

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**

Praha 2008

**Bakalářská práce**

**Nonsense mediated mRNA decay  
u *Saccharomyces cerevisiae***

Lenka Senohrábková

školitel: RNDr. František Půta, CSc.

Poděkování patří mému školiteli RNDr. Františku Půtovi, CSc. za pomoc a cenné rady při psaní této práce. Ráda bych také poděkovala všem členům laboratoře a kamarádkám Petře Macháčkové a Tereze Zelenkové.

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: NMD u *Saccharomyces cerevisiae* jsem vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2008

Lenka Senohrábková

## Abstrakt

**Nonsense mediated mRNA decay (NMD)** je dráha degradující aberantní transkripty, které obsahují v protein-kódující oblasti předčasný terminační kodón (PTC). Ve skutečnosti, se přes tuto dráhu odbourávají i wild-type transkripty označované jako „error free“. Tyto mRNA nemají PTC, ale jiný funkční rys zodpovědný za jejich cílení k degradaci přes NMD např. uORF bez stabilizujícího elementu či abnormálně dlouhou 3'UTR. NMD je kontrolním mechanismem, zabraňujícím syntéze zkrácených nebo potencionálně škodlivých proteinů. V současné době popisují průběh NMD u *Saccharomyces cerevisiae* tři modely: downstream marker model, aberantně terminační model a koherentní model. Výsledky z letošního roku naznačují, že aberantně terminační model je chybný a nebo má poly(A) konec či Pab1p pouze redundantní funkci. Z tohoto pohledu je důležité zmínit tzv. koherentní model, který předpokládá že na rozhodování o spuštění NMD se podílí celá řada faktorů. Po rozeznání aberantního transkriptu se sestaví surveillance komplex kódovaný geny UPF1, UPF2 a UPF3. Tyto geny regulují také odstranění čepičky z 5'konce nonsense i wild type mRNA. Degradace nonsense mRNA probíhá dvěma směry: majoritně z 5'konce (odstraněním čepičky nezávislé na deadenylaci) a minoritně z 3'konce (zrychlenou deadenylací na oligoadenylové intermediáty a následný rozpad).

**Klíčová slova:** NMD, Upf1, Upf2, Upf3, surveillance complex, premature termination codon, DSE

## Abstract

Nonsense mediated mRNA decay (NMD) is a pathway degrading aberrant transcripts, which contain premature termination codon (PTC) in the protein coding region. Nevertheless, wild-type transcripts referred to as „error free“ are degraded through this pathway, too. Instead of PTC, these mRNAs possess other functional feature responsible for their targeting to degradation through the NMD e.g. uORF without a stabilization element or with an abnormally extended 3'UTR. The NMD pathway is a control mechanism, which prevents the synthesis of truncated and potentially deleterious proteins. At present, there are three models describing a course of the NMD in *Saccharomyces cerevisiae*: the downstream marker model, the aberrant termination model and the coherent model. According to outcomes of this year, it appears that the aberrant termination model is wrong or the poly(A) tail or Pab1p have only redundant role. In this regard, it is important to mention so-called coherent model, which supposes that the number of factors are participating in regulation of triggering the NMD pathway. After recognition of the aberrant transcript, the surveillance complex, encoded by UPF1, UPF2 and UPF3 genes, is assembled. These also genes regulate decapping of 5' end of nonsense and wild type mRNA. The degradation of nonsense mRNAs proceeds in two orientations: deadenylation-independent decapping from 5'-end is the major way and accelerated deadenylation to form oligoadenylated intermediates and subsequent decay from 3'-end is the minor one.

**Key words:** NMD, Upf1, Upf2, Upf3, surveillance complex, premature termination codon, DSE

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	6
<b>2. NMD u <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	7
2.1. UPF1 .....	8
2.2. UPF2 (NMD2) .....	12
2.3. UPF3 .....	13
<b>3. NMD modely <i>S. cerevisiae</i></b> .....	14
3.1. DSE model .....	15
3.1.1. downstream element (DSE) .....	16
3.1.2. stabilizační element (STE) .....	18
3.1.3. značící protein.....	19
3.2. Aberantně terminační model (faux 3'UTR).....	19
<b>4. Průběh NMD</b> .....	22
<b>5. Degradace nonsense transkriptů</b> .....	24
<b>7. Závěr</b> .....	27
<b>Seznam použité literatury</b> .....	28

# 1. Úvod

Genová exprese u eukaryotních organismů zahrnuje řadu propojených kroků od transkripce genetického materiálu až po proteinovou syntézu s mRNA jako klíčovým intermediátem v tomto procesu. V průběhu exprese však může dojít k procesní chybě a ke vzniku aberantních transkriptů. Proto si eukaryotní buňky vyvinuly řadu kontrolních mechanismů, nacházejících se v jádře i cytoplasmě. V jádře jsou degradovány převážně aberantní transkripty vzniklé procesní chybou v průběhu genové exprese. V cytoplasmě se ověřuje schopnost translace transkriptů, degradují se zde mRNA postrádající stop kodón (non-stop-mediated mRNA decay, NSD), transkripty se zastavenou translační elongací (no-go mRNA decay, NGD) a mRNA s předčasným terminačním kodónem (**nonsense-mediated decay, NMD**).

Jak již z názvu vyplývá, primárními substráty pro NMD dráhu jsou mRNA obsahující v protein kódující oblasti předčasný terminační kodón (**premature termination codon, PTC**). Buď jako důsledek mutace genu, ze kterého jsou kódovány nebo chyby v průběhu transkripce či chyby v průběhu posttranskripčních úprav. Mezi další endogenní substráty náleží transkripty:

- nesestřížené pre-mRNA v cytoplasmě (CYH2)
- s upstream čtecími rámcem/rámci (PRP1, GCN4)
- vystavené posunu čtecího rámce v průběhu translace (EST3)
- podstupující „leaky scanning“ (SPT10)
- bicistronní (YLR315W/YLR317W)
- s abnormálně prodlouženou 3' netranslatovanou oblastí (3'UTR)

Všechny tyto mRNA se stávají substráty pro NMD, jestliže dojde k předčasné translační terminaci, a nebo terminační události, která je k předčasné translační terminaci funkčně ekvivalentní. NMD tedy slouží jako ochrana buňky před aberantními transkripty, kódujícími nefunkční, a nebo dokonce škodlivé proteiny. Faktory regulující NMD byly původně identifikovány v kvasince a zahrnují interakční proteiny, které jsou kódovány vysoce konzervovanými neesenciálními geny UPF1<sup>1</sup>, UPF2 (také znám jako NMD2<sup>2</sup>) a UPF3. Mutace nebo delece i jen v jednom z UPF genů způsobuje 5–20 násobné snížení rychlosti rozpadu a současně způsobuje supresi nonsense kodónu bez ovlivnění rychlosti rozpadu wild-type mRNA. UPF geny jsou konzervované u všech eukaryot a jsou esenciální pro funkčnost NMD. Homology kvasinkových Upf proteinů byly identifikovány v *Schizosaccharomyces pombe*

---

<sup>1</sup> Zkratka UPF pochází z experimentu, kde tyto proteiny byly schopné suprimovat +1 frameshift mutaci v HIS4 genu (**Up-frameshift**).

<sup>2</sup> Zkratka z **nonsense-mediated mRNA decay**.

*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, a člověku.

## 2. NMD u *Saccharomyces cerevisiae*

Ačkoliv je NMD evolučně konzervovaná dráha, jednotlivé organismy si vyvinuly odlišné mechanismy rozpoznání a degradace aberantních transkriptů. U *S. cerevisiae* je NMD translačně dependentní událost. Tento závěr vyplývá z celé řady experimentů:

- a) NMD může být zabráněno pomocí tRNA, suprimujících nonsense kodón (Belgrader et al., 1993).
- b) NMD je funkční pouze za předpokladu, že byl dokončen alespoň jeden translační iniciační/terminační cyklus (Ruiz-Echevarria and Peltz, 1996; Ruiz-Echevarria et al., 1998).
- c) Upf1p, Upf2p a Upf3p (Upfp – Upf protein) jsou asociovány s polyribosomy (Peltz et al., 1993; Atkin et al., 1995, 1997).
- d) Rychlá degradace nonsense transkriptů pokračuje po odstranění inhibitoru elongace cykloheximidu z růstového media (Zhang et al., 1997).
- e) Upfp interagují s translačními terminačními faktory eRF1 a eRF3 (Czaplinski et al., 1998; Wang et al., 2001) .
- f) Dominantně negativní forma Upf2p (overexprese GAL4(AD)<sup>3</sup> fúzaného s 764 amino–acidickým C–terminálním fragmentem Nmd2p) inhibuje NMD pouze při lokalizaci v cytoplasmě (He and Jacobson, 1995).
- g) NMD neprobíhá u *S. cerevisiae* v jádře (Kuperwasser et al., 2004).
- h) Při rozeznání nonsense-mRNA dochází k represi translace pomocí Upf1p (Mulhrad and Parker, 1999a).

Hlavní složkou NMD dráhy u *S. cerevisiae* je tzv. surveillance complex (SC), proteinový komplex, kódovaný geny UPF1, UPF2 a UPF3 (He and Jacobson, 1995; Weng et al., 1996a,b; He et al., 1997). Někteří autoři zahrnují do SC i translační terminační faktory eRF1 a eRF3, se kterými Upf proteiny interagují (Czaplinski et al., 1998; González et al., 2000; Wang et al., 2001).

Primárně se proteiny Upf podílejí na degradaci nonsense transkriptů. Sekundárními substráty jsou přirozeně vyskytující se mRNA, nazývané „error free“. Takovéto transkripty neobsahují PTC, ale jiný funkční rys, zodpovědný za jejich cílení k degradaci NMD dráhou např. uORF bez stabilizující sekvence (viz. kapitola 4.1.2) (Lelivelt and Culbertson, 1999; Ruiz-Echevarria and Peltz, 2000; He et al., 2003).

---

<sup>3</sup> GAL4(AD) - GAL4 aktivační doména. Gal4p je transkripční aktivátor v kvasinkách, který se často využívá v dvouhybridních systémech k zjištění protein – proteinové interakce.

Pomocí NMD tak může docházet ke globálnímu ovlivňování exprese kvasinkového transkriptomu. Komparativní analýza více než 6000 otevřených čtecích rámců ve wild-type a  $upf^-$  kmeni, přinesla zajímavé výsledky. Delece *Upf* genů, znamenala u více než 500 mRNA 2-11 násobnou akumulaci transkriptů (např. PRP1, CPA1). Naopak u zhruba 40 mRNA došlo ke překvapivému snížení množství (např. PHO84). *Upf* proteiny zřejmě ovlivňují množství přirozeně se vyskytujících mRNA v buňce (Lelivelt and Culbertson, 1999). Regulace kvasinkového transkriptomu dráhou NMD se může dít přímo nebo nepřímo. Jako příklad lze uvést PRP1, mRNA s uORF, transkripční aktivátor podílející se mimojiné na aktivaci exprese enzymů, účastníci se biosyntézy uracilu (převzato z Leeds et al., 1992). Jak bylo již dříve prokázáno URA3 mRNA se akumuluje v buňkách  $upf^-$  bez zvýšené stability transkriptu. A to vlivem zvýšené transkripce pomocí *Prp1p*, jehož transkript je v těchto buňkách stabilizován. Ovlivněním stability jedné mRNA kódující regulační protein se může nepřímo změnit množství dalších transkriptů (Leeds et al., 1991, 1992; Lelivelt and Culbertson, 1999).

## **2.1. UPF1**

UPF1 gen kóduje 109kDa fosfoprotein s oblastí bohatou na cystein a histidin blízko jeho amino-konce a obsahuje všechny charakteristické motivy RNA/DNA helikáz rodiny I. *Upf1p* vykazuje RNA/DNA dependentní ATPázovou a RNA/DNA helikázovou aktivitu ve směru  $5' \rightarrow 3'$  (Czaplinski et al., 1995; Weng et al., 1996a,b, 1998; Wang et al., 2006).

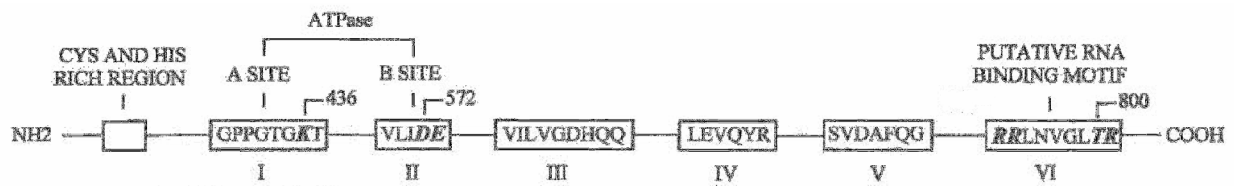
*Upf1* je multifunkční protein, který se podílí na rozpadu nonsense transkriptů a ovlivňuje jejich translační terminaci (Czaplinski et al., 1995; Weng et al., 1996a,b, 1998).

Pro zamezení suprese nonsense kodónu je rozhodující schopnost *Upf1p* vázat ATP/neschopnost vázat RNA (Czaplinski et al., 1995; Weng et al., 1996b, 1998). Mutační analýzou bylo prokázáno, že pro vazbu ATP je významný konzervovaný lysin v poloze 436 (K436) v helikázovém motivu I. Pro ATPázovou a helikázovou aktivitu jsou důležité aminokyseliny glutamová a asparagová (DE572) v helikázovém motivu II a pro vazbu RNA aminokyseliny threonin a arginin v helikázovém motivu VI (TR800) (obr.1) (Weng et al., 1996a,b, 1998).

*Upf1p* podporuje translační terminaci interakcí s eRF1 a eRF3 faktory (eukaryotic release factor), podílejícími se na uvolnění polypeptidového řetězce z ribosomu. Vzájemné interakce *Upf1p*-eRF1 a *Upf1p*-eRF3 byly potvrzeny *in vitro* i *in vivo*. Bylo zjištěno, že způsobují inhibici ATPázové/helikázové aktivity *Upf1p* (Czaplinski et al., 1998). V kvasinkách jsou tyto proteiny kódovány geny SUP45 (eRF1) a SUP35 (eRF3). *Sup45p* rozeznává stop kodón uvnitř ribozomálního místa A a spouští hydrolýzu esterové vazby spojující polypeptidový řetězec s tRNA v místě P. *Sup35p* je GTPázou stimuluje aktivitu *Sup45p*. Tyto dva proteiny interagují spolu navzájem, a *Sup35* navíc s poly(A)-vazebným proteinem, v kvasinkách nazývaným



Pab1 (poly-A binding protein 1) (Amrani et al., 2004). Sup35p kompetuje s RNA o vazbu na Upf1p. Navázáním ATP na Upf1p se snižuje afinita Upf1p k RNA, což funkčně zesiluje interakci mezi Upf1p a Sup35p (Weng et al., 1996b, 1998; Czaplinski et al., 1998). K translační terminaci nonsense mRNA postačuje samotná vazba ATP na Upf1p bez hydrolýzy. Mutanta DE572AA, postrádající ATPázovou/helikázovou aktivitu, ale stále schopná vázat ATP, je funkční v translační terminaci. Toto pozorování potvrdil i experiment *in vivo* s nehydrolyzovatelným analogem ATP – ATP $\gamma$ S a wild-type Upf1 (Weng et al., 1996a,b, 1998).

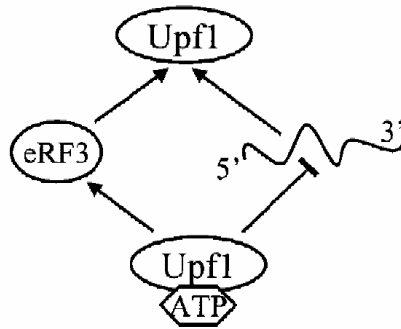


	WT Upf1	<i>upf1</i> $\Delta$	K436Q (Motiv I)	DE572AA (Motiv II)	TR800AA (Motiv VI)
Nonsense suprese ( <i>leu2 - 2, tyr7 - 1</i> ) <sup>4</sup>	-	+	+	-	-
mRNA turnover	+	-	-	-	-
helikázová aktivita	+	-	-	-	-
ATPázová aktivita	+	-	-	-	-

Obr.1 Schematické znázornění Upf1 genu. Tučně jsou vyznačené konzervované aminokyseliny důležité pro vazbu ATP (K436), pro helikázovou/ATPázovou aktivitu (DE572) a pro vazbu RNA (TR800). V tabulce jsou uvedené mutanty *upf1p* a aktivity, které dané mutanty vykazují. Znaménko plus (+) značí, že daná aktivita probíhá a naopak znaménko minus (-) indikuje neprobíhající aktivitu (převzato a upraveno z Weng et al., 1996b, 1998).

Pro degradaci nonsense transkriptů je důležitá ATPázová/helikázová aktivita Upf1p (Weng et al., 1996a,b, 1998). Mutanty DE572AA a TR800AA (mutanta neschopná vázat RNA), stále vázající ATP brání supresi nonsense kodónu, ale inaktivují NMD. Naopak mutanta K436Q (se sníženou afinitou k ATP) je nefunkční jak v translační terminaci, tak i NMD (Weng et al., 1996a,b, 1998). Na základě těchto výsledků bylo navrženo, že ATP by mohl sloužit jako kofaktor Upf1p, dovolující „přepínání“ mezi translační terminací a NMD aktivitami.

<sup>4</sup> Buňky obsahující nonsense mutaci v genech pro *leu2* a *tyr7* jsou neschopné růstu na mediu postrádající leucin a tyrosin a obsahují málo těchto mRNA. Avšak delece Upf1 v tomto kmeni, dovoluje růst na mediu bez leucinu a tyrosinu. Navíc buňky obsahují stejné množství příslušných mRNA jako na úrovni divokého kmene. Důsledkem zvýšení koncentrace těchto mRNA je frameshift a nebo suprese nonsense kodónu, která způsobí, že tRNA úspěšně kompetuje s translačními terminačními faktory u nonsense kodónu. Dojde tudíž snadněji k inkorporaci aminokyseliny a prodloužení polypeptidového řetězce než translační terminaci (Leeds et al., 1991; Leeds et al. 1992).



Obr.2 Modulace interakcí Upf1p. Vazba ATP na Upf1p zeslabuje interakci Upf1p:RNA komplexu, což podporuje interakci mezi eRF3 (Sup35p) a Upf1p (převzato z Czaplinski et al., 1998).

Upf1p je epistatický k Upf2p a Upf3p. Tento závěr vyplývá z pozorování:

- Největší suprese nonsense kodónu v buňkách postrádajících UPF1 aktivitu (Maderazo et al., 2000; He and Jacobson, 2001).
- Kombinace *nmd2Δ* nebo *upf3Δ* s delecí *upf1* nemá aditivní efekt na supresi nonsense kodónu a fenotyp *upf1Δ* nahradí fenotyp *nmd2Δ* a *upf3Δ* (Maderazo et al., 2000).
- Nadprodukce (overexpres) Upf1p může vyrovnat ztrátu Nmd2p nebo Upf3p, ale ne naopak (Maderazo et al., 2000).

Na základě těchto výsledků bylo navrženo, že Upf1p hraje centrální roli v regulaci efektivity translační terminace nonsense mRNA. Upf2p a Upf3p ovlivňují translační terminaci, regulací aktivity Upf1p (Maderazo et al., 2000; He and Jacobson, 2001).

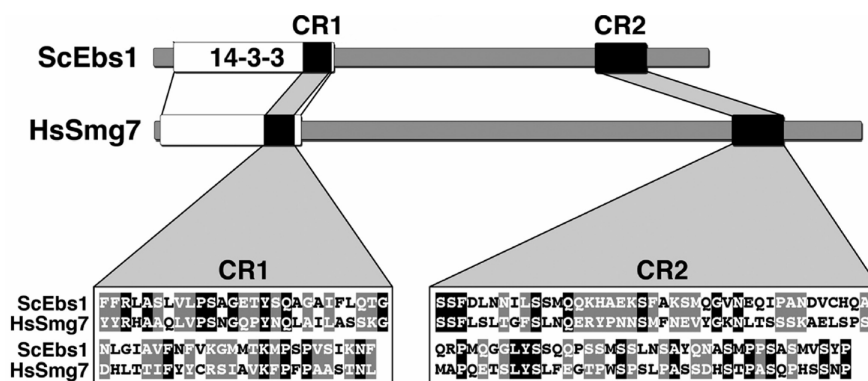
Jiné experimenty sice potvrzují centrální roli Upf1p v translační terminaci, ale oponují tvrzení o regulaci aktivity Upf1p skrze Upf1p-Upf2p a Upf1p-Upf3p interakce. Upf2p a Upf3p možná mění translaci nonsense transkriptů díky interakci se Sup35p (eRF3) namísto Upf1p (Wang et al., 2001), jelikož:

- Upf2p a Upf3p interagují se Sup35p *in vitro* i *in vivo*. Interakce Upf2p-Sup35p je zprostředkovaná acidickou doménou Upf2p. Upf3p interaguje se Sup35p prostřednictvím alespoň jedné své terminální domény (Wang et al., 2001). Mutanty genu UPF2 a UPF3, jejichž proteiny postrádají schopnost interagovat se Sup35p (*upf2ΔAD*; *upf3pΔN,C*), také ztrácí schopnost zamezit supresi nonsense kodónu v kmeni s delecí příslušného genu (Wang et al., 2001).
- Mutanta Upf2p postrádající celou Upf1p–interakční doménu je stále ze 70% aktivní v zamezení suprese nonsense kodónu v *upf2Δ* kmeni (Wang et al., 2001).
- Upf3p nemůže sám o sobě regulovat aktivitu Upf1p. Interakce Upf1p-Upf3p je zprostředkovaná přes Upf2p (He et al., 1997).

Experimenty *in vitro* prokázaly kompetici mezi Upf2p, Upf3p a Sup45p navzájem o vazbu na Sup35p, protože se tyto tři proteiny váží do podobných míst. Navázáním Sup45p na Sup35p se výrazně zeslabí Sup35p-Upf2p a Sup35p-Upf3p interakce, což značí, že se Upf2p a Upf3p mohou vázat na Sup35p pouze za podmínky, kdy Sup35p nevytváří komplex se Sup45p. Naopak Upf1p může asociovat se Sup45p–Sup35p komplexem. Tyto výsledky naznačují, že se Upf2p, Upf3p a Sup45p váží na Sup35p odděleně, zatímco Upf1p se může vázat na Sup35p zároveň s jakýmkoliv z těchto proteinů. Buď je surveillance komplex dynamickou strukturou nebo dochází k tvorbě více než jednoho druhu komplexu mezi Upf proteiny a uvolňovacími faktory (Wang et al., 2001).

U vyšších eukaryot je pro funkci Upf1p v NMD vyžadován cyklus fosforylace-defosforylace. Surveillance komplex se zde tvoří v závislosti na předešlé fosforylaci Upf1p (shrnutí v Conti and Izaurralde, 2005; Isken and Maquat, 2007).

U *S. cerevisiae* doposud nebyly identifikovány orthology metazoálních regulačních proteinů, vyjma Smg7<sup>5</sup> (Luke et al., 2007). Smg7 se podílí u vyšších eukaryot na defosforylaci Upf1. Tento protein není sám o sobě fosfatázou, ale interaguje s protein-fosfatázou 2A (shrnutí v Conti and Izaurralde, 2005; Isken and Maquat, 2007). Domnělým orthologem Smg7p u *S.cerevisiae* je Ebs1p. N-terminální oblast Ebs1p obsahuje 14-3-3 doménu, vykazující největší podobnost se 14-3-3 doménou Smg7. Do této domény se u vyšších eukaryot váže Upf1 svými fosforylovanými seriny (Luke et al., 2007; shrnutí v Conti and Izaurralde, 2005; Isken and Maquat, 2007). Oba proteiny mají dvě velmi konzervované oblasti, nazývané CR1 (nachází se v 14-3-3 doméně) a CR2 (leží v C-terminální doméně) (Luke et al., 2007).



Obr.3 Sekvenční analýza lidského Smg7p a kvasinkového Ebs1p. Oba dva geny obsahují dvě velmi konzervované oblasti – CR1 a CR2 (černé čtverečky). Bíle je zobrazena 14-3-3 doména na N-konci, konzervované aminokyseliny jsou značeny bíle na černém pozadí a podobné aminokyseliny bíle na šedém pozadí (převzato a upraveno z Luke et al., 2007).

<sup>5</sup> Smg - tato zkratka pochází z názvu supressor with morphological effect on genitalia.

Další podobnost mezi Ebs1p a Smg7 spočívá v tom, že při jejich nadprodukcí je Upf1p směřován do P-tělísek. Ko-immunoprecipitací byla zjištěna fyzická interakce mezi Upf1p-Ebs1p. Možná Ebs1p může Upf1p směřovat, a nebo udržovat v P-tělískách (Luke et al., 2007).

Dodnes není stále jasný význam fosforylace a defosforylace Upf1p u *S. cerevisiae*. Polemizuje se také nad tím, zda je vůbec cyklus fosforylace-defosforylace Upf1p pro průběh NMD dráhy u *S. cerevisiae* vyžadován (Wang et al., 2006; Luke et al., 2007; shrnuto v Fasken and Corbett, 2005; Isken and Maquat, 2007).

## **2.2. UPF2 (NMD2)**

Gen NMD2 s intronem v blízkosti 5' konce (šest nukleotidů downstream od iniciátorového ATG) kóduje fosfoprotein o molekulové váze 127kDa (Cui et al., 1995; He et al., 1995, Wang et al., 2006). Nmd2p obsahuje vysoce acidický interval (aminokyseliny (AA) 833-936), 36,8 % asparagové kyseliny a 25,6 % kyseliny glutamové, blízko karboxy-konce, možný bipartitní jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal, NLC) na amino-konci a zřejmě transmembránovou doménu (AA 470-490) (He et al., 1995).



Obr.4 Schematické znázornění Nmd2p, šrafovaná oblast značí Upf1p–interakční doménu (převzato z He et al., 1996).

Nmd2p interaguje s Upf1p prostřednictvím interakční domény, lokalizované uvnitř 157 AA dlouhého acidického segmentu v karboxy-konci. Uvnitř interakční domény se nacházejí dvě oblasti (AA 947-985; 1034-1061), jejichž mutace, delece nebo změna jejich primární sekvence značně redukuje rozsah interakce s Upf1p. Mutace způsobí nejenom narušení interakce Upf1p-Upf2p, ale také inaktivaci NMD, což značí, že interakce Upf1p–Nmd2p je požadována pro funkčnost této dráhy (He et al., 1996).

Deleční analýzou byly identifikovány dvě domény Nmd2p interagující s Upf3p. První doména (AA 564-771) je hlavní determinantou pro interakci s Upf3p. Druhá doména Nmd2p (AA 879-933) je slabší a pojímá téměř celou hyperacidickou doménu (He et al., 1997).

N-terminální doména (AA 30-50) Nmd2p je zodpovědná za interakci s Hrp1p, RNA vazebným proteinem esenciálním v dráze NMD (viz. kapitola 4.1.3) (He et al., 1997; González et al., 2000; Wang et al., 2006). Delece této domény značně redukuje interakci s Hrp1p a schopnost vyvolat NMD, naopak nemá žádný vliv na interakce Nmd2p-Upf1p, Nmd2p-Upf3p a Nmd2p-Sup35p. Nmd2p a Hrp1p spolu totiž neinteragují přímo, ale prostřednictvím Upf1p (González et al., 2000; Wang et al., 2006). Interakce Nmd2p-Hrp1p je zesílena přidáním poly(U)RNA (preferovaný substrát pro Upf1p). RNA zde zřejmě neslouží

pouze jako substrát pro vytvoření kvarterního komplexu Nmd2p/Hrp1p/Upf1p/RNA, ale také ovlivňuje aktivitu Upf1p. Po navázání Upf1p na RNA zřejmě získá Upf1p schopnost vytvářet stabilní komplex s Hrp1p a Nmd2p, neboť mutanta *upf1p* neschopná vázat RNA (TR800AA), neinteraguje ani s Hrp1p *in vitro* i *in vivo* (Weng et al., 1998; Wang et al., 2006).

V N-terminální doméně Nmd2p se dále nachází DSS motiv, skládající se ze zbytku aminokyseliny aspartátové a dvou serinů (v *S. cerevisiae* Asp31, Ser32, Ser33), který je konzervovaný u *S. cerevisiae* a člověka. Tento motiv je významný pro interakci Nmd2p-Hrp1p. Jednoduché či dvojité mutace vedou v DSS motivu ke snížení interakce Upf2p-Hrp1p. Pouze trojitá mutace kompletně ruší tuto interakci, což vede k závěru, že jednotlivé zbytky mohou částečně navzájem kompenzovat ztrátu (Wang et al., 2006). DSS motiv je fosforylován *in vivo*. Tato fosforylace je esenciální pro interakci s Hrp1p a pro vyvolání NMD. Mutace v DSS→AAA, vede ke 30% snížení ve fosforylaci Nmd2p a k dramatické redukci schopnosti Nmd2p interagovat s Hrp1p, a tudíž neschopnosti vyvolat NMD (Wang et al., 2006). Navíc substituce serinu za kyselinu asparagovou (DSS→DDS), mimikuje konstitutivně fosforylovanou formu Upf2p a prakticky inaktivuje NMD. Zdá se, že fosforylačně-defosforylační cyklus Upf2p by mohl být vyžadován pro funkci proteinu v NMD (Wang et al., 2006).

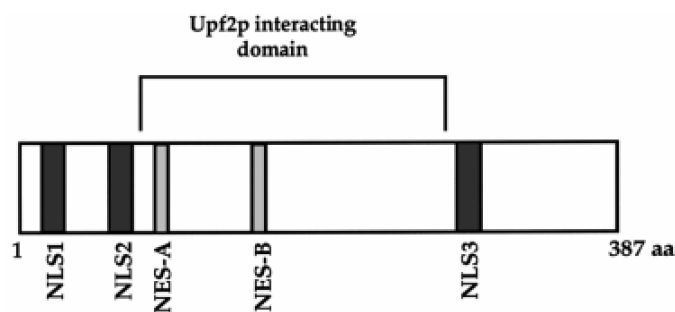
**Upf2p 22 VFPLKSKKLDSSIKRNTG 39**

Obr.5 Část N-terminální domény Upf2p, červeně zakroužkovaný je DSS motiv zodpovědný za vazbu Hrp1p (převzato a upraveno z Wang et al., 2006).

### **2.3. UPF3**

Produkt genu UPF3 je bazický, primárně cytoplasmatický 45kDa protein. K jeho akumulaci v jádře či jadérku dochází, pokud je overexprimován a nebo pokud jisté mutace genu UPF3 zabraňují jadernému exportu. Obsahuje tři oddělené bazické sekvence bohaté na zbytky argininu/lysinu, podobající se bipartitnímu jadernému lokalizačnímu signálu. Tato sekvence byla nalezena v nucleoplasminu a jiných proteinech cílených do jádra. NLS sekvence označované jako NLS1, NLS2, NLS3, odpovídají aminokyselinám 15–31, 58–74 a 284–300 (obr.6; Lee and Culbertson, 1995).

Na základě dvouhybridních interakcí byla prokázána interakce mezi oblastmi Upf3p (NLS1, NLS2, NLS3) a Srp1p (homolog importinu- $\alpha$  v *S. cerevisiae*). Dalšími experimenty se potvrdilo, že Upf3p je aktivně importován mechanismem, kde Srp1p váže Upf3p a interaguje s transportním receptorem Kap95 (homolog importinu- $\beta$  v *S. cerevisiae*), zprostředkovávajícím vstup komplexu do jádra (Shirley et al., 2002).



Obr.6 Schematická reprezentace Upf3p (převzato a upraveno z Shirley et al., 1998).

Upf3p obsahuje rovněž dvě oddělené oblasti podobající se na leucin bohatému jadernému exportnímu signálu (NES), NES-A (AA 88-97), NES-B (AA 151-160). Pouze NES-A funguje jako jaderný exportní signál Upf3p, zatímco NES-B nefunguje jako exportní signál, a nebo je méně efektivní (Shirley et al., 1998). Navzdory podobnosti NES-A s na leucin bohatou sekvencí NES, není Upf3p exportován přes exportin Crm1/Xpo1p vázající právě tuto sekvenci. Další experimenty navíc vyvrátily možnost pasivní difúze Upf3p přes jaderné póry. Zřejmě je Upf3p transportován do cytoplasmu alternativním na Crm1p nezávislým mechanismem (Shirley et al., 2002).

Mutační analýzou NES-A, kdy byly nahrazeny konzervované lysinové zbytky za alanin (L88A, L93A) a semikonzervovaný isoleucin za alanin (I90A), se prokázalo, že jednoduchá substituce, která nijak významně neovlivňuje distribuci Upf3p, nemá také vliv na funkci Upf3p v NMD. Dvojnásobná či trojnásobná substituce způsobuje defekt v exportu Upf3p, a takovéto buňky vykazují  $nmd^-$  fenotyp. Tyto výsledky navrhují, že export Upf3p je požadován pro plnou funkčnost NMD (Shirley et al., 1998, 2002). Upf3p se možná účastní počátečních kroků NMD, a to identifikací nonsense transkriptů, asociací s mRNP partikulami, a nebo s ribosomálními podjednotkami sestavenými v jádře (Shirley et al., 1998).

Interakce mezi Upf3p a Upf1p je nepřímá a vyžaduje Upf2p. Upf2p může vázat Upf1p a Upf3p současně, a tím podporovat tvorbu Upf1p-Nmd2p-Upf3p komplexu *in vivo* (He et al., 1997). Tato hypotéza byla potvrzena nadprodukcí Nmd2p, což mělo za následek 10-100 násobné zvýšení Upf1p-Upf3p interakce. Zvýšení je však závislé na intaktní Upf1p- a Upf3p-interakční doméně uvnitř Nmd2p a na schopnosti Upf1p a Upf3p interagovat s Nmd2p (He et al., 1997).

### 3. NMD modely *S. cerevisiae*

Dodnes nejsou zcela objasněny všechny „kroky“ mechanismu nonsense mediated mRNA decay (NMD), pomocí nichž probíhá rozeznání předčasného terminačního kodónu (PTC) od nativního terminačního kodónu a určení aberantního transkriptu pro degradaci přes tuto

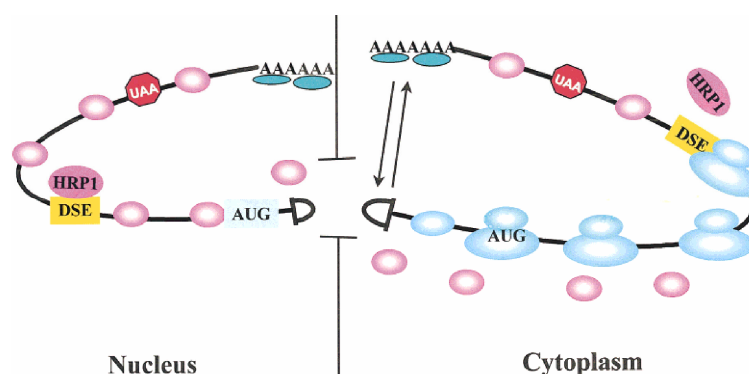
dráhu. Zpočátku bylo navrženo hned několik modelů, avšak s přibývajícím poznatkami se pozornost vědců zaostřila na dva. Prvním je DSE (**d**own**s**tream **e**lement) model a druhým aberantně terminační model, známý také pod jménem *faux* 3'UTR. Tyto modely se liší principem rozeznání PTC od nativního terminačního kodónu, naopak společným rysem obou modelů je sestavení surveillance komplexu a způsob degradace transkriptů.

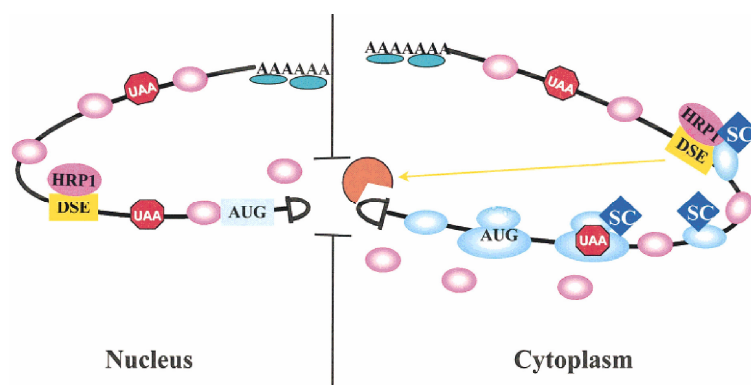
### 3.1. DSE model:

Tento model vykazuje značnou podobnost s EJC modelem, který popisuje NMD u savců (**e**xon-**j**unction-**c**omplex, EJC). EJC je multiproteinový komplex, depozitovaný v průběhu splicingu 20-24 nukleotidů upstream od hranice exon-exon, který slouží jako proteinová značka. Ke spuštění NMD dochází, jestliže tato značka není v průběhu translace odstraněna ribosomem. Za substrát pro NMD u savců se považuje transkript, který má PTC minimálně 50-55 nukleotidů upstream od hranice exon-exon. Translatující ribosom se rozpadne na tomto PTC, a tudíž nemůže odstranit EJC, což vyvolá NMD (shrnuto v Isken and Maquat, 2007).

DSE model předpokládá centrální roli značícího proteinu Hrp1, který se váže na specifickou sekvenci v mRNA, nazývanou se DSE. Podobně jako u savců i zde, pokud dojde předčasnému zastavení translace u PTC, nemůže translatující ribosom odstranit Hrp1p, který tak spustí NMD (Peltz et al., 1993; González et al., 2000).

V DSE modelu hrají důležitou roli tzv. tři cis-aktivující sekvence a tři trans-aktivující faktory. Mezi trans-aktivující faktory patří již výše zmíněné tři Upf proteiny. K třem cis-aktivujícím sekvencím náleží downstream element, PTC či jiný rys mRNA funkčně ekvivalentní k PTC a stabilizační sekvence (**s**tabilization **e**lement, STE) (Peltz et al., 1993; Hagan et al., 1995; Zhang et al., 1995; Ruiz-Echevarria and Peltz 1996; 2000; Ruiz-Echevarria et al., 1998; González et al., 2000).





Obr. 7 Downstream marker model (DSE) předpokládá přítomnost proteinové značky, Hrp1p na DSE. Pokud v mRNA není PTC, dojde k odstranění proteinové značky translující ribosomem (horní strana obrázku). Jestliže je v mRNA PTC, ribosom není schopen odstranit Hrp1p z DSE, sestaví se surveillance komplex (SC) a spustí se NMD (dolní strana obrázku) (převzato z Czapliniski et al., 1999).

### 3.1.1. Downstream element (DSE):

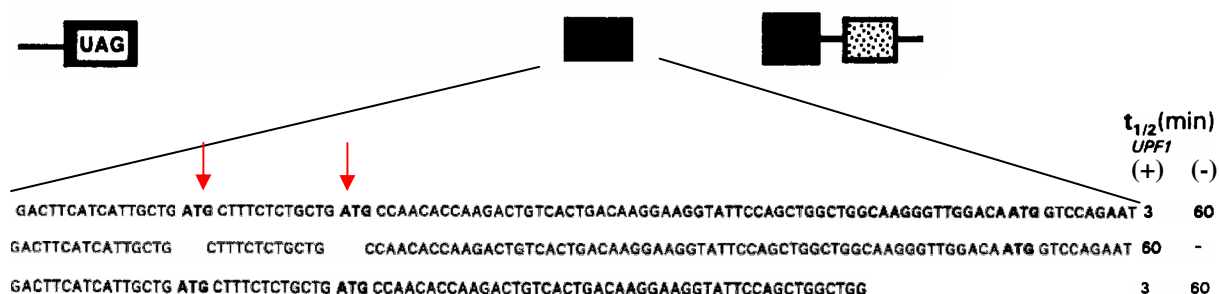
DSE leží v protein kódující oblasti před nativním terminačním kodónem. Tato sekvence byla zevrubně studována na genu PGK1 (ORF 1251 nukleotidů) kódujícím 3-fosfoglycerát kinázu jejichž mRNA je hojná a stabilní, avšak zavedením PTC se výrazně změní její stabilita. Pro stabilitu nonsense transkriptu není určující typ PTC, ale vzdálenost PTC od DSE. Při introdukci PTC do dvou třetin protein kódující sekvence (nukleotidy 70-847) od 5' konce mRNA se zvýšila rychlost degradace 12krát. Zavedení PTC do poslední třetiny protein kódující oblasti (nukleotidy 953-1158) nemělo žádný vliv na rychlost degradace mRNA (Hagan et al., 1995; Peltz et al., 1993, Zhang et al., 1995). Delecí DSE se zvýšila stabilita transkriptu obsahující PTC téměř na úroveň wild-type mRNA. Signál pro vyvolání NMD je tedy bipartitní prvek skládající se z PTC a DSE (Hagan et al., 1995; Peltz et al., 1993; Ruiz-Echevarria and Peltz 1996). Tyto výsledky byly potvrzeny i na genu HIS4 (Hagan et al., 1995). Delece DSE vedla ke zvýšení stability transkriptu, množství mRNA (2,5 krát) a proteinů (8 krát) vzhledem k nonsense mRNA ve wild-type kmeni (Mulhrad and Parker, 1999a). Podobného výsledku bylo dosaženo s nonsense mRNA, ale s delecí Upf1p, přičemž rozdíl v množství proteinu není způsoben změnou stability nonsense mRNA. Rychlost degradace je v obou kmenech stejná. Diference spočívá v proteinové produkci, kterou ovlivňuje Upf1p. Delece genu UPF1 zvyšuje translační efektivitu nonsense transkriptu. Naopak upf1Δ nemá skoro žádný vliv na produkci proteinu v případě mRNA s deletovaným DSE. Celkově tyto výsledky naznačují, že rozeznání mRNA jako aberantní vede k represí translace (Mulhrad and Parker, 1999a).

Pro přesnější charakterizaci DSE v PGK1 genu byla vytvořena tzv. mini-PGK1<sup>6</sup> alela. Za DSE byla označena 106 nukleotidové sekvence (PGK1 nukleotidy 1138-1244), jejíž inserce za

<sup>6</sup> mini PGK1 alela – je PGK1 gen s deletovanou protein kódující oblast v rozhraní 5,6-92,6% (nukleotidy 70-1158).

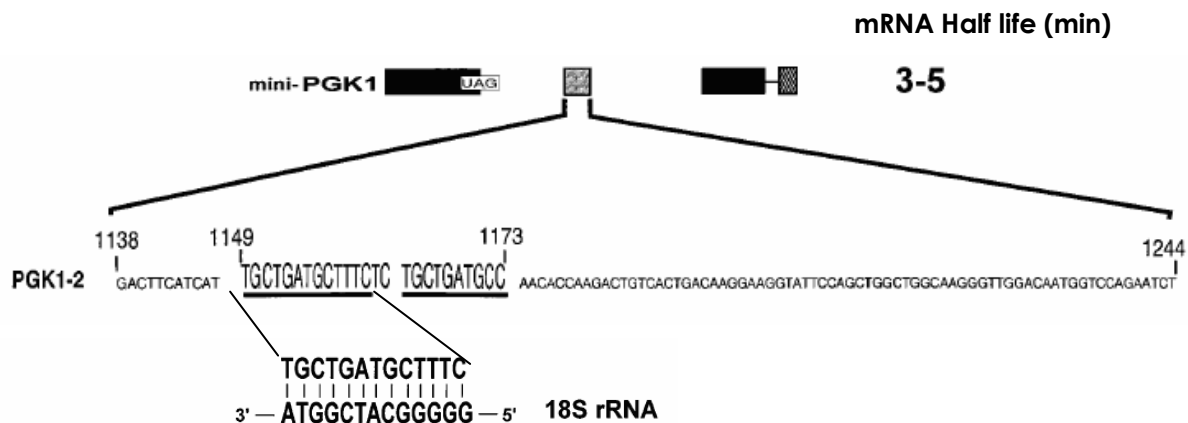


5'proximální nonsense mutaci v mini-PGK1 genu, výrazně zvýšila degradaci mRNA. Deleční analýzou DSE se zjistilo, že 5'proximálních 34 nukleotidů je nezbytných pro fungování DSE v dráze NMD. Tato sekvence obsahuje 2 ATG uvnitř 9 nukleotidového opakovaného motivu. Dvě ATG oblasti v 34 nukleotidové sekvenci DSE mohou sloužit jako místa translační reiniciace. Tento návrh podpořil experiment se stem-loop strukturou, která inhibuje translační iniciaci a reiniciaci. Její inserce ihned za nonsense kodón stabilizovala jinak nestabilní transkript PGK1 (Peltz et al., 1993). Pro fungování DSE jako nezávislého elementu je ale potřeba 80 nukleotidů 5'proximální sekvence. Sekvenční motiv tedy výrazně ovlivňuje sekvence, kterého ho lemují (Peltz et al., 1993; Hagan et al., 1995). Jestliže se za sebe umístí dvě DSE, tzn. 4 kopie sekvenčního motivu, pak DSE může fungovat nezávisle na těchto lemujících sekvencích (Peltz et al., 1993; Zhang et al., 1995).



Obr.8 Deleční analýza DSE. Nahoře je znázorněna mini PGK1 alela s inzertovanou 106 nukleotidovou sekvencí. Pro funkčnost DSE je nezbytná 34 nukleotidová sekvence obsahující dvě ATG (červené šipky) a 80 nukleotidová sekvence je nezbytná pro fungování DSE jako nezávislého elementu. Rychlost degradace jednotlivých transkriptů byla měřena v  $Upf1^+$  a  $Upf1^-$  kmeni (Převzato a upraveno z Peltz et al., 1993).

Srovnávací analýza sekvencí ukázala, že 9 nukleotidová opakovaná sekvence je komplementární k sekvenci kvasinkové 18S rRNA (Peltz et al., 1993; Zhang et al., 1995). Tato komplementární oblast je definována jako sekvenční (konzervovaný) motiv DSE. K hledání přítomnosti těchto dvou oblastí v ostatních kvasinkových genech byla použita sekvence: **5'-TGYYGATGYYYYY-3'** (Y=T nebo C) (Zhang et al., 1995). Analýzou bylo např. zjištěno, že v PGK1 genu se nacházejí celkem tři oblasti (PGK1-0 654-738, PGK1-1 738-955, PGK1-2 1138-1244) z nichž každá obsahuje dvě kopie sekvenčního motivu. V ADE3 (1218-1324) a HIS4 (3123-3233) genu se nalézají 1 oblast se dvěma kopiemi sekvenčního motivu. Inzerci příslušných oblastí do nonsense mini-PGK1 genu, bylo potvrzeno, že tyto sekvence fungují jako DSE (Zhang et al., 1995).



**consensus sequence: 5'-TGYYGATGYYYYY-3'**  
(sequence motif)

Obr.9 Schematická reprezentace mini-PGK1 genu s nonsense mutací (černý obdélník) a mini-PGK1 genu s nonsense mutací a DSE (šedý čtverec). Sekvence komplementární k 18S rRNA je podtržena. Sekvenční motiv (konsenzus sekvence) byla použita pro hledání dalších genů obsahujících tyto dva motivy, přičemž Y= T nebo C (převzato a upraveno ze Zhang et al., 1995).

### 3.1.2. Stabilizační element (STE):

NMD není v určitých transkriptech aktivována, jelikož postrádají DSE (např. GCN4<sup>7</sup> transkript). Jiné mRNA inaktivují NMD pomocí speciální sekvence, nazývané **stabilizační element (STE)** (Peltz et al., 1993; Hagan et al., 1995; Ruiz-Echevarria et al., 1998).

Stabilizační elementy se dají rozdělit do dvou tříd. První skupinu tvoří STE lokalizované v protein kódující oblasti, upstream od nativního terminačního kodónu. Pro inhibici NMD musí být translatovány (např. PGK1 transkript) (Peltz et al., 1993; Hagan et al., 1995). Jak již bylo zmíněno výše, degradace transkriptů NMD dráhou závisí na pozici PTC vzhledem k NMD. Introdukci PTC bez ohledu na typ, do poslední třetiny protein kódující oblasti, nemá vliv na rychlost degradace transkriptu (Hagan et al., 1995; Peltz et al., 1993; Zhang et al., 1995). V této oblasti se nachází STE, jehož translací se nonsense transkripty stávají nesenzitivními k NMD (Peltz et al., 1993; Hagan et al., 1995).

Pro druhou třídu je charakteristické umístění STE v leader oblasti (např. GCN4 nebo YAP1<sup>8</sup> mRNA) (Ruiz-Echevarria et al., 1998; Ruiz-Echevarria and Peltz, 2000). STE je AU bohatá oblast, na niž se váže Pub1p (polyuridylylate-binding protein), kritický faktor upravující stabilitu mRNA obsahující uORF (Anderson et al., 1993; Ruiz-Echevarria and Peltz, 2000).

<sup>7</sup>GCN4 - tento gen kóduje transkripční aktivátor genů aminokyselinové biosyntézy. Transkript má neobvykle dlouhou 5'leader oblast (600 nukleotidů), která obsahuje čtyři krátké upstream otevřené čtecí rámce (u ORF). Každý kóduje dvě nebo tři aminokyseliny a modulují translaci GCN4 proteinu. Bylo potvrzeno, že tento transkript je substrátem pro NMD.

<sup>8</sup> YAP1 – gen kódující transkripční aktivátor, který ovlivňuje buněčnou odpověď na stresové podmínky. Obsahuje jeden uORF v leader oblasti.

STE slouží jako obecný blokátor aktivity NMD dráhy při inzerci do heterogenních transkriptů. Delece STE nebo PUB1 činí tyto mRNA citlivými k NMD (Ruiz-Echevarria et al., 1998; Ruiz-Echevarria and Peltz, 2000).

Jak přesně je dráha NMD modulována pomocí komplexu STE-Pub1p není jasné. Může se tak díť podporováním disociace surveillance komplexu z mRNA nebo modifikací tohoto komplexu, který poté nerozezná komplex DSE-Hrp1p (Ruiz-Echevarria and Peltz, 2000).

### **3.1.3. Značící protein:**

Protein fungující jako proteinová „značka“ je produktem genu HRP1/NAB4. HRP1 kóduje 75kDa RNA-vazebný protein, esenciální pro růst, pendlující mezi jádrem a cytoplasmou. Jeho funkce není omezena pouze na dráhu NMD. Hrp1p se účastní štěpení a polyadenylace 3'konce pre-mRNA jako podjednotka štěpícího faktoru I (cleavage factor I, CFI) (Kessler et al., 1997; González et al., 2000).

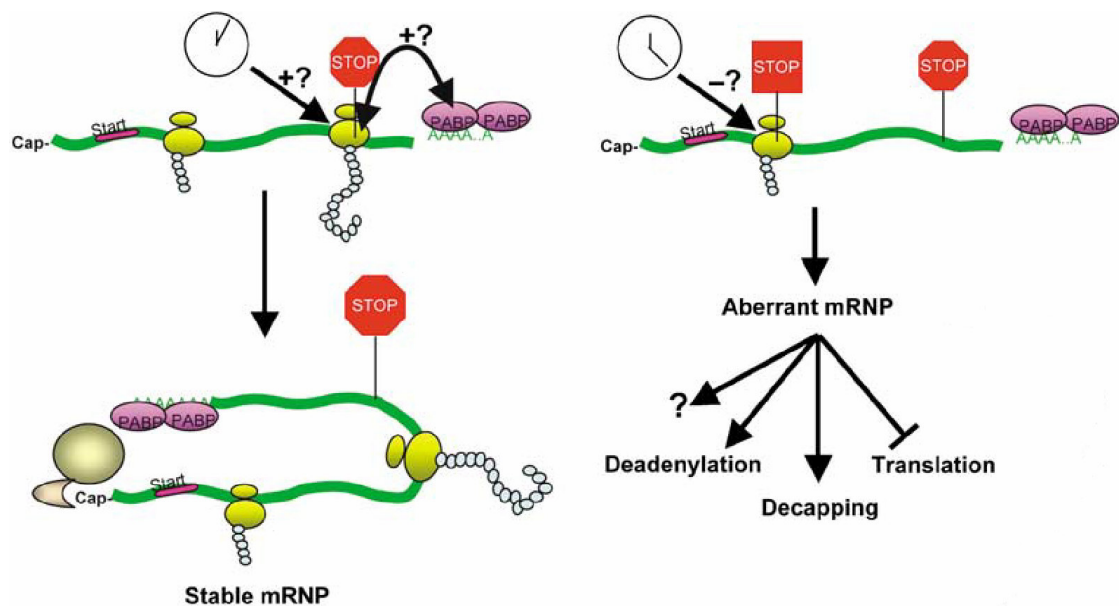
Z hlediska NMD jsou esenciální dva motivy rozeznávající RNA (RNA recognition motifs, RRM) Hrp1p, pomocí nichž se váže na sekvenční motiv DSE a interaguje s Upf1p. RRM obsahují arginin-glycin bohatou oblast. Mutace RRM a přilehlých oblastí vede k 5-10 násobné stabilizaci nonsense mRNA bez ovlivnění stability wild-type transkriptů. Tato stabilizace může být důsledkem defektu jak vazby RNA, tak i interakce s Upf1p (Kessler et al., 1997; González et al., 2000).

Úspěšné proběhnutí prvního kola translace, kdy translující ribosom odstraní proteiny navázané na mRNA v jádře (Hrp1p), vede k remodelaci jaderné mRNP na cytoplasmatickou formu se strukturou „closed loop“. Tato remodelace determinuje translabilitu a stabilitu mRNA. U nonsense transkriptu však tento proces remodelace neproběhne kompletně, zřejmě díky přítomnosti Hrp1p na DSE, což má za následek vznik aberantní mRNP (González et al., 2000; Wang et al., 2001; shrnuto v Hilleren and Parker, 1999).

## **3.2. Aberantně terminační model (*faux* 3'UTR):**

Tento model předpokládá rozdíl v translační terminaci na PTC a nativním terminačním kodónu. Za nativním kodónem se nachází 3'UTR, oblast asociovaná s regulačními proteiny u kvasinek dlouhá zhruba 100 nukleotidů a následována poly(A) koncem s navázaným Pab1p. Zdá se, že pro správnou remodelaci z jaderné mRNP na cytoplasmatickou formu je důležitá interakce terminujícího ribosomu asociovaného s uvolňovacími faktory a regulačními proteiny na 3'UTR a/nebo s poly(A)koncem s Pab1p. Při terminaci na PTC dochází k abnormálnímu prodloužení 3'UTR. Terminující ribosom s uvolňovacími faktory tak není schopen interagovat s regulačními proteiny na „normálním“

3'UTR a/nebo s poly(A)koncem vázajícím Pab1p. Výsledkem je aberantní mRNP a následná degradace (Amrani et al., 2004; Muhlrud and Parker, 1999b; Baker and Parker, 2006).



Obr.10 Aberantně terminační model předpokládá, že předčasná a normální terminační událost je biochemicky či časově odlišná (naznačeno pomocí hodin). Normální translační terminace je rychlejší než předčasná a spouští remodelaci mRNP na stabilní mRNP (pravá strana obrázku). Předčasná translační terminace vede k aberantní mRNP (levá strana obrázku) (převzato a upraveno z Shyu and van Hoof et al., 2008).

Rozdíl mezi translační terminací na nativním a na předčasném terminačním kodónu není jasný. Odlišnost translační terminace může být způsobena rozdílem rychlostí translační terminace, a nebo je translační terminace odlišná biochemicky (Amrani et al., 2004; Keeling et al., 2004; shrnuto v Hilleren and Parker, 1999).

Prvkem určujícím rychlost translační terminace je ATPázová aktivita Upf1p, sloužící jako „kinetické“ hodiny. Jestliže nastane produktivní translační terminace před ATP hydrolýzou bude mRNA chráněna proti degradaci NMD. Pokud translace probíhá pomaleji a neukončí se před hydrolýzou ATP, mRNA se degraduje (shrnuté v Hilleren and Parker, 1999).

Nejvíce je rozvíjen tento model z pohledu biochemicky odlišné translační terminace. Efektivita translační terminace na PTC a nativním stop kodónu závisí nejenom na typu terminačního kodónu, ale i na nukleotidech, které stop kodóny bezprostředně obklopují. Terminační kodóny s vysokou úrovní pročtení vedou až ke 100 násobnému snížení efektivitě translační terminace (např. QXQ; Q=CAA – kodón pro glutamin, X= stop kodón) (Bonetti et al., 1995; Keeling et al., 2004). Substráty pro NMD jsou transkripty obsahující stop kodón s nízkou úrovní pročtení/s vysokou úrovní translační terminací (Keeling et al., 2004). Tímto způsobem mohou být patrně chráněny transkripty se slabou expresí nebo mRNA (převzato z Keeling et al., 2004).

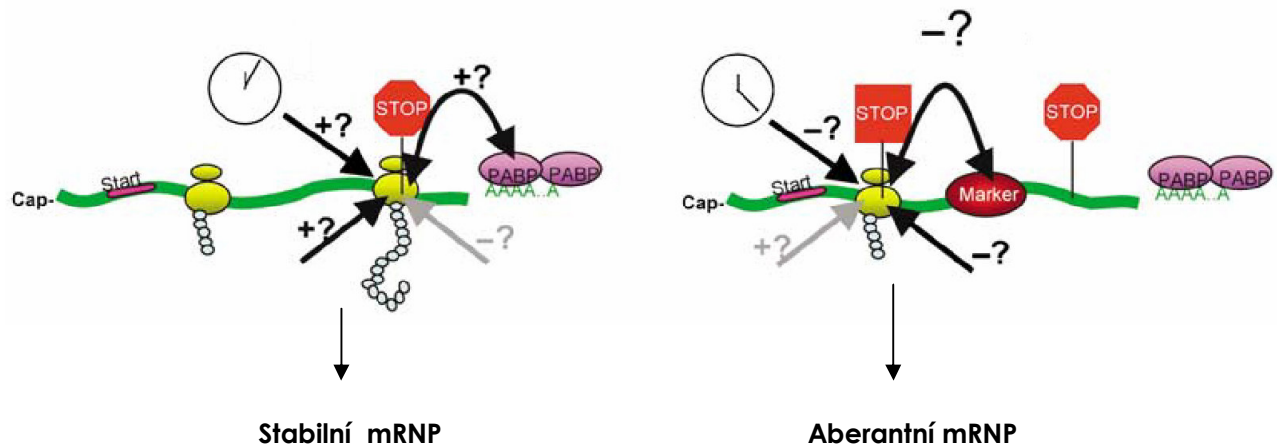
Na biochemicky odlišnou translační terminaci na PTC a nativním terminačním kodónu poukazují také výsledky z toeprint analýzy. Toeprint analýza identifikuje pozici 40S ribosomální podjednotky či 80S ribosom, k čemuž využívá inhibiční primer extenze. Radioaktivně značené oligonukleotidy hybridizují k 3'konci transkriptu. Reverzní transkriptáza (RT) prodlužuje primery a syntetizuje komplementární DNA směrem k 5'konci mRNA. Při střetu RT s ribosomem/asociovaným faktorem vázaným na mRNA se RT zastaví a vygeneruje se toeprint fragment. RT se zastaví přibližně 13 nukleotidů před uracilem terminačního kodónu, umístěným v A místě ribosomu (shrnutí v Amrani et al., 2006). Z toeprint experimentů vyplývá, že ribosomy terminující předčasně u PTC jsou méně efektivně uvolňovány z mRNA než při setkání s nativním terminačním kodónem. Tato skutečnost umožňuje ribosomům translační reiniciaci na nonsense transkriptech, neboť přidání cykloheximidu do translační reakce vyvolalo u transkriptů s PTC vznik aberantních toeprint fragmentů. Pokud se setká ribosom s PTC, neuvolní se z mRNA, ale místo toho nastává translační reiniciace, převážně na AUG ležících ve směru 5'od PTC (retro-reiniciace), přičemž před translační retro-reiniciací dojde k rozeznání PTC pomocí Sup45 a peptidové hydrolýze. Retro-reiniciace je pouze projevem této dráhy, není pro ni esenciální, neboť odstraněním reiniciačních AUG míst se nijak neovlivní rychlost degradace nonsense mRNA (Amrani et al., 2004). V souladu s těmito výsledky, delecí protein-kódující oblasti za PTC se mRNA stabilizuje a zároveň vymizí aberantní toeprint fragmenty (Peltz et al., 1993; Mulhrad and Parker, 1999a; Amrani et al., 2004; shrnutí v Hilleren and Parker, 1999). Naopak mutace v polyadenylačním místě vede k abnormálně dlouhé 3'UTR, takový transkript se stává citlivým k NMD (Mulhrad and Parker, 1999b).

Názor na roli poly(A) konce a Pab1p v rozeznání PTC se v literatuře značně liší. Testovala se stabilita nonsense mRNA PGK1 *in vivo*, navázáním Pab1p 37-73 nukleotidů ve směru 3'od PTC. Introdukcí vazebné sekvence pro obalový protein viru MS2 za PTC a s využitím různých MS2-fúzních proteinů, byla prokázána selektivní stabilizace nonsense-transkriptů pomocí Pab1p, v menším rozsahu i se Sup35p. Navázání Pab1p do **blízkosti PTC** tedy „mimikuje“ 3'UTR (Amrani et al., 2004). Naopak navázání Pab1p ve větší vzdálenosti (164 nukleotidů) ve směru 3'od PTC či do 3'UTR PGK1 nonsense mRNA, nemělo žádný vliv na stabilitu (Amrani et al., 2004; Coller et al., 1998). Tato pozorování jsou v souladu s tím, že role Pab1p v rozeznání PTC není závislá na štěpení a polyadenylaci 3'konce mRNA (Baker and Parker, 2006). Poprvé byl stabilizující účinek Pab1p pozorován na wild-type transkriptech. Zde byla sekvence pro obalový protein viru MS2 zavedena do 3'UTR, což mělo za následek zvýšení stability wild-type mRNA, které neměly žádný poly(A) konec, a nebo jen její malou část (Coller et al., 1998). Celkově tyto poznatky ukazují na to, že zvýšení stability mRNA navázáním Pab1p se může dít mimo NMD dráhu.

Na základě nejnovějších výsledků byl model aberantní terminace výrazně zpochybněn. Zavedení PTC do mRNA (s šesti nukleotidy tvořícími 3'UTR) bez poly(A) konce, vedlo k výrazné destabilizaci a následné degradaci transkriptu. Naopak v kmeni *upf1Δ* došlo k selektivní

stabilizaci. Stejného výsledku bylo dosaženo i při delecí genu PAB1 (Meaux et al., 2008). Buď poly(A) konec s Pab1p nehrají v rozlišení předčasné terminační události žádnou roli, a nebo mají redundantní funkci (Meaux et al., 2008). Z hlediska redundantní funkce je určitě zajímavé zmínit tzv. koherentní model.

V tomto roce se objevil názor konstatující, že ani jeden z těchto dvou modelů se nedá aplikovat na všechny případy NMD. Kombinací základních rysů determinujících rozeznání PTC od normálního terminačního kodónu, byl navržen tzv. **koherentní model**. V něm se na rozhodování o předčasné translační terminaci podílí více odlišných signálů (např. typ stop kodónu a nukleotidů obklopujících ho, délka 3'UTR a proteiny s ním asociované, DSE, Pab1p). Nakonec závisí na převaze pozitivních (např. Pab1p) či negativních signálů (např. DSE), zda bude mRNA degradována. Při převaze pozitivních signálů dojde k normální translační terminaci a remodelaci mRNP. Převaha negativních signálů buď brání remodelaci a nebo vede k aberantní mRNP remodelaci a následné degradaci (shrnuto v Shyu and van Hoof et al., 2008).



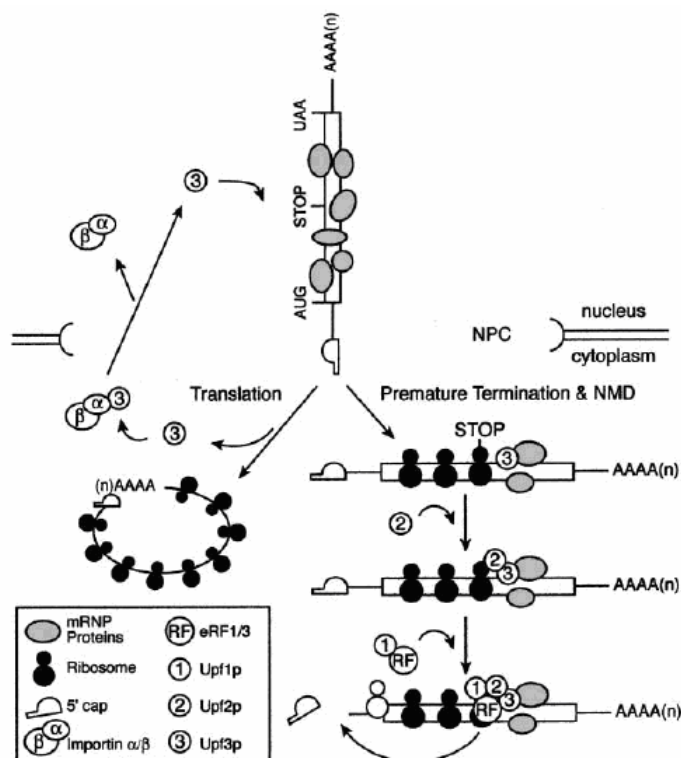
Obr.11 Koherentní model. Šipky s plus znaménkem (+) představují pozitivní signály, šipky s minus znaménkem (-) indikují negativní signály. Dráhy NMD se mohou ovlivňovat i další rysy, které doposud nebyly objeveny (šedé šipky). Hodiny značí dobu trvání translace (převzato a upraveno z Shyu and van Hoof et al., 2008).

## 4. Průběh NMD

Není zcela objasněné, kdy dochází k determinaci nonsense transkriptu. Zda pouze v průběhu tzv. „prvotního“ kola translace či v jakémkoliv kole. U vyšších eukaryot se rozhoduje v průběhu „prvotní“ translace. Pouze nově syntetizované mRNA s komplexem CBC20/CBC80 navázaným na 5' čepičku a obsazené EJC mohou být substrátem pro NMD. Na transkriptech s eIF-4E nebyl detekován EJC a tyto mRNA nepodstupují NMD (shrnuto v Isken and Maquat, 2007). V *S. cerevisiae* je více podporována představa o NMD, jež se může konat v jakémkoliv kole translace. Vypovídá o tom několik výsledků:

1. Nonsense transkripty s nízkou úrovní pročetí stop kodónu/vysokou úrovní translační terminace jsou substráty pro NMD (Keeling et al., 2004).
2. V *upfΔ* kmeni s jednoduchou delecí genu UPF1, UPF2 či UPF3 byly nonsense transkripty stabilizovány a asociovány s polyribosomy. Expresí příslušného UPF genu, zaklonovaného pod indukibilní promotor, v daném *upfΔ* kmeni se obnovila NMD (Maderazo et al., 2003).
3. Nonsense mRNA vystupující z jádra mohou mít na 5'konci Cbc1p nebo eIF-4E. V průběhu/po prvotním kole translace dochází k remodelaci Cbc1-transkriptu na eIF-4E-transkript. Oba typy nonsense mRNA, jak s Cbc1p tak i s eIF-4E na 5'konci, jsou substráty pro NMD. Tento závěr je v souladu s předchozím pozorováním, že delce genu CBC1 je viabilní a v buňkách nadále probíhá NMD (Gao et al., 2005).

Pokud NMD dráha může být aktivována v jakémkoliv kole translace, pak musí dojít k znovu označení mRNA jako substrátu. Po prvním kole se odstraní „značky“ získané v jádře. V následujících kolech translace zřejmě dochází nejdříve k vazbě Sup45p-Sup35p-Upf1p komplexu na transkript a poté k asociaci komplexu Upf2p-Upf3p (shrnuto v Culbertson and Neeno-Eckwall, 2005). Tato myšlenka je podpořena tím, že Upf1p-Sup35p-Sup45p komplex je 5-20-krát hojnější než Upf3p-Upf2p komplex (Maderazo et al., 2000).



Obr.12 Možný model počátečních kroků NMD dráhy u *S. cerevisiae* (převzato z Shirley et al., 2002).

Přesný průběh, krok po kroku, NMD dráhy není znám. Zřejmě po zabalení mRNA do mRNP dojde již v průběhu výstupu z jádra, a nebo ihned po transportu do cytoplasmu k translaci. Předpokládá se, že v jádře dochází k asociaci Hrp1p s DSE a zřejmě se na mRNA také váže Upf3p. Oba proteiny pendlují mezi jádrem a cytoplasmou. Upf3p je nejméně hojný ze všech Upf proteinů (1600 Upf1p, 160 Upf2p a 80 Upf3p), a tudíž také limitující pro tvorbu surveillance komplexu (SC), proto se předpokládá jeho role v počátcích NMD dráhy (Maderazo et al., 2000; Shirley et al., 2002; Kessler et al., 1997; González et al., 2000). Nutné je ovšem zmínit fakt, že doposud se nepodařilo detekovat Upf3p navázaný na mRNA. Možná se

váže na jiný mRNP protein, a nebo je jeho interakce s ním příliš transientní či slabá na purifikaci imunoprecipitací (shrnuto v Culbertson and Neeno-Eckwall, 2005). Jakmile se translující ribosom zastaví na nonsense kodónu, naváže se Sup45p a Sup35p do místa A na ribosomu. V průběhu terminačního procesu dochází k vazbě Upf1p na komplex Sup45p-Sup35p. Touto vazbou je zablokována ATPázová a RNA vazebná aktivita Upf1p (Weng et al., 1996a, 1998; Czaplinski et al., 1998). Po hydrolýze vazby peptidyl-tRNA disocijuje Sup45p z ribosomu, což umožní Upf2p-Sup35p interakci. Vyplývá to z pozorování, že Upf1p asocijuje s polyribosomy v nepřítomnosti ostatních Upf proteinů. Upf2p se může naopak navázat pouze, pokud již je tam předem přítomen Upf3p (Atkin et al., 1997). Upf2p a Upf3p se nemohou vázat na komplex Sup45p-Sup35p, ale pouze na Sup35p samotný (Wang et al., 2001). Je tu také ovšem možnost, že Upf2p se váže na mRNP dříve než Upf1p, vytváří se komplex Upf3p-Upf2p, který po uvolnění Sup45p asocijuje se Sup35p/Upf1p (Shirley et al., 2002). Po navázání komplexu Upf2p/Upf2p-Upf3p, disocijuje Sup35p, aktivuje se helikázová a RNA vazebná aktivita Upf1p a vytvoří se surveillance komplex (SC) (Weng et al., 1996a, 1998; Czaplinski et al., 1998). Buď samotný SC, a nebo SC asociovaný s ribosomem či ribosomální podjednotkou skenuje sekvenci ve směru 3' od PTC. Po interakci SC s Hrp1p na DSE dojde ke spuštění degradace nonsense mRNA, díky aberantní konformaci mRNP (González et al., 2000; Weng et al., 1996a; Wang et al., 2001).

## 5. Degradace nonsense transkriptů

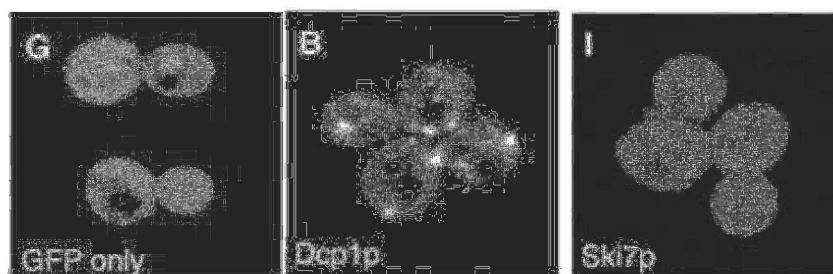
Hlavní cesta degradace nonsense transkriptů probíhá přes odstranění čepičky na 5' konci a následnou degradaci ve směru 5' → 3', pomocí Xrn1 exoribonukleázy aniž by došlo dříve k deadenylaci. (Mulhrad and Parker, 1994; Hagan et al., 1995; Beelman et al., 1996; Mulhrad and Parker, 1999b; Cao and Parker, 2003). Minoritní 3' → 5' degradace se odehrává bez závislosti na dřívějším odstranění čepičky, prostřednictvím cytoplasmatického exosomu, SKI komplexu a Ski7p (Mulhrad and Parker, 1994; Hagan et al., 1995; Araki et al., 2001; Cao and Parker, 2003; Mitchell and Tollervey, 2003).

Na odstranění m<sup>7</sup>GDP z 5' konce mRNA se podílí decapping komplex, kódovaný geny DCP1 a DCP2. Tyto proteiny se podílejí také na degradaci normálních stabilních a nestabilních transkriptů. Dcp1p podporuje aktivitu Dcp2p, katalytické podjednotky DCP1-DCP2 komplexu. Dcp2p obsahuje v N-terminální doméně Mut motiv, který je esenciální pro jeho funkci (Mulhrad and Parker, 1994; Beelman et al., 1996; LaGrandeur and Parker, 1998; Dunckley and Parker, 1999). Tento motiv byl nalezen u třídy proteinů hydrolyzující pyrofosfátové vazby (převzato z Dunckley and Parker, 1999). Oba proteiny spolu interagují *in vivo* i *in vitro*. Dcp2p navíc vykazuje dvouhybridní interakci s Upf1p (He and Jacobson, 1995; Beelman et al., 1996; Dunckley and Parker, 1999). Rychlost odstranění čepičky na



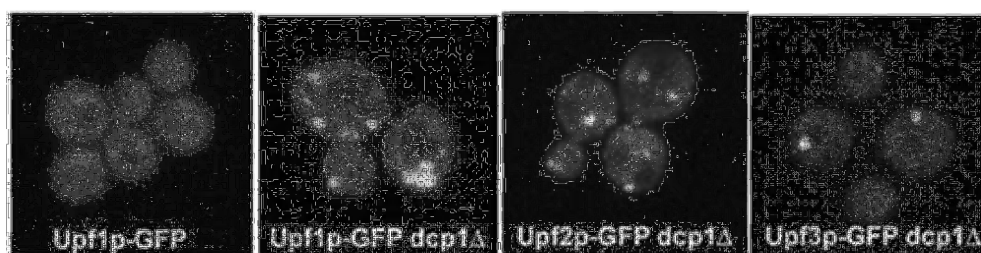
5'konci je pozičně dependentní na PTC. Transkripty s PTC blízko 5'konce vykazují větší rychlost než mRNA s PTC ležících blízko 3'konce (Cao and Parker, 2003).

Degradace nonsense transkriptů se odehrává v cytoplasmě, zřejmě v tzv. P-tělískách (P-bodies). Jedná se o dynamické struktury, které obsahují proteiny účastnící se degradace 5'→3' (Xrn1, Dcp1-Dcp2 komplex a aktivátory odstranění čepičky). P-tělíska, ale postrádají exosomální komplex, Ski komplex (Ski2p/Ski3p/Ski8p) a Ski7p podílející se na degradaci 3'→5', jejichž proteiny jsou rovnoměrně distribuovány v cytoplasmě (Araki et al, 2001; Sheth and Parker, 2003). Tyto poznatky naznačují, že v P-tělískách probíhá pouze degradace transkriptů ve směru 5'→3'. Velikost P-tělísek závisí na množství mRNA v nich přítomných. Inhibice degradace transkriptů (*dcp1Δ*, *xrn1Δ*) zvýšila jejich velikost, naopak inhibice translace (tudíž i odstranění čepičky), pomocí cykloheximidu, vedla k jejich vymizení (Sheth and Parker, 2003).



Obr.13 Vizualizace cytoplasmatické lokalizace fúzních proteinů Dcp1p-GFP (B) a Ski7p-GFP (I). Dcp1p je lokalizován v P-tělískách, naopak Ski7p účastnící se degradace 3'→5' je rovnoměrně rozmístěn v cytoplasmě (Sheth and Parker, 2003).

O degradaci nonsense transkriptů v P-tělískách vypovídá několik pozorování. Normálně jsou Upf proteiny lokalizované rovnoměrně v cytoplasmě. Inhibicí odstranění čepičky (*dcp1Δ*, *dcp2Δ* a *xrn1Δ*) však vede k jejich akumulaci v P-tělískách (Sheth and Parker, 2006).



Obr.14 Vizualizace cytoplasmatické lokalizace fúzních proteinů Upf1p-GFP a Upf1p-Upf3p-GFP dcp1Δ (převzato z Sheth and Parker, 2006).

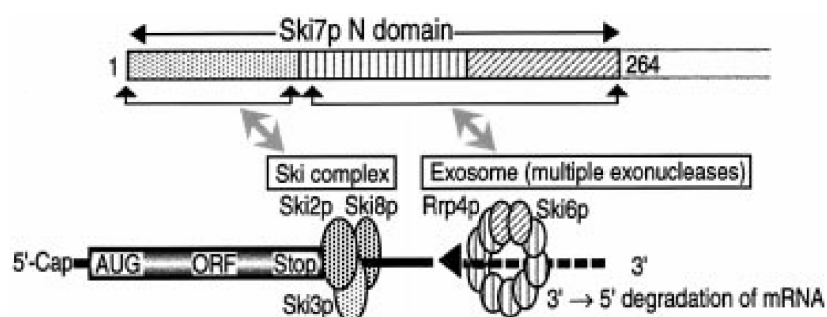
Translačně reprimované nonsense transkripty vstupují do P-tělísek možná pod vlivem Upf1p, a to bez aktivace jeho ATPázové funkce. Samotná lokalizace nonsense mRNA není dostatečná pro vyvolání NMD, vyžaduje přítomnost i ostatních dvou Upf proteinů (Sheth and

Parker, 2003, 2006). Pro cílení Upf1p do P-tělísek není potřeba ani jeden ze zbývajících Upf proteinů. Naopak pro lokalizaci Upf2p a Upf3p do P-tělísek je vyžadován Upf1p, a to zřejmě jeho ATPázové doména/funkce (Sheth and Parker, 2006). Nadprodukce mutanty Upf1 s defektem v ATPáze (DE572AA) způsobila akumulaci např. nonsense mRNA, Dcp1p nebo Dcp2p v P-tělískách, ale nedocházelo k lokalizaci Upf2p a Upf3p. Buď tato alela není schopná rekrutovat Upf2p a Upf3p nebo tyto proteiny asociují s mRNP až po hydrolýze ATP (Sheth and Parker, 2006). Upf1p směřuje do P-tělísek i wild-type transkripty. Hydrolýza ATP je poté vyžadována pro rozhodování, zda má být daná mRNA degradována. Pokud ano, sestaví se surveillance komplex a dochází k degradaci. V opačném případě se transkript navrácí zpět do cytoplasmy, kde může být dále translatován (Sheth and Parker, 2006).

Zatímco mRNA s PTC blízko 5'konce způsobila redukcii velikosti a počtu P-tělísek v upf1Δ i přes zvýšení množství mRNA z důvodu inhibice NMD, delece genu UPF2 a UPF3 naopak zvětšila velikost a počet P-tělísek zhruba 2-krát vzhledem k upf1Δ. Na cílení transkriptů s PTC v blízkosti 3'konce participují všechny tři Upf proteiny. To znamená, že Upf2p a Upf3p se také možná podílejí na rozeznání aberantní terminační události (Sheth and Parker, 2006).

Deadenylačně dependentní 3' → 5' degradace probíhá pomaleji než 5' → 3', zrychlenou deadenylací na oligoadenylové intermediáty před kompletní degradací (Cao and Parker, 2003; Mitchell and Tollervey, 2003).

Na odstranění aberantních transkriptů se podílí Ski7p, který se váže svou N-terminální doménou na cytoplasmatický exosom, Ski komplex a Upf1p. Ski7p interaguje přímo se Ski3p a Ski8p, avšak interakce Ski7p a Ski2p vyžaduje zbývajících Ski proteiny tvořící Ski komplex (Wang et al., 2005). Vazba Ski7p na Upf1p je dependentní na přítomnosti Upf2p a nezávislá na RNA (Araki et al., 2001; Takahashi and Araki, 2003; Mitchell and Tollervey, 2003). Funkce Upf1p je vyžadována, jak pro zrychlenou deadenylaci, tak i pro následné odbourávání oligoadenylových intermediátů (Mitchell and Tollervey, 2003).



Obr.15 N-terminální doména Ski7p interaguje se Ski komplexem (Ski2/Ski3/Ski8) a cytoplasmatickým exosomem. Interakční doména Ski7p se Ski komplexem zahrnuje aminokyseliny 1-96 a s exosomem 80-184 a 168-264 (převzato a upraveno z Araki et al., 2001).

## 7. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o dráze nonsense mediated mRNA decay u kvasinky *S. cerevisiae*. Primárními substráty jsou nonsense mRNA s PTC uvnitř protein-kódující oblasti. Ve skutečnosti tato dráha ovlivňuje i wild-type transkripty jako např. mRNA s uORF, podstupující leaky scanning či s abnormálně prodlouženou 3'UTR. Dráha NMD se tedy podílí na globálním ovlivňování kvasinkového transkriptomu ať už přímým či nepřímým vlivem.

V současné době jsou navrženy tři modely popisující její průběh: DSE model, aberantně terminační model a koherentní model. Zdá se však, že aberantně terminační model není správný, a nebo má poly(A) konec či Pab1p redundantní funkci. Z toho pohledu se jeví zajímavým koherentní model, který byl poprvé zmíněn v tomto roce. Všechny tyto modely se liší způsobem rozeznání PTC od nativního terminačního kodónu. Společným rysem je naopak účast tří Upf proteinů (Upf1p-Upf3p), jež po spuštění dráhy vytvářejí surveillance komplex, a způsob degradace aberantních transkriptů.

Pro podrobný popis průběhu NMD u *S. cerevisiae* zůstává stále řada otázek nezodpovězených, zejména potřeba fosforylačně-defosforylačního cyklu a případný smysl fosforylace Upf1p, faktory ovlivňující rozeznání PTC od nativního terminačního kodónu, role Pab1p v této dráze a v jakém pořadí Upf proteiny na aberantní transkript nasedají.

## Seznam použité literatury

**Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A.** 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*. 432(7013):112-8.

**Amrani N, Sachs MS, Jacobson A.** 2006. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(6):415-25. Review.

**Anderson JT, Paddy MR, Swanson MS.** 1993. PUB1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13(10):6102-13.

**Araki Y, Takahashi S, Kobayashi T, Kajihō H, Hoshino S, Katada T.** 2001. Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 20(17):4684-93.

**Atkin AL, Altamura N, Leeds P, Culbertson MR.** 1995. The majority of yeast UPF1 co-localizes with polyribosomes in the cytoplasm. *Mol. Biol. Cell.* 6(5):611-25.

**Atkin AL, Schenkman LR, Eastham M, Dahlseid JN, Lelivelt MJ, Culbertson MR.** 1997. Relationship between yeast polyribosomes and Upf proteins required for nonsense mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 272(35):22163-72.

**Baker KE, Parker R.** 2006. Conventional 3' end formation is not required for NMD substrate recognition in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 12(8):1441-5.

**Beelman CA, Stevens A, Caponigro G, LaGrandeur TE, Hatfield L, Fortner DM, Parker R.** 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature.* 382(6592):642-6.

**Belgrader P, Cheng J, Maquat LE.** 1993. Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90(2):482-6.

**Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM.** 1995. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 251(3):334-45.

**Cao D, Parker R.** 2003. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell.* 113(4):533-45.

**Coller JM, Gray NK, Wickens MP.** 1998. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes Dev.* 12(20):3226-35.

**Conti E, Izaurralde E.** 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17(3):316-25. Review.

**Cui Y, Hagan KW, Zhang S, Peltz SW.** 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 9(4):423-36.

**Culbertson MR, Neeno-Eckwall E.** 2005. Transcript selection and the recruitment of mRNA decay factors for NMD in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 11(9):1333-9. Review.

**Czaplinski K, Weng Y, Hagan KW, Peltz SW.** 1995. Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA.* 1(6):610-23.

**Czaplinski K, Ruiz-Echevarria MJ, Paushkin SV, Han X, Weng Y, Perlick HA, Dietz HC, Ter-Avanesyan MD, Peltz SW.** 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12(11):1665-77.

**Czaplinski K, Ruiz-Echevarria MJ, González CI, Peltz SW.** 1999. Should we kill the messenger? The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover. *Bioessays.* 21(8):685-96. Review.

**Dunckley T, Parker R.** 1999. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* 18(19):5411-22.

**Fasken MB, Corbett AH.** 2005. Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12(6):482-8. Review.

**Gao Q, Das B, Sherman F, Maquat LE.** 2005. Cap-binding protein 1-mediated and eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated pioneer rounds of translation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(12):4258-63.

**González CI, Ruiz-Echevarria MJ, Vasudevan S, Henry MF, Peltz SW.** 2000. The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell.* 5(3):489-99.

**Hagan KW, Ruiz-Echevarria MJ, Quan Y, Peltz SW.** 1995. Characterization of cis-acting sequences and decay intermediates involved in nonsense-mediated mRNA turnover. *Mol. Cell Biol.* 15(2):809-23.

**He F, Jacobson A.** 1995. Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway by use of an interacting protein screen. *Genes Dev.* 9(4):437-54.

**He F, Brown AH, Jacobson A.** 1996. Interaction between Nmd2p and Upf1p is required for activity but not for dominant-negative inhibition of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in yeast. *RNA.* 2(2):153-70.

**He F, Brown AH, Jacobson A.** 1997. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell Biol.* 17(3):1580-94.

**He F, Jacobson A.** 2001. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p regulate the decapping and exonucleolytic degradation of both nonsense-containing mRNAs and wild-type mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 21(5):1515-30.

**He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A.** 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol. Cell* 12(6):1439-52.

**Hilleren P, Parker R.** 1999. mRNA surveillance in eukaryotes: kinetic proofreading of proper translation termination as assessed by mRNP domain organization? *RNA.* 5(6):711-9. Review.

**Isken O, Maquat LE.** 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* 21(15):1833-56. Review.

**Keeling KM, Lanier J, Du M, Salas-Marco J, Gao L, Kaenjak-Angeletti A, Bedwell DM.** 2004. Leaky termination at premature stop codons antagonizes nonsense-mediated mRNA decay in *S. cerevisiae*. *RNA.* 10(4):691-703.

**Kessler MM, Henry MF, Shen E, Zhao J, Gross S, Silver PA, Moore CL.** 1997. Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes Dev.* 11(19):2545-56.

**Kuperwasser N, Brogna S, Dower K, Rosbash M.** 2004. Nonsense-mediated decay does not occur within the yeast nucleus. *RNA.* 10(12):1907-15.

**LaGrandeur TE, Parker R.** 1998. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.* 17(5):1487-96.

**Lee BS, Culbertson MR.** 1995. Identification of an additional gene required for eukaryotic nonsense mRNA turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92(22):10354-8.

**Leeds P, Peltz SW, Jacobson A, Culbertson MR.** 1991. The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 5(12A):2303-14.

**Leeds P, Wood JM, Lee BS, Culbertson MR.** 1992. Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 12(5):2165-77.

**Lelivelt MJ, Culbertson MR.** 1999. Yeast Upf proteins required for RNA surveillance affect global expression of the yeast transcriptome. *Mol. Cell Biol.* 19(10):6710-9.

- Luke B, Azzalin CM, Hug N, Deplazes A, Peter M, Lingner J.** 2007. *Saccharomyces cerevisiae* Ebs1p is a putative ortholog of human Smg7 and promotes nonsense-mediated mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 35(22):7688-97.
- Maderazo AB, He F, Mangus DA, Jacobson A.** 2000. Upf1p control of nonsense mRNA translation is regulated by Nmd2p and Upf3p. *Mol. Cell Biol.* 20(13):4591-603.
- Maderazo AB, Belk JP, He F, Jacobson A.** 2003. Nonsense-containing mRNAs that accumulate in the absence of a functional nonsense-mediated mRNA decay pathway are destabilized rapidly upon its restitution. *Mol. Cell Biol.* 23(3):842-51.
- Meaux S, van Hoof A, Baker KE.** 2008. Nonsense-mediated mRNA decay in yeast does not require PAB1 or a poly(A) tail. *Mol. Cell.* 29(1):134-40.
- Mitchell P, Tollervey D.** 2003. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell.* 11(5):1405-13.
- Muhrad D, Parker R.** 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature.* 370(6490):578-81.
- Muhrad D, Parker R.** 1999a. Recognition of yeast mRNAs as "nonsense containing" leads to both inhibition of mRNA translation and mRNA degradation: implications for the control of mRNA decapping. *Mol. Biol. Cell.* 10(11):3971-8.
- Muhrad D, Parker R.** 1999b. Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA.* 5(10):1299-307.
- Peltz SW, Brown AH, Jacobson A.** 1993. mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three cis-acting sequence elements and one trans-acting factor. *Genes Dev.* 7(9):1737-54.
- Ruiz-Echevarría MJ, Peltz SW.** 1996. Utilizing the GCN4 leader region to investigate the role of the sequence determinants in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 15(11):2810-9.
- Ruiz-Echevarría MJ, González CI, Peltz SW.** 1998. Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA. *EMBO J.* 17(2):575-89.
- Ruiz-Echevarría MJ, Peltz SW.** 2000. The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell.* 101(7):741-51.
- Sheth U, Parker R.** 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 300(5620):805-8.

- Sheth U, Parker R.** 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell*. 125(6):1095-109.
- Shirley RL, Lelivelt MJ, Schenkman LR, Dahlseid JN, Culbertson MR.** 1998. A factor required for nonsense-mediated mRNA decay in yeast is exported from the nucleus to the cytoplasm by a nuclear export signal sequence. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 21):3129-43.
- Shirley RL, Ford AS, Richards MR, Albertini M, Culbertson MR.** 2002. Nuclear import of Upf3p is mediated by importin-alpha/-beta and export to the cytoplasm is required for a functional nonsense-mediated mRNA decay pathway in yeast. *Genetics*. 161(4):1465-82.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A.** 2008. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J.* 27(3):471-81. Review.
- Takahashi S, Araki Y, Sakuno T, Katada T.** 2003. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22(15):3951-9.
- Wang W, Czaplinski K, Rao Y, Peltz SW.** 2001. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO J.* 20(4):880-90.
- Wang L, Lewis MS, Johnson AW.** 2005. Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA*. 11(8):1291-302.
- Wang W, Cajigas IJ, Peltz SW, Wilkinson MF, González CI.** 2006. Role for Upf2p phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell Biol.* 26(9):3390-400.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW.** 1996a. Identification and characterization of mutations in the UPF1 gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol. Cell Biol.* 16(10):5491-506.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW.** 1996b. Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol. Cell Biol.* 16(10):5477-90.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW.** 1998. ATP is a cofactor of the Upf1 protein that modulates its translation termination and RNA binding activities. *RNA*. 4(2):205-14.
- Zhang S, Ruiz-Echevarria MJ, Quan Y, Peltz SW.** 1995. Identification and characterization of a sequence motif involved in nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell Biol.* 15(4):2231-44.
- Zhang S, Welch EM, Hogan K, Brown AH, Peltz SW, Jacobson A.** 1997. Polysome-associated mRNAs are substrates for the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 3(3):234-44.



