

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

BAKALÁRSKA PRÁCA

**POLYADENYLÁCIA AKO SÚČASŤ REGULÁCIE
GÉNOVEJ EXPRESIE U VYŠŠÍCH EUKARYOT**

SILVIA MRVOVÁ

ŠKOLITEĽ: RNDr. TOMÁŠ MAŠEK, Ph.D.

2008 / 2009

Abstrakt

Pre-mRNA prechádza zložitou cestou od jej syntézy až po vytvorenie finálneho proteínu. Aby sa z nej stala dobre translatovateľná mRNA, musí byť zostrihaná, mať čapičku na 5'konci a polyadenylovaný 3'koniec.

Polyadenylácia je významný proces, pri ktorom sa na 3'koniec mRNA pridáva približne 200 – 300 adenozinových zvyškov. Na procese sa podieľa veľké množstvo proteínových faktorov, ktoré sa často zúčastňujú aj ostatných úprav pre-mRNA. Dôležitá sekvencia pre polyadenyláciu je AAUAAA, na ktorú sa viaže faktor CPSF. CPSF spolu s CstF naštiepi RNA a môže nastať polyadenylácia sprostredkovaná PAP polymerázou.

Polyadenylácia hrá významnú úlohu pri expote mRNA z jadra do cytoplazmy, pri stabilizácii a degradácii mRNA, má vplyv na efektivitu transkripcie a iniciáciu translácie. Porucha v tvorbe poly(A) konca môže mať negatívne následky na zdravie organizmu.

Okrem jadrovej polyadenylácie poznáme aj polyadenyláciu cytoplazmatickú, ktorá sa odohráva v cytoplazme počas zrania oocytov mechanizmom podobným tej jadrovej.

Špeciálnym typom je alternatívna polyadenylácia, ktorá využíva rôzne polyadenylačné miesta, a vedie tak k rôznym 3'UTR oblastiam transkriptov a v niektorých prípadoch k zmene kódujúcich oblastí protínov.

Kľúčové slová: cytoplazmatická polyadenylácia, alternatívna polyadenylácia, mRNA metabolismus, translácia, stabilita mRNA, transport mRNA

Abstract

Pre-mRNA is modified in several tightly regulated and interconnected steps during a pathway from its synthesis to the formation of final protein. For efficient translation, mRNA has to be spliced, retrieves a m⁷G -cap on its 5'end and poly(A) tail on its 3'end.

Polyadenylation is an important process, in which about 200 – 300 adenosine residues are added to the nascent 3'end of mRNA. There are many protein factors participating in polyadenylation as well as in other pre-mRNA modifications. The key sequence for polyadenylation is AAUAAA, which is recognized by a Cleavage/Polyadenylation factor (CPSF). CPSF cleaves RNA and forms an actual template for polyadenylation in cooperation with Cleavage Specificity factor (CstF).

Polyadenylation plays an important role in mRNA export from nucleus to cytoplasm, in mRNA stabilization and, on the other hand, in mRNA degradation. Last but at least, it influences efficiency of transcription and rate of translation initiation. A defect in poly(A) tail formation can elicit negative consequences on the organism's health.

Apart from nuclear polyadenylation, cytoplasmatic polyadenylation is known as well. It takes place in cytoplasm during maturation of oocytes by mechanism similar to that seen in nucleus.

Finally, an alternative polyadenylation utilizes different polyadenylation sites which lead to the formation of alternative 3'UTRs and in some cases to changes in protein coding sequence.

Key words: cytoplasmatic polyadenylation, alternative polyadenylation, mRNA methabolism, translation, mRNA stability, mRNA transport

Obsah:

1. Úvod	5
2. Proces polyadenylácie	5
2.1 RNA sekvencie špecifikujúce miesto pre polyadenyláciu	5
2.2 Faktory zúčastnené na polyadenylácii	6
2.3 Mechanizmus polyadenylácie	9
3. Cytoplazmatická polyadenylácia	11
4. Špeciálne RNA	13
4.1 Histónová mRNA	13
4.2 Malé jadrové RNA	15
5. Úloha polyadenylácie v bunke	15
5.1 Stabilizácia 3' konca, ochrana mRNA proti degradácii	15
5.2 Transport mRNA z jadra do cytoplazmy	17
5.3 Vplyv na transláciu	18
5.4 Regulácia génovej expresie	21
6. Regulácia tvorby poly(A) konca	22
7. Defekty vo formovaní poly(A) konca a ich vplyv na zdravie jedinca	23
8. Polyadenylácia u nižších eukaryot	24
9. Záver	26
10. Zoznam použitej literatúry	27

1. Úvod

Jedným z najdôležitejších krokov v génovej expresii po transkripcii sú úpravy mRNA, medzi ktoré patrí pridanie cap (čapičky) na 5' koniec mRNA a vytvorenie poly(A) reťazca na 3' konci. Práve vytvorenie poly(A) konca je významné pre ukončenie transkripcie, pre stabilitu mRNA a pre transport mRNA z jadra.

Defekt v tvorbe poly(A) konca má dôsledok na životaschopnosť bunky, jej rast a vývoj. Formovanie 3' konca mRNA je kľúčovým regulačným krokom génovej expresie a jeho nefunkčnosť alebo porucha funkcie vedú k závažným problémom. U človeka je to napríklad thalasémia (Higgs *et al.*, 1983) alebo amyotrofická laterálna skleróza (Lin *et al.*, 1998).

Posledné roky priniesli mnoho poznatkov ohľadom mechanizmu tvorby poly(A) konca, jeho regulácie a interakcie s inými procesmi v bunke. Boli tiež identifikované nové sekvencie – polyadenylačné signály a zúčastnené proteíny.

Vo svojej práci sa zameriavam na polyadenyláciu u vyšších eukaryot a jej zapojenie do regulácie génovej expresie, s dôrazom na bunky cicavcov, okrajovo, pre porovnanie, spomeniem aj mechanizmus u nižších eukaryot, konkrétne kvasiniek.

2. Proces polyadenylácie

2.1 RNA sekvencie špecifikujúce miesto pre polyadenyláciu

U buniek cicavcov sú typické tri elementy definujúce jadro polyadenylačného signálu, a to AAUAAA motív, U-bohatá (USE – upstream specificity element), U/GU-bohatá (DSE – downstream specificity element) oblasť a samotné polyadenylačné miesto.

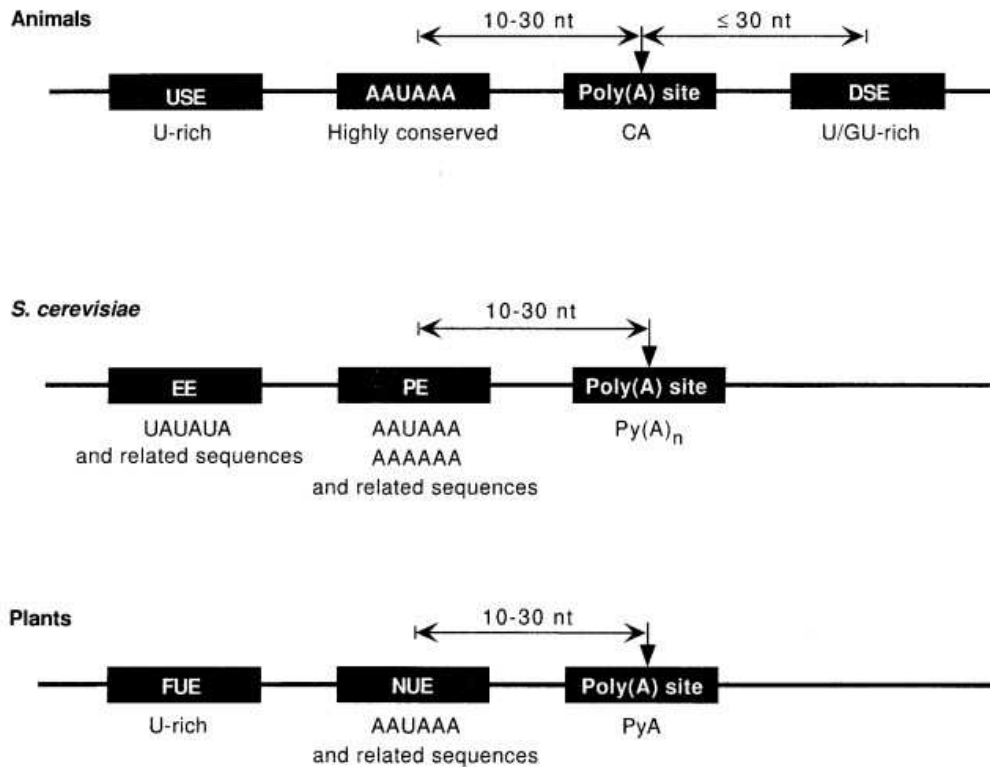
AAUAAA motív je jeden z najkonzervovanejších elementov všeobecne (Proudfoot, 1991), nachádza sa 10 až 30 nukleotidov proti smeru transkripcie (upstream) od polyadenylačného miesta. Najčastejšie vyskytujúca sa varianta je AUUAAA, jej aktivita je porovnateľná so sekvenciou pôvodnou. Rôzne varianty, ako aj úplná absencia tohto motívu, hrá úlohu v alternatívnej polyadenylácii (Challoner *et al.*, 1989).

Elementy po smeru transkripcie (downstream) od polyadenylačného miesta sú už menej konzervované, rozlišujú sa dva hlavné typy – U-bohaté oblasti a GU-bohaté oblasti. Polyadenylačný signál môže obsahovať iba jednu z oblastí, ale i obe, ktoré pracujú synergisticky (Gil, Proudfoot, 1987).

Selekcia polyadenylačného miesta je daná hlavne vzdialenosťou medzi AAUAAA sekvenciou a elementmi downstream (Chen *et al.*, 1995). Sekvencie okolo poly(A) miesta síce

nie sú konzervované, ale u 70% mRNA stavovcov sa v okolí nachádza adenozin (Sheets *et al.*, 1990).

U rastlín je známa potreba troch miest – blízky upstream element NUE (near-upstream element), vzdialený upstream element FUE (far-upstream element) a samotné polyadenylačné miesto (Rothnie, 1996).



Obr. 1: Schematické znázornenie polyadenylačných miest (Rothnie, 1996).

2.2 Faktory zúčastnené na polyadenylácii

Pred samotnou polyadenyláciou prebieha štiepenie, pre ktoré sú dôležité faktory CPSF (cleavage/polyadenylation specificity factor), CstF (cleavage-stimulatory factor), faktory CF I_m a CF II_m (cleavage factors), RNA polymeráza II a PAP (poly(A) polymeráza). Aj keď pre samotný proces polyadenylácie stačí hydrolyzovať jednu fosfodiesterovú väzbu, zúčastnený komplex je enormnej veľkosti (Proudfoot, 2004). Naznačuje to jeho regulačnú funkciu na iných bunčných pochodoch ako je zostrih, pridávanie čapičky, transport (Calvo, Manley, 2003).

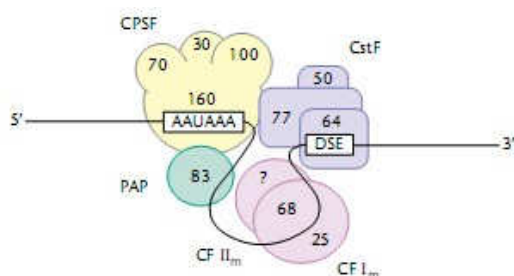
Štiepenie a polyadenylácia vyžadujú faktor CPSF, ktorý sa viaže na sekvenciu AAUAAA nezávisle na sekundárnej štruktúre. Tento faktor sa skladá zo štyroch podjednotiek – CPSF-160, CPSF-100, CPSF-73 a CPSF-30 (Bienroth *et al.*, 1991). Je známe, že transkripcia

a polyadenylácia sú úzko prepojené, dokazuje to aj fakt, že mnoho CPSF býva asociovaných s transkripčným faktorom TFIID. Podjednotka CPSF-160 sa viaže na AAUAAA a interaguje s PAP a Cstf-77, a tým formuje stabilné komplexy na prekurzoroch mRNA (Keller, Minvielle-Sebastia, 1997). CPSF-73 je zodpovedný za štiepenie pred polyadenyláciou (Dominski *et al.*, 2005). CPSF-30 viaže RNA polyméry s poly(U) oblasťami, kooperuje s CPSF-160 pri rozpoznaní RNA substrátov a pomocou interakcie s PAB II stabilizuje polyadenylačný komplex (Chen *et al.*, 1999).

CstF je nutný pre štiepenie, nie však pre polyadenyláciu. Skladá sa z troch polypeptidov s hmotnosťou 77, 64 a 50 kDa (Gilmartin, Nevins, 1991). CstF-77 priamo interaguje s CPSF-160, čím podporuje vzájomnú stabilizáciu komplexu CPSF-CstF-RNA, a premostňuje zvyšné dve podjednotky (Takagaki, Manley, 1994). CstF-64 obsahuje RNA-viažúcu doménu (N-terminálnu) a viaže sa k U-bohatým a GU-bohatým downstream elementom (DSE). CstF-50 obsahuje motív, ktorý môže sprostredkovať proteín-proteín interakciu (Takagaki *et al.*; 1992).

Faktory CF I_m a CF II_m sú taktiež vyžadované len pre štiepenie. CF I_m sa skladá zo štyroch polypeptidov o hmotnosti 25, 59, 68 a 72 kDa (Rüegsegger *et al.*, 1998). Podjednotky CF I_m-68 a CF I_m-25 viažu RNA. CF I_m tiež stabilizuje komplex CPSF-RNA, čo umožňuje pritiahnutie ďalších faktorov (Rüegsegger *et al.*, 1996). O CF II_m je toho zatiaľ stále málo známeho.

RNA polymeráza II je dôležitá hlavne kvôli svojej CTD doméne, ktorá z nej robí ďalší štiepiaci faktor. Ukázalo sa, že významnú úlohu pri pridávaní čapčky, zostrihu a polyadenylácii hrá práve táto C-koncová doména. Skladá sa z heptapeptidových sekvencií a jej úlohou je vratná fosforylácia serínov. Zvyčajne je pre štiepenie dôležitá prítomnosť ATP, ktorý sa následne obnovuje cez kreatínfosfát. Bolo však dokázané, že prítomnosť CTD samotného bez ATP a kreatínfosfátu (CP) vedie k štiepeniu (Hirose, Manley, 1998). CSPF a CTD nahradzujú CP v štiepiacej reakcii. Interakcia CTD s CPSF a CstF môže prípadne stabilizovať štiepiaci komplex.



Obr. 2: Model štiepiaceho komplexu (Wahle, Kühn, 1997).

Pre samotnú tvorbu poly(A) konca je dôležitá prítomnosť poly(A) polymerázy. Pre jej úspešnú lokalizáciu do jadra sú nutné NLS-1 a NLS-2 jadrové lokalizačné signály (Dingwall, Laskey, 1991). Obsahuje aj oblasť interagujúcu s CPSF-160, ktorá priťahuje polymerázu do komplexu. Približne dve tretiny štruktúry PAP (v N-terminálnej oblasti) sú konzervované v eukaryotách, táto časť obsahuje katalytickú doménu homológnu rodine nukleotidyltransferáz (do ktorej patria mnohé DNA a RNA polymerázy). V katalytickom jadre sa nachádza triáda aspartátových zvyškov, ktoré sú esenciálne pre jej aktivitu (Martin, Keller, 1996). V C-terminálnej oblasti sa nachádza oblasť bohatá na serín a threonín, ktorých viacnásobná fosforylácia reguluje aktivitu PAP (Colgan *et al.*, 1996). Posledných 20 aminokyselín sa podieľa na prepojení zostrihu (splicing) a polyadenylácii a na autoregulácii U1A transkriptov (viď. kapitola 4.2) (Gunderson *et al.*, 1994).

Fosforylácia PAP v určitej časti bunečného cyklu vedie k jej inaktivácii (Mizrahi, Moore, 2000) a je tiež dôležitá pre interakciu umožňujúcu lokalizáciu PAP do cytoplazmy (Kim *et al.*, 2003), nevie sa však, či sa tento mechanizmus zúčastňuje regulácie polyadenylácie *in vivo*.

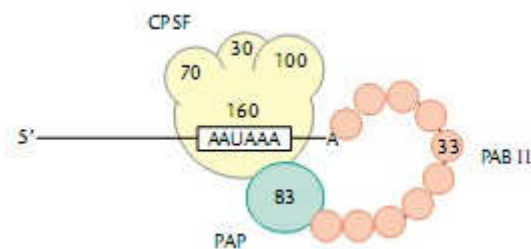
V ľudských mitochondriách boli objavené enzýmy hmtPAP (human mitochondrial poly(A)-specific polymerase zodpovedná za polyadenyláciu) a hmtPNPáza (human mitochondrial polynucleotide phosphorylase zodpovedná za deadenyláciu). Úloha polyadenylácie v mitochondriách nie je ešte úplne známa, predpokladá sa však, že nemá vplyv na stabilitu mRNA. PNPázy boli objavené v medzimembránovom priestore, kde nedochádza k styku s transkriptami, čo môže naznačovať prípadnú funkciu v metabolizme mitochondriálnej mRNA a zároveň aj v udržovaní mitochondriálnej homeostázy (Chen *et al.*, 2007).

Na poly(A) koniec sa viažu proteíny označované ako PABP (poly(A)-binding proteins). Je to skupina proteínov bez katalytickej aktivity prítomná len u eukaryot. U jednobunkových eukaryot je PABP kódovaný jedným génom, u človeka existuje päť génov pre PABP (jeden jadrový, štyri cytoplazmatické) a u *Arabidopsis* osem. V bunke zastávajú mnoho funkcií. Jadrové PABP proteíny slúžia ako faktory zúčastňujúce sa na polyadenylácii – určujú jej dĺžku naviazaním sa na RNA. Svoju úlohu hrajú aj v transporte mRNA z jadra do cytoplazmy. Uľahčujú vytvorenie uzavretej slučky mRNP partikulí, ktorá je dôležitá pre transláciu. Medzi ďalšie nemenej významné funkcie patrí recyklácia ribozómov a udržovanie stability mRNA.

CPSF a PAP sú dostačujúce pre priebeh polyadenylácie, pre jej rýchly postup a kontrolu dĺžky je však potrebný aj dodatočný faktor poly(A)-väzbový proteín II. (Bienroth *et al.*,

1993). 33kDa vážiaci PAB II obsahuje veľmi kyslú N-terminálnu doménu a veľmi bázickú C-terminálnu doménu, uprostred je RNP doména. Tento proteín sa viaže hlavne k poly(A) a poly(G) úsekom a tvorí oligoméry (Nemeth *et al.*, 1995). Pripája sa k CPSF-30 (Chen *et al.*, 1999).

Ako scaffold proteín slúži symplekín, ktorý sa vyskytuje v jadrových komplexoch obsahujúcich CPSF a iné faktory. V bunkách stavovcov je lokalizovaný hlavne v jadre, ale v epiteliálnych bunkách sa môže vyskytovať aj na tesných spojoch (Hofmann *et al.*, 2002). Zúčastňuje sa taktiež polyadenylačnej mašínérie u buniek cicavcov a formovania 3'konca histónovej mRNA (Kolev, Steitz, 2005).



Obr. 3: Model polyadenylačného komplexu (Wahle, Kühn, 1997).

2. 3 Mechanizmus polyadenylácie

CstF a CPSF cestujú na konci RNA polymerázy až sú dopravené k polyadenylačnému miestu na RNA molekule. Podjednotky CPSF sú asociované s transkripčným faktorom TFIID (zúčastňuje sa iniciácie transkripcie). Práve počas iniciácie sa z TFIID oddelia a pridajú sa ku koncu RNA polymerázy.

Prvým krokom je väzba CPSF k AAUAAA prostredníctvom CPSF-160 podjednotky za pomoci CPSF-30 a pravdepodobne aj CPSF-100. CstF faktor sa viaže downstream od miesta štiepenia na DSE cez podjednotku CstF-64. Jednotlivé interakcie medzi CPSF a CstF sú obecné slabé, ale sú stabilizované hlavne interakciou medzi CPSF-160 a CstF-77 (Hirose, Manley, 1998). Interakcie CPSF s CstF určujú oblasť, kde leží miesto štiepenia. Rozpoznanie polyadenylačného signálu pomocou CPSF a CstF je asistované faktorom CF I_m. K vytvoreniu úplného štiepiaceho komplexu je potrebné pripojenie CF II_m a PAP, ktorá interaguje s CPSF-160.

Najskôr je RNA štiepené (rozštiepením vnútornej fosfodiesterovej väzby) v spolupráci so štiepiacimi faktormi. CPSF-160 priťahuje PAP na substrát. PAP pridáva približne 200 A nukleotidov na 3'koniec vytvorený štiepením. Prekurzorom je ATP, pridáva sa rovnakým

typom väzby (v smere od 5' k 3') ako u klasickej syntézy RNA. Na rozdiel od klasickej RNA polymerázy, PAP polymeráza nevyžaduje templát pre pridávanie adenozínu, pretože poly(A) koniec je nie kódovaný v genome.

Počas syntézy poly(A) sa ku koncu pridávajú polyA-viažúce proteíny a zatiaľ neznámym mechanizmom tak určujú konečnú dĺžku poly(A) konca. PAB II sa naviaže na pár adenozínových zvyškov (minimálne 11-12 adenozínových zbytkov), ktoré tam poly(A) polymeráza pridala distributívnou syntézou (prisyntetizuje kúsok, odpadne, znova sa naviaže a opäť sa to opakuje), PAP sa touto stimuláciou PAB II (spolu s CPSF) prepne na kontinuálnu (procesívnu) syntézu, pričom PAB II na seba viaže adenozíny a dodáva ich PAP. Preto je pridávanie adenozínových zvyškov spočiatku pomalé, až kým sa pripojí 11 nukleotidov a vytvorí sa väzbové miesto pre PAB II. Keď poly(A) koniec dosiahne dĺžku 250 adenozínov, polyadenylácia sa spomalí až zastaví za účasti PAB II proteínu (Wahle, 1995). Samotná poly(A) polymeráza je schopná syntetizovať veľmi dlhé poly(A) reťazce, fyzická prítomnosť PAB II jej v tom však bráni a dovoľuje ich nasyntetizovať len do fyziologickej dĺžky cca 250 adenozínov. Jeden PAB II sa viaže jedenkrát za približne 15-20 adenozínových zvyškov. Po nasyntetizovaní správnej dĺžky poly(A) konca sa polymeráza prepne naspäť na distributívnu syntézu.

Poly(A)-viažúce proteíny zostanú naviazané aj po syntéze poly(A) konca počas cesty mRNA z jadra do cytoplazmy a neskôr sa zúčastňujú na syntéze proteínu na ribozóme.

Zaujímavosťou je, že po rozštípení 3'konca, RNA polymeráza pokračuje v transkripcii (v niektorých prípadoch až stovky nukleotidov za miestom štiepenia). Až časom sa zastaví a kúsok RNA downstream od miesta štiepenia je degradovaná v jadre. Predpokladá sa, že prenos faktorov z RNA polymerázy na RNA spôsobí konformačnú zmenu, ktorá následne uvoľní polymerázu od substrátu; svoju úlohu tu hrajú aj terminátory transkripcie.

Formovanie 3'konca mRNA a faktory na ňom zúčastnené ovplyvňujú aj iné procesy. CPSF sa stabilne asociuje s faktorom TFIID, ktorý zostavuje preiniciačný komplex na promotore (Dantonel *et al.*, 1997). TFIID priťahuje CPSF k promotoru a počas iniciácie transkripcie je CPSF premiestnený na RNA polymerázu II. Terminácia transkripcie nastáva za polyadenylačným miestom, aby vznikol funkčný transkript a zároveň sa obmedzilo vzniku zbytočne dlhých transkriptov. Vďaka CTD doméne RNA polymerázy II kinázy a fosfatázy hrajú významnú úlohu v regulácii senzitivity polymerázy k danému terminačnému miestu (Hirose, Manley, 1998). Dôležité je aj zastavenie polymerázy za polyadenylačným miestom a prípadne následné uvoľnenie polymerázy od templátu, čo je spôsobené terminačnými faktormi.

Je tiež známe, že transkripcia ovplyvňuje polyadenyláciu (McCracken, 1997). Predpokladalo sa, že vplyv na to má CTD doména RNA polymerázy; dnes sa však prikláňa k názoru, že za to môže skôr RNA, ktorá prinesie faktory štiepenia CPSF a CstF, a tým pomáha zostaveniu štiepiaceho komplexu.

Faktory zostrihu (splicing) môžu polyadenyláciu stimulovať alebo inhibovať. Aktivácia polyadenylácie prebieha cez posledný terminálny exón, ktorý začína 3'zostrihovým miestom a končí poly(A) miestom. Tento exón spojuje zostrihové a polyadenylačné faktory. Zahrňuje to účasť faktorov ako U2AF rozoznávajúcich 3'zostrihové miesto. Bola však dokázaná aj prítomnosť U1 snRNP, ktoré rozoznávajú 5'zostrihové miesto (Berget, 1995). U1 snRNP však väčšinou spôsobuje inhibíciu naviazaním upstream od polyadenylačného miesta. Inhibícia môže tiež nastať naviazaním zostrihových faktorov downstream od polyadenylačného miesta. Oba prípady sa však vyskytujú najmä u transkriptov vírusov. U cicavcov nastáva inhibícia pomocou dvoch U1A proteínov, ktoré blokujú poly(A) polymerázu (Gunderson *et al.*, 1994).

3. Cytoplazmatická polyadenylácia

Mnoho modifikácií mRNA prebieha väčšinou v jadre – napríklad zostrih, pridanie čapíčky, štiepenie pred polyadenyláciou. Polyadenylácia sa však môže vyskytnúť aj mimo jadra – v cytoplazme.

Počas ranného vývoja mnohých živočíšnych druhov je pridanie poly(A) konca prebiehajúce v cytoplazme významným kontrolným mechanizmom translácie špecifických materských mRNA. Niektoré sa pridaním poly(A) konca stanú aktívne, niektoré naopak poly(A) koniec stratia a stanú sa translačne menej aktívne.

Typickým príkladom cytoplazmatickej polyadenylácie sú zrejúce oocyty, v ktorých je potlačená degradácia mRNA a bunka si tak vytvorí obrovské zásoby mRNA a znova vstúpi do meiotického delenia v príprave na oplodnenie. Počas zrania sa degraduje obal bunkového jadra, takže cytoplazmatický a jadrový materiál sa mieša. Polyadenylácia počas zrania vyžaduje dve sekvencie: klasický AAUAAA motív a blízku U-bohatú oblasť (Paris, Richter, 1990). Keďže U-bohatú oblasť a AAUAAA je možné nájsť prakticky na každej mRNA, za špecifitu je zodpovedný element CPE (cytoplasmatic polyadenylation element).

Mnohé mRNA sú skladované iba s 10 až 30 adenzínmi na konci ako translačne neaktívne. Keď sú v nejakej časti vývoja potrebné proteíny kódované týmito mRNA, k týmto 10 - 30 adenzínom sa pridajú ďalšie, čo stimuluje iniciáciu translácie. Stále je však otázne, či

samotné pridanie adenzínov je dostatočné pre spustenie translácie a nie je úplne známe, ako môže rozdiel v dĺžke poly(A) konca spôsobiť také dramatické zmeny v translačnej aktivite, pravdepodobne je potrebná účasť ďalších sekvenčných elementov.

Jadrová polyadenylácia prebieha konštitutívne a pridáva cca 200-300 adenzínov ku skoro každej mRNA; zatiaľ čo cytoplazmatická polyadenylácia je striktné regulovaná, nepridáva sa konštantný počet adenzínov, ale každá mRNA získava poly(A) koniec rôznej dĺžky, a to v rozličný čas počas vývoja. Pred jadrovou polyadenyláciou prebieha endonukleotické štiepenie, pred cytoplazmatickou nie.

Niektoré mRNA, ktoré už podstúpili polyadenyláciu v jadre, môžu byť polyadenylované aj v cytoplazme. Po opustení jadra sú skrátené, takže substráty pre cytoplazmatickú polyadenyláciu už obsahujú krátky poly(A) koniec, na ktorý cytoplazmatické faktory pridávajú ďalšie adenzíny.

Pre tento typ polyadenylácie je dôležitá prítomnosť CPSF a PAP, podobne ako jadrová, ale vyžaduje aj prítomnosť CPE. CPSF sa, podobne ako u jadrovej polyadenylácie, podieľa na sekvenčnej špecifite polyadenylácie a jeho aktivita počas ranného vývoja vedie k aktivácii cytoplazmatickej polyadenylácie.

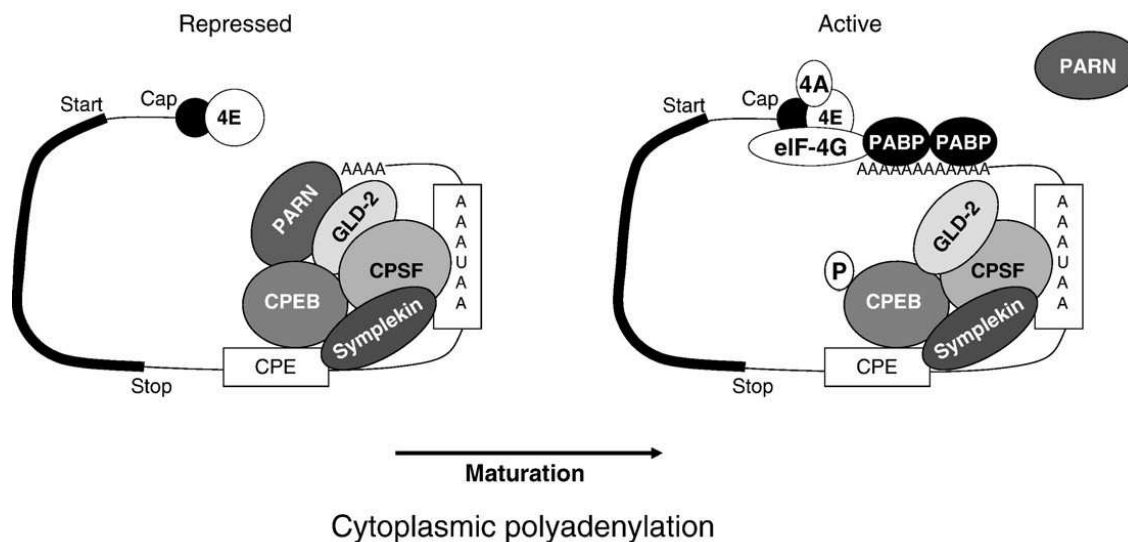
Ukázalo sa, že CPE je významný faktor deadenylácie v cytoplazme oocytov kvôli uchovaniu mRNA do meiotického delenia.

Prítomný je aj faktor zodpovedný za špecifitu mRNA (CPEB) a deadenyláza (PARN – poly(A) špecifická ribonukleáza). Ukázalo sa, že CPEB indukovaná polyadenylácia a následná translácia sa objavujú nielen počas zrania oocytu, ale aj počas vývoja embrya a jeho bunecného cyklu (Groisman *et al.*, 2002) a počas stimulácie neuronálnych synapsí (Du, Richter, 2005).

Fosforylácia CPEB stimuluje cytoplazmatickú polyadenyláciu tým, že po svojom naviazaní na špecifickú sekvenciu pritiahne polymerázu k tejto RNA (Groisman *et al.*, 2002).

Okrem iných vstupujú do hry aj symplekín zúčastnený na polyadenylácii, a Gld2, ktorý predstavuje netypickú cytoplazmatickú poly(A) polymerázu z rodiny DNA nukleotidyltransferáz (Kwak *et al.*, 2004).

Cytoplazmatická polyadenylácia hrá úlohu v bunkovom cykle, v starnutí bunky a vo vytváraní pamäti cestou synaptickej plasticity (Richter, 2000).



Obr. 4: Aktivácia cytoplazmatickej polyadenylácie. V nezralých oocytoch sú už pripravené všetky faktory vrátane deadenylázy PARN. Počas zrania dochádza k fosforylácii CPEB, preusporiadaniu komplexu, odpojeniu deadenylázy a môže začať polyadenylácia – poly(A) polymerázou Gld-2 (Radford *et al.*, 2008).

4 Špeciálne RNA

4.1 Histónová mRNA

Históny sú malé bázičné proteíny, ktoré pomáhajú baleniu DNA do chromozómov. Na rozdiel od ostatných mRNA v bunke, prekursori histónovej mRNA väčšinou neobsahujú intróny a väčšina mRNA nie je polyadenylovaná u vyšších eukaryot. U stavovcov však boli objavené aj histónové mRNA polyadenylované (Schumperli, 1988).

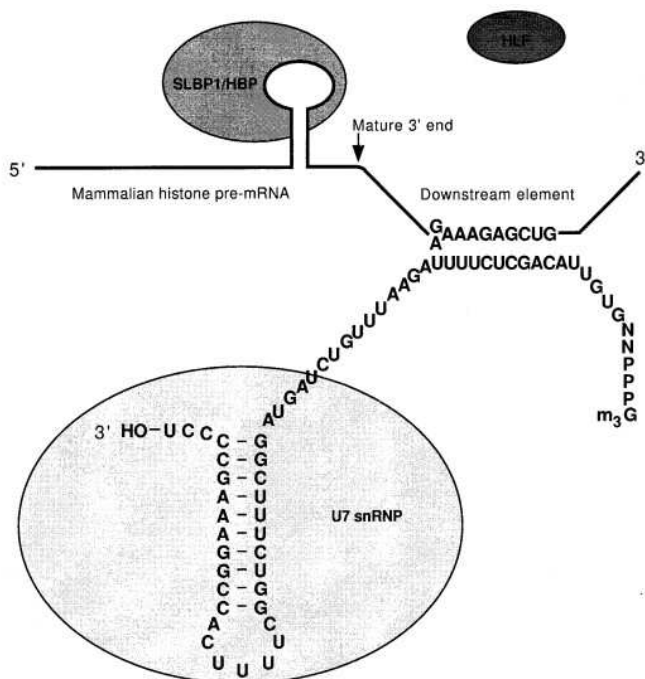
Nepolyadenylované históny majú gény usporiadané v zhlukoch, sú to replikačne-závislé históny syntetizované v S fáze bunkového cyklu. Malá časť mRNA je polyadenylovaná, môžu sa vyskytovať intróny a gény nie sú usporiadané v zhlukoch, jedná sa o replikačne-nezávislé históny. Táto skupina obsahuje rôzne históny dôležité pre remodeláciu a opravu chromatinu (Ausio, 2006).

3' koniec histónovej mRNA je formovaný endonukleotickým štiepením prekursoru. RNA element pozostáva z dvoch častí. Prvou je 6 párov báz dlhá stem-loop (vlásenková) štruktúra (RNA sa obráti naspäť a vytvorí krátky double helix) a štvornukleotidová slučka. Druhou časťou je sekvencia približne desiatich nukleotidov bohatá na puríny. Endonukleotické štiepenie prebieha medzi týmito časťami, približne po štvrtom alebo piatom nukleotide, čo je väčšinou adenosín.

Množstvo je regulované v priebehu bunecného cyklu, najviac je v S fáze, čo sa pripisuje zvýšeniu translácie a stability. Túto stabilitu ovplyvňuje vlásenková štruktúra a štvornukleotidová slučka spolu s enzýmom SLBP (stem-loop binding protein). Časovanie translácie histónovej mRNA je unikátne spojené so syntézou DNA a chromatínu, preto prebieha iba v S fáze, ovplyvňuje to zmena množstva práve SLBP enzýmu.

Na tvorbe maturovaného konca sa zúčastňujú malé jadrové ribonukleoproteínové partikule U7 snRNP, ktoré sa viažu na purín bohatú oblasť a predstavujú tak orientačný bod pre miesto štiepenia, ďalej v teple labilný faktor (zaručujúci tvorbu histónov hlavne v S fáze, pretože je ľahko inaktivovateľný teplom) a proteín viažúci sa k vlásenkovej štruktúre na 3'konci, o ktorom sa predpokladá, že sa zúčastňuje štiepenia, ale jeho prítomnosť nemusí byť nutná.

Samotné štiepenie má na starosti faktor CPSF-73, ktorý sa podieľa aj na štiepení pri polyadenylácii. Ďalším spoločným proteínom je symplekín, ktorý tvorí proteínové lešenie polyadenylácie.



Obr. 5: Model komplexu zúčastneného na štiepení histónovej mRNA (Mowry, Steitz, 1988).

Predpokladá sa, že vlásenková štruktúra a na nej naviazaný enzým SLBP sa podieľajú na mnohých bunkových procesoch, ako je export z jadra, translácia a degradácia histónov.

V súčasnosti sa vie, že polyadenylovaná je histónová mRNA u nižších eukaryot. Predpokladá sa, že táto polyadenylácia je evolučne veľmi stará a môže siahať až do odvetvovania eukaryotického fylogenetického stromu.

4.2 Malé jadrové RNA

SnRNA gény majú definované konce transkripcie a nepotrebuju poly(A) konce. Štiepenie nastáva krátko za maturovaným 3'koncom, ktorý je naďalej upravovaný postupným orezávaním exozómom (3'exonukleázová aktivita). Kotranskripčne je pridávaná 5'čapička.

Na CPSF sa môže viazať U1 snRNP (jej časť U1A), konkrétne na CPSF-160 podjednotku, čo stabilizuje väzbu CPSF k AAUAAA a zvyšuje účinnosť procesu (Lutz *et al.*, 1996). U1A taktiež interaguje s poly(A)polymerázou, čím ju inhibuje (Gunderson *et al.*, 1998).

Zaujímavosťou je, že proteín U1A, súčasť U1 snRNP, ktorý rozpoznáva počas zostrihu 5'zostrihové miesto (Tang, Rosbash, 1996), sa zúčastňuje aj autoregulácie samého seba tým, že reguluje polyadenyláciu svojej pre-mRNA (Boelens *et al.*, 1993). V prípade nadbytku alebo v prípade, že nie je potreba U1A, inhibuje poly(A) polymerázu naviazaním dvoch svojich molekúl na pre-mRNA (Gunderson *et al.*, 1994).

5. Úloha polyadenylácie v bunke

5.1 Stabilizácia 3'konca, ochrana mRNA proti degradácii

Väčšina mRNA molekúl v bakteriálnej bunke má polčas života okolo 3 minút, čo umožňuje baktérii rýchle prispôbenie sa podmienkam prostredia. V eukaryotických bunkách je mRNA omnoho stabilnejšia, niektoré mRNA vydržia viac ako 10 hodín. Väčšina má však polčas života okolo 30 minút. Medzi molekuly s krátkym polčasom života patria transkripty kódujúce faktory zúčastňujúce sa bunkového cyklu, regulačné proteíny, protoonkogény, cytokíny a pod. Naopak mRNA s dlhým polčasom života kódujú proteíny, ktoré sú produkované vo veľkom množstve konečne diferenciovanými bunkami (Russell *et al.*, 1997). Jedná sa napríklad o mRNA kódujúce globíny, kolagény, imunoglobulíny a iné.

Významnou úlohou polyadenylácie je stabilizácia 3'konca pred prítomnými exonukleázami, ktoré by inak na mRNA hneď zaútočili. Dĺžka poly(A) konca teda určuje aj polčas života mRNA, čím je dlhší, tým je mRNA stabilnejšia a viac chránená pred degradáciou.

Existujú dve hlavné cesty degradácie mRNA. Najbežnejšie je postupné skracovanie poly(A) konca v cytosole. Keď sa docieli kritickej dĺžky (zvyčajne 30 zostávajúcich adenozinov), odbúrava sa čapička na 5'konci a mRNA je rýchlo degradovaná. V tejto kritickej dĺžke sa odpútajú molekuly PABP proteínu, ktorý stabilizoval koniec, a teda môže dôjsť k odbúraniu. Mnohé mRNA nesú na 3'UTR sekvencie viažúce faktory urýchľujúce

alebo spomaľujúce degradáciu, napríklad opakované sekvencie AU (AU-rich element) znamenajú rýchlejšiu degradáciu. Stabilné mRNA naopak majú v 3'UTR polypyrimidínový C-bohatý motív, na ktorý sa viaže rodina poly(C)-viažúcich proteínov (Makeyev, Liebhaber, 2002). Naviazanie poly(C)-špecifického proteínu o hmotnosti 40 kDa vedie k významnej stabilizácii poly(A) konca. Mutácia v tomto proteíne vedie k rýchlemu skracovaniu poly(A) reťazca a následne k rýchlej degradácii mRNA (Holcik, Liebhaber, 1997).

Druhá cesta degradácie spočíva v jednom kroku, kedy špecifická endonukleáza jednoducho odštiepi celý poly(A) koniec od zvyšku mRNA, ktorá je potom degradovaná. Opäť to závisí na sekvenciách v 3'UTR oblasti. Prístup k miestam citlivým na štiepenie endonukleázami je kontrolovaný sekvenčne-špecifickými RNA-viažúcimi proteínmi, ktorých množstvo a schopnosť väzby závisí na stimuloch z prostredia. Tento typ degradácie sa využíva napríklad pri železom-regulovanom odbúravaní transferínového receptora (Rouault, Klausner, 1997).

Špecifickým typom degradácie mRNA je degradácia v smere 3' – 5', na ktorej sa podieľajú exozómy. Tento exozóm obsahuje okolo 10 proteínov, medzi nimi napríklad rôzne helikázy a RNázy (Houseley *et al.*, 2006). Produktom exozómov sú zvyšky mRNA s čapičkou na 5' konci, ktorá je neskôr odbúravaná nukleázami.

Vyskytuje sa aj NMD degradácia (nonsense-mediated decay) využívaná na selektívnu degradáciu transkriptov obsahujúcich predčasné terminačné kodóny, zabraňuje sa tak vzniku nesprávnych proteínov. Za tento typ degradácie sú zodpovedné „exon-junction“ komplexy (EJC), ktoré sa vyskytujú na pre-mRNA počas splincingu. Keď je terminálny kodón na alebo v blízkosti koncového exónu, tak je EJC odstránený ribozómom (rozpoznáva CBC – cap binding complex) počas prvého kola translácie. Ak je terminačný kodón viac ako 50 nukleotidov upstream od finálneho exónu, je táto mRNA rozoznávaná ako chybná a začína jej degradácia (Nagy, Maquat, 1998).

Okrem toho existuje aj non-stop decay (NSD), ktorá degraduje mRNA bez stop kodónu, a u kvasiniek nedávno objavená no-go decay degradácia odstraňujúca mRNA, na ktorej je pozastavený pohyb ribozómu, či už z dôvodu prítomnosti sekundárnych štruktúr na transkripte alebo prostým zastavením alebo spomalením elongácie (Doma, Parker, 2006).

Zaujímavosťou je, že u niektorých typoch RNA – tRNA, rRNA a snRNA, vedie pridanie poly(A) konca pomocou TRAMP (TNFR-associated membrane proteín) a prítomnosť poly(A)-polymerázového komplexu k rýchlej degradácii takýchto RNA (Anderson, 2005).

Podľa dĺžky poly(A) konca sa dá usudzovať aj na „vek“ mRNA, novovzniknuté mRNA majú dlhší koniec na rozdiel od starších mRNA, ktoré už majú odštiepenú časť adenozinov.

Vzhľadom na to, že u baktérii poly(A) koniec pomáha exoribonukleázam v degradácii, zatiaľ čo u eukaryot v stabilizácii mRNA, predpokladá sa, že poly(A) koniec začal byť vyžadovaný, až keď sa eukaryota odvetvili (Lundberg, von Gabain, 2001).

5.2 Transport mRNA z jadra do cytoplazmy

U eukaryotických buniek iba malá časť z celkových vytvorených pre-mRNA molekúl, tzv. maturovaná mRNA, sa v bunke ďalej využíva. Zvyšok – intróny, zlomené alebo chybné RNA, nesprávne zostrihnuté RNA – je nepotrebný a zpravidla rýchlo degradovaný. Spôsob, akým bunka rozpoznáva, ktoré mRNA môže použiť, je transport správnych mRNA z jadra do cytoplazmy pre ďalšie využitie - transláciu na proteíny.

Transport prebieha cez komplex jadrového póru, ktorý rozpoznáva a transportuje iba kompletnú mRNA. Jadrový pór je štruktúra na jadrovej membráne, ktorá sa skladá z proteínov nukleoporínov, ktoré tvoria centrálnu štruktúru póru, jadrový košík a cytoplazmatické fibrily. Transport cez túto štruktúru je umožnený pomocou špecifických receptorov, ktoré interagujú jednak s „nákladom“ určeným na transport, jednak s jadrovým pórom. Molekuly RNA bývajú transportované ako ribonukleoproteínové komplexy.

Receptormi pre export mRNA sú TAP/P15 za účasti transkripčného exportného komplexu TREX, ktorých štruktúry sú konzervované od kvasiniek až po ľudskú bunku (Masuda *et al.*, 2005). TREX komplex obsahuje Aly a UAP56, ktoré sú členmi DEAD box helikáz, ktoré rozvíjajú mRNA a rušia interakcie RNA s proteínmi (Strasser *et al.*, 2002). Aj ďalší člen DEAD box rodiny je súčasťou exportnej mašínérie – proteín DBP5, ktorý sa asociuje s cytoplazmatickými fibrilami jadrového póru. TREX komplex je v prípade buniek cicavcov ťahaný zostrihovou mašínériou (Masuda *et al.*, 2005).

Transportné proteíny a faktory sú k mRNA pridávané behom alebo krátko po syntéze a umožňujú jej interakciu s jadrovými pórmi.

Aby bola mRNA transportovaná, musí prejsť pridaním čapičky, zostrihom intrónov a polyadenyláciou. Každý z týchto krokov má svoj vlastný mechanizmus a enzýmy, predpokladá sa však, že jednotlivé mechanizmy sú prepojené cez interakcie jednotlivých proteínov na docielenie vyššej účinnosti celého procesu exportu; plus všetky fázy sú prepojené s transkripciou, čo zaisťuje vytvorenie funkčnej messengerovej ribonukleovej partikule (mRNP). Vzhľadom na dôležitosť kotranskripčných procesov, musia existovať kontroly, že mRNA už prešlo jednotlivými úpravami. Preto na export je dôležitá prítomnosť komplexu viažúceho sa na čapičku (CBP – cap binding protein), naopak prítomnosť snRNP

zúčastnených na zostrihu je pre transport nežiadúca. K mRNA sa pútajú aj ďalšie proteíny naznačujúce kompletný zostrih. Keďže jadrový pór voľne prepúšťa len molekuly do určitej veľkosti, tieto proteíny slúžia aj ako exportný signál pre molekulu mRNA.

K mRNA sa na 5'konci pridáva čapička, na ktorú sa pripájajú proteíny tvoriace komplex viažuci čapičku (CBC – cap binding complex). Zároveň sa viaže na spliceozóm a pridáva sa poly(A) koniec na 3'. Prítomnosť zostrihového aparátu priťahuje TREX komplex, ktorý sa viaže na 5'koniec (Cheng *et al.*, 2006). Proteín Aly sa viaže na receptor TAP/P15 a nastáva export v smere 5' - 3'.

Vďaka týmto mechanizmom je syntéza RNA v jadre oddelená od translácie v cytoplazme a translujú sa len maturované mRNA.

5.3 Vplyv na transláciu

Ukázalo sa, že významnú úlohu v translácii hrá proteín PTB (polypyrimidine-tract-binding protein – efektor polyadenylácie). PTB má vplyv na reguláciu translácie a jej iniciáciu (Vancarcel, Gebauer, 1997). Pôvodne bol objavený ako proteín zúčastnený v zostrihu, postupne sa zistilo, že má mnoho ďalších funkcií v procesoch ako polyadenylácia, stabilita mRNA a iniciácia translácie. Jeho funkcia závisí na lokalizácii v bunke a na interakcii s inými proteínmi. Zistilo sa, že funguje ako RNA chaperón a dokáže prestavať štruktúru RNA, a tým ovplyvniť väzbu k rôznym faktorom (Auweter *et al.*, 2007). Umožňuje alternatívnu formu iniciácie translácie modulovaním štruktúry IRES (internal ribosome entry site). IRES-sprostredkovaná translácia sa využíva v podmienkach, kedy je inhibovaná tvorba čapičky, napríklad v strese bunky, apoptóze alebo infekcii, a neprebíha tak čapičkou-sprostredkovaná translácia (Spriggs *et al.*, 2008). Na infekcii sa účastnia aj virové IRES, pretože vírus často kóduje proteázy štiepiace translačný iniciačný faktor eIF4G, takže translácia virových proteínov musí prebiehať na čapičke nezávislým spôsobom. PTB tu funguje ako ITAF (IRES-transactivating factor), tj. Pomáha zaujať takú IRES štruktúru, ktorá sprostredkováva najefektívnejšiu iniciáciu translácie (Mitchell *et al.*, 2005). PTB sa zúčastňuje aj na pritiažení ribozómu. Dokáže zároveň sprostredkovať väzbu medzi ribozómom a IRES (Spriggs *et al.*, 2005).

Na iniciácii translácie sa podieľa aj PABP proteín, a to cirkularizovaním mRNA, kedy interagujú cytoplazmatický čapičku-viažuci komplex s PABP proteínom. Vznik tejto uzavretej slučky súvisí s interakciou iniciačného faktoru eIF4G s PABP a interakciou eIF4G s čapičkou-viažúcim proteínom eIF4E. Táto spolupráca faktorov vedie k zvýšeniu afinity

eIF4E k čapičke (Luoy, Goss, 2001), posilňuje väzbu PABP k RNA (Le *et al.*, 1997) a zvyšuje ATPázovú a RNA helikázovú aktivitu eIF4A (Bi, Goss, 2000). Kombinácia týchto efektov zaručuje zvýšenú transláciu mRNA obsahujúcich čapičku a poly(A) koniec.

Aktivita PABP je regulovaná PABP-interagujúcimi proteínmi (Paip – PABP-interacting proteins). Paip sa viaže k eIF3, zároveň eIF3-Paip1 stabilizuje interakcie medzi PABP a eIF4G, a tým napomáha cirkularizácii mRNA. Dochádza k tvorbe komplexov, ktoré cez rôzne sprostredkované interakcie dostávajú mRNA k ribozómu. V súčasnosti sa ukazuje, že existujú dva spôsoby, ako je mRNA prostredníctvom poly(A) konca rekrutované k translačnému aparátu, a to spojenie poly(A)-PABP-eIF4G-eIF3 (resp. eIF4G-eIF4E-cap), a nedávno u cicavcov objavené prepojenie poly(A)-Paip1-eIF3 (Martineau, *et al.*, 2008).

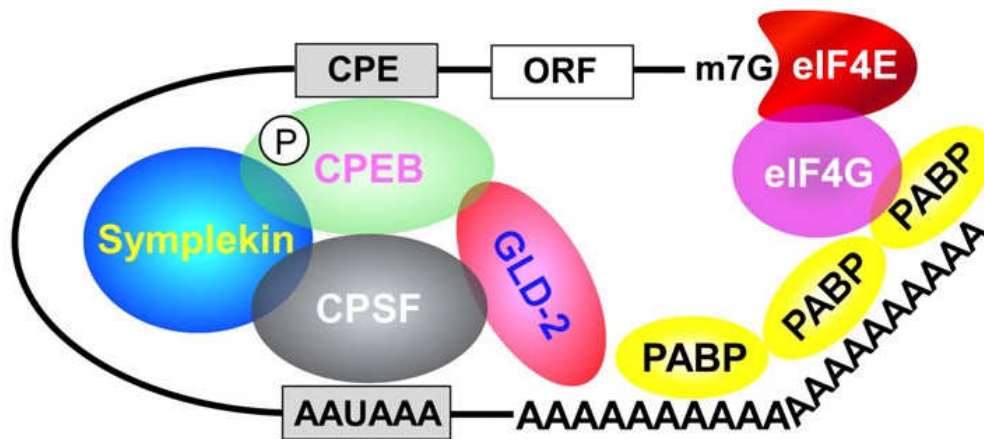
Nezastúpiteľnú úlohu v iniciácii translácie teda hrá faktor eIF3, ktorý u cicavcov pozostáva až z 13 neidentických podjednotiek (eIF3a – eIF3m). Organizuje interakcie medzi mnohými faktormi translácie a ich zoskupenie na 40S podjednotke ribozómu. Spolupodieľa sa na rozpoznávaní iniciačného kodónu. Svojím umiestnením na 40S podjednotke je cieľom regulačných faktorov, napr. proteínkinázy mTOR (Hinnebusch, 2006). Z hľadiska polyadenylácie je dôležité, že jeho podjednotka eIF3e sa viaže k faktoru eIF4G, ktorý sa, okrem iného, pripája k PABP (LeFebvre *et al.*, 2006).

V molekulách mRNA, kde poly(A) sekvencia predbieha iniciačný kodón, či už prirodzene alebo je umelo vložená do 5'UTR, bolo pozorované, že iniciácia translácie je len málo závislá na prítomnosti čapičkovej štruktúry a podrobnejším výskumom sa zistilo, že v týchto prípadoch nie je potreba iniciačného – čapičku-viažúceho faktoru eIF4F (Shirokikh, Spirin, 2008). I ďalšie pokusy tejto pracovnej skupiny ukázali, že mRNA bez čapičky sa horšie translatuje v prvom kole iniciácie, ale v ďalších, kedy sa vlastne na transkripte začínajú formovať polyzomy, je efektivita prekladu už zrovnateľná s variantou nesúcou čapičku (Alekhina *et al.*, 2007). Tieto informácie naznačujú nezastúpiteľnú úlohu poly(A) konca v iniciácii translácie, pri tvorbe polyzomálnych komplexov a pri zahájení prekladu mRNA nesúcich IRES element.

Cytoplazmatická polyadenylácia vedie k aktivácii translácie tým, že poly(A) koniec priťahuje iniciačné faktory pomocou ich väzby k PABP (polyA-binding protein). Zároveň dochádza k uvoľneniu mRNA z represných komplexov buď výmenou čapičku-viažúceho komplexu za eIF4E / eIF4G, alebo vytiahnutím mRNA z P-body podobných RNP komplexov (Bregues *et al.*, 2005).

Dĺžka poly(A) konca tiež ovplyvňuje translatovateľnosť mRNA. Zníženie znamená väčšinou represiu translácie, zatiaľ čo zvýšenie jej aktiváciu.

Terminácia translácie je stimulovaná faktorom eRF1, ktorý je aktivovaný GTPázou eRF3 (Kisselev *et al.*, 2003). eRF3 interaguje s C-terminálnou doménou cytoplazmatického PABP, a tým posilňuje rozpad translačného aparátu a recykláciu ribozómu (Hoshino *et al.*, 1999).



Obr. 6: Model polyadenyláciou-indukovanej aktivácie translácie. Počas zrania oocyty je CPEB fosforylovaný na Ser-174, čo zvyšuje jeho afinitu k CPSF. To vedie k cytoplazmatickej polyadenylácii. Narastajúci poly(A) koniec priťahuje PABP, ktorý interaguje s eIF4G. Tým zvyšuje afinitu eIF4G k eIF4E a vedie k cirkularizácii mRNA (Barnard *et al.*, 2004).

U kvasiniek existuje využitie na čapíčke nezávislej translácie, počas stresu spôsobeného napríklad limitáciou živín. Tento mechanizmus je dôležitý pre fyziologickú adaptáciu na stres, vo svojom dôsledku vedie k indukcii hyfálneho rastu u *Saccharomyces cerevisiae*. Gény dôležité pre tento tzv. invazívny rast kvasiniek obsahujú dlhé 5' neprekádané oblasti (5'UTR), ktoré obsahujú zložité sekundárne štruktúry. Ďalej však nesú A-bohatý element, ktorý sprostredkovoáva vnútornú iniciáciu translácie tým, že priťahuje Pab1 proteín do 5'UTR. IRES pre svoju translačnú aktivitu v tomto prípade vyžaduje iniciačný faktor eIF4G, jeho odstránenie spôsobilo pokles translácie na 25% pôvodnej aktivity. Predpokladá sa teda, že Pab1 sa viaže na 5'UTR prostredníctvom A-bohatých sekvencií imitujúcich poly(A) koniec, a tým nahrádza funkciu čapíčky a eIF4E v priťahovaní faktoru eIF4G (Gilbert *et al.*, 2007).

Iné štúdie na kvasinkách ukazujú, že mRNA sa môže pripojsť k ribozómu i nezávisle na prítomnosti eIF4G (a tým pravdepodobne nezávisle na interakcii eIF4E s čapíčkou), a to buď priamou väzbou na eIF3, alebo podobným mechanizmom sprostredkovaným Pab1 a poly(A) koncom. Deplécia eIF4G v translačne kompetentnom lyzáte totiž vedie k akumulácii 48S prediniciačných komplexov namiesto ich úbytku (Jivotovskaya *et al.*, 2006).

5.4 Regulácia génovej expresie

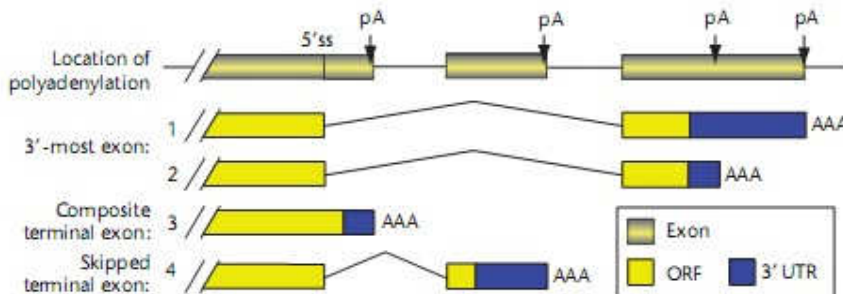
V eukaryotických mRNA existuje viacero miest možnej polyadenylácie, preto výber jedného patrí k možnostiam regulácie génovej expresie, hovorí sa o alternatívnej polyadenylácii.

Približne polovica ľudských génov (54%) má alternatívne miesta polyadenylácie (Tian *et al.*, 2005) vedúce k vzniku rozdielnych 3'UTR sekvencií (neprekladané oblasti) a v niektorých prípadoch až ku vzniku rozdielnych proteínových produktov. Okrem toho k zvyšovaniu diverzity mRNA prispievajú i mechanizmy alternatívnej iniciácie transkripcie a alternatívneho splicingu. Existujú aj rôzne posttranslačné úpravy proteínov (napr. fosforylácia), ako aj regulácia tvorby proteínov, či už lokalizovanou transláciou RNA v bunke alebo stabilitou RNA.

Existujú dve triedy alternatívnej polyadenylácie – odohrávajúca sa na 3'častiach exónov a odohrávajúca sa upstream od 3'exónov. Prvá trieda je väčšinou umiestnená downstream od stop kodónu a vedie k vzniku rôznych 3'UTR oblastí. Druhá trieda je zvyčajne vystrihnutá, a preto sa tieto polyadenylačné miesta volajú intrónové poly(A) miesta. Vedú k zmene v proteín-kódujúcej sekvencii.

Intrónové poly(A) miesta môžu byť ďalej rozdelené na dve skupiny – miesta, ktoré konvertujú vnútorný exón na terminálny exón, sa volajú kombinované terminálne exóny; miesta, ktoré vedú k využitiu terminálneho exónu a sú následne vystrihnuté, sa volajú vynechané terminálne exóny.

Podľa najnovších výskumov, 48% ľudských génov má alternatívne miesta v 3'častiach exónov, 22% v intrónoch a 13% majú oba typy alternatívnych miest polyadenylácie (Lee *et al.*, 2007).



Obr. 7: Typy alternatívnej polyadenylácie (Tian, 2008).

Čo sa týka regulácie, predpokladá sa, že jednotlivé miesta polyadenylácie sú vybrané podľa úrovne vývoja organizmu a podľa časti bunecného cyklu (Zhang *et al.*, 2005). Záleží to

na rôznych faktoroch; napríklad hladina CstF-64 bola spojená s alternatívnou polyadenyláciou imunoglobulínu M v imunitných bunkách; vyradenie 25 kDa podjednotky CF I_m s alternatívnou polyadenyláciou mnohých génov; nadprodukcia CstF-64 a CPSF-160 s alternatívnou polyadenyláciou u samčích pohlavných buniek u myši (Tian, 2008). Celkovo je možné povedať, že množstvo jednotlivých faktorov polyadenylácie sa líši v rôznych tkanivách organizmu (Zhang *et al.*, 2005). Mnohé faktory taktiež podliehajú modifikáciám, ktoré upravujú ich funkciu v rámci regulácie polyadenylácie (fosforylácia a defosforylácia PAP a CF faktorov).

Častejšie využívané spravidla bývajú konzervované poly(A) miesta (Ara *et al.*, 2006).

Alternatívne miesta polyadenylácie sa vyvíjali počas celej evolúcie, preto neprekvapí, že gény s dlhšou „históriou“ majú aj viac miest polyadenylácie ako tie „kratšie žijúce“. Jedným z možných mechanizmov je aj vloženie transponovateľných elementov (TE) do génovej oblasti, ktorý dáva vznik novému polyadenylačnému miestu (Zhang, Chasin, 2006). Poly(A) miesto môže byť v rámci TE, prípadne v jeho blízkosti – časť polyadenylačného miesta leží na TE, časť na pôvodnom géne.

Existuje úzka spolupráca medzi zostrihom a polyadenyláciou, keďže veľké množstvo alternatívnych miest polyadenylácie leží v rámci intrónov a zároveň množstvo proteínov podieľajúcich sa na zostrihu sa zúčastňuje aj na modulácii polyadenylácie. Využitie 5' miest zostrihu môže inhibovať polyadenyláciu, naopak využitie 3' zostrihových miest vedie k polyadenylácii (Tian, 2008).

6. Regulácia tvorby poly(A) konca

Regulácia tvorby poly(A) konca je jedným zo spôsobov, ako určovať množstvo a typ vytvorených mRNA v bunke – na tejto úrovni sa rozhoduje, či vôbec transkript exportovať a kde umiestniť 3' koniec. To môže byť samozrejme ovplyvnené podmienkami prostredia, celkovým stavom bunky, fázou jej životného cyklu a pod. Transkript, ktorý nie je polyadenylovaný, je zvyčajne degradovaný alebo menej účinne transportovaný z jadra do cytoplazmy.

Regulovaná môže byť aj účinnosť, s akou sa zoskupuje polyadenylačný komplex na substráte. Polyadenylačné miesta môžu byť slabé, pretože signálne sekvencie slabo priťahujú komplex alebo sú v nevhodnom okolí.

Ďalšou možnosťou je regulácia priamo zúčastnených enzýmov posttranslačnými úpravami.

Známym regulátorom polyadenylácie je proteín PTB (polypyrimidin-tract-binding protein), o ktorom sa predpokladá, že súťaží s CstF o pyrimidín-bohaté downstream oblasti, a tým pádom bráni štiepeniu 3'konca nutnému pre spustenie polyadenylácie (Castelo-Branco *et al.*, 2004). PTB ovplyvňuje aj výber polyadenylačného miesta a vedie k vzniku mRNA s variabilnými 3'koncami, a teda k proteínom s rôznymi C-koncami.

7. Defekty vo formovaní poly(A) konca a ich vplyv na zdravie jedinca

Pre štiepenie a následnú polyadenyláciu je dôležitá sekvencia AAUAAA, na ktorú sa viažu faktory popísané vyššie. Je preto zjavné, že poruchy v tejto sekvencii vedú k závažným problémom a chorobám.

Napríklad mutácia – delécia dvoch posledných nukleotidov tejto sekvencie má za následok zníženie stability génu pre ľudský $\alpha 2$ globín, zároveň interferuje - znižuje transkripciu génu pre $\alpha 1$ globín. Dôsledkom je zníženie množstva $\alpha 1$ a $\alpha 2$ globínu, čo vedie k chorobe zvanej α -thalasémia (Giordano *et al.*, 1999).

Naopak, multiplikácia sekvencie môže dať vznik viacerým alternatívnym miestam polyadenylácie a vedie tak k viacerým produktom z jedného génu. Takéto mutácie môžu viesť k rôznym poruchám v závislosti na množstve jednotlivých izoforiem proteínu.

Existujú dve polyadenylačné sekvencie v géne pre amyloidový prekursor, ktoré produkujú dva typy 3'UTR. Dlhšia forma obsahuje navyše 258 nukleotidov, ktoré zvyšujú transláciu. Ukázalo sa však, že stačí prídanie ôsmich nukleotidov ku krátkej forme a efektivita translácie je rovnaká ako u dlhej. Dva guanozínové zvyšky na 3'konci týchto ôsmich nukleotidov fungujú ako kontrola translácie. Na proteíny v mozgu sa viaže iba kratšia forma, avšak viac translatovateľná je dlhšia forma (pretože sa neviažu proteíny, ktoré by bránili translácii), čo v konečnom dôsledku môže zapríčiniť vznik amyloidných plakov hromadením dlhej formy, a teda Alzheimerovej choroby (Mbella *et al.*, 2000).

Je zrejme, že polyadenylácia má svoju úlohu aj pri rakovine, napr. alternatívnou polyadenyláciou môže vzniknúť nesprávny proteín, ktorý bunku poškodzuje. Bola dokázaná existencia dvoch foriem poly(A) polymerázy – jedna klasická zúčastnená na polyadenylácii v zdravých bunkách a poly(A) polymeráza prítomná v nádorových bunkách. Enzým prítomný v nádorových bunkách je oveľa viac fosforylovaný, čo spôsobuje obrovský nárast jeho aktivity (Rose, Jacob, 1979).

V bunkovom cykle sa nachádzajú kontrolné body, ako BRCA1 (breast cancer), p53 a iné, ktoré majú dôležitý význam pri poškodení bunky, kedy aktivujú opravné mechanizmy alebo

indukujú apoptózu. (Kastan, Lim, 2000). Ak je bunka poškodená, BRCA1 sa fosforyluje a spolu s jej väzbovým proteín BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein), indukujú odpoveď bunky (Deng, Wang, 2003). Komponenta BARD1 sa viaže na podjednotku CstF-50, čím inhibuje polyadenyláciu (Kleiman, Manley, 2001). Mutácie v tomto géne boli spojené so zvýšeným výskytom rakoviny prsníka a vaječníkov.

Každodenne sme vystavovaní vplyvu nebezpečných látok v prostredí, v strave alebo cigaretovom dyme. Aromatické aminy v týchto látkach môžu byť acetylované acetyltransferázami NAT1 a NAT2 (O-acetylácia), čo môže viesť k vzniku nebezpečných karcinogénnych látok (Hein *et al.*, 1993). Existuje rozsiahly polyadenylačný polymorfizmus v týchto enzýmoch, využívajú sa rôzne polyadenylačné miesta, čo vedie k vzniku viacerých variant. Niektoré varianty NAT1 sú schopné rapídnej acetylácie a vedú k zvýšenému riziku kolorektálneho karcinomu (Lang *et al.*, 1994).

Zvýšené riziko systematickej lupus erythematosus sa prikladá molekule SNP, ktorá má vplyv na alternatívnu polyadenyláciu génu pre interferónový regulačný faktor 5 (IRF5).

Medzi ďalšie choroby, na ktoré majú poruchy v polyadenylácii, prípadne alternatívna polyadenylácia vplyv patria aj trombofília, imunodisregulácie, polyendokrinopatie, enteropatie, X-viazané syndrómy a Wiskott-Aldrich syndróm (Chen *et al.*, 2006).

8. Polyadenylácia u nižších eukaryot

Polyadenylačné signály u kvasiniek sú menej konzervované ako u vyšších eukaryot a viac komplikované. Minimálne tri elementy sú vyžadované, a to UA-bohatý element účinnosti (EE – efficiency element - dôležitý pre aktiváciu pozičného elementu), A-bohatý pozičný element (PE – positioning element) a vlastné miesto polyadenylácie (Guo, Sherman, 1996) (vid'. Obr. 1). Rozpoznanie polyadenylačného miesta je založené na väčšom množstve slabých interakcií, nie na jednej vysokoafinitnej interakcii.

Pre štiepenie sú nevyhnutné štiepiace faktory CF I_y a CF II_y, ktoré nie sú príbuzné cicavčím CF I_m a CF II_m. Pre polyadenyláciu je dôležitá prítomnosť CF I_y, polyadenylačného faktoru I (PFI) a poly(A) polymerázy (Pap1). Po purifikovaní komplexov sa však ukázalo, že CF II_y a PFI majú mnohé polypeptidové reťazce spoločné, nie je ešte úplne známa zastupiteľnosť týchto dvoch faktorov. Funkcia jednotlivých podjednotiek daných faktorov tiež nie je úplne objasnená, tak ako nie je objasnené, ktorý polypeptid štiepi RNA.

Reguláciu dĺžky poly(A) konca má na starosti proteín Pab1 (kvasinkový homológ cicavčieho PAB I). Tento 70 kDa proteín sa viaže na poly(A) konce v jadre aj cytoplazme

a účastní sa iniciácie translácie (Tarun *et al.*, 1997). Dĺžku poly(A) konca ovplyvňuje pritiahnutím PAN (poly(A)-specific nuclease) a obmedzením prístupu Pap1 k RNA substrátu (Zhelkovsky *et al.*, 1998). Kvasinky s defektom tohto proteínu, prípadne kvasinky s úplnou absenciou tohto proteínu majú príliš dlhé poly(A) konce. Priemerná dĺžka poly(A) konca je 70 adenozinov. Na rozdiel od vyšších eukaryot, kde PABP prepína syntézu z distributívnej na procesívnu, u kvasiniek sa na tom pravdepodobne podieľajú faktory nepríbuzné jadrovým alebo cytoplazmatickým PABP; PABP ich iba nepriamo reguluje interakciou s RNA-procesívnymi faktormi alebo nasadením na nascentné mRNA. Ukázalo sa, že Pab1 interaguje s nukleoporíni, a tak umožňuje transport mRNA z jadra do cytoplazmy (Allen *et al.*, 2001). Pre kvasinky je prítomnosť PABP esenciálna pre život (Sachs *et al.*, 1987).

Pab1 spolupracuje s poly(A)-špecifickými nukleázami PAN (poly(a)-specific nuclease), čím ovplyvňuje dĺžku poly(a) konca. PAN sa skladá z minimálne dvoch podjednotiek – Pan2 (127 kDa) a Pan3 (76 kDa), obe sú kódované neesenciálnymi génami (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Podjednotky spolu navzájom interagujú. Pan2 interaguje s Pab1 a tvorí katalytické centrum nukleázy (patrí do rodiny RNáz D - 3'-5' exoribonukleáz) (Mian, 1997). PAN tak udržiava dĺžku poly(A) konca medzi 50 – 90 adenozinových zvyškov, ide o neustále nastavovanie syntézy a degradácie.

Čo sa týka proteínov zúčastnených regulácie polyadenylácie u kvasiniek, medzi najznámejšie patrí Ref2 RNA-väzbový proteín, ktorý sa podieľa na účinnom procesingu slabých poly(A) miest (Russnak *et al.*, 1994).

Na rozdiel od vyšších eukaryot, kde väčšina histónových mRNA nie je polyadenylovaná (obsahujú slučku na 3'konci), u nižších eukaryot polyadenylovaná je.

Väčšina génov u kvasiniek neobsahuje žiadne intróny, preto TREX komplex, zúčastnený na exporte mRNA z jadra, je pritiahnutý do procesu cez transkripčnú mašineriu. Keďže mRNA obsahujú čapičku a na ňu sa viažúci CBC komplex, predpokladá sa, že to priťahuje TREX komplex. Ukázalo sa, že aj iné špecifické sekvencie a na ne sa viažúce komplexy sa môžu zúčastniť na exporte génov bez intrónov, nevie sa však, či tu hrá úlohu aj prítomnosť CBC/TREX komplexov (Huang, Steitz, 2001).

Exportné mechanizmy na kvasinkách sú momentálne predmetom výskumu, keďže obsahujú faktory senzitívne na teplo, predpokladá sa, že sú iné požiadavky na export mRNA v rôznych teplotách (Takemura *et al.*, 2004).

9. Záver

Polyadenylácia, rovnako ako aj ostatné modifikácie mRNA typu zostrih a pridanie čapičky, patrí medzi dôležitý a nevyhnutný proces pre ďalší osud väčšiny mRNA. Určuje jej export z jadra, určuje jej stabilitu, prípadne rýchlosť degradácie, ovplyvňuje transkripciu a transláciu cez viaceré svoje faktory.

Preto je jasné, že akákoľvek chyba v polyadenylácii môže mať fatálne následky pre zdravie jedinca, či už sa kvôli nedostatočnému alebo chýbajúcemu poly(A) koncu degraduje potrebná mRNA, alebo nesprávna cytoplazmatická polyadenylácia môže viesť k defektom vo vývoji jedinca.

Veľa faktorov a detailov ohľadom tohto zaujímavého a esenciálneho procesu ešte nie je úplne známych alebo presných, preto si myslím, že by sa malo naďalej pokračovať v intenzívnom výskume, aby sme sa dozvedeli viac o procese, ako aj o jeho vplyve na rôzne defekty a choroby. Možno nám práve tieto poznatky pomôžu liečiť závažné ľudské ochorenia ako thalasémia, rôzne imunologické poruchy i čoraz aktuálnejšiu Alzheimerovu chorobu.

10. Zoznam použitej literatúry

- Alekhina, O. M., Vassilenko, K. S., Spirin, A. S. (2007): Translation of non-capped mRNAs in a eukaryotic cell-free system: acceleration of initiation rate in the course of polysome formation. *Nucleic Acid Research* 19:6547-6559.
- Allen, N. P., Huang, L., Burlingame, A., Rexach, M. (2001): Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* 276:29268-29274.
- Anderson, J. T. (2005): RNA turnover: unexpected consequences of being tailed. *Current Biology* 15: R635–R638.
- Ara, T., Lopez, F., Ritchie, W., Benech, P., Gautheret, D. (2006): Conservation of alternative polyadenylation patterns in mammalian genes. *BMC Genomics* 7: 189.
- Ausio, J. (2006): Histone variants—The structure behind the function. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5: 228–243.
- Auweter, S. D., Oberstrass, F. C., Allain, F. H. T. (2007): Solving the structure of PTB in komplex with pyrimidine tracts: an NMR study of protein-RNA complexes of weak affinities. *J. Mol. Biol.* 367:174-186.
- Barnard, D. C., Ryan, K., Manley, J. L., Richter, J. D. (2004): Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* 119:641-645.
- Berget, S. M. (1995): Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* 270:2411-2414.
- Bi, X., Goss, D. J. (2000): Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem*, 275:17740-17746.
- Bienroth, S., Keller, W., Wahle, E. (1993): Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J.* 12:585–594.
- Bienroth, S., Wahle, E., Suter-Crazzolara, C., Keller, W. (1991): Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *J. Biol. Chem.* 266:19768–19776.
- Boeck, R., Tarum, S., Rieger, M., Deardoff, J. A., Muller-Auer, S., Sachs, A. B. (1996): The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 271:432-438.
- Boelens, W.C., Jansen, E.J.R., vanVenrooij, W.J., Stripeke, R., Mattaj, I.W., Gunderson, S.I. (1993): The human snRNP-specific U1A protein inhibits polyadenylation of its own pre-mRNA. *Cell* 72: 881–892.
- Bregues, M., Teixeira, D., Parker, R. (2005): Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. *Science*, 310: 486 - 489.

- Brown, C. E., Tarun, S. Z., Boeck, R., Sachs, A. B. (1996): PAN3 encodes a subunit of the Pab1-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16:5744-5753.
- Calvo, O., Manley, J.L. (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes Dev.* 17, 1321–1327.
- Castelo-Branco, P., Furger, A., Wollerton, M., Smith, C., Moreira, A., Proudfoot, N. (2004): Polypyrimidine tract binding protein modulates efficiency of polyadenylation. *Mol Cell Biol*, 24:4174-4183.
- Challoner, P. B., Moss, S. B., Groudine, M. (1989): Expression of replication-dependent histone genes in avian spermatids involves an alternate pathway of mRNA 3'-end formation. *Mol. Cell. Biol.* 17:4667 – 4676.
- Chen, F., MacDonald, C. C., Wilusz, J. (1995): Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res.* 23: 2614–2620.
- Chen, H. W., Koehler, C. M., Teitell, M. A. (2007): Human polynucleotide phosphorylase: location matters. *Trends Cell Biol.* 17:600-608.
- Chen, J. M., Ferec, C., Cooper, D. N. (2006): A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Human Genetics* 120: 1–21.
- Chen, Z., Li, Y., Krug, R. (1999): Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3' end processing machinery. *EMBO J.* 18:2273-2283.
- Cheng H., Dufu, K., Lee, C. S. (2006): Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* 127: 1389–1400.
- Colgan, D. F., Murthy, K. G., Prives, C., Manley, J. L. (1996): Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature* 384:282-285.
- Dantoni, J. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., Tora, L. (1997): Transcriptional factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* 389:399-402.
- Deng, C. X., Wang, R. H. (2003): Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 12 Spec No 1:R113–23.
- Dingwall, C., Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16:478–481.
- Doma, M. K., Parker, R. (2006): Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440:561-564.
- Dominski, Z., Yang, X.C., Marzluff, W.F. (2005): The polyadenylation factor CPSF-73 is involved in histone-pre-mRNA processing. *Cell* 123:37–48.

- Du, L., Richter, J.D. (2005): Activity-dependent polyadenylation in neurons. *RNA* 11:1340–1347.
- Gil, A., Proudfoot, N. J. (1987): Position-dependent sense elements downstream of AAUAA are required for efficient rabbit β -globin mRNA 3' end formation. *Cell* 49: 99 – 406.
- Gilbert, W. V., Zhou, K., Butler, T. K., Doudna, J. A. (2007): Cap-independent translation is required for starvation-induced differentiation in yeast. *Science* 5842:1224 – 1227.
- Gilmartin, G. M., Nevins, J. R. (1991): Molecular analyses of two poly(A) site-processing factors that determine the recognition and efficiency of cleavage of the pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 11:2432–2438.
- Giordano, P.C., Harteveld, C. L., Bok, L. A.. (1999): A complex haemoglobinopathy diagnosis in a family with both beta zero- and alpha (zero/+)-thalassemia homozygosity. *European Journal of Human Genetics* 7:163–168.
- Groisman, I., Jung, M.Y., Sarkissian, M., Cao, Q., and Richter, J.D. (2002): Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* 109:473–483.
- Gunderson, S. I., Beyer, K., Martin, G., Keller, W., Boelens, W. C., Mattaj, L. W. (1994): The human U1A snRNP protein regulates polyadenylation via a direct interaction with poly(A) polymerase. *Cell* 76:531–541.
- Gunderson, S. I., Polycarpou-Schwarz, M., Mattaj, I. W. (1998): U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase. *Mol. Cell.* 1:255–264.
- Guo, Z., Sherman, F. (1996): 39-end forming signals of yeast mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 21:477–481.
- Hein, D. W., Doll, M. A., Rustan, T. D., Gray, K., Feng, Y., Ferguson, R. J.. and Grant, D. M. (1993): Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis (Lond.)*. 14:1633-1638.
- Higgs, D. R., Goodburn, S., Lamb, J., Clegg, J. B., Weatherall, D. J., Proudfoot, N. J. (1983). α -Thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 306:398–400.
- Hinnebusch, A. G. (2006): eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* 31:553-562.
- Hirose, Y., Manley, J. L. (1998): RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395:93–96.
- Hofmann I, Schnölzer, M., Kaufmann, I., Franke, W.W. (2002): Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Biol. Cell* 13: 1665-1676.

- Holcik, M., Liebhaber, S. A. (1997): Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3' untranslated region RNA-protein complexes sharing cis and trans components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 2410–2414.
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., Katada, T. (1999): The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem*, 274:16677-16680.
- Houseley J., LaCava, J., Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 529–539.
- Huang, Y., Steitz, J. A. (2001): Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell*, 4:899-905.
- Jivotovskaya, A.V., Valasek, L., Hinnebusch, A.G, Nielsen, K.H. (2006): Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 (eIF3) and eIF2 Can Promote mRNA Binding to 40S Subunits Independently of eIF4G in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 26:1355-1372.
- Kastan, M. B., Lim, D. S. (2000): The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:179–86.
- Keller, W., Minvielle-Sebastia, M. (1997): A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3' end processing. *Curr. Opin. Cell. Biol. Chem.* 271:27167-27175.
- Kim, H., Lee, J., and Lee, Y. (2003). Regulation of poly(A) polymerase by 14–3-3epsilon. *EMBO J.* 22, 5208–5219.
- Kisselev, L., Ehrenberg, M., Frolova, L. (2003): Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J*, 22:175-182.
- Kleiman, F. E., Manley, J. L. (2001): The BARD1-CstF-50 interaction links mRNA 3' end formation to DNA damage and tumor suppression. *Cell* 104:743–53.
- Kolev, N. G., Steitz, J. A. (2005): Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. *Genes Dev.* 19: 2583-2592
- Kwak, J. E., Wang, L., Ballantyne, S., Kimble, J., and Wickens, M. (2004): Mammalian GLD-2 homologs are poly(A) polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4407–4412.
- Lang, N., Butler, M. A., Massengill, M. L., Stolts, R. C., Hauer-Jensen, M., Kadlubar, F. F. (1994): Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prev.*, 3:75-682.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J., Gallie, D. R. (1997): Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem*, 272:16247-16255.

- Lee, J. Y., Yeh, I., Park, J. Y., Tian, B. (2007): PolyA_DB 2: mRNA polyadenylation sites in vertebrate genes. *Nucleic Acids Research* 35: D165–D168.
- LeFebvre, A. K., Korneeva, N. L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R. D., Bradley, C. A., Hershey, J. W. B., Rhoads, R. E. (2006): Translational initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J. Biol. Chem.* 32:22917-22932.
- Lin, C. L., Bristol, L. A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L., Rothstein, J. D. (1998): Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589–602.
- Lundberg, U., von Gabain, A. (2001): mRNA stability. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1038/npg.els.0000533
- Luo, Y., Goss, D. J. (2001): Homeostasis in mRNA initiation: wheat germ poly(A)-binding protein lowers the activation energy barrier to initiation complex formation. *J Biol Chem*, 276:43083-43086.
- Lutz, C. S., Murthy, K. G., Schek, N., O'Connor, J. P., Manley, J. L., Alwine, J. C. (1996): Interaction between the U1 snRNP-A protein and the 160-kD subunit of cleavage-polyadenylation specificity factor increases polyadenylation efficiency in vitro. *Genes Dev.* 10:325–337.
- Makeyev, A.V., Liebhaber, S. A. (2002): The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA* 8: 265–278.
- Martin, G., Keller, W. (1996): Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and a catalytic domain, homologous to the family X polymerases, and to other nucleotidyltransferases. *EMBO J.* 15:2593-2603.
- Martineau, Y., Derry, M. C., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, J. J., Shyu, A. B., Imataka, H., Gehring, K., Sonenberg, N. (2008): Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell Biol.* 28:6658-6667.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H. (2005): Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes & Development* 19: 1512–1517.
- Mbella, E. G., Bertrand, S., HuezGand Octave J. N. (2000): AGGnucleotide sequence of the 3' untranslated region of amyloid precursor protein mRNA plays a key role in the regulation of translation and the binding of proteins. *Molecular and Cellular Biology* 20: 4572–4579.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., Bentley, D. L. (1997): The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385:357–361.
- Mian, I. S. (1997): Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.* 25:3187-3195.

- Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Bushell, M., Evans, J. R., Stoneley, M., le Quesne, J. P. C., Spriggs, R. V., Willis, A. E. (2005): Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract binding protein dependent internal ribosome entry. *Genes Dev.* 19:1556-1571.
- Mizrahi, N., Moore, C. (2000): Posttranslational phosphorylation and ubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase at the S/G(2) stage of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2794–2802.
- Mowry, K. L., Steitz, J. A. (1988): snRNP mediators of 3' end processing: functional fossils? *Trends Biochem. Sci.* 13:447–451.
- Nagy, E., Maquat, L. E. (1998): A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23:198-199.
- Nemeth, A., Krause S., Blank, D., Jenny, A., Jenó, P., Lusting, A., Wahle, E. (1995): Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res.* 23:4034–4041.
- Paris, J., Richter, J. D. (1990): Maturation-specific polyadenylation and translational control: diversity of cytoplasmic polyadenylation elements, influence of poly(A) tail size, and formation of stable polyadenylation complexes. *Mol. Cell. Biol.* 10:5634–5645.
- Proudfoot, N. (1991): Poly(A) signals. *Cell* 64:671–674.
- Proudfoot, N. (2004): New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 272–278.
- Radford, H. E., Meijer, H. A., de Moor, C. H. (2008): Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1779:217-229.
- Richter, J. D. (2000): Influence of polyadenylation-induced translation on metazoan development and neuronal synaptic plasticity, in: N. Sonenberg, J. Herchey, M.B. Mathews (Eds.), *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 785–805.
- Rose, K. M., Jacob, S. T. (1979): Phosphorylation of poly(A) polymerase. Comparison between liver and hepatoma enzymes. *J. Biol. Chem.*, 254:10256-10261.
- Rothnie, H. M. (1996): Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol. Biol.*32:43–61.
- Rueggsegger, U., Beyer, K., Keller, W. (1996): Purification and characterization of human cleavage factor Im involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J. Biol. Chem.* 271:6107–6113.
- Rouault, T., Klausner, R. (1997): Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Current Topics in Cellular Regulation* 35: 1–19.
- Russell, J. E., Morales, J., Liebhaber, S. A. (1997): The role of globin mRNA stability in the control of globin gene expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 57: 249–287.

- Russnak, R., Nehrke, K. W., Platt, T. (1994): *REF2* encodes an RNA binding protein directly involved in yeast mRNA 3' end formation. *Mol. Cell. Biol.* 15:1689–1697.
- Rüegsegger, U., Blank, D., Keller, W. (1998): Human pre-mRNA cleavage factor Im is related to spliceosomal SR proteins and can be reconstituted in vitro from recombinant subunits. *Mol. Cell* 1:243-253.
- Sachs, A. B., Davis, R.W., Kornberg, R.D. (1987): A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3268–3276.
- Schumperli, D. (1988): Multilevel regulation of replication-dependent histone genes. *Trends Genet.* 4:187–191.
- Sheets, M. D., Ogg, S. C., Wickens, M. P. (1990): Point mutations in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18: 5799–5805.
- Shirokikh, N. E., Spirin, A. S. (2008): Poly(A) leader of eukaryotic mRNA bypasses the dependence of translational on initiation factors. *PNAS* 31:10738-10743.
- Spriggs, K. A., Mitchell, S. A., Willis, A. E. (2005): Investigation of interactions of polypyrimidine tract-binding protein with artificial internal ribosome entry segment. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1483-1486.
- Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M., Willis A. E. (2008): Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol. Cell* 100:27-38.
- Strasser K., Masuda, S., Mason, P. (2002): TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 28: 304–308.
- Takagaki, Y., MacDonald, C., Shenk, T., Manley, J. (1992): The human 64-kDa polyadenylation factor contains a ribonucleoprotein-type RNA binding domain and unusual auxiliary motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1403–1407.
- Takagaki, Y., Manley, J. (1994): A polyadenylation factor subunit is the human homologue of the *Drosophila* suppressor of forked protein. *Nature* 372:471-474.
- Takemura, R., Inoue, Y., Izawa, S. (2004): Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock. *J. Cell. Sci.* 15: 4189–4197.
- Tang, J., Rosbash, M. (1996): Characterization of yeast U1 snRNP A protein: identification of the N-terminal RNA binding domain (RBD) and evidence that the C-terminal RBD functions in splicing. *RNA* 2, 1058-1070.
- Tarun, S. Z., Wells, S. E., Deardoff, J. A., Sachs, A.B. (1997): Translation initiation factor eIF4G mediates in vivo poly(A) tail-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9046-9051.

Tian, B., Hu, J., Zhang, H., Lutz, C. S. (2005): A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Research* 33: 201–212.

Tian, B. (2008): Alternative Polyadenylation in the Human Genome: Evolution. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020768

Valcarcel, J., Gebauer, F. (1997): Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr. Biol.* 7:R705–R708.

Wahle, E. (1995): Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J. Biol. Chem.* 270:2800–2808.

Wahle, E., Kühn, U. (1997): *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 57: 41–71.

Wang, Z. F., Sirotkin, A. M., Buchold, G. M., Skoultchi, A. I., Marzluff, W. F. (1997): The mouse histone H1 genes: Gene organization and differential regulation. *J. Mol. Biol.* 271: 124–138.

Zhang, X. H., Chasin, L. A. (2006): Comparison of multiple vertebrate genomes reveals the birth and evolution of human exons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 13427–13432.

Zhang, H., Lee, J. Y., Tian, B. (2005): Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biology* 6: R100.

Zhelkovsky, A., Helmling, S., Moore, C. (1998): Processivity of the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase requires interactions at the karboxyl-terminal RNA binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 18:5942-5951.