

DEGRADACJA NIEPRAWIDŁOWYCH TRANSKRYPTÓW W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH I PROKARIOTYCZNYCH

DEGRADATION OF TRUNCATED mRNA IN EUKARYOTIC AND PROKARYOTIC CELLS

Katarzyna Dorota RACZYŃSKA^{1,2}, Halina AUGUSTYNIAK¹

¹Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej oraz ²Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM

Streszczenie: Procesy degradujące transkrypty zawierające przedwczesny kodon stop lub w ogóle pozbawione kodonu stop chronią komórki przed powstaniem niefunkcjonalnych, a czasem toksycznych białek. Szlaki degradacji takich mRNA opisano u ssaków, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, drożdży i roślin. Etapy degradacji, jak i uczestniczące w tym procesie czynniki białkowe nie zawsze są identyczne u różnych organizmów. Rozpoznanie nieprawidłowych mRNA zależy od przestrzennego oddziaływania pomiędzy składnikami rybosomu zatrzymanego na kodonie stop a białkami wiążącymi się w rejonie 3'UTR transkryptu. Poszczególne czynniki białkowe zaangażowane w degradację mogą też uczestniczyć w innych procesach, takich jak: cykl komórkowy, replikacja czy wyciszenie genów. W komórkach prokariotycznych na straży jakości mRNA stoją cząsteczki tmRNA, które zachowują się jak tRNA i mRNA. Funkcją tmRNA jest rozpoznanie transkryptu bez kodonu stop na rybosomie, dokończenie syntezy wadliwego białka w procesie trans-translacji i przywrócenie rybosomom stanu aktywności. tmRNA naznacza jednocześnie wadliwe mRNA i białko do degradacji.

Słowa kluczowe: transkrypty, kodon stop, translacja, degradacja, NMD, tmRNA.

Summary: Cells have evolved mechanism to get rid of nonfunctional or potentially deleterious proteins that are coded by mRNA with premature translation termination or mRNA without stop codon. The pathway of degradation of such mRNA have been described in mammals, flies, nematodes, yeast and plants. The degradation steps as well as factors involved in are not identical in different species. The general way of recognition of aberrant transcripts depends on spatial relationship between ribosome components and ribonucleoproteins bound to the 3'UTR sequence. Moreover, protein factors involved in degradation can participate in additional processes like cell cycle regulation, replication or RNA interference. The control of mRNA quality in prokaryotes is performed by tmRNA that works both as tRNA and mRNA. tmRNA recognizes ribosomes stalled by transcripts without stop codon and continues the synthesis of truncated proteins in trans-translation process. In consequence ribosomes are reactivated and aberrant transcript and protein are triggered for decay.

Key words: transcripts, stop codon, translation, degradation, NMD, tmRNA.

WPROWADZENIE

Poziom stabilnych transkryptów w komórce jest regulowany przez szybkość zarówno syntezy, jak i degradacji mRNA. Niestabilność mRNA wywołuje wiele czynników. Należą do nich, między innymi, destabilizujące motywy sekwencji i aktywność kompleksów degradacyjnych. Te ostatnie odgrywają istotną rolę zwłaszcza w przypadku degradacji nieprawidłowych mRNA, takich jak: transkrypty z przedwczesnym kodonem stop lub w ogóle pozbawione sygnału terminacji translacji. Blokowanie translacji tych mRNA jest ważnym mechanizmem zapobiegającym powstawaniu wadliwych białek zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Pomimo że wiele składników kompleksów degradacyjnych jest wysoce zachowawczych, mechanizmy rozpoznawania i degradacji nieprawidłowych mRNA są odmienne w różnych organizmach.

W komórkach eukariotycznych degradacja transkryptów z przedwczesnym kodonem stop odbywa się najczęściej w procesie NMD (ang. *Nonsense-Mediated mRNA Decay*), a transkryptów pozbawionych kodonu stop – w procesie NSD (ang. *Nonstop-mediated mRNA Decay*). Komórki bakteryjne natomiast wytworzyły specyficzną cząsteczkę tmRNA (ang. *transfer-messenger RNA*), która naznacza do degradacji zarówno transkrypty pozbawione kodonu stop, jak i produkty ich translacji.

DEGRADACJA PRAWIDŁOWYCH TRANSKRYPTÓW

Transkrypty eukariotyczne chroni przed degradacją struktura czapeczki na 5' końcu i sekwencja poliA na 3' końcu oraz, odpowiednio, związany z nimi kompleks CBC (ang. *Cap Binding Complex*) i białko wiążące poliA – PABP (ang. *PoliA Binding Protein*).

Degradacja naturalnych mRNA w komórkach ssaków rozpoczyna się w większości przypadków deadenylacją, po której następuje egzonukleolityczne cięcie w kierunku 3' → 5'. W mniejszym stopniu RNA jest trawiony przez 5' → 3' egzonukleazę po usunięciu z 5' końca czapeczki [4, 58, 65].

Degradacja naturalnych mRNA w komórkach drożdży przebiega w cytoplazmie, głównie w kierunku 5' → 3' i jest poprzedzona częściową deadenylacją (por. ryc. 3A). Skrócenie ogona poliA o długości 55–75 nt do około 10 nt wiąże się z oddysocjowaniem białka Pab1p, co z kolei przyspiesza usunięcie czapeczki z udziałem enzymów Dcp1p/Dcp2p. W oddziaływaniu mRNA i kompleksu usuwającego czapeczkę pośredniczą koaktywatory Lsm1-7 [73]. Następnie mRNA jest całkowicie trawiony przez 5' → 3' egzonukleazę Xrn1p. Trawienie od końca 3' z udziałem cytoplazmatycznego egzozomu zawierającego kompleks białek Ski2p, Ski3p, Ski8p oraz białko Ski7p przebiega rzadziej. Trawienie od 3' końca poprzedza całkowita deadenylacja transkryptu [2, 4, 19, 65].

W komórkach *Arabidopsis thaliana* degradacja prawidłowych transkryptów przebiega różnymi drogami. Część transkryptów podlega najpierw endonukleolitycznemu cięciu na rybosomach, a następnie powstały fragment 3' jest degradowany w kierunku

5'→3', a fragment 5' w kierunku 3'→5', niezależnie od usunięcia czapeczki i deadenyacji. Degradacja części transkryptów (na przykład transkryptu genu *PHYA* owsa) przebiega z obu końców, ale po uprzednim usunięciu czapeczki lub ogona poliA [22].

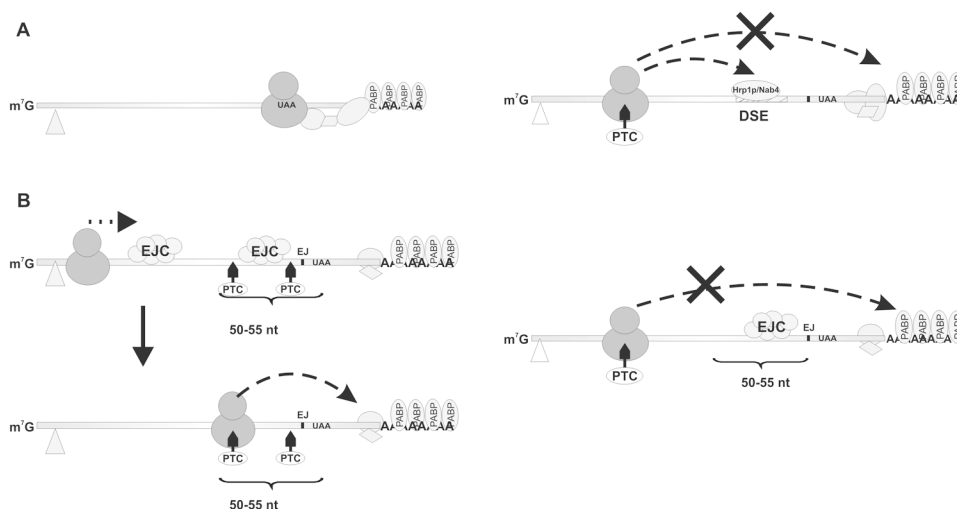
Inaczej degradowane są transkrypty, które posiadają przedwczesny kodon stop lub w ogóle nie mają kodonu stop. Przedwczesny kodon stop może powstać na skutek mutacji punktowych lub też delecji czy insercji, które zmieniają ramkę odczytu, na przykład w wyniku alternatywnego splicingu. Wadliwe transkrypty bez kodonu stop mogą też powstać na skutek występowania przedwczesnych sygnałów endonukleolitycznego cięcia i poliadenylacji, wówczas ich 3' koniec znajduje się obrębie sekwencji kodującej.

ROZPOZNANIE WADLIWEGO TRANSKRYPTU

Czynnikiem uruchamiającym proces degradacji transkryptów z przedwczesnym kodonem stop lub pozbawionych kodonów stop na drodze, odpowiednio, NMD lub NSD jest związanie transkryptu z rybosomami. U wszystkich organizmów proces degradacji NMD jest zależny od translacji, a u ssaków, z pewnymi wyjątkami, również od splicingu [49]. Wykazano, że zarówno zablokowanie translacji czy mutacja w kodonie start, jak również obecność supresorowych tRNA wpływa na stabilizację wadliwych mRNA [27].

Degradacji podlegają przeważnie mRNA z przedwczesnym kodonem stop lub wydłużonym rejonem 3'UTR, co ma związek z zaburzeniem odległości między kodonem stop a 3' końcem transkryptu (ryc. 1). Podczas translacji prawidłowego mRNA czynniki białkowe – RNP (ang. *Ribonucleoproteins*) uczestniczące w dojrzewaniu 3' końca mRNA prawdopodobnie oddziałują ze składnikami rybosomu zatrzymanego na kodonie stop. Taka interakcja wywołuje zmiany konformacyjne RNPs, które stabilizują transkrypt i kierują go do kolejnych rund translacji [26, 27]. Stwierdzono, że w komórkach ssaków kodon stop powinien znajdować się do 50 nukleotydów powyżej ostatniego egzonu lub w obrębie ostatniego egzonu (ryc. 1B). W transkryptach drożdży natomiast istotna jest długość rejonu 3'UTR, który zawiera średnio 100 nukleotydów. Prawdopodobnie tylko taka odległość umożliwia właściwe oddziaływanie zatrzymanych na kodonie stop składników rybosomów z RNPs, gdyż jej skrócenie lub wydłużenie indukuje NMD [1, 26, 27, 53, 62]. W transkryptach drożdży występuje ponadto specyficzna sekwencja DSE (ang. *Downstream Sequence Element*), która wiąże białko Hrp1p/Nab4 (ryc. 1A) [20]. Jeśli sekwencja DSE jest położona poniżej przedwczesnego kodonu stop – PTC (ang. *Premature Termination Codon*) (do 150 nt), składniki rybosomu zatrzymanego na przedwczesnym kodonie stop oddziałują z białkiem Hrp1p/Nab4. Białko to wiąże się następnie z białkami Upf1p i Upf2p i prawdopodobnie w ten sposób uruchamia proces NMD [19]. Wykazano, że zarówno mutacje w genie białka Hrp1p/Nab4, jak i brak motywu DSE lub jego występowanie powyżej kodonu stop stabilizują transkrypty z PTC [19, 20].

Istotną rolę w oddziaływaniu ze składnikami rybosomu zatrzymanego na prawidłowym kodonie stop odgrywa białko PABP. PABP oddziałuje z czynnikiem uwalniającym eRF3



RYCINA 1. Mechanizm rozpoznania nieprawidłowego kodonu stop w komórkach drożdży (A) i ssaków (B). Właściwy kodon stop umożliwia oddziaływanie składników rybosomu z białkami obecnymi w rejonie 3'UTR. Trójkąt wskazuje kodon start. Kierunek ruchu rybosomów pokazano kropkowaną strzałką. EJ – miejsce połączenia egzon-egzon; EJC – kompleks wiążący się z połączeniem egzon-egzon; PTC – przedwczesny kodon stop; PABP – białka wiążące poliA; DSE – motyw sekwencji wiążący białko Hrp1p/Nab4

(ang. *eukaryotic Release Factor*) i może indukować terminację translacji oraz powrót rybosomów do stanu aktywnego. W transkryptach ze skróconym rejonem 3'UTR lub pozbawionych sygnału terminacji właściwa odległość między kodonem stop a białkiem PABP zostaje zaburzona. Odczytywanie na rybosomie 3' końca takich transkryptów powoduje oddysocjowanie PABP i wpływa na destabilizację nieprawidłowych mRNA [34]. Wykazano, że w komórkach drożdży wprowadzenie „właściwego” rejonu 3'UTR w rejonie przedwczesnego kodonu stop wywoływało właściwą terminację translacji i inaktywację procesu NMD [1].

CZYNNIKI UCZESTNICZĄCE W PROCESIE NMD

W procesie degradacji transkryptów z przedwczesnym kodonem stop na drodze NMD bierze udział szereg czynników białkowych. U wszystkich organizmów, u których proces ten zidentyfikowano, istotną rolę odgrywają białka UPF1, UPF2 i UPF3. Kluczowym enzymem procesu NMD jest helikaza UPF1 [10, 49]. Białko UPF1 u różnych eukariotów wykazuje około 50% identyczności; mniejszą homologię, bo tylko około 20–30%, wykazują białka UPF2 i UPF3. Mniejsza konserwatywność dwóch ostatnich czynników może wynikać z tego, że oddziałują one również z innymi białkami, które nie są wysoce zachowawcze w różnych organizmach [11].

W procesie NMD przebiegającym w komórkach drożdży degradacja transkryptów z przedwczesnym kodonem stop wymaga aktywności białek UPF1, UPF2 i UPF3, chociaż do degradacji transkryptów bez kodonu stop czynniki te nie są już wymagane. Z kolei, w komórkach *C. elegans* zidentyfikowano aż siedem białek SMG biorących udział w degradacji poprzez NMD: SMG1-7 [66]. Okazało się, że trzy spośród nich: SMG2, SMG3 i SMG4 są homologami białek UPF1-3 [11]. W komórkach ludzkich natomiast w przebiegu NMD biorą udział białka UPF1-3 oraz SMG1, SMG5-7, przy czym białko UPF3 występuje w postaci dwóch paralogów: UPF3a i UPF3b [16, 76].

Poszczególne czynniki białkowe nie zawsze występują u wszystkich organizmów. I tak u *D. melanogaster* nie zidentyfikowano białka SMG7 [16], a w komórkach drożdży stwierdzono brak ortologów białek SMG1, SMG5-7 [11, 66]. Okazało się także, że dwa czynniki kompleksu EJC (ang. *Exon-exon Junction Complex*), który wiąże się po splicingu z każdym połączeniem egzon-egzon, białka RNPS1 i Y14 mają zdolność wywoływania procesu NMD, kiedy przyłączają się poniżej kodonu stop [76]. U roślin dotychczas potwierdzono udział w procesie NMD jedynie białka UPF1 i UPF3 [3, 32].

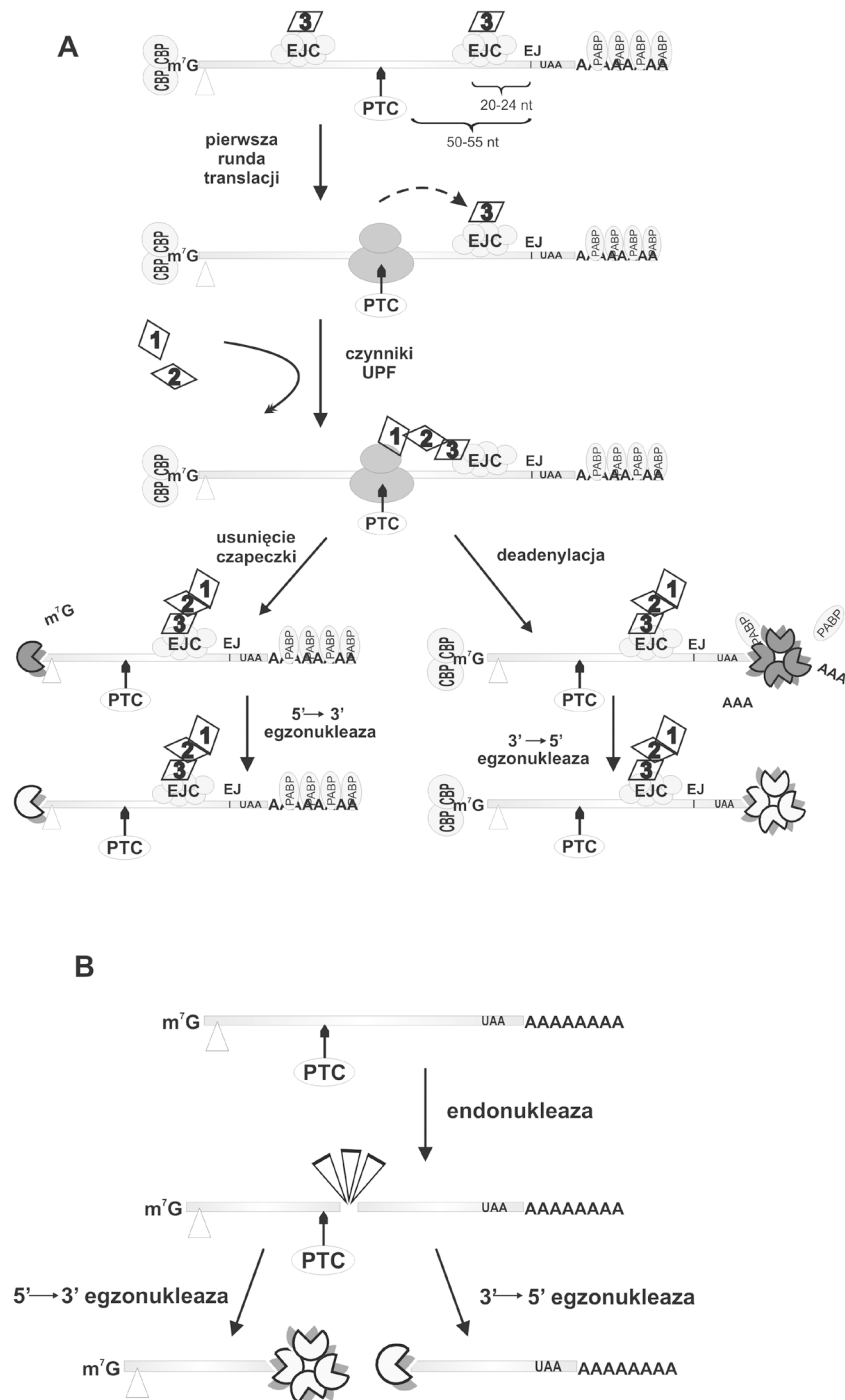
Istotną rolę podczas uruchamiania degradacji w procesie NMD odgrywa cykliczna fosforylacja i defosforylacja białka UPF1, które na N- i C-końcu ma wielokrotnie powtórzone reszty seryny. U ludzi i *C. elegans* fosforylacja jest katalizowana przez kinazę SMG1, a defosforylacja przez białka SMG5-7; te ostatnie, same nie będąc fosfatazami, aktywują fosfatazę 2A (PP2A). PP2A ma zdolność oddziaływania z czynnikiem eRF1, co sugeruje, że fosforylacja ma miejsce na etapie terminacji translacji [10, 11, 16, 52]. Przypuszcza się, że ufosforylowane białko UPF1 wiąże się z N-końcem białka SMG7, zawierającym domenę charakterystyczną dla białek z rodziny 14-3-3 [14]. Domena C-końcowa białka SMG7 naznacza mRNA do degradacji. Białko SMG7 oddziałuje ponadto z białkami SMG5 i PP2A [75]. Sugeruje się także, że czynnikiem sygnałnym dla zapoczątkowania NMD może być zdolność białka UPF1 do hydrolizy ATP [26, 27]. U *S. cerevisiae*, pomimo braku białek SMG1, SMG5, SMG6 i SMG7, białko UPF1 jest również fosforylowane i co więcej, do właściwego przebiegu procesu NMD wymagana jest również fosforylacja białka UPF2. Ufosforylowana domena N-końcowa UPF2 oddziałuje następnie z białkiem Hrp1p, co wywołuje degradację na drodze NMD [77].

Oprócz wyżej wymienionych białek, w degradacji transkryptów drogą NMD uczestniczą enzymy usuwające czapeczkę: DCP1/DCP2 oraz deadenylazy i egzonukleazy prowadzące degradację mRNA w kierunku 3' → 5' [7, 48, 51, 72].

1. Proces NMD w komórkach ssaków i *D. melanogaster*

Przebieg procesu NMD u ssaków i u muszki owocowej wykazuje pewne różnice. Na przykład, u muszki owocowej, w odróżnieniu od ssaków, proces NMD jest niezależny od splicingu i rozpoczyna się od endonukleolitycznego przecięcia wadliwego transkryptu.

Do degradacji wadliwych transkryptów w procesie NMD u ssaków kierowane są takie mRNA, których sygnał terminacji translacji znajduje się w odległości większej niż 50–55 nukleotydów powyżej ostatniego z 3' końca połączenia egzon-egzon, powstałego po usunięciu intronu. Kodony stop położone w mniejszej odległości lub w obrębie ostatniego egzonu są rozpoznawane jako właściwe [53].



RYCINA 2. Schemat degradacji transkryptów drogą NMD w komórkach ssaków (A) i *D. melanogaster* (B). Trójkąt wskazuje kodon start. Wyjaśnienia skrótów podano w opisie do ryciny 1

Rozpoznanie przedwczesnego kodonu stop odbywa się podczas pierwszej rundy translacji, której poddawana jest dojrzała cząsteczka mRNA. Po splicingu, z cząsteczką mRNA w odległości 20–24 nukleotydów przed każdym połączeniem egzon-egzon wiąże się białkowy kompleks EJC. W jego skład wchodzi między innymi białko UPF3a lub UPF3b [76]. Pierwsza runda translacji ma miejsce w cytoplazmie lub zachodzi podczas eksportu mRNA z jądra do cytoplazmy, co sugeruje jej powiązanie z błoną jądrową. Jeśli kodon stop jest ułożony właściwie, następuje seria procesów kierujących transkrypt do następnych rund translacji, tj. czynnik UPF3 i kompleks EJC oddysocjują, czynnik translacji eIF4E zajmuje pozycję kompleksu CBC, a jądrowe białko PABP zostaje zastąpione przez cytoplazmatyczny odpowiednik. Jeśli natomiast rybosomy zatrzymają się na przedwczesnym kodonie stop, proces przemodelowania białek zostaje zablokowany, a cząsteczkę wadliwego mRNA rozpoznaje kompleks terminacyjny, tj. białko UPF3 wiąże się z białkiem UPF2, a następnie z UPF1, które oddziałuje z czynnikami terminacji translacji eRF1 i eRF3 (ryc. 2A) [4, 48, 53]. U ssaków w oddziaływaniach kompleksu terminacyjnego z kompleksem EJC uczestniczy również białko CBP80, które wiąże się z czynnikiem UPF1, co z kolei wzmacnia jego oddziaływanie z białkiem UPF2 [9, 33, 35, 47].

Ostatnio wykazano, że do uruchomienia procesu NMD nie jest wymagana bezpośrednia interakcja rybosomów z kompleksem CBC podczas inicjacji translacji; translacja może rozpocząć się również w obrębie sekwencji kodującej nieprawidłowy mRNA. Wynika stąd, że translacja sama w sobie jest czynnikiem wywołującym NMD [29].

Przyjmuje się, że degradacja może przebiegać dwiema drogami:

- a) poprzez usunięcie czapeczki z 5' końca z udziałem białek DCP1/DCP2 oraz koaktywatorów LSM1-7 i następnie trawienie przez 5' → 3' egzonukleazę XRN1;
- b) deadenylację i trawienie egzonukleolityczne w kierunku 3' → 5' przez egzosom i kompleks białek Ski [4, 48] (ryc. 2A).

Proces degradacji transkryptów zarówno z przedwczesnym kodonem stop, jak i prawidłowych mRNA może przebiegać również na drodze SMD (ang. *Staufen Mediated Decay*). W degradacji typu SMD bierze udział białko Staufen1, wiążące w komórkach ssaków dsRNA. Degradacja w procesie SMD nie jest zależna ani od splicingu, ani od obecności kompleksu EJC, ale wymaga obecności czynnika UPF1. Białko Staufen1 wiąże się z czynnikiem UPF1 oraz z rejonem 3'UTR transkryptu poniżej kodonu stop i nadaje go do degradacji [46]. Wykazano również, że proces degradacji SMD nie wymaga obecności białek UPF2, UPF3 i CBP80 [33, 46].

U *Drosophila melanogaster* degradacja transkryptów z przedwczesnym kodonem stop jest niezależna od splicingu [16]. Proces NMD rozpoczyna się od endonukleolitycznego przecięcia w pobliżu PTC, a następnie fragment 5' transkryptu jest trawiony w kierunku 3' → 5' przez egzosom z udziałem białek Ski, a fragment 3' przez 5' → 3' egzonukleazę XRN1 (ryc. 2B). Oba procesy przebiegają więc niezależnie od usunięcia czapeczki i deadenylacji. Endonukleaza uczestnicząca w tym procesie nie została jeszcze zidentyfikowana [15].

2. Proces NMD w komórkach drożdży

Degradacja transkryptów drożdżowych z przedwczesnym kodonem stop przebiega inaczej niż u ssaków i chociaż wymaga również obecności czynników UPF1-3, nie zależy od splicingu. Pierwsza runda translacji przebiega w cytoplazmie, a proces NMD jest najczęściej niezależny od deadenylacji. Degradacja rozpoczyna się od usunięcia czapeczki przez enzymy Dcp1p/Dcp2p z udziałem białek Lsm1-7, a następnie mRNA, który wciąż ma nienaruszony ogon poliA, jest trawiony w kierunku 5' → 3' przez egzonukleazę Xrn1p (ryc. 3B) [19]. Tą samą drogą usuwane są transkrypty z wydłużonym rejonem 3'UTR, który powstał na skutek mutacji w miejscach poliadenylacji [62]. Alternatywna droga degradacji transkryptów z PTC przebiega niezależnie od usunięcia czapeczki w kierunku 3' → 5' z udziałem egzosomu [59]. Degradację aktywuje oddziaływanie N-końcowej domeny białka Ski7p z czynnikiem UPF1; wymagany jest również czynnik UPF2 [72]. Podobnie jak podczas generalnej degradacji mRNA, droga ta rozpoczyna się częściową deadenylacją (do ogona długości 7–20 adenin) [59] (ryc. 3B).

Zarówno w komórkach drożdży, jak i ssaków problemem są również mRNA, których 3'-koniec znajduje się w obrębie sekwencji kodującej na skutek występowania przedwczesnych sygnałów endonukleolitycznego cięcia i poliadenylacji [13]. Transkrypty te są pozbawione kodonu stop i mogą prowadzić nie tylko do syntezy wadliwego białka, ale również unieruchamiają rybosomy, gdyż nie są rozpoznawane przez czynniki terminacji RF.

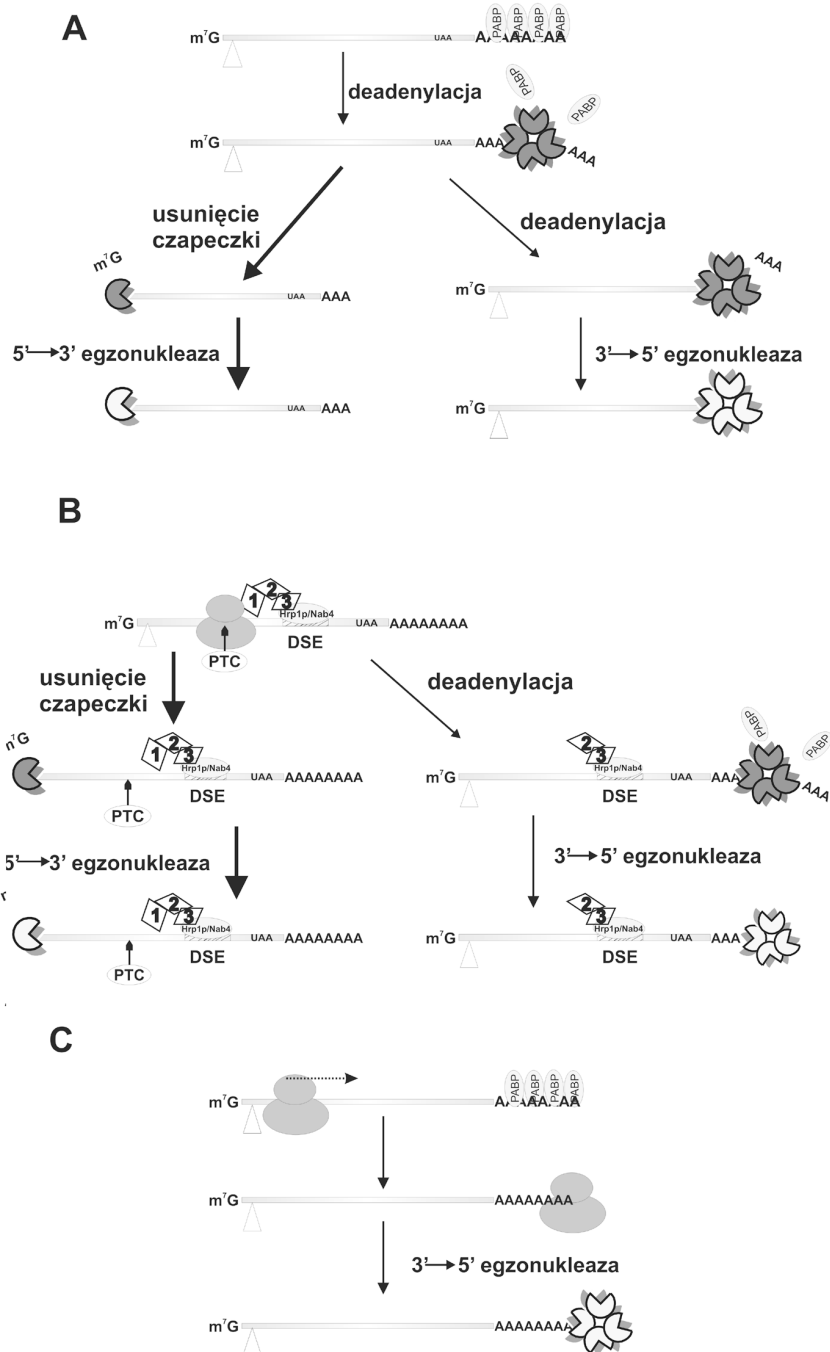
Degradacja transkryptów pozbawionych kodonu stop została dobrze poznana w komórkach drożdży. Proces NSD nie jest związany z procesem NMD i nie wymaga udziału czynnika UPF1 ani deadenylacji, pomimo że również zależy od translacji. Sekwencja wadliwego mRNA jest odczytywana do końca 3', a następnie „utyka” na rybosomie (ryc. 3C). Część takich transkryptów jest rozpoznawana przez C-końcową domenę białka Ski7p, która wykazuje homologię z czynnikiem terminacji eRF3. Ski7p wchodzi na wolne miejsce A na rybosomie i inicjuje degradację wadliwego transkryptu, wiążąc domeną aminową cytoplazmatyczny egzosom. Degradacja przebiega w kierunku 3' → 5' i nie zależy od usunięcia czapeczki [13]. Taki egzosom wykazuje również właściwości deadenylazy, gdyż degradacja rozpoczyna się bez uprzedniego usunięcia ogona poliA [31].

Degradacja nonsensownych transkryptów może też przebiegać w kierunku 5' → 3' z udziałem egzonukleazy Xrn1p [34]. Podobnie degradowane są transkrypty ze skróconym rejonem 3'UTR [34].

Z uwagi na obecność homologów białek Ski w ludzkich komórkach sugeruje się, że mechanizm degradacji transkryptów pozbawionych kodonów stop jest tam podobny [31].

3. Proces NMD w komórkach roślinnych

W odróżnieniu od ssaków i drożdży, proces NMD u roślin nie jest jeszcze do końca poznany. Wiadomo, że roślinne transkrypty z przedwczesnym kodonem stop są degradowane w procesie NMD w cytoplazmie. Jak wspomniano, potwierdzono w nim udział jedynie białek UPF1 i UPF3 [3, 32]. Wiadomo również, że degradacji na drodze NMD podlegają mogą zarówno transkrypty po splicingu, jak i niezawierające intronów. Co więcej, okazało się, że transkrypty z PTC, które uległy częściowemu splicingowi, nie są degradowane, a degradacja transkryptu genu *waxy* ryżu jest zależna od wycięcia intronu położonego powyżej



RYCINA 3. Drogi degradacji transkryptów w komórkach drożdży: A – degradacja naturalnych transkryptów, B – degradacja mRNA z przedwczesnym kodonem stop, C – degradacja transkryptów bez kodonu stop. Trójkąt wskazuje kodon start. Kierunek ruchu rybosomów pokazano kropkowaną strzałką. Główne drogi degradacji wskazują grubsze strzałki. Wyjaśnienia skrótów podano w opisie do ryciny 1

PTC [36]. Sugeruje się więc, że splicing nie jest procesem bezpośrednio wywołującym NMD, ale jest niezbędny do transportu mRNA z jądra do cytoplazmy [36].

UDZIAŁ NMD W INNYCH PROCESACH

W procesie NMD mogą być degradowane mRNA mające dodatkową otwartą ramkę odczytu z kodonem stop w rejonie 5'UTR, także mRNA, które mają introny w obrębie rejonu 3'UTR, niektóre mRNA białek wiążących selen, około jedna trzecia produktów alternatywnego splicingu, który generuje przedwczesny kodon stop, oraz transkrypty transpozonów, retrowirusów i pseudogenów [25, 28, 50, 56, 60, 61]. Okazało się również, że alternatywny splicing może służyć do celowego wytworzenia niestabilnych transkryptów. W procesie określanym jako RUST (ang. *Regulated Unproductive Splicing and Translation*) nadmiar danego białka indukuje splicing własnego pre-mRNA w kierunku wytworzenia izoform z PTC, które następnie zostają zdegradowane w procesie NMD. Taka regulacja na etapie potranskrypcyjnym może zapewniać kontrolę w sytuacji, kiedy na przykład nie mogą jej regulować czynniki transkrypcyjne [49, 50, 64].

Transkrypty, które podlegają kontroli w procesie NMD, są związane z różnymi szlakami metabolicznymi. Proces NMD zachodzi na przykład podczas syntezy receptorów komórek T i immunoglobulin oraz zapobiega pewnym chorobom genetycznym u ludzi. Okazało się, że jedna trzecia tych chorób jest spowodowana powstaniem transkryptów z przedwczesnym kodonem stop. Są to, między innymi, dystrofia mięśniowa Duchenna oraz β -talasemia [26, 78].

Ciekawe, że zablokowanie degradacji w procesie NMD zmienia stabilność około 10% transkryptomu w komórkach drożdży, *Drosophila melanogaster* i ludzi [25, 56, 67]. Liczba i różnorodność transkryptów oraz zachowawczość tego procesu wśród badanych eukariotów świadczy o tym, że NMD nie powstał jedynie do degradacji wadliwych mRNA, ale jest szeroko rozpowszechnionym mechanizmem potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [28, 50]. Złożoność i istotę procesu NMD ilustruje odpowiedź komórki na jego dysfunkcję. Wykazano eksperymentalnie, że w komórkach *Drosophila* proces NMD jest niezbędny podczas podziałów komórkowych. Mutanty pozbawione czynników UPF1 lub UPF2 zatrzymują się w fazie G_2/M cyklu komórkowego [67]. Brak UPF1 jest także letalny dla zarodków mysich i ludzkich linii komórkowych [5, 55]. Z kolei, w *S. cerevisiae* zablokowanie procesu NMD powoduje tylko niewielki defekt oddechowy, a u *C. elegans* zmiany morfologiczne narządów płciowych [66]. Niezbędność procesu NMD dla żywotności jedynie wyższych eukariotów może wynikać z faktu, iż podstawowe geny regulowane w procesie NMD nie są zachowawcze w różnych gatunkach, co potwierdziły badania z użyciem mikromacierzy [25, 56, 67]. Na przykład, większość mRNA z PTC u *Drosophila* nie ma ortologów u drożdży i człowieka regulowanych w ten sam sposób [67]. Być może więc proces NMD reguluje ekspresję genów istotnych dla myszy i człowieka, a mniej istotnych, na przykład, dla drożdży czy nicieni. U roślin proces NMD jest zaangażowany w regulację genów niezbędnych do ich funkcjonowania i rozwoju. Mutanty UPF1 i UPF3 charakteryzują

się zaburzeniami w budowie organów wegetatywnych i kwiatowych, wykazują opóźnione kwitnienie, a nawet brak żywotności nasion [3, 82].

Okazało się, że czynniki NMD mogą być także zaangażowane w inne niż NMD procesy. Stwierdzono, że u ssaków czynnik UPF1 bierze udział w regulacji cyklu komórkowego oraz replikacji i naprawie DNA. Śmierć komórek ludzkich w odpowiedzi na brak białka UPF1 może więc wiązać się z zapobieganiem powstawania niestabilnej informacji genetycznej. Takiej funkcji UPF1 nie stwierdza się natomiast u niższych ewolucyjnie drożdży i nicieni [6]. Również inne białka uczestniczące w procesie degradacji NMD transkryptów mogą być zaangażowane w utrzymanie stabilności DNA. Na przykład białko SMG1 wraz z białkiem UPF1 bierze udział w naprawie ludzkiego DNA, a SMG6 uczestniczy w utrzymaniu właściwej długości telomerów [5]. W komórkach ludzkich białko UPF1 uczestniczy również w zależności od replikacji degradacji histonowych mRNA [44]. Ponadto, białko UPF1 oprócz zaangażowania w degradację w procesie NMD jest także wymagane u ssaków do degradacji transkryptów drogą SMD [46]. Stwierdzono także, że czynniki UPF1, UPF2 i UPF3, podobnie jak składniki kompleksu EJC, indukują wiązanie mRNA z polisomami i przyspieszają inicjację translacji w komórkach ssaków [63, 79]. Natomiast białka SMG2, SMG5 i SMG6 są wymagane w procesie wyciszania genów u *C. elegans*. Sugeruje się, że białka te uczestniczą w amplifikacji i rozprzestrzenianiu sygnału wyciszenia [12]. Podobną rolę pełni w roślinach homolog białka SMG2 – białko UPF1 [3]. Brak zaangażowania w proces interferencji pozostałych czynników NMD świadczy jednak, że nie występują istotne powiązania procesu NMD i RNAi.

Jak wspomniano, proces degradacji NMD dotyczy również pseudogenów, które nabyły w toku ewolucji PTC [25, 56, 60]. Jest to o tyle istotne, że ich introny często kodują snoRNA lub mikroRNA. W wyniku przebiegu procesu NMD transkrypty pseudogenów po splicingu ulegają degradacji, a sekwencje snoRNA i mikroRNA mogą pełnić swoje funkcje [60]. Proces NMD uczestniczy też w regulacji homeostazy aminokwasowej komórek ludzkich. Niedobór aminokwasów hamuje translację, w tym również proces NMD, a to z kolei pozwala na wydajniejszą ekspresję genów uczestniczących w metabolizmie aminokwasów lub związanych z nimi czynników transkrypcyjnych. W normalnych warunkach transkrypty te pozostają na niskim poziomie lub są degradowane w procesie NMD [56]. Regulacja homeostazy aminokwasowej przez NMD występuje też prawdopodobnie u drożdży oraz w komórkach *Drosophila* [25, 67].

MECHANIZM DEGRADACJI TRANSKRYPTÓW BEZ KODONU STOP W KOMÓRKACH BAKTERII

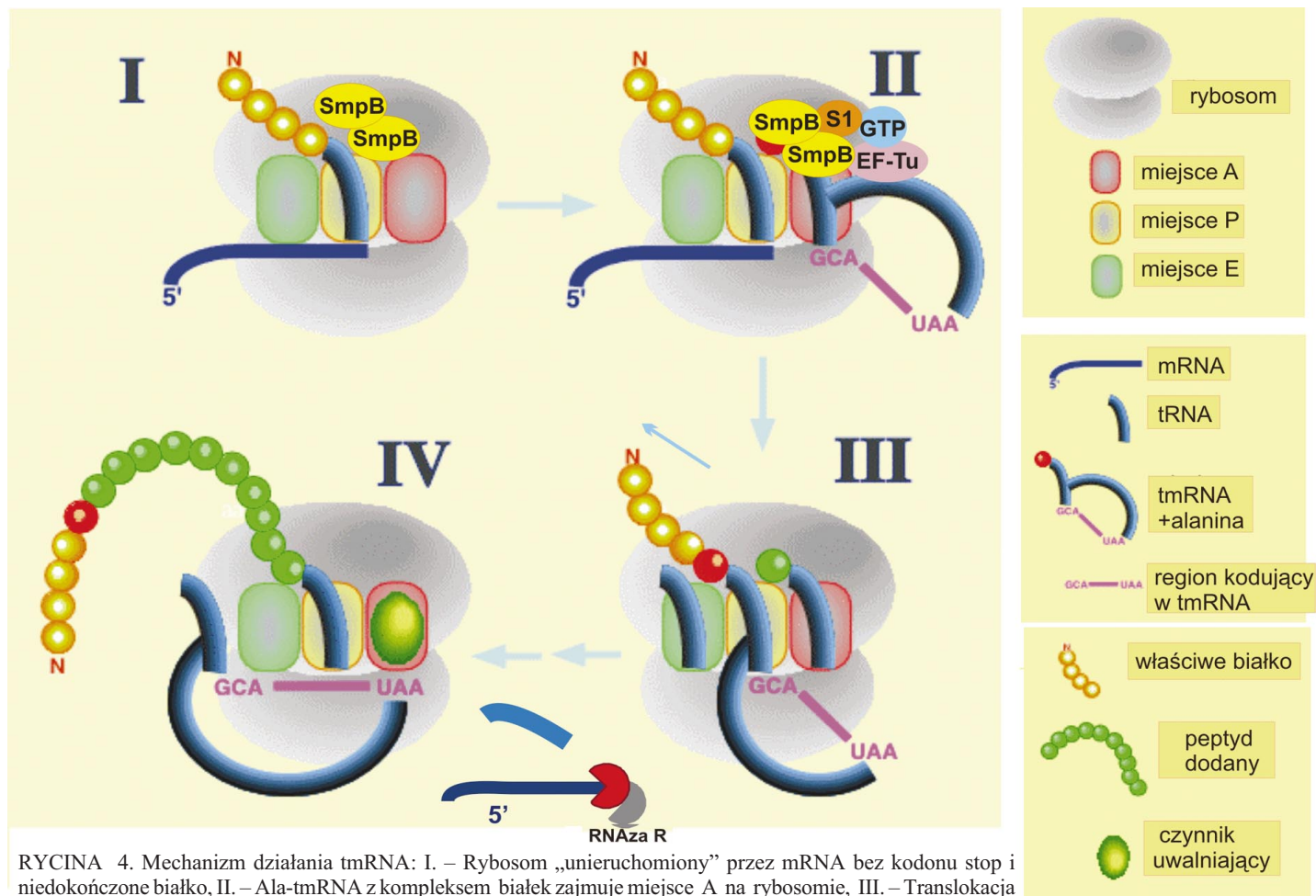
Komórki bakteryjne w celu degradacji transkryptów pozbawionych kodonów stop wytworzyły cząsteczkę tmRNA (ang. *transfer-messenger RNA*). Cząsteczkę tę, zwaną również 10Sa lub SsrA RNA, zidentyfikowano po raz pierwszy w komórkach *E. coli*. tmRNA ma długość średnio 350 nukleotydów (od 250 do 425 nukleotydów) i łączy w sobie funkcje zarówno tRNA, jak i mRNA. Dojrzewanie 5' i 3' końców tmRNA

przypomina dojrzewanie tRNA. Część tmRNA ulega pofałdowaniu w strukturę o kształcie litery L, która zawiera ramię akceptorowe CCA rozpoznawane przez syntetazę alaninową. Ten fragment tmRNA zwany jest domeną TLD (ang. **t**RNA-**L**ike **D**omain). Sekwencja CCA jest kodowana u większości bakterii i tylko u niektórych dodawana przez transferazę nukleotydylową. W obrębie sekwencji tmRNA można również zidentyfikować otwartą ramkę odczytu, zwaną domeną MLD (ang. **m**RNA-**L**ike **D**omain). Składa się ona z 48 do 126 nukleotydów i zawiera od 9 do 28 kodonów, w tym kodony stop [42]. W strukturze przestrzennej tmRNA *E. coli* można wyróżnić występowanie 4 pseudowęzłów i 12 helis. Liczba węzłów i helis w tmRNA różnych gatunków może być zmienna [8, 83].

Funkcją tmRNA jest rozpoznanie wadliwego transkryptu na rybosomie, dokończenie syntetyzowanego białka i uaktywnienie rybosomów poprzez uwolnienie, a następnie naznaczenie do degradacji wadliwego mRNA i białka.

Przed przyłączeniem do rybosomów uwieczonych przez pozbawiony kodonu stop transkrypt, cząsteczka tmRNA podlega aminoacylacji na 3' końcu przez syntetazę aminoacylo-tRNA, która przyłącza alaninę. Następnie, Ala-tmRNA w połączeniu z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu i GTP wiąże się do rybosomów. W związaniu tmRNA na rybosomie uczestniczy również białko SmpB, które już wcześniej oddziałuje z rybosomami [30, 38, 42]. Białko to ma zdolność wiązania zarówno tmRNA, całych rybosomów, jak i poszczególnych podjednostek rybosomalnych. Wczesny etap tej translacji wymaga obecności 2 cząsteczek SmpB na rybosomie; tylko taki kompleks ma zdolność wiązania tmRNA. W późniejszym etapie białka te ulegają reorganizacji [23, 24, 38]. C-końcowy fragment białka SmpB zawiera wysoce konserwatywne reszty istotne w procesie przeniesienia wadliwego polipeptydu na alanylo-tmRNA i odczytanie sekwencji kodującej tmRNA [71]. Białko to może pełnić rolę stabilizatora kompleksu peptydylotmRNA-SmpB-rybosom, zastępując oddziaływanie struktury kodon-antykodon [38, 57, 71]. W oddziaływaniu tmRNA z rybosomem uczestniczy również rybosomalne białko S1. Z uwagi na to, że S1 ma zdolność rozplatania helis RNA, przypuszcza się, że umożliwia ono związanie tmRNA z rybosomem poprzez rozplecenie helis RNA i wyeksponowanie „odzyskanego” kodonu. Chociaż białko to u większości bakterii ma budowę wysoce zachowawczą, to nie występuje u wszystkich tych bakterii, które zawierają aktywną cząsteczkę tmRNA; nie jest więc niezbędne dla jej aktywności [43, 54, 70].

Translacja uszkodzonego mRNA może przebiegać aż do ostatniego nukleotydu, a sygnałem rozpoznawanym przez tmRNA jest puste miejsce „A” na rybosomie (ryc. 4) [80]. Ponieważ po związaniu tmRNA rybosomy katalizują reakcję przeniesienia niepełnego polipeptydu na alaninę w tmRNA, dojrzałe białko zawsze zawiera niekodowaną alaninę, która rozgranicza peptyd kodowany przez wadliwy mRNA i tmRNA. Przeniesienie tRNA z miejsca P na miejsce E i jego uwolnienie jest skorelowane z oddysocjowaniem wadliwego mRNA, który jest następnie degradowany przez 3'–5' RNAzę R [39, 43, 81]. Domena tRNA z tmRNA jest przenoszona na miejsce P, a miejsce A zajmuje pierwszy kodon otwartej ramki odczytu domeny MLD, na bazie której przebiega następnie synteza białka aż do osiągnięcia kodonu stop [17, 39]. Cały ten proces nazwano trans-translacją.



W naturalnie występujących tmRNA w pozycji 86 zawsze występuje adenina, a w pozycji 90, która stanowi pierwszy nukleotyd kodonu „odzyskanego” – guanina [80]. Kodon odzyskany to w większości przypadków alanina. Zamiana kodonu odzyskanego z GCA (Ala) na inny powoduje jednak przyłączenie innego aminokwasu do uszkodzonego białka, co wskazuje, że nie ma inicjatorowego tRNA, jak ma to miejsce w przypadku rozpoczęcia typowej translacji [80]. Istotną funkcję w rozpoznaniu kodonu odzyskanego pełni sekwencja położona powyżej U(85)A(86)R(87) (gdzie R oznacza purynę), zwłaszcza adenina w pozycji 86. Eksperymentalnie wykazano, że zamiana adeniny w tej pozycji na inną zasadę wpływa na dezaktywację cząsteczki tmRNA [80]. Kiedy zamieniono kodon odzyskany na kodon stop, żaden aminokwas, nawet alanina, nie był dołączony do uszkodzonego peptydu. Gdy natomiast drugi kodon zamieniono na kodon stop, wówczas do białka były dołączone dwa aminokwasy – alanina oraz ten z kodonu odzyskanego. Tym samym wykazano, że takie rozpoznanie odbywa się na bardzo wczesnym etapie trans-translacji, a kodon odzyskany jest odczytywany, zanim zwiąże się z tRNA; może to nawet poprzedzać związanie z rybosomami [18, 37, 80]. Kodon stop występuje w większości tmRNA pojedynczo, czasem jednak występują dwa, a nawet trzy powtórzone po sobie kodony stop [8]. Po rozpoznaniu kodonu stop czynniki uwalniające RF wiążą się do miejsca A, białko oddysocjowuje, a rybosomy powracają do stanu aktywnego. Zawarty w nieprawidłowym białku peptyd, średnio długości 11 aminokwasów, ma C-koniec z przewagą aminokwasów hydrofobowych i aromatycznych. Taka sekwencja rozpoznawana jest jako sygnał kierujący wadliwe białko do degradacji przez cytoplazmatyczne i periplazmatyczne proteazy zależne od ATP [17, 42, 80]. Wykazano, że w przypadku translacji na polisomach aktywacja tmRNA następuje już na pierwszym rybosomie po rozpoznaniu braku kodonu stop [39].

Dotychczas zidentyfikowano około 560 sekwencji tmRNA w około 480 gatunkach bakteryjnych [83]. Nawet tak mała bakteria jak *Mycoplasma genitalium*, która ma mniej niż 500 genów, ma gen *SsrA*, co świadczy o istotnej roli tej cząsteczki. Niekiedy struktura tmRNA powstaje z dwuczęściowego transkryptu, jak u α -proteobakterii *Caulobacter crescentus*. Wynika to stąd, że część transkryptu tmRNA zostaje wycięta, a dwa powstałe fragmenty tworzą strukturę funkcjonalnej cząsteczki tmRNA [45]. tmRNA zidentyfikowano również w organellach komórkowych. Najmniejszy tmRNA występuje w mitochondriach *Reclinomonas americana* i ma długość tylko 189 pz. Zaangażowanie tmRNA w degradację w mitochondriach nie zostało jeszcze potwierdzone doświadczalnie [40]. Z kolei chloroplastowe tmRNA pozbawione są innej niż w mitochondriach części. W tym przypadku brak jest również dowodów na ich zaangażowanie w degradację [21]. Ostatnio doniesiono o zidentyfikowaniu w plastydach dwóch roślin białka SmpB, związanego z aktywnością tmRNA [41]. Cząsteczek tmRNA nie zidentyfikowano do tej pory u archeobakterii ani w genomie jądrowym eukariotów, gdzie wytworzyły się inne mechanizmy degradacji nieprawidłowych mRNA [83].

Zaangażowanie tmRNA w translację wykazano również w innych przypadkach: na przykład gdy rybosomy są uwięzione w wyniku pojawiania się skupień rzadkich kodonów argininowych AGA lub stabilnych struktur drugorzędowych w obrębie sekwencji mRNA [69]. W dwóch przypadkach aktywność tmRNA stwierdzono podczas odczytania kodonu stop w prawidłowych mRNA [68] lub gdy rybosomy, dzięki supresorowym

tRNA, odczytywały mRNA bez zatrzymania na kanonicznym kodonie stop syntetyzując wydłużony peptyd [17, 74].

PODSUMOWANIE

Transkrypty pozbawione kodonu stop lub mające przedwczesny kodon stop mogą prowadzić do syntezy niefunkcjonalnych, w tym również toksycznych białek. Procesy zapobiegające szkodliwym skutkom wynikającym z ich występowania są więc istotne dla właściwego funkcjonowania komórek. Świadczy o tym ich rozpowszechnienie oraz szeroka gama genów, których produkty regulują.

W komórkach eukariotycznych nieprawidłowe transkrypty są degradowane w procesie NMD; jego przebieg jest różny u różnych organizmów. Na przykład, NMD w komórkach ssaków, w odróżnieniu od NMD w komórkach *D. melanogaster*, roślin czy drożdży, zależy od splicingu. Z kolei u *C. elegans* degradacja poprzez NMD rozpoczyna się od endonukleolitycznego przecięcia transkryptu. Ssaki wytworzyły ponadto dodatkową drogę degradacji SMD, a w komórkach drożdży za degradację transkryptów pozbawionych kodonu stop odpowiedzialny jest inny proces. Białka uczestniczące w procesie NMD nie są zachowawcze, część z nich uczestniczy również w innych, istotnych procesach komórkowych. Poznanie roli określonych białek w tych procesach wciąż wymaga dalszych badań.

Komórki prokariotyczne oraz organelle komórkowe znalazły inny sposób na degradację nieprawidłowych transkryptów – cząsteczkę tmRNA. tmRNA naznacza do degradacji zarówno mRNA bez kodonu stop, jak i niewłaściwe białko oraz przywraca aktywność rybosomom.

LITERATURA

- [1] AMRANI N, GANESAN R, KERVESTIN S, MANGUS DA, GHOSH S, JACOBSON A. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 2004; **432**: 112–118.
- [2] ANDERSON JS, PARKER RP. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 1998; **17**: 1497–1506.
- [3] ARCIGA-REYES L, WOOTTON L, KIEFFER M, DAVIES B. UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in *Arabidopsis*. *Plant J* 2006; **47**: 480–489.
- [4] ARRAIANO CM, MAQUAT LE. Post-transcriptional control of gene expression: effectors of mRNA decay. *Mol Microbiol* 2003; **49**: 267–276.
- [5] AZZALIN CM, LINGNER J. The Double Life of UPF1 in RNA and DNA Stability Pathways. *Cell Cycle* 2006b; **5**: 1496–1498.
- [6] AZZALIN CM, LINGNER J. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* 2006a; **16**: 433–439.
- [7] BAKER KE, PARKER R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**: 293–299.
- [8] BURKS J, ZWIEB C, MULLER F, WOWER I, WOWER J. Comparative 3-D modeling of tmRNA. *BMC Mol Biol* 2005; **6**: 14.
- [9] CHIU SY, LEJEUNE F, RANGANATHAN AC, MAQUAT LE. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev* 2004; **18**: 745–754.
- [10] CONTI E, IZAURRALDE E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 316–325.
- [11] CULBERTSON MR, LEEDS PF. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 207–214.

- [12] DOMEIER ME, MORSE DP, KNIGHT SW, PORTEREIKO M, BASS BL, MANGO SE. A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2000; **289**: 1928–1931.
- [13] FRISCHMEYER PA, VAN HOOF A, O'DONNELL K, GUERRERIO AL, PARKER R, DIETZ HC. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 2002; **295**: 2258–2261.
- [14] FUKUHARA N, EBERT J, UNTERHOLZNER L, LINDNER D, IZAURRALDE E, CONTI E. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell* 2005; **17**: 537–547.
- [15] GATFIELD D, IZAURRALDE E. Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 2004; **429**: 575–578.
- [16] GATFIELD D, UNTERHOLZNER L, CICCARELLI FD, BORK P, IZAURRALDE E. Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J* 2003; **22**: 3960–3970.
- [17] GILLET R, FELDEN B. Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue. *Mol Microbiol* 2001a; **42**: 879–885.
- [18] GILLET R, FELDEN B. Transfer RNA(Ala) recognizes transfer-messenger RNA with specificity; a functional complex prior to entering the ribosome? *EMBO J* 2001b; **20**: 2966–2976.
- [19] GONZALEZ CI, BHATTACHARYA A, WANG W, PELTZ SW. Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 2001; **274**: 15–25.
- [20] GONZALEZ CI, RUIZ-ECHEVARRIA MJ, VASUDEVAN S, HENRY MF, PELTZ SW. The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell* 2000; **5**: 489–499.
- [21] GUENEAU DE NOVOA P, WILLIAMS KP. The tmRNA website: reductive evolution of tmRNA in plastids and other endosymbionts. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: D104–108.
- [22] GUTIERREZ RA, MACINTOSH GC, GREEN PJ. Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 429–438.
- [23] HALLIER M, DESREAC J, FELDEN B. Small protein B interacts with the large and the small subunits of a stalled ribosome during trans-translation. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 1935–1943.
- [24] HALLIER M, IVANOVA N, RAMETTI A, PAVLOV M, EHRENBERG M, FELDEN B. Pre-binding of small protein B to a stalled ribosome triggers trans-translation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 25978–25985.
- [25] HE F, LI X, SPATRICK P, CASILLO R, DONG S, JACOBSON A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell* 2003; **12**: 1439–1452.
- [26] HILLEREN P, PARKER R. Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 1999b; **33**: 229–260.
- [27] HILLEREN P, PARKER R. mRNA surveillance in eukaryotes: kinetic proofreading of proper translation termination as assessed by mRNP domain organization? *RNA* 1999a; **5**: 711–719.
- [28] HILLMAN RT, GREEN RE, BRENNER SE. An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol* 2004; **5**: R8.
- [29] HOLBROOK JA, NEU-YILIK G, GEHRING NH, KULOZIK AE, HENTZE MW. Internal ribosome entry sequence-mediated translation initiation triggers nonsense-mediated decay. *EMBO Rep* 2006; **7**: 722–726.
- [30] HONG SJ, TRAN QA, KEILER KC. Cell cycle-regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. *Mol Microbiol* 2005; **57**: 565–575.
- [31] VAN HOOF A, FRISCHMEYER PA, DIETZ HC, PARKER R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 2002; **295**: 2262–2264.
- [32] HORI K, WATANABE Y. UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; **43**: 530–540.
- [33] HOSODA N, KIM YK, LEJEUNE F, MAQUAT LE. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 2005; **12**: 893–901.
- [34] INADA T, AIBA H. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J* 2005; **24**: 1584–1595.
- [35] ISHIGAKI Y, LI X, SERIN G, MAQUAT LE. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 2001; **106**: 607–617.

- [36] ISSHIKI M, YAMAMOTO Y, SATOH H, SHIMAMOTO K. Nonsense-mediated decay of mutant waxy mRNA in rice. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1388–1395.
- [37] IVANOV PV, ZVEREVA MI, SHPANCHENKO OV, DONTSOVA OA, BOGDANOV AA, AGLYAMOVA GV, LIM VI, TERAOKA Y, NIERHAUS KH. How does tmRNA move through the ribosome? *FEBS Lett* 2002; **514**: 55–59.
- [38] IVANOVA N, PAVLOV MY, BOUAKAZ E, EHRENBERG M, SCHIAVONE LH. Mapping the interaction of SmpB with ribosomes by footprinting of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 2005a; **33**: 3529–3539.
- [39] IVANOVA N, PAVLOV MY, EHRENBERG M. tmRNA-induced release of messenger RNA from stalled ribosomes. *J Mol Biol* 2005b; **350**: 897–905.
- [40] JACOB Y, SEIF E, PAQUET PO, LANG BF. Loss of the mRNA-like region in mitochondrial tmRNAs of jakobids. *RNA* 2004; **10**: 605–614.
- [41] JACOB Y, SHARKADY SM, BHARDWAJ K, SANDA A, WILLIAMS KP. Function of the SmpB tail in transfer-messenger RNA translation revealed by a nucleus-encoded form. *J Biol Chem* 2005; **280**: 5503–5509.
- [42] KARZAI AW, ROCHE ED, SAUER RT. The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* 2000; **7**: 449–455.
- [43] KARZAI AW, SAUER RT. Protein factors associated with the SsrA:SmpB tagging and ribosome rescue complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3040–3044.
- [44] KAYGUN H, MARZLUFF WF. Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. *Nat Struct Mol Biol* 2005; **12**: 794–800.
- [45] KEILER KC, SHAPIRO L, WILLIAMS KP. tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: A two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 7778–7783.
- [46] KIM YK, FURIC L, DESGROSEILLERS L, MAQUAT LE. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 2005; **120**: 195–208.
- [47] LEJEUNE F, ISHIGAKI Y, LI X, MAQUAT LE. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J* 2002; **21**: 3536–3545.
- [48] LEJEUNE F, LI X, MAQUAT LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell* 2003; **12**: 675–687.
- [49] LEJEUNE F, MAQUAT LE. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 309–315.
- [50] LEWIS BP, GREEN RE, BRENNER SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 189–192.
- [51] LYKKE-ANDERSEN J. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 8114–8121.
- [52] MANGO SE. Stop making nonSense: the *C. elegans* smg genes. *Trends Genet* 2001; **17**: 646–653.
- [53] MAQUAT LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 2005; **118**: 1773–1776.
- [54] MCGINNESS KE, SAUER RT. Ribosomal protein S1 binds mRNA and tmRNA similarly but plays distinct roles in translation of these molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 13454–13459.
- [55] MEDGHALCHI SM, FRISCHMEYER PA, MENDELL JT, KELLY AG, LAWLER AM, DIETZ HC. Rnt1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 99–105.
- [56] MENDELL JT, SHARIFI NA, MEYERS JL, MARTINEZ-MURILLO F, DIETZ HC. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 2004; **36**: 1073–1078.
- [57] METZINGER L, HALLIER M, FELDEN B. Independent binding sites of small protein B onto transfer-messenger RNA during trans-translation. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 2384–2394.
- [58] MEYER S, TEMME C, WAHLE E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2004; **39**: 197–216.
- [59] MITCHELL P, TOLLERVEY D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell* 2003; **11**: 1405–1413.
- [60] MITROVICH QM, ANDERSON P. mRNA surveillance of expressed pseudogenes in *C. elegans*. *Curr Biol* 2005; **15**: 963–967.
- [61] MORIARTY PM, REDDY CC, MAQUAT LE. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2932–2939.

- [62] MUHLRAD D, PARKER R. Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* 1999; **5**: 1299–1307.
- [63] NOTT A, LE HIR H, MOORE MJ. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* 2004; **18**: 210–222.
- [64] PAN Q, SALTZMAN AL, KIM YK, MISQUITTA C, SHAI O, MAQUAT LE, FREY BJ, BLENCOWE BJ. Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* 2006; **20**: 153–158.
- [65] PARKER R, SONG H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**: 121–127.
- [66] PULAK R, ANDERSON P. mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev* 1993; **7**: 1885–1897.
- [67] REHWINKEL J, LETUNIC I, RAES J, BORK P, IZAURRALDE E. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* 2005; **11**: 1530–1544.
- [68] ROCHE ED, SAUER RT. Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop codons. *J Biol Chem* 2001; **276**: 28509–28515.
- [69] ROCHE ED, SAUER RT. SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J* 1999; **18**: 4579–4589.
- [70] SAGUY M, GILLET R, METZINGER L, FELDEN B. tmRNA and associated ligands: a puzzling relationship. *Biochimie* 2005; **87**: 897–903.
- [71] SUNDERMEIER TR, DULEBOHN DP, CHO HJ, KARZAI AW. A previously uncharacterized role for small protein B (SmpB) in transfer messenger RNA-mediated trans-translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2316–2321.
- [72] TAKAHASHI S, ARAKI Y, SAKUNO T, KATADA T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* 2003; **22**: 3951–3959.
- [73] THARUN S, HE W, MAYES AE, LENNERTZ P, BEGGS JD, PARKER R. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 2000; **404**: 515–518.
- [74] UEDA K, YAMAMOTO Y, OGAWA K, ABO T, INOKUCHI H, AIBA H. Bacterial SsrA system plays a role in coping with unwanted translational readthrough caused by suppressor tRNAs. *Genes Cells* 2002; **7**: 509–519.
- [75] UNTERHOLZNER L, IZAURRALDE E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* 2004; **16**: 587–596.
- [76] WAGNER E, LYKKE-ANDERSEN J. mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3033–3038.
- [77] WANG W, CAJIGAS IJ, PELTZ SW, WILKINSON MF, GONZALEZ CI. Role for Upf2p phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 3390–3400.
- [78] WEISCHENFELDT J, LYKKE-ANDERSEN J, PORSE B. Messenger RNA surveillance: neutralizing natural nonsense. *Curr Biol* 2005; **15**: R559–562.
- [79] WILKINSON MF. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* 2005; **21**: 143–148.
- [80] WILLIAMS KP, MARTINDALE KA, BARTEL DP. Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *EMBO J* 1999; **18**: 5423–5433.
- [81] YAMAMOTO Y, SUNOHARA T, JOJIMA K, INADA T, AIBA H. SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. *RNA* 2003; **9**: 408–418.
- [82] YOINE M, NISHII T, NAKAMURA K. *Arabidopsis* UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth. *Plant Cell Physiol* 2006; **47**: 572–580.
- [83] ZWIEB C, GORODKIN J, KNUDSEN B, BURKS J, WOWER J. tmRDB (tmRNA database). *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 446–447.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 13.12. 2006 r.

Przyjęto: 21.02. 2007 r.

60-371 Poznań, ul. Międzychodzka 5

E-mail: doracz@amu.edu.pl