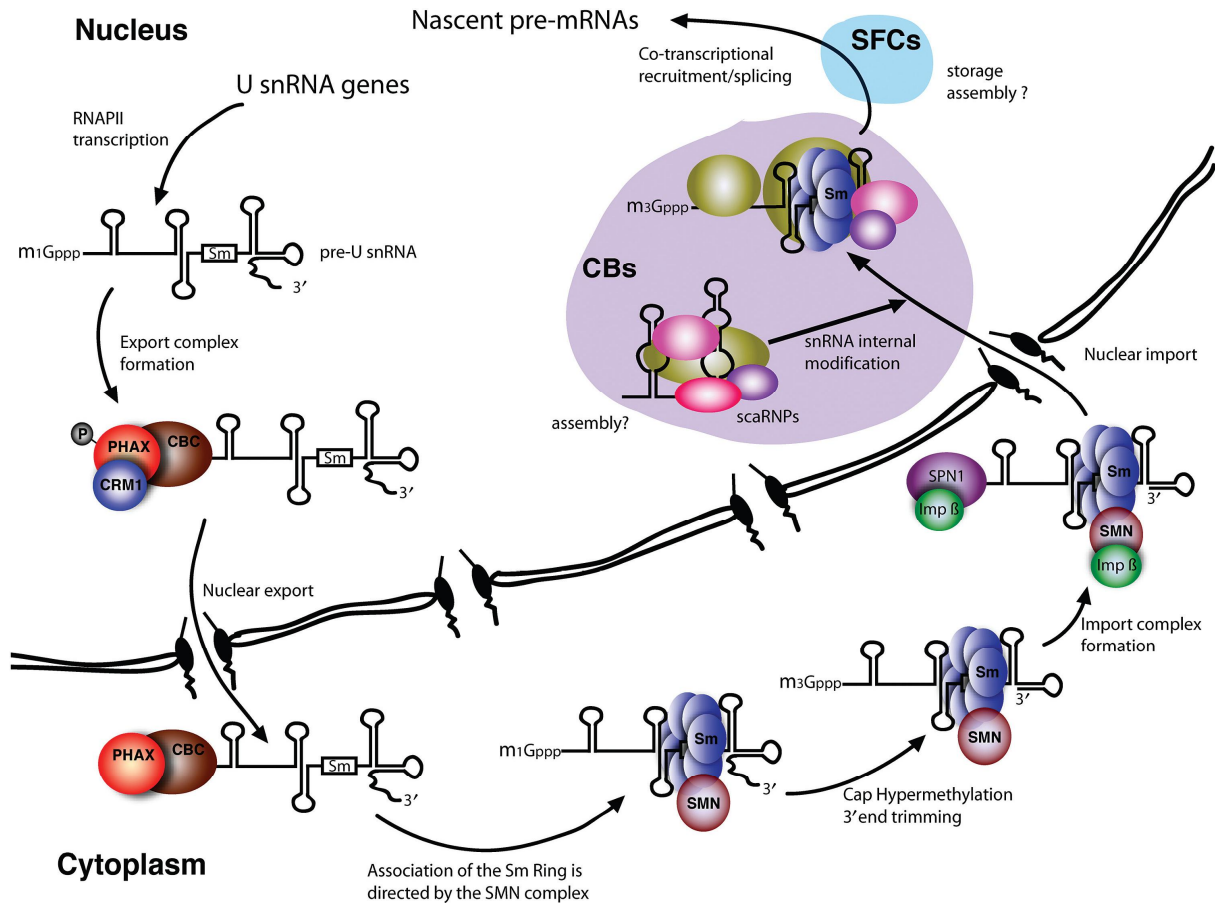
částice akumulují hlavně v CB. Jsou hypermetylované na 5'konci, což ukazuje, že byly importované z cytoplasmy a že to nejsou nascentní transkripty (Mattaj a kol. 1986).

### 2.2.3.1 snRNA:

snRNA se účastní v pre-mRNA sestihu jako malý jaderný ribonukleový komplex (snRNP). Jak už bylo psáno výše, geny pro U snRNA jsou asociovány s CB v savčích buňkách. Pro tuto asociaci je vyřadována transkripce těchto genů a přítomnost nascentního transkriptu U snRNA. (Frey a kol. 2001). Geny jsou transkribovány pomocí RNA polymerázy II a RNA polymerázy III, která transkribuje U6 snRNA (Paule a kol. 2000). Poté je na 5'konci nasynthetizována N7-methylguanidinová epikapsa ( $m^7G$  cap) (Eliceiri a kol. 1976). Na ní se naváže CBC (Patel a kol. 2008). 3'konci pre-snRNA je tvořen pomocí heterododekamerického metallo-laktamázového komplexu neboli integratoru, který je přímo vázán na C-terminální doménu (CTD) v RNA polymeráze II (Baillat a kol. 2005). Pro export do cytoplasmy je jeť vyřadován fosforylovaný adaptor pro RNA export (PHAX), který se váže na CBC. PHAX slouží jako adaptor mezi komplexem CBC/RNA a CRM1/RanGTP proteiny a je regulován fosforylací. Do cytoplasmy je U snRNA (kromě U6 snRNA) s navázanými proteiny přenesena přes jaderný pór. V cytoplasmě je PHAX následně defosforylován a komplex se rozpadne. PHAX i CBC jsou znovu přeneseny do jádra, kde je PHAX opět fosforylován pomocí CK2 a lze ho opět použít pro další export (Ohno a kol. 2000). V cytoplasmě interagují U snRNA za pomoci SMN komplexu se 7 Sm proteiny (B/B', D3, D2, D1, E, F a G) do formy snRNP Sm core struktury. Sm proteiny se vážou do vysoce konzervovaného místa PuAU<sub>4-6</sub>GPU na U snRNA (Will a kol. 2001). V cytoplasmě probíhá hypermethylace U snRNA na 2,2,7-tri-methylguanidinové ( $m_3G$ ) formy pomocí methyltransferasy (W.Mattaj 1986). Komplex je importován do jádra pomocí importinu a snurpotinu 1 (Narayanan a kol. 2004). Nejprve jsou smrovány do CB, než se začnou akumulovat v jiných jaderných částkách (Sleeman, 2001). V CB probíhá jejich modifikace pomocí scaRNAs. scaRNAs se akumulují specificky v CB a nebyly detekovány mimo něj. Fungují jako guide RNA v 2'-O-methylaci a pseudouridilaci U1, U2, U4 a U5 snRNAs (Jády a kol. 2001). Pokud scaRNA nejsou cíleny do CB ale do jádřka, nejsou snRNA modifikovány (Jády a kol. 2003). Jejich modifikace je však nezbytná pro jejich funkci (Yu a kol. 1998). Ukázalo se, že v CB se sestavuje komplex di-snRNP (U4/U6 snRNP) (Bell a kol. 2002). Proteiny SART3/p110, které asociují s U4/U6 snRNP jsou koncentrovány v CB (Staněk a kol. 2003). Dále se v CB tvoří i komplex tri-snRNP (U4/U6 a U5 snRNP), což je centrální



jednotka spliceosomu. Po inhibici jeho formace se ukázalo, že se v CB hromadí U4/U6 di-snRNPs a p110 (Schaffer a kol. 2004). Předpokládá se, že akumulace snRNP v CB urychluje sestavování U4/U6 tri-snRNPs (Klingauf a kol. 2006, Novotný a kol. 2011).



Obrázek 5: Model exportu a importu snRNAs zpět do jádra a jejich maturace v cytoplasmu. Převzato Nucleic Acid Research, Patel, Bellini, 2008

### 2.2.3.2 Telomerázová RNA:

Telomerasa je RNP reverzní transkriptáza, která syntetizuje telomerázové DNA repetice podle RNA templátu na konci chromozomu. Tento enzymatický komplex je sestaven z vnitřního RNA templátu, telomerázové reverzní transkriptázy (TERT), a dyskerinu (TERC vázající protein) (Venteicher a kol. 2009). V netransformovaných buňkách se telomery zkracují po každém buněčném dělení, což je důležitý aspekt pro stárnutí buněk. Starší buňky mají kratší telomery a nakonec podléhají apoptóze. FISH studie ukázaly, že RNA komponenta lidské

telomerázy (hTR) se nachází v CB v bu kách nádorových linií. Nejvíce hTR v CB bylo detekováno v průběhu S-fáze bun ěného cyklu. Pomocí (time-lapse) imunofluorescen ní mikroskopie se ukázalo, že CB pohybující se v nukleoplasm ě v S fázi bun ěného cyklu asociují s telomerázou 10-40 minut (Jády a kol. 2006). Je zde vázána k scaRNA díky svému CAB boxu, který je pro lokalizaci vyžadován (Jády a kol. 2004). Je zde možnost, že CB mohou doručovat hTR do k telomerám nebo fungovat v jejich regulaci (Jády a kol. 2006)

#### **2.2.4 Fibrillarin:**

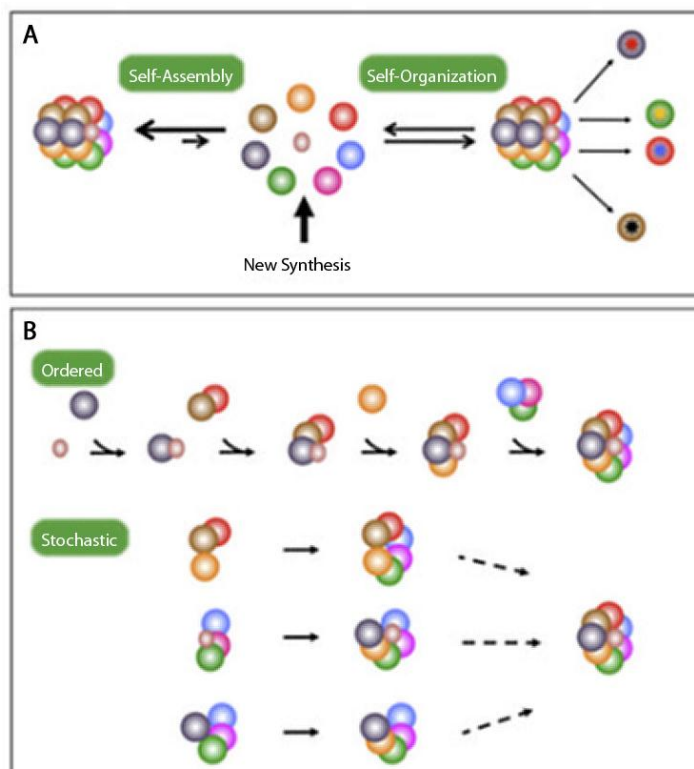
Fibrillarin je 34 kDa protein, který byl identifikován v autoimunním séru z pacient ě se sklerodermií pomocí nepřímé imunofluorescence. Elektronová mikroskopie nám poté ukázala, že fibrillarin se nachází ve fibrilárním regionu jádřka, proto tento protein dostal název fibrillarin (Ochs a kol. 1985). Je velmi evolu ěn konzervován. Jeho homology najdeme i u nířních eukaryot. Jeho kvasinkový homolog je protein Nop1. Pomocí fluorescen ní mikroskopie, kdy na fibrillarin byl navázán GFP a CB byla zviditeln ěna imunofluorescen ní zna ěním p80 coilinu, se ukázalo, že fibrillarin není vázán jen v jádřku, ale je lokalizován i v CB (Snaar a kol. 2000). Je asociován se v ěmi C/D box snoRNAs, které se účastní 2'-O-metylace, a nebo jako chaperony ve zpracování rRNA (Watkins a kol. 2000). Studie Steitz (1989) ukázala, že fibrillarin se váže na U3, U8 a U13 snoRNA. Bylo ukázáno, že fibrillarin je důležitý pro tvar jádřka a pro bun ěný řst. Bu ky ochuzené o fibrillarin vykazovaly abnormální morfologii jadřného uspo řádání (Amin a kol. 2007). Fibrillarin je nezbytný v posttranskrip ěních úpravách pre-rRNA a v uspo řádání ribosomu. Bylo zjiřeno, že funguje jako metyl-transferása (Tollervey a kol. 1993).

### **3. Formování Cajalových tělísek:**

Cajalova tělířka jsou velmi dynamické struktury m ěnící sv ě j po et ě velikost během bun ěného cyklu. Zjistilo se, že nejvyšřho po tu dosahují CB p ě p ěchodu z M fáze do G1 fáze bun ěného cyklu (Andrade a kol. 1993). Cofil znamená, že na formování Cajalových tělířek má velký vliv fáze bun ěného cyklu bu ky a hlavn ě její transkrip ní aktivita, pon vadž CB hrají významnou roli p ě zpracování pre-mRNA. V poslední dob ě se zjiřuje, že na jejich formování mají také velký vliv řzné modifikace coilinu, nap řklad jeho fosforylace (Hebert 2010).

Byly uvedeny dvě fundamentální hypotézy formování CB (obrázek .6) (Misteli 2008). Jedna hypotéza tvrdí, že se tvoří náhodně, tzv. Stochastic self-organization model, kdy se komponenty spojují bez daného pořadí. Toto tvrzení bylo i podpořeno prací Kaiser, Dundr (2008), ve které demonstrovali formaci CB de novo pomocí lac represor/operator systému. Vzniklé CB měly velmi podobnou velikost jako endogenní CB a velmi podobnou disociační kinetiku. Hlavní výsledek této práce byl, že jakákoli komponenta CB, která byla imobilizovaná na Lac lokusu, mohla iniciovat formování CB. Avšak práce White (2011) nám ukázala, že ne všechny kroky formace jaderných tělísek jsou náhodné. Autoi provedli analýzu mechanismu uspořádání HLB (histon locus body) u *Drosophily melanogaster*, ve které identifikovali faktory Mxc a FLASH, které se uspořádají v raném embryu během 10. buněného cyklu a až během 11. buněného cyklu se k nim naváží další komponenty HLB (U7 snRNP, Mute, MPM-2) hlavně díky fosforylaci Mxc, který je substrátem pro cyklin E/ cdk 2. Tento nenáhodný krok nebyl pozorován u savčích buněk, ale jen u buněk *Drosophily melanogaster*.

Druhý model ukazuje, že formování CB je vysoce kontrolovaná série kroků, ve kterých se komponenty spojují v přesném pořadí tzv. The ordered assembly model (Misteli 2008).



Obrázek . 6: Modely formování Cajalových tělísek. Pevzato Dev Cell. 2009, Matera

### **3.1 Dlefité faktory pro formování CB:**

Dlefitými faktory pro formování CB je transkripční aktivita buky, buný cyklus a v neposlední ad se ukazuje i rzné modifikace coilinu a jiných komponent CB.

#### **3.1.1. Transkripční aktivita buky**

Dlefitým krokem k formování CB je jeho iniciace. Jif d íve bylo pozorováno, fe se CB formují v blízkosti gen U2 snRNP a jejich asociace vyf laduje nascentní transkripty (Matera 2001). RNA tedy m fe sloufit jako fyziologické idlo pro iniciaci formace CB (Dundr 2011). Formace na základ transkript RNA byla ukázána v práci Shevstov, Dundr (2011), kde ukázali, fe transkripce je ídíící silou ve formování jaderných t lísek a RNA transkripty m flou sloufit k imobilizaci voln difundujících klí ových komponent jaderných t lísek a sloufit jako jejich le-ení p i jejich formaci. Z ejm nejpravd podobn j-í model formování jaderných t lísek za pomoci RNA transkript je, fe nascentní RNA transkripty, které jsou syntetizované v ur ítých genových místech, jsou schopné p itahovat a zadržovat komponenty ze nukleoplasmu, cofl vede k formování ur ítých jaderných t lísek. Tento model podporují i p ede-íé výsledky práce Dundr a kol. z roku 2008, kde ukázali formaci CB de novo z jakýchkoli jeho komponent. Dále se zjistilo, fe sest íh se d je na transkriptech, které jsou stále p ipojené k RNA polymeráze II (Brody 2011). CB se tedy m flou formovat na RNA transkriptech v míst , kde jsou pot eba snRNA pro sest íh k urychlení zpracování pre-mRNA (Dundr 2011). Také velká tvorba Sm proteinu v primárních bun ých liniích, které oby ejn neobsahují CB a hladina snRNP vede k formaci CB (Sleeman 2001).

#### **3.1.2. Coilin a formování CB:**

Coilin je fosfoprotein, který se poufívá jako marker pro identifikaci CB (Ra-ka 1991). Byly provedeny r zné muta ní analýzy, které ukázaly, fe coilin je d lefitý pro formování CB i pro jeho integritu. Ukázalo se, fe fosforylace je jednou z nejd lefit j-ích modifikací coilinu p i formaci CB, ale jeho fosforylace se zv t-uje b hem mitózy (obrázek . 7), ve které se naopak CB rozru-ují (Fornseca a kol. 1993). Jeho fosforylace a defosforylace by mohla jedna z regulací formování CB.

Byly provedeny pokusy na generaci my-í, které chyb lo 487 aminokyselin na C-konci coilinu. Analýzou tkání a bun ých linií ze vzniklých homozygotních mutant byla pozorována mimojaderná ohniska obsahující fibrillarín a Nopp140, ale fládné jiné jaderné

zna ky. Tyto ohniska jsou nazývána zbytková CB (residual CB). Tato studie demonstruje, že pro správnou formaci CB je potřebná plná délka proteinu coilinu. Bylo zde také pozorováno, že ve zbytkových CB se nevyskytovaly SMN komplex a snRNP, což ukazuje, že vazebné místo pro tyto komponenty leží na C-konci coilinu (Tucker a kol. 2001). U *Arabidopsis thaliana* a *Drosophily melanogaster* naopak není detekován viditelný fenotyp v r stu i plodnosti pokud chybí coilin a CB. U *Arabidopsis thaliana* byly sestaveny mutanty, u kterých byla provedena delece v genu pro Atcoilin, což znamenalo ztrátu CB a bodové mutace, i áste né delece v tomto genu. Zde pozorovali snižující se velikost CB. Nem lo to v-ak vliv na r stový fenotyp. Hypotéza, že coilin určuje velikost CB je také podpo ena expresí Atcoilin cDNA v transgenních rostlinách *Arabidopsis*, což vedlo k velké expresi Atcoilinu a ke zv t-ení CB (Collier a kol. 2006), av-ak p i velké expresi lidského coilinu v HeLa bu kách byla CB rozru-ena (Shpargel a kol. 2003). Podobn ě jako u *Arabidopsis* je tomu i u *Drosophily melanogaster*, zde se ukázalo, že coilin je nepostradatelný pro formaci CB, ale nemá vliv na flivotaschopnost a plodnost. V této studii je zajímavé, že u mutant ě, ve kterých chyb ěl coilin, byla detekována HLB ale ne CB, z ěhož vyplývá, že coilin nemá vliv na formaci HLB (Liu a kol. 2009). U my-í vedla delece genu pro coilin ke snížení flivotaschopnosti a m la vliv na fertilitu. U zebrafish se tato delece projevila úmrtím zárodk ěb hem embryogeneze (Strzelecka a kol. 2010).

### 3.1.2.1 Modifikace coilinu:

Bylo provedeno mnoho experiment ě na modifikaci coilinu, které ukázaly jeho velký vliv na formování CB.

Jedním z t chto experiment ě byla specifická delece C-konce p80 coilinu u lov ka, která ukázala, že lokalizace coilinu v CB není urč ena analogem k NLS (jaderný lokaliza ní signál) motivu, který je vyřadován v jaderném importu. Tyto mutanty netvo ěly klasické CB, ale tzv. pseudo-CB, které nebyly schopny dopl ovat snRNPs (Bohmann 1995). Zjistilo se, že C-konec v coilinu obsahuje doménu bohatou na fosfoserinové zbytky a reguluje po et CB v bu ce. Velmi zajímavé je, že heterologní protein coilin vykazuje r zný regula ní potenciál v r zných bu kách. Nap íklad my-í coilin produkuje po etná ohniska v HeLa bu kách, pokud je produkován ve vysoké hladin ě, ale naopak je tomu u my-ích bun k, kde vysoká produkce coilinu vedla ke -patné formaci ohnisek. fiabí coilin produkuje po etná ohniska v my-ích i HeLa bu kách, av-ak nemá C-konec bohatý na serin jako je tomu u lidského a my-ího

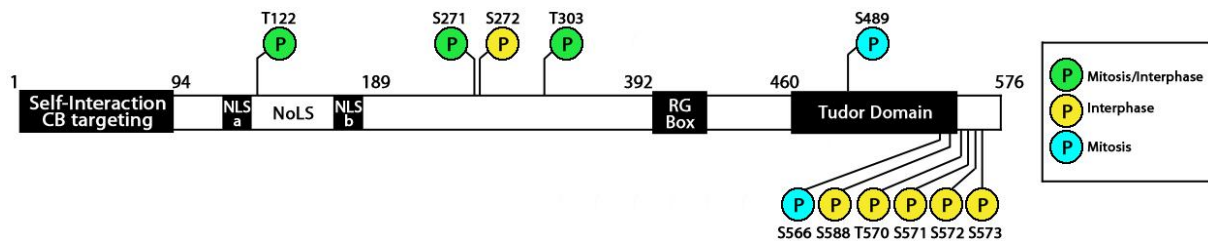
coilinu, který má v t-í regula ní p ekáflky se z etelem k jejich schopnosti formovat CB (Shpargel a kol. 2002)

Práce Lyon (1997) ukázala, že defosforylace je vyžadována pro normální formaci CB. Auto i vystavili HeLa bu ky nízké hladin specifickému Ser/Thr protein fosfatázovému inhibitoru ó okadaové kyselin , která zp sobila akumulaci p80 coilinu a snRNP v jádru. Celý tento d j je vratný. Dále zkonstruovali mutanty S202D u nichž zam nili serin 202 za aspartát, ímž zabránili fosforylaci coilinu na serinovém zbytku. Tato bodová mutace také zp sobila lokalizaci snRNP v jádru.

Dal-í modifikací coilinu, která reguluje formaci CB, je jeho metylace. Lidský coilin obsahuje argininy 397, 410, 413 a 415, které jsou dimethylovány in vivo (Boisvert a kol. 2002). Tyto argininy jsou lokalizovány v GAR regionu, což je známé místo jejich metylace (Gary a kol. 1998). Bylo potvrzeno, že coilin obsahuje sDMA (symetrické dimetyl-argininové) zbytky. Jejich mutace v coilinovém RG boxu, který je zodpov dný za vazbu k SMN, m la za následek formaci Gems. Inhibice proteinové metylace in vivo a in vitro výrazn snížila vazbu coilinu k SMN. Tato studie ukázala, že symetrická dimethylace coilinového RG boxu ur uje, zda bude SMN komplex formovat gems nebo se bude za le ovat do CB (Hebert a kol. 2002). Tuto studii potvrzuje i práce Boisvert (2002), kde pomocí inhibitoru metylasy (MTA) se snížil počet CB a zvýšil se počet Gems. Výsledkem je, že metylace coilinu je velmi d ležitá pro udržení SMN v CB. Za metylaci arginin u coilinu je zodpov dný enzym PRMT5 (protein arginin metyltransferasa 5). Tento enzym a je-t PRMT7 jsou také zodpov dné za symetrickou dimethylaci arginin u Sm protein (Gonsalvez a kol. 2007), která je d ležitá k navázání se k SMN komplexu p i tvorbu jádra kolem snRNA v cytoplasm . SMN se váže preferen n k metylovaným Sm protein m (Brahms a kol. 2001). Bylo prokázáno, že p i deregulaci metyltransferáz PRMT5 a PRMT7 se snížil počet snRNA s uspo ádaným Sm core (Gonsalvez a kol. 2007), inhibice tohoto uspo ádání snRNPs m že p ísp í k rozrušení CB (Lemm a kol. 2006).

R zné studie nám ukázaly, že coilin m že indukovat formaci CB nebo CB podobných struktur, záleží v-ak z jakého organismu coilin použijeme k sestavení konstruktu (Hebert 2010). Byla provedena studie, ve které p ípojili na N-konec coilinu GFP (N-konec obsahuje doménu zodpov dnou za vlastní interakci coilinu). Tento zna ený coilin normáln lokalizoval v CB. Naproti tomu coilin spojený s GFP p es C- konec ukázal formaci početných ohnisek, které byly podobné jako u CB a obsahovaly Sm epitopy a protein fibrillarin (Hebert a kol.

2000). Podobná ohniska nalezneme i u mutací v coilinu v lidských buňkách (Shpargel a kol. 2003).



Obrázek 7: Schéma lidského coilinu ukazující místo coilinové vlastní interakce, jadérového lokalizačního signálu (NoLS), jaderného lokalizačního signálu, RG box a tudor doménu. Jsou zde zobrazeny fosforylované zbytky. Modré jsou významné fosforylované zbytky v mitóze, žluté v interfázi a zelené v mitóze i interfázi. Převzato z PLoS one, Hebert 2011

### 3.1.3. Další faktory dle formování CB:

Mnoho studií vyvolává RNA interferenci k vyřazení proteinů, které se akumulují v CB nebo jsou dle formování pro snRNP uspořádání a ukazují nám, že celistvost CB není závislá jen na jedné komponentě.

Vztah mezi probíhající U snRNP biogenezí a strukturou celistvosti CB byl prokázán v práci Lemm z roku 2006, kde pomocí RNA interference, provedli depleci hTGS1 (lidský homolog methyltransferasy, která provádí hypermetylaci m<sup>7</sup>G epimarku na 5' konci U snRNAs), SMN a PHAX proteinu v HeLa buňkách. Výsledkem bylo, že ztráta 1 z těchto 3 proteinů má za následek rozptýlení coilinu v nukleoplasmu do početných malých ohnisek. Což znamená, že CB se rozpadají, pokud je blokována biogeneze U snRNPs. Také studie Carvalho (1999) ukázala, že inhibice transportu U snRNAs do cytoplasmy pomocí Leptomycin B, vede k vyřazení snRNPs z CB a následně ke snížení jejich počtu. Všechny tyto studie ukazují, že na formaci CB má velký vliv biogeneze snRNPs a komponenty s ní spojené. Na rozpad CB nemá podíl jen zastavení U snRNP biogeneze, ale podílí se na něm i protein FLASH, který se nachází v CB a je nezávislý na přítomnosti coilinu. Jeho vyřazení způsobí ztrátu CB a lokalizaci coilinu v perinukleárním prostoru (Barcaroli a kol. 2006).

Dynamická povaha CB se také odvíjí od metabolického stavu buňky. Například práce Alvarez (2007) ukázala regulaci rRNA syntézy mezi létem a zimou u eurytermní ryby. Tato regulace hraje důležitou roli v sezónní aklimatizaci. Pomocí RT-PCR (real time polymerázová reakce) analyzovali transkripty p80 coilinu ve všech tkáních a ukázali, že genová

exprese coilinu byla vyšší u ryb aklimatizovaných na letní poasí než u ryb, které byly aklimatizované na zimu. To ukazuje, že organizace CB může hrát roli i v adaptivních procesech. Bylo by zajímavé provést tuto studii u více organismů. U ryb byl také analyzován počet CB během embryogeneze (Strzelecka a kol. 2010). Práce Malatesta z roku 1994 zase ukazuje změnu počtu CB u hibernujících kůrek, kteří měli v jádru během hibernace velký počet CB a téměř žádně po ní. Počet CB se také mění během vývoje, protože pro buňku je výhodnější mít více CB ve stavu, kdy je zvýšená potřeba zpracování RNA. Nejvíce gems a CB se vyskytuje ve fetálních tkáních, kde se nachází v podobě separovaných struktur. Jejich separace však mizí s přibývajícím věkem a v tkáních dospělého jedince zmizí úplně. Výjimkou jsou motorické neurony, kde CB a gems jsou početněji než ve fetální tkáni (Young a kol. 2001).

Další faktor ovlivňující počet CB v buňce může být její fyziologický stav. V transformovaných savčích buňkách pomocí adenoviru byl zjištěn nárůst až na 99 % buněk, které obsahovaly CB. Stejný jev byl viděn i u nesmrtelných buněk, kde CB byly až u 40 % buněk (Spector a kol. 1992). Další studie nám ukázala zvyšující se počet CB u neuronů krys, které byly vystaveny osmotickému šoku. Zvýšení počtu CB bylo zapříčineno zvýšenou genovou expresí (Lafarga a kol. 1991).

CB formaci mohou také indukovat exogenně předané komponenty CB. V oocytech u obojživelníků byl detekován zvýšený počet CB, při injekci in vitro syntetizované U7 snRNA nebo funkcích U7 snRNA genů (Tuma a kol. 1999). Práce Kaiser (2008) také ukazuje, že CB mohou být formovány de novo pomocí komponent jako je coilin, SMN komplex i snRNPs.

#### **3.1.4. Regulace formování CB:**

Je zřejmé, že CB jsou zodpovědná za uspořádání a modifikaci snRNPs a za správný průběh transkripce. V regulaci CB biogeneze může hrát důležitou roli posttranslační modifikace jejich komponent jako je například fosforylace (Hebert 2010). K této myšlence přispěla studie Lyon z roku 1997, kde inhibice serin/threonin fosfatázy ukázala hromadění CB v jádru. Stejně tomu je i u bodové mutace, kde byl serinový zbytek 202 zaměněn za aspartát.



Další myšlenkou regulace CB biogeneze je pomocí buněného cyklu. Hlavní dráha, ve které mitogeny podporují vstup buňky do buněného cyklu, který zahrnuje i aktivaci Cdk (cyklin dependentních kináz), je MAP kinázová dráha vedoucí ke zvýšení exprese proteinu Myc, který stimuluje expresi mnoha genů, které jsou dleflité v buněném rstu. Cdk2/cyklinE se nachází v CB během  $G_1$  a S fáze buněného cyklu (Hebert 2010) a studie Liu (2000) ukázala, že tato kináza a možná i casein kináza 2 může fosforylovat coilin in vitro. Během mitózy se CB rozruší (Carmo-Fonseca a kol. 1993). To není zapříčiněno změnou hladiny coilinu, která je u normálních buňek během buněného cyklu relativně konstantní (Andrade a kol. 1993), nýbrž díky mitoticky specifické fosforylaci coilinu na nejméně dalších 2 místech (obrázek 7) (Carmo-Fonseca a kol. 1993). Specifické kinázy a fosfatázy, které modifikují proteiny CB takové jako je coilin i Nopp140, nejsou stále známé.

V podmínkách, kdy buňka je ve stresu jsou generované signály, které mohou také působit k regulaci biogeneze CB. Protein p53 je senzor buněného stresu, který je přímo vázaný na SMN protein a oba se tedy nachází v CB. Při přerušení této interakce dochází k apoptóze, což může vysvětlovat úbytek motorických neuronů u pacientů se spinální svalovou atrofií (Young a kol. 2002). Také při infekci adenovirem bylo pozorováno rozrušení CB a p80 coilin byl detekován v početných malých ohniskách, které neobsahovaly snRNP. V tomto případě nemá na rozrušení CB přímý vliv adenovirus, ale následná inhibice transkripce hostitelských proteinů (Rebelo a kol. 1996).

#### 4. Závěr:

Ukazuje se, že CB jsou velmi heterogenní struktury, které hrají dleflité role v mnoha dalších odehrávajících se v jádře buňky. Jsou nalezeny v různých organismech, avšak u některých organismů vykazují i jiné funkce než v savčích buňkách, kde je převzaly jiná jaderná tělíska, například cleavage bodies. Zde se jedná nejspíše o evoluční přizpůsobení CB různým buněným potřebám u různých druhů. Je zajímavé, že při ztrátě CB u savců, například u myši, vykazují buňky nižší životaschopnost a fertilitu, kdežto u buňek rostlin i *Drosophily melanogaster* nevykazuje tato ztráta žádný viditelný fenotyp. U *Drosophily* se však vyskytují ječ HLB, které se účastní regulace genové exprese histonových genů. Zřejmě nejdaleflitější komponentou v CB je fosfoprotein coilin, který je dleflitý ve formování CB prostřednictvím jeho modifikací. Pomocí inhibitoru fosfatázy bylo ukázáno, že jeho defosforylace je dleflitá při formování CB, avšak jeho hyperfosforylace v mitóze zapříčiní jejich rozpad. Je zřejmé, že protein coilin se účastní i regulace biogeneze CB, prostřednictvím Cdk2/cyklin E, která se

aktivuje během buněčného cyklu savčích buněk. Coilin není jediný fosfoprotein CB, který se účastní jejich formace. Nejsou známy další kinázy ani fosfatázy, které by tyto komponenty modifikovaly.

Na formaci CB má kromě buněčného cyklu a transkripční aktivity vliv okolního prostředí působící na organismus. Studie ukázala závislost teploty na formaci CB, například při adaptaci na teplé a studené prostředí u ryb, podobná studie byla provedena i u hibernujících savců, která také ukázala vliv na formaci a počet CB, tento jev je zejména spjatý s velikostí genové exprese. Dalším iniciátorem formace CB je transformace buněk pomocí viru (například adenoviru). Naproti tomu pokud nedojde k transformaci, ale pouze k virové infekci počet CB klesá z důvodu inhibice transkripce hostitelských genů. Z toho vyplývá, že ne každý virus může zvýšit počet buněk s CB v organismu.

Ze studie Kaiser (2008) víme, že CB se mohou formovat de novo. Jejich formace zde neukázala hierarchické uspořádání, avšak tato studie byla provedena pouze v HeLa buňkách. Jiná studie, která byla provedena u buněk *Drosophily melanogaster* ukázala, že všechny kroky ve formaci jsou úplně náhodné a že k určitému kroku je potřeba modifikace určité komponenty. Nelze tedy zcela jasně říct, že formace CB probíhá podle stochastického modelu i podle modelu hierarchického uspořádání. Stále také nejsou známy iniciátory formace. Byly provedeny experimenty, které ukazují, že RNA by mohla sloužit jako lepení pro jejich výstavbu. Ve studii Kaiser 2008 k de novo formaci použili komponentu CB, i když jako iniciátor by mohl sloužit i protein vyskytující se v CB. Nemyslím si však, že to může být jakákoli komponenta CB, která by mohla iniciovat jejich formaci. Tuto hypotézu potvrzují i studie, ve kterých do buněk vpravili pomocí mikroinjekce U7 snRNA, která iniciovala formaci CB. Tyto pokusy by se mohly provést s více komponenty CB. Nejsou ještě zcela známy funkce a vznik CB, avšak je zejména, že jsou nepostradatelnou složkou v tělní buněk, vzhledem k jejich výskytu u nižších a vyšších živočichů i u rostlin a že během evoluce nedošlo k jejich ztrátě.

## 5. Reference:

- Alvarez, M., G. Nardocci, M. Thiry, R. Alvarez, M. Reyes, A. Molina, and M. I. Vera. "The Nuclear Phenotypic Plasticity Observed in Fish During Rna Regulation Entails Cajal Bodies Dynamics." [In English]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, no. 1 (Aug 2007): 40-45.
- Amin, Mohammed Abdullahel, Sachihito Matsunaga, Nan Ma, Hideaki Takata, Masami Yokoyama, Susumu Uchiyama, and Kiichi Fukui. "Fibrillarin, a Nucleolar Protein, Is Required for Normal Nuclear Morphology and Cellular Growth in Hela Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 360, no. 2 (2007): 320-26.
- Andrade, L. E. C., E. K. L. Chan, I. Raska, C. L. Peebles, G. Roos, and E. M. Tan. "Human Autoantibody to a Novel Protein of the Nuclear Coiled Body - Immunological Characterization and Cdna Cloning of P80-Coilin." [In English]. *Journal of Experimental Medicine* 173, no. 6 (Jun 1991): 1407-19.
- Andrade, L. E. C., E. M. Tan, and E. K. L. Chan. "Immunocytochemical Analysis of the Coiled Body in the Cell-Cycle and During Cell-Proliferation." [In English]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 5 (Mar 1993): 1947-51.
- Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. "Identification and Characterization of Gemin7, a Novel Component of the Survival of Motor Neuron Complex." [In English]. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 35 (Aug 2002): 31957-62.
- Baillat, David, Mohamed-Ali Hakimi, Anders M. Näär, Ali Shilatifard, Neil Cooch, and Ramin Shiekhattar. "Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear Rna Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of Rna Polymerase Ii." *Cell* 123, no. 2 (2005): 265-76.
- Barcaroli, D., D. Dinsdale, M. H. Neale, L. Bongiorno-Borbone, M. Ranalli, E. Munarriz, A. E. Sayan, et al. "Flash Is an Essential Component of Cajal Bodies." [In English]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 40 (Oct 2006): 14802-07.
- Bell, M., S. Schreiner, A. Damianov, R. Reddy, and A. Bindereif. "P110, a Novel Human U6 Snrnp Protein and U4/U6 Snrnp Recycling Factor." [In English]. *Embo Journal* 21, no. 11 (Jun 2002): 2724-35.
- Bellini, M., and J. G. Gall. "Coilin Can Form a Complex with the U7 Small Nuclear Ribonucleoprotein." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 9, no. 10 (Oct 1998): 2987-3001.
- Boisvert, F. M., J. Cote, M. C. Boulanger, P. Cleroux, F. Bachand, C. Autexier, and S. Richard. "Symmetrical Dimethylarginine Methylation Is Required for the Localization of Smn in Cajal Bodies and Pre-Mrna Splicing." [In English]. *Journal of Cell Biology* 159, no. 6 (Dec 2002): 957-69.
- Brahms, H., L. Meheus, V. De Brabandere, U. Fischer, and R. Luhrmann. "Symmetrical Dimethylation of Arginine Residues in Spliceosomal Sm Protein B/B' and the Sm-Like Protein Lsm4, and Their Interaction with the Smn Protein." [In English]. *Rna-a Publication of the Rna Society* 7, no. 11 (Nov 2001): 1531-42.
- Brody, Y., N. Neufeld, N. Bieberstein, S. Z. Causse, E. M. Bohnlein, K. M. Neugebauer, X. Darzacq, and Y. Shav-Tal. "The in Vivo Kinetics of Rna Polymerase Ii Elongation During Co-Transcriptional Splicing." [In English]. *Plos Biology* 9, no. 1 (Jan 2011).
- Carmofonseca, M., J. Ferreira, and A. I. Lamond. "Assembly of Snrnp-Containing Coiled Bodies Is Regulated in Interphase and Mitosis - Evidence That the Coiled Body Is a Kinetic Nuclear-Structure." [In English]. *Journal of Cell Biology* 120, no. 4 (Feb 1993): 841-52.
- Carrero, Z. I., V. Velma, H. E. Douglas, and M. D. Hebert. "Coilin Phosphomutants Disrupt Cajal Body Formation, Reduce Cell Proliferation and Produce a Distinct Coilin Degradation Product." [In eng]. *PLoS One* 6, no. 10 (2011): e25743.
- Carvalho, T., F. Almeida, A. Calapez, M. Lafarga, M. T. Berciano, and M. Carmo-Fonseca. "The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, Smn: A Link between Snrnp Biogenesis and the Cajal (Coiled) Body." [In English]. *Journal of Cell Biology* 147, no. 4 (Nov 1999): 715-27.

- Cioce, M., and A. I. Lamond. "Cajal Bodies: A Long History of Discovery." In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 105-31. Palo Alto: Annual Reviews, 2005.
- Collier, S., A. Pendle, K. Boudonck, T. van Rij, L. Dolan, and P. Shaw. "A Distant Coilin Homologue Is Required for the Formation of Cajal Bodies in Arabidopsis." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 17, no. 7 (Jul 2006): 2942-51.
- Darzacq, X., B. E. Jady, C. Verheggen, A. M. Kiss, E. Bertrand, and T. Kiss. "Cajal Body-Specific Small Nuclear Rnas: A Novel Class of 2'-O-Methylation and Pseudouridylation Guide Rnas." [In English]. *Embo Journal* 21, no. 11 (Jun 2002): 2746-56.
- Dundr, M. "Seed and Grow: A Two-Step Model for Nuclear Body Biogenesis." [In eng]. *J Cell Biol* 193, no. 4 (May 16 2011): 605-6.
- Dundr, M., M. D. Hebert, T. S. Karpova, D. Stanek, H. Xu, K. B. Shpargel, U. T. Meier, et al. "In Vivo Kinetics of Cajal Body Components." [In eng]. *J Cell Biol* 164, no. 6 (Mar 15 2004): 831-42.
- Eliceiri, George L., and Marta S. Sayavedra. "Small Rnas in the Nucleus and Cytoplasm of HeLa Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 72, no. 2 (1976): 507-12.
- Frey, M. R., and A. G. Matera. "Association of Snrna Genes with Coiled Bodies Is Mediated by Nascent Snrna Transcripts." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 10 (Nov 1999): 438A-38A.
- ô ô ô . "Rna-Mediated Interaction of Cajal Bodies and U2 Snrna Genes." [In English]. *Journal of Cell Biology* 154, no. 3 (Aug 2001): 499-509.
- Gall, J. G. "Cajal Bodies: The First 100 Years." [In English]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16 (2000): 273-+.
- ô ô ô . "A Role for Cajal Bodies in Assembly of the Nuclear Transcription Machinery." [In English]. *Febs Letters* 498, no. 2-3 (Jun 2001): 164-67.
- Gall, J. G., M. Bellini, Z. A. Wu, and C. Murphy. "The Cajal Body (Coiled Body): A Model." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 10 (Nov 1999): 94A-94A.
- Gary, J. D., and S. Clarke. "Rna and Protein Interactions Modulated by Protein Arginine Methylation." [In English]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 61* 61 (1998): 65-131.
- Gonsalvez, G. B., L. Tian, J. K. Ospina, F. M. Boisvert, A. I. Lamond, and A. G. Matera. "Two Distinct Arginine Methyltransferases Are Required for Biogenesis of Sm-Class Ribonucleoproteins." [In English]. *Journal of Cell Biology* 178, no. 5 (Aug 2007): 733-40.
- Hebert, M. D. "Phosphorylation and the Cajal Body: Modification in Search of Function." [In English]. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 496, no. 2 (Apr 2010): 69-76.
- Hebert, M. D., and A. G. Matera. "Self-Association of Coilin Reveals a Common Theme in Nuclear Body Localization." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 11, no. 12 (Dec 2000): 4159-71.
- Hebert, M. D., K. B. Shpargel, J. K. Ospina, K. E. Tucker, and A. G. Matera. "Coilin Methylation Regulates Nuclear Body Formation." [In English]. *Developmental Cell* 3, no. 3 (Sep 2002): 329-37.
- Hofmann, I., M. Schnolzer, I. Kaufmann, and W. W. Franke. "Symplekin, a Constitutive Protein of Karyo- and Cytoplasmic Particles Involved in Mrna Biogenesis in Xenopus Laevis Oocytes." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 13, no. 5 (May 2002): 1665-76.
- Isaac, C., Y. F. Yang, and U. T. Meier. "Nopp140 Functions as a Molecular Link between the Nucleolus and the Coiled Bodies." [In English]. *Journal of Cell Biology* 142, no. 2 (Jul 1998): 319-29.
- Jady, B. E., E. Bertrand, and T. Kiss. "Human Telomerase Rna and Box H/Aca Scarnas Share a Common Cajal Body-Specific Localization Signal." [In English]. *Journal of Cell Biology* 164, no. 5 (Mar 2004): 647-52.
- Jady, B. E., X. Darzacq, K. E. Tucker, A. G. Matera, E. Bertrand, and T. Kiss. "Modification of Sm Small Nuclear Rnas Occurs in the Nucleoplasmic Cajal Body Following Import from the Cytoplasm." [In English]. *Embo Journal* 22, no. 8 (Apr 2003): 1878-88.

- Jady, B. E., and T. Kiss. "A Small Nucleolar Guide Rna Functions Both in 2'-O-Ribose Methylation and Pseudouridylation of the U5 Spliceosomal Rna." [In English]. *Embo Journal* 20, no. 3 (Feb 2001): 541-51.
- Jady, B. E., P. Richard, E. Bertrand, and T. Kiss. "Cell Cycle-Dependent Recruitment of Telomerase Rna and Cajal Bodies to Human Telomeres." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 17, no. 2 (Feb 2006): 944-54.
- Kaiser, T. E., R. V. Intine, and M. Dundr. "De Novo Formation of a Subnuclear Body." [In English]. *Science* 322, no. 5908 (Dec 12 2008): 1713-17.
- Kiss, Tamás, Eléonore Fayet-Lebaron, and Beáta E. Jády. "Box H/Aca Small Ribonucleoproteins." *Mol Cell* 37, no. 5 (2010): 597-606.
- Klingauf, M., D. Stanek, and K. M. Neugebauer. "Enhancement of U4/U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle Association in Cajal Bodies Predicted by Mathematical Modeling." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 17, no. 12 (Dec 2006): 4972-81.
- Kolb, S. J., D. J. Battle, and G. Dreyfuss. "Molecular Functions of the Smn Complex." [In English]. *Journal of Child Neurology* 22, no. 8 (Aug 2007): 990-94.
- Krieghoff-Henning, Eva, and Thomas G. Hofmann. "Role of Nuclear Bodies in Apoptosis Signalling." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783, no. 11 (2008): 2185-94.
- Lafarga, M., M. A. Andres, M. T. Berciano, and E. Maquiera. "Organization of Nucleoli and Nuclear-Bodies in Osmotically Stimulated Supraoptic Neurons of the Rat." [In English]. *Journal of Comparative Neurology* 308, no. 3 (Jun 1991): 329-39.
- Lemm, I., C. Girard, A. N. Kuhn, N. J. Watkins, M. Schneider, R. Bordonne, and R. Luhrmann. "Ongoing U Snrnp Biogenesis Is Required for the Integrity of Cajal Bodies." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 17, no. 7 (Jul 2006): 3221-31.
- Liu, J. L., M. Buszczak, and J. G. Gall. "Nuclear Bodies in the Drosophila Germinal Vesicle." [In English]. *Chromosome Research* 14, no. 4 (May 2006): 465-75.
- Liu, J. L., Z. Wu, Z. Nizami, S. Deryusheva, T. K. Rajendra, K. J. Beumer, H. J. Gao, *et al.* "Coilin Is Essential for Cajal Body Organization in Drosophila Melanogaster." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 20, no. 6 (Mar 2009): 1661-70.
- Liu, Ji-Long, Christine Murphy, Michael Buszczak, Sarah Clatterbuck, Robyn Goodman, and Joseph G. Gall. "The Drosophila Melanogaster Cajal Body." *The Journal of Cell Biology* 172, no. 6 (March 13, 2006 2006): 875-84.
- Liu, Q., and G. Dreyfuss. "A Novel Nuclear Structure Containing the Survival of Motor Neurons Protein." [In English]. *Embo Journal* 15, no. 14 (Jul 1996): 3555-65.
- Lyon, C. E., K. Bohmann, J. Sleeman, and A. I. Lamond. "Inhibition of Protein Dephosphorylation Results in the Accumulation of Splicing Snrnps and Coiled Bodies within the Nucleolus." [In English]. *Experimental Cell Research* 230, no. 1 (Jan 1997): 84-93.
- Malatesta, M., C. Zancanaro, T. E. Martin, E. K. Chan, F. Amalric, R. Luhrmann, P. Vogel, and S. Fakan. "Is the Coiled Body Involved in Nucleolar Functions?" [In eng]. *Experimental Cell Research* 211, no. 2 (Apr 1994): 415-9.
- Matera, A. G., K. E. Tucker, P. W. Szymczyk, K. B. Shpargel, and M. D. Hebert. "Coilin Forms the Bridge between Cajal Bodies and Smn, the Spinal Muscular Atrophy Protein." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 12 (Nov 2001): 101A-01A.
- Matera, A. Gregory. "Drosophila Cajal Bodies: Accessories Not Included." *The Journal of Cell Biology* 172, no. 6 (March 13, 2006 2006): 791-93.
- Mattaj, Iain W. "Cap Trimethylation of U Snrna Is Cytoplasmic and Dependent on U Snrnp Protein Binding." *Cell* 46, no. 6 (1986): 905-11.
- Misteli, T. "Cell Biology Nuclear Order out of Chaos." [In English]. *Nature* 456, no. 7220 (Nov 2008): 333-34.
- Monneron, A., and W. Bernhard. "Fine Structural Organization of Interphase Nucleus in Some Mammalian Cells." [In English]. *Journal of Ultrastructure Research* 27, no. 3-4 (1969): 266-&.
- Morgan, G. T., O. Doyle, C. Murphy, and J. G. Gall. "Rna Polymerase Ii in Cajal Bodies of Amphibian Oocytes." [In English]. *Journal of Structural Biology* 129, no. 2-3 (Apr 2000): 258-68.

- Narayanan, U., T. Achsel, R. Luhrmann, and A. G. Matera. "Coupled in Vitro Import of U Snrnps and Smn, the Spinal Muscular Atrophy Protein." [In English]. *Molecular Cell* 16, no. 2 (Oct 2004): 223-34.
- Nizami, Z., S. Deryusheva, and J. G. Gall. "The Cajal Body and Histone Locus Body." [In English]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, no. 7 (Jul 2010).
- Novotny, I., M. Blazikova, D. Stanek, P. Herman, and J. Malinsky. "In Vivo Kinetics of U4/U6.U5 Tri-Snrnp Formation in Cajal Bodies." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 22, no. 4 (Feb 2011): 513-23.
- Ohno, Mutsuhito, Alexandra Segref, Angela Bachi, Matthias Wilm, and Iain W. Mattaj. "Phax, a Mediator of U Snrna Nuclear Export Whose Activity Is Regulated by Phosphorylation." *Cell* 101, no. 2 (2000): 187-98.
- Ochs, R. L., M. A. Lischwe, W. H. Spohn, and H. Busch. "Fibrillarin - a New Protein of the Nucleolus Identified by Autoimmune Sera." [In English]. *Biology of the Cell* 54, no. 2 (1985): 123-33.
- Patel, S., N. Novikova, B. Beenders, C. Austin, and M. Bellini. "Live Images of Rna Polymerase Ii Transcription Units." [In English]. *Chromosome Research* 16, no. 2 (Apr 2008): 223-32.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. "Purification of Native Survival of Motor Neurons Complexes and Identification of Gemin6 as a Novel Component." [In English]. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 9 (Mar 2002): 7540-45.
- Platani, M., I. Goldberg, A. I. Lamond, and J. R. Swedlow. "Cajal Body Dynamics and Association with Chromatin Are Atp-Dependent." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 13 (Nov 2002): 376A-76A.
- Platani, M., I. Goldberg, J. R. Swedlow, and A. I. Lamond. "In Vivo Analysis of Cajal Body Movement, Separation, and Joining in Live Human Cells." [In English]. *Journal of Cell Biology* 151, no. 7 (Dec 2000): 1561-74.
- Rebelo, L., F. Almeida, C. Ramos, K. Bohmann, A. I. Lamond, and M. CarmoFonseca. "The Dynamics of Coiled Bodies in the Nucleus of Adenovirus-Infected Cells." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 7, no. 7 (Jul 1996): 1137-51.
- Santama, N., S. C. Ogg, A. Malekkou, S. E. Zographos, K. Weis, and A. I. Lamond. "Characterization of Hcinap, a Novel Coilin-Interacting Protein Encoded by a Transcript from the Transcription Factor Tafiid(32) Locus." [In English]. *Journal of Biological Chemistry* 280, no. 43 (Oct 2005): 36429-41.
- Shevtsov, S. P., and M. Dundr. "Nucleation of Nuclear Bodies by Rna." [In English]. *Nat Cell Biol* 13, no. 2 (Feb 2011): 167-U34.
- Shpargel, K. B., J. K. Ospina, K. E. Tucker, M. D. Hebert, and A. G. Matera. "Posttranslational Modifications of Coilin Control Cajal Body Number and Composition." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 13 (Nov 2002): 421A-21A.
- Shpargel, K. B., J. K. Ospina, K. E. Tucker, A. G. Matera, and M. D. Hebert. "Control of Cajal Body Number Is Mediated by the Coilin C-Terminus." [In English]. *Journal of Cell Science* 116, no. 2 (Jan 2003): 303-12.
- Schul, W., B. Groenhout, K. Koberna, Y. Takagaki, A. Jenny, E. M. M. Manders, I. Raska, R. vanDriel, and L. deJong. "The Rna 3' Cleavage Factors Cstf 64 Kda and Cpsf 100 Kda Are Concentrated in Nuclear Domains Closely Associated with Coiled Bodies and Newly Synthesized Rna." [In English]. *Embo Journal* 15, no. 11 (Jun 1996): 2883-92.
- Sleeman, J. E., P. Ajuh, and A. I. Lamond. "Snrnp Protein Expression Enhances the Formation of Cajal Bodies Containing P80-Coilin and Smn." [In English]. *Journal of Cell Science* 114, no. 24 (Dec 2001): 4407-19.
- Sleeman, J. E., L. Trinkle-Mulcahy, A. R. Prescott, S. C. Ogg, and A. I. Lamond. "Cajal Body Proteins Smn and Coilin Show Differential Dynamic Behaviour in Vivo." [In English]. *Journal of Cell Science* 116, no. 10 (May 2003): 2039-50.
- Snaar, S., K. Wiesmeijer, A. G. Jochemsen, H. J. Tanke, and R. W. Dirks. "Mutational Analysis of Fibrillarin and Its Mobility in Living Human Cells." [In English]. *Journal of Cell Biology* 151, no. 3 (Oct 2000): 653-62.
- Spector, D. L., G. Lark, and S. Huang. "Differences in Snrnp Localization between Transformed and Nontransformed Cells." [In English]. *Molecular Biology of the Cell* 3, no. 5 (May 1992): 555-69.

- Stanek, D., S. D. Rader, M. Klingauf, and K. M. Neugebauer. "Targeting of U4/U6 Small Nuclear Rnp Assembly Factor Sart3/P110 to Cajal Bodies." [In English]. *Journal of Cell Biology* 160, no. 4 (Feb 2003): 505-16.
- Strzelecka, M., S. Trowitzsch, G. Weber, R. Luhrmann, A. C. Oates, and K. M. Neugebauer. "Coilin-Dependent Snrnp Assembly Is Essential for Zebrafish Embryogenesis." [In English]. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, no. 4 (Apr 2010): 403-U35.
- Sun, J., H. Z. Xu, S. H. Subramony, and M. D. Hebert. "Interactions between Coilin and Piasy Partially Link Cajal Bodies to Pml Bodies." [In English]. *Journal of Cell Science* 118, no. 21 (Nov 2005): 4995-5003.
- Tollervey, D., H. Lehtonen, R. Jansen, H. Kern, and E. C. Hurt. "Temperature-Sensitive Mutations Demonstrate Roles for Yeast Fibrillarin in Pre-Ribosomal-Rna Processing, Pre-Ribosomal-Rna Methylation, and Ribosome Assembly." [In English]. *Cell* 72, no. 3 (Feb 1993): 443-57.
- Toyota, Cory, Misty Davis, Angela Cosman, and Michael Hebert. "Coilin Phosphorylation Mediates Interaction with Smn and Smb ." *Chromosoma* 119, no. 2 (2010): 205-15.
- Tucker, K. E., M. T. Berciano, E. Y. Jacobs, D. F. LePage, K. B. Shpargel, J. J. Rossire, E. K. L. Chan, *et al.* "Residual Cajal Bodies in Coilin Knockout Mice Fail to Recruit Sm Snrnps and Smn, the Spinal Muscular Atrophy Gene Product." [In English]. *Journal of Cell Biology* 154, no. 2 (Jul 2001): 293-307.
- Tuma, R. S., and M. B. Roth. "Induction of Coiled Body-Like Structures in Xenopus Oocytes by U7 Snrna." [In English]. *Chromosoma* 108, no. 6 (Nov 1999): 337-44.
- Tuma, R. S., J. A. Stolk, and M. B. Roth. "Identification and Characterization of a Sphere Organelle Protein." [In English]. *Journal of Cell Biology* 122, no. 4 (Aug 1993): 767-73.
- Tycowski, Kazimierz T., Mei-Di Shu, Abiodun Kukoyi, and Joan A. Steitz. "A Conserved Wd40 Protein Binds the Cajal Body Localization Signal of Scarnp Particles." *Mol Cell* 34, no. 1 (2009): 47-57.
- Velma, Venkatramreddy, Zunamys I. Carrero, Angela M. Cosman, and Michael D. Hebert. "Coilin Interacts with Ku Proteins and Inhibits in Vitro Non-Homologous DNA End Joining." *FEBS Letters* 584, no. 23 (2010): 4735-39.
- Venteicher, Andrew S., Eladio B. Abreu, Zhaojing Meng, Kelly E. McCann, Rebecca M. Terns, Timothy D. Veenstra, Michael P. Terns, and Steven E. Artandi. "A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis." *Science* 323, no. 5914 (January 30, 2009 2009): 644-48.
- Watkins, Nicholas J., Véronique Ségault, Bruno Charpentier, Stephanie Nottrott, Patrizia Fabrizio, Angela Bachi, Matthias Wilm, *et al.* "A Common Core Rnp Structure Shared between the Small Nucleolar Box C/D Rnps and the Spliceosomal U4 Snrnp." *Cell* 103, no. 3 (2000): 457-66.
- White, A. E., B. D. Burch, X. C. Yang, P. Y. Gasdaska, Z. Dominski, W. F. Marzluff, and R. J. Duronio. "Drosophila Histone Locus Bodies Form by Hierarchical Recruitment of Components." [In English]. *Journal of Cell Biology* 193, no. 4 (May 2011): 677-94.
- Will, Cindy L., and Reinhard Lührmann. "Spliceosomal Usnrnp Biogenesis, Structure and Function." *Curr Opin Cell Biol* 13, no. 3 (2001): 290-301.
- Wu, C. H. H., and J. G. Gall. "U7 Small Nuclear-Rna in C-Snurposomes of the Xenopus Germinal Vesicle." [In English]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 13 (Jul 1993): 6257-59.
- Wu, Z. G., C. Murphy, H. G. Callan, and J. G. Gall. "Small Nuclear Ribonucleoproteins and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins in the Amphibian Germinal Vesicle - Loops, Spheres, and Snurposomes." [In English]. *Journal of Cell Biology* 113, no. 3 (May 1991): 465-83.
- Xu, H. Z., R. S. Pillai, T. N. Azzouz, K. B. Shpargel, C. Kambach, M. D. Hebert, D. Schumperli, and A. G. Matera. "The C-Terminal Domain of Coilin Interacts with Sm Proteins and U Snrnps." [In English]. *Chromosoma* 114, no. 3 (Aug 2005): 155-66.
- Young, P. J., P. M. Day, J. Zhou, E. J. Androphy, G. E. Morris, and C. L. Lorson. "A Direct Interaction between the Survival Motor Neuron Protein and P53 and Its Relationship to Spinal Muscular Atrophy." [In English]. *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 4 (Jan 2002): 2852-59.

- Younis, I., L. Khair, M. Dunder, M. D. Lairmore, G. Franchini, and P. L. Green. "Repression of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 and Type 2 Replication by a Viral Mrna-Encoded Posttranscriptional Regulator." [In eng]. *J Virol* 78, no. 20 (Oct 2004): 11077-83.
- Yu, Y. T., M. D. Shu, and J. A. Steitz. "Modifications of U2 Snrna Are Required for Snrnp Assembly and Pre-Mrna Splicing." [In English]. *Embo Journal* 17, no. 19 (Oct 1998): 5783-95.