

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Eliška Holická

Exozóm a jeho role v metabolismu RNA v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*
Exosome and its role in RNA metabolism of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha, 2012

Mé poděkování patří doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za vstřícné a trpělivé odborné vedení při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolegům a kamarádům z laboratoře, a to především za velmi cenné rady. Děkuji také Jiřímu Kratochvílovi za nedocenitelnou podporu.

Prohlášení:

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

V Praze, 10.05.2012

Eliška Holická

Abstrakt

Exozóm je proteinový komplex přítomný v jádře a cytoplazmě kvasinek podílející se na degradaci, úpravách a nastavení hladiny vzniku a zániku RNA. Jeho jádro se skládá z devíti katalyticky inaktivních podjednotek, se kterými fyzicky asociuje RNA nukleáza Rrp44.

Funkce exozómu je závislá na mnoha kofaktorech, respektive fakultativně asociovaných enzymech, což zajišťuje jeho vysokou versatilitu. V různých kompartmentech buňky funguje odlišným způsobem a hraje roli v odlišných procesech. V jádře se podílí především na úpravách prekurzorů různých specializovaných RNA, kdežto v cytoplazmě hlavně na degradaci nativních mRNA. Jeho základní funkcí je ale ve všech těchto procesech exonukleolytické štěpení jednořetězcové RNA od 3' konce.

Exozóm má své homology napříč organismy – různé druhy nukleáz v bakteriích, archeální exozóm, PM-Scl komplex (nebo také exozóm) u člověka, což implikuje vysokou konzervovanost této degradační mašinerie. Je tedy zřejmé, že exozóm u kvasinek není jejich evoluční novinkou, spíše naopak některé komponenty tohoto komplexu v průběhu evoluce ztratily svou původní funkci.

Klíčová slova: exozóm, degradace RNA, úprava RNA, RNA exonukleáza, Rrp44, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Exosome is a protein complex present in the yeast nucleus and cytoplasm, which participates in RNA degradation, processing and turnover. The core of exosome consists of nine catalytically inactive subunits, which physically associate with RNA nuclease Rrp44.

The function of exosome is dependent on many cofactors or facultatively associated enzymes, and these associations provide high versatility of the complex. In different compartments the complex works by other means and plays a role in distinct processes. In nucleus, exosome acts mainly in pre-RNA processing, whereas in cytoplasm its major role is to degrade native mRNA. Nevertheless, in all of these processes, its general role is the 3' exonucleolytic cleavage of single-stranded RNA.

Exosome has homologs in many various kinds of organisms – e. g. different types of bacterial nucleases, archeal exosome, human PM-Scl complex (or exosome), which implicates high conservation of this degradation machinery. Thus, it is very likely that some exosome components lost their original function over the evolution, more than that the yeast exosome is an evolutionary innovation.

Key words: exosome, RNA degradation, RNA processing, RNA exonuclease, Rrp44, *Saccharomyces cerevisiae*

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	1
1 Úvod.....	2
2 Exozóm a jeho komponenty.....	3
2.1 Jádru exozómu.....	4
2.2 Rrp44 (Dis3).....	5
2.2.1 Doména PIN proteinu Rrp44.....	7
3 Vstup substrátu k aktivnímu místu proteinu Rrp44	8
3.1 Cesta přes PH-kruh.....	8
3.2 Přímá cesta.....	9
4 Kofaktory jaderného exozómu.....	10
4.1 Rrp6.....	11
4.2 Rrp47 (Lrp1).....	11
4.3 Komplex TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation complex).....	12
4.4 Mpp6.....	14
4.5 Další kofaktory.....	14
5 Kofaktory cytoplazmatického exozómu.....	15
5.1 Ski7 a komplex Ski.....	15
6 Procesy, ve kterých se exozóm uplatňuje.....	16
6.1 Jaderné úpravy, kontrola kvality a degradace defektních pre-RNA.....	16
6.1.1 Úpravy 3' konce rRNA, snoRNA, snRNA.....	16
6.1.1.1 Úpravy rRNA.....	17
6.1.1.2 Úpravy snoRNA (small nucleolar RNA – malé jadéřkové RNA).....	18
6.1.1.3 Úpravy snRNA (small nuclear RNA – malé jaderné RNA).....	18
6.1.2 Degradace tRNA.....	19
6.1.3 Kontrola kvality mRNA před exportem z jádra a degradace pre-RNA.....	20
6.2 Cytoplazmatická degradace normálních i defektních mRNA.....	21
6.2.1 3'-5' degradace normálních mRNA (exosome-mediated normal mRNA decay).....	22
6.2.2 3'-NMD dráha (nonsense-mediated decay).....	22
6.2.3 Degradace nonstop mRNA (nonstop decay)	24
7 Závěr.....	25
Seznam použité literatury.....	26

Seznam použitých zkratk

NLS	jaderný lokalizační signál (<i>nuclear localization signal</i>)
Exo9	jádro exozómu obsahující devět podjednotek (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3, Rrp4, Rrp40 a Csl4)
Exo10	desetipodjednotkový exozóm (obsahující Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3, Rrp4, Rrp40, Csl4 a Rrp44)
Exo11	jedenáctipodjednotkový exozóm (obsahující Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3, Rrp4, Rrp40, Csl4, Rrp44 a Rrp6)
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
mRNA	mediátorová RNA (<i>messenger RNA</i>)
NMD dráha	dráha degradující nonsense mRNA (<i>nonsensemediated mRNA decay</i>)
ncRNA	nekódující RNA (<i>noncoding RNA</i>)
NMP	nukleosid monofosfát
snoRNA	malá jadérková RNA (<i>small nucleolar RNA</i>)
snRNA	malá jaderná RNA (<i>small nuclear RNA</i>)
PH-kruh	centrální heterohexamerický kruh exozómu (<i>RNase PHlike ring</i>)
pre-mRNA	prekurzor mediátorové RNA
pre-rRNA	prekurzor ribozomální RNA
pre-tRNA	prekurzor transferové RNA
PTC	předčasný triplet terminující translaci (<i>premature termination codon</i>)
RNP	ribonukleoprotein
rRNA	ribozomální RNA
TRAMP komplex	Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylační komplex
tRNA	transferová RNA
tRNA_i^{Met}	iniciační transferová RNA
UTR	nepřekládaná oblast (<i>untranslated region</i>)

1 Úvod

Ribonukleová kyselina má v eukaryotické buňce mnoho funkcí. Jednu z nich vykonává messengerová RNA, která slouží jako mediátor mezi informační složkou buňky (DNA) a složkou výkonnou (proteinem). mRNA vzniká transkripcí DNA pomocí DNA-dependentní RNA polymerázy II a v procesu translace se překládá do proteinu za přispění tRNA v ribozómových komplexech. rRNA je důležitou součástí těchto ribozómů.

Prekurzory rRNA a tRNA vznikají transkripcí z DNA pomocí DNA-dependentních RNA polymeráz I, respektive III, jsou upravovány na hotové rRNA a tRNA a poté dopravovány na místa svého působení.

K důležitým druhům RNA dále patří také snRNA přítomné v jádře, které se účastní sestřihu pre-mRNA, a snoRNA v jadérku, které se podílí na tvorbě rRNA a jejich modifikaci.

Všechny tyto RNA podstupují před svou maturací úpravy (sestřih, štěpení apod.), jejich kvalita a funkčnost je přísně kontrolována, a taktéž jejich kvantita a životnost je přesně regulována pomocí řízené degradace. Na všech těchto procesech se vedle řady enzymů včetně různých jiných nukleáz podílí také komplex nazývaný se exozóm podle své dominantně exonukleázové funkce. Tento komplex je neobyčejně důležitý díky svým mnohačetným rolím, z nichž v mnoha je nezastupitelný. Mnoho procesů, pro něž je nutný, je navíc nezbytných pro život buňky.

Degradovány exozómem nejsou pouze „staré“ a nepotřebné RNA, ale také aberantní RNA, které nevlastní všechny náležitosti potřebné pro vykonávání funkce, pro kterou byly předurčeny. Jsou to mimo jiné RNA bez stop kodónu, RNA vlastníci předčasný terminační kodón (PTC), RNA transkribované z nekódujících oblastí nebo špatně sestřižené či nesprávně modifikované RNA. A stejně jako degradace samotná i schopnost rozpoznání takovýchto RNA určených k destrukci je velmi důležitou schopností buňky. Toto rozpoznání zajišťují pravděpodobně všechny možné kofaktory s exozómem asociované, podílí se na něm ale možná i samotný exozóm.

Exonukleázová aktivita není pouze destrukční silou, která ničí vše nepotřebné, za určitých okolností se může stát i silou tvořivou, jestliže tvoříme z dlouhých prekurzorů částečným štěpením kratší produkty. I zde je exozóm nezbytný, i když je jeho funkční repertoár poněkud omezený jednosměrnou orientací jeho asociovaných nukleáz.

Ve výše uvedených úlohách hraje svou roli mnoho vzájemně propojených hráčů, často svázaných se zdánlivě velmi odlišnými procesy. Cílem této práce bylo předložit alespoň jeden

z úhlů pohledu, který nastíní propojenost RNA metabolismu v buňce shrnutím těch nejzákladnějších funkcí exozómu a jeho interakčních partnerů. Je nicméně více než pravděpodobné, že mnoho úloh a kofaktorů tohoto komplexu ještě neznáme.

2 Exozóm a jeho komponenty

Exozóm byl poprvé popsán v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a nazván exozómem jakožto komplex mnoha asociovaných exoribonukleáz (Mitchell *et al.*, 1997), což se později ukázalo být poněkud nepřesné. Původně se totiž mělo za to, že všechny podjednotky jsou enzymaticky aktivní. Jeho hlavní očekávaná funkce byla úprava 3' konce mnoha různých RNA u eukaryot (Mitchell *et al.*, 1997).

Nejdříve bylo objeveno pouze pět podjednotek exozómu (proteiny Rrp4, Rrp41, Rrp42, Rrp43 a nukleáza Rrp44; Mitchell *et al.*, 1997), brzy bylo identifikováno i zbylých pět podjednotek exozómového jádra (Rrp40, Rrp45, Rrp46, Mtr3, Csl4) a jaderný kofaktor Rrp6 (Allmang *et al.*, 1999b).

Především po zjištění, že devět podjednotek exozómu je enzymaticky inaktivních (Liu *et al.*, 2006), získalo na významu studium nejrůznějších kofaktorů asociovaných s exozómem. Katalyticky inaktivní část je v novější literatuře označována jako jádro exozómu (dříve bylo jako jádro nazýváno deset základních komponent považovaných za aktivní nukleázy), zde ji budeme zkráceně nazývat Exo9 (Liu *et al.*, 2006). Základně vybavený exozóm o 398 kDa (Wang *et al.*, 2007), obsahující kromě jádra ještě Rrp44, budeme dále značit jako Exo10, exozóm s asociovaným Rrp6 jako Exo11 (Liu *et al.*, 2006).

V kvasinkách působí dvě základní formy exozómu, jaderná a cytoplazmatická, které se kromě své lokalizace liší svým složením a v závislosti na tom i svou funkcí. V obou těchto formách se vyskytuje deset základních podjednotek – jádro (Exo9) a nukleáza Rrp44. Liší se svými kofaktory (Allmang *et al.*, 1999b; van Hoof *et al.*, 2000b) a některé jejich komponenty jsou odlišně fosforylovány, což by mohlo implikovat rozdíly ve vazbě substrátu nebo aktivitě komplexu (Synowsky *et al.*, 2009).

Exozóm je velmi konzervovaný komplex (Mitchell *et al.*, 1997), je homologní a funkčně ekvivalentní lidskému komplexu PM-Scl taktéž nazývanému exozóm, oba komplexy jsou i podobné svou velikostí (Allmang *et al.*, 1999b).

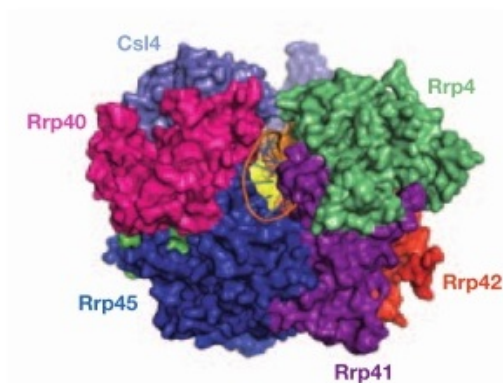
Na modelu *Saccharomyces cerevisiae* byl exozóm velmi intenzivně zkoumán, v návaznosti na zvyšující se počet znalostí o jeho roli se však centrum pozornosti

v nejrecentnějších člancích přesunuje spíše na jeho lidský homolog, což je vzhledem k jeho potenciálnímu medicínskému významu pochopitelné.

2.1 Jádru exozómu

Jádru exozómu (Exo9), jehož trojrozměrný model z bočního pohledu je vyobrazen na Obr. 1, má asi 284 kDa a skládá se, jak už bylo uvedeno výše, z devíti proteinových podjednotek, které nejsou katalyticky aktivní. Všechny tyto proteiny jádra exozómu jsou však esenciální pro jeho životaschopnost. Lze předpokládat, že tyto podjednotky v průběhu evoluce ztratily svá katalytická místa, poněvadž jejich homology u prokaryot a archeí vykazují enzymatickou aktivitu, ale v kvasinkách tyto proteiny umožňují hlavně interakci s mnoha asociovanými regulačními či enzymatickými faktory a substráty (Mitchell *et al.*, 1997; Allmang *et al.*, 1999b; Liu *et al.*, 2006; Dziembowski *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Šest podjednotek tvoří mezi sebou heterodimery a společně vytváří centrální heterohexamerický kruh exozómu (*RNase PH-like ring*, dále jen PH-kruh), který je zobrazen na Obr. 2 vlevo. Tyto proteiny, Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 a Mtr3, jsou homology bakteriální (*E. coli*) RNázy PH (Mitchell *et al.*, 1997; Allmang *et al.*, 1999b; Luz *et al.*, 2007).



Obrázek 1: Model jádra eukaryotického exozómu, pohled „z boku“ (převzato a upraveno z Vanacova a Stefl, 2007).

Zbylé tři podjednotky, Rrp4, Rrp40 a Csl4, tzv. *cap* proteiny, interagují s komplexem slaběji než podjednotky PH-kruhu (Luz *et al.*, 2007; Synowsky *et al.*, 2009). Jejich vazba na podjednotky PH-kruhu je nastíněna na Obr. 2 vpravo. Mají sekvence homologní k RNA-vazebným doménám S1, což pravděpodobně znamená, že interagují přímo se substrátovými RNA (Allmang *et al.*, 1999b). Rrp40 dokonce prokazatelně váže jednořetězcovou RNA *in vitro* bez sekvenční specifity (Luz *et al.*, 2007).

Cap protein Csl4 obsahuje N-terminální doménu, centrální doménu S1 a C-terminální doménu, která je strukturně podobná *zinc ribbons* (podskupina struktur zinkového prstu). Žádná z těchto domén není esenciální, nicméně doména *zinc ribbon* je vyžadována pro

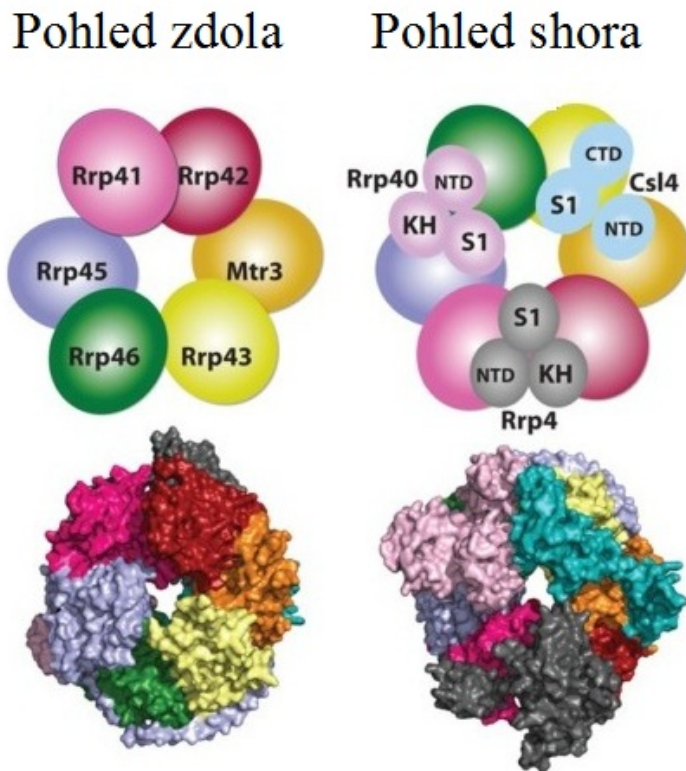
degradaci RNA zprostředkovanou cytoplazmatickým exozómem. Protein Csl4 jako takový esenciální pro viabilitu je, narozdíl od ostatních *cap* proteinů ale nezajišťuje důležitá spojení podjednotek PH-kruhu, není tedy důležitý pro strukturu exozómu. Jedna z jeho hypotetických funkcí je, že zajišťuje vazby na substráty nebo esenciální kofaktory - více vazebných míst v proteinu by vysvětlilo postradatelnost každé domény (Schaeffer *et al.*, 2009).

Další dva *cap* proteiny, Rrp4 a Rrp40, obsahují N-terminální RPL27-*like* doménu, centrální doménu S1 a C-terminální doménu KH. Tyto domény jsou esenciální (Schaeffer *et al.*, 2009).

Jádro exozómu tedy pravděpodobně hraje roli ve vazbě nebo výběru substrátu (Dziembowski *et al.*, 2007; Bonneau *et al.*, 2009). Podjednotky Exo9 jsou také nutné pro interakci kofaktorů Ski7 a Rrp6 s hlavní exozómovou nukleázou Rrp44 (Dziembowski *et al.*, 2007).

2.2 Rrp44 (Dis3)

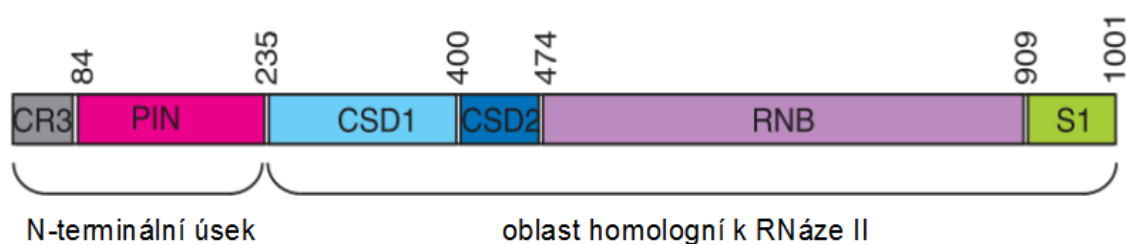
Protein Rrp44 je jedinou katalytickou podjednotkou Exo10 a je zodpovědný za jeho veškerou exonukleázovou aktivitu *in vitro* i *in vivo* (Dziembowski *et al.*, 2007), disponuje však i endonukleázovou aktivitou (Lebreton *et al.*, 2008; Schaeffer *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2009). Delece genu *RRP44* je letální (Mitchell *et al.*, 1997), zatímco kvasinky s inaktivací



Obrázek 2: Struktura jádra eukaryotického exozómu. Podjednotky Rrp41 (purpurová), Rrp42 (červená), Mtr3 (oranžová), Rrp43 (žlutá), Rrp46 (zelená) a Rrp45 (modrá) tvoří PH-kruh, podjednotky Rrp40 (světle růžová), Csl4 (azurová) a Rrp4 (šedá) tvoří tzv. cap (převzato a upraveno z Lima a Januszzyk, 2010).

pouze exonukleázového katalytického místa proteinu Rrp44 jsou životaschopné (Dziembowski *et al.*, 2007).

Tento enzym je podobný lidskému hDis3 (Shiomi *et al.*, 1998) a je homologem bakteriálních RNáz II, resp. RNázy R *E. coli* (Mitchell *et al.*, 1997; Allmang *et al.*, 1999b), ale obsahuje N-terminální doménu PIN, která chybí jak u RNázy R, tak u RNázy II (Lorentzen *et al.*, 2008). Rrp44 tedy pravděpodobně vznikl v evoluci fúzí této domény PIN a bakteriální RNázy II/R (Lebreton *et al.*, 2008). Zastoupení domén v nukleáze Rrp44 je schematicky zobrazeno na Obr. 3. Domény tohoto proteinu jsou funkčně oddělitelné, primárně zajišťují degradaci nebo vazbu substrátu (Schneider *et al.*, 2007).



Obrázek 3: Schematická reprezentace domén proteinu Rrp44 (převzato a upraveno z Schaeffer *et al.*, 2009).

3'-5' exonukleázová aktivita tohoto proteinu je procesivní a silně preferuje 3' hydroxylovou skupinu na substrátu, substrát hydrolyticky štěpí na nukleosid 5'-monofosfáty (dále jen NMP) a je závislá na submilimolárních koncentracích hořčnatých kationtů (Mitchell *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2006; Dziembowski *et al.*, 2007). Navzdory své procesivitě degraduje pouze přibližně jeden substrát za minutu. Faktorem limitujícím rychlost enzymu by mohla být konformační změna před započítím hydrolyzy anebo při uvolnění produktů (Dziembowski *et al.*, 2007).

Nukleáza Rrp44 má asi padesátkrát vyšší afinitu k jednořetězcové RNA než k jednořetězcové DNA (Lorentzen *et al.*, 2008) a rozhodnutí, zda Rrp44 využije svou endonukleázovou nebo exonukleázovou aktivitu, je závislé na typu substrátu (Schaeffer *et al.*, 2011).

Se zbytkem exozómu podjednotka Rrp44 interaguje tak, že svou C-terminální částí se váže zesponu PH-kruhu k podjednotkám exozómového jádra Rrp45 a Rrp43, s C-koncem Rrp45 interaguje hydrofobními a polárními vazbami, zatímco jeho N-terminální část je navázána na podjednotku Rrp41 (Wang *et al.*, 2007; Bonneau *et al.*, 2009).

Protein Rrp44 je sám o sobě schopen rozplétat sekundární struktury na substrátových

RNA, přítomnost jádra exozómu překvapivě tuto schopnost snižuje. Rrp44 dokáže degradovat substráty s minimálním jednořetězcovým 3' koncovým přesahem 4 nukleotidy, na delších přesazích (alespoň 9 nukleotidů) je ale mnohem účinnější. Exozómový komplex nicméně potřebuje delší jednořetězcové přesahy (viz kapitola 3.1), to pravděpodobně znamená, že jádro exozómu degradaci kratších přesahů fyzicky překáží, což by mohlo sloužit jako ochrana proti nechtěné degradaci stabilních RNA (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Lorentzen *et al.*, 2008).

Exonukleázová aktivita proteinu Rrp44 je *in vitro* potlačována manganatými kationty (Schneider *et al.*, 2009) a zvyšována hořečnatými kationty. Pro hořečnaté kationty jsou v aktivním místě nejspíš dvě, ale minimálně jedno vazebné místo (Lorentzen *et al.*, 2008). Doména RNB, která tuto aktivitu zajišťuje, fyzicky interaguje s doménou PIN, což umožňuje exonukleázové a endonukleázové doméně fungovat rovněž v *trans* (Bonneau *et al.*, 2009). RNA se do katalytického místa domény RNB váže svým 3' koncem pomocí interakce fosfátové kostry s aminokyselinovými zbytky proteinu (Lorentzen *et al.*, 2008; více v kapitole 3).

Doména CSD1 Rrp44 reguluje aktivitu domény PIN (Schaeffer *et al.*, 2009), interaguje konzervovanými elektrostatickými interakcemi s Rrp45 (Bonneau *et al.*, 2009) a podílí se na vazbě substrátu k RNB doméně (Lorentzen *et al.*, 2008).

2.2.1 Doména PIN proteinu Rrp44

Doména PIN na N-konci proteinu Rrp44 má endonukleázovou aktivitu, a to *in vitro* i *in vivo* (Schneider *et al.*, 2009), která je nezávislá na exonukleázové aktivitě domény RNB. Nemá *in vivo* žádný vliv na degradaci jednořetězcových substrátů, ale umožňuje degradaci např. cirkulárních RNA nebo RNA se sekundární strukturou, zejména stabilních RNA s krátkými 3' přesahy, kde přispívá k jejich rozvíjení (Lorentzen *et al.*, 2008; Lebreton *et al.*, 2008). Exonukleázová a endonukleázová aktivita spolu spolupracují, endonukleázová aktivita pravděpodobně poskytuje exonukleáze nové 3' konce (Lebreton *et al.*, 2008).

Doména PIN je podstatně aktivnější na substrátech s 5' monofosfátem než na těch s 5' hydroxylem (Schaeffer *et al.*, 2009). Je tedy možné, že endonukleázová aktivita Rrp44 váže většinu primárních substrátů relativně neúčinně, protože obsahují 5' hydroxyl, ale počáteční štěpení na produkty s 5' monofosfátem by mohlo afinitu Rrp44 k substrátu zvyšovat. Tento proces možná zajišťuje rychlé dokončení degradace poté, co je jednou štěpení zahájeno

(Schaeffer *et al.*, 2009).

Endonukleázová aktivita je *in vitro* stimulována manganatými kationty, přítomnost těchto kationtů umožňuje efektivně degradovat RNA i mutantnímu proteinu Rrp44 s inaktivovanou exonukleázovou aktivitou (naopak exonukleázová aktivita Rrp44 je těmito ionty inhibována, viz výše). Endonukleázovou aktivitu domény PIN lze navíc *in vitro* zrušit čtyřmi bodovými mutacemi v konzervovaných aminokyselinových zbytcích pravděpodobně vázajících ionty kovů. Přestože ale *in vitro* vyžaduje endonukleázová aktivita nefyziologickou koncentraci manganatých kationtů, *in vivo* je tato aktivita dostačující pro rychlou degradaci mRNA. Je tedy pravděpodobné, že *in vivo* je endonukleázová aktivita stimulována spíše kofaktory namísto kationtů, poněvadž kationtů by bylo potřeba velké množství a navíc mohou inhibovat jiné enzymatické aktivity (Schneider *et al.*, 2009; Schaeffer *et al.*, 2011).

Doména PIN má také důležitou strukturní funkci - ukázala se být významná a dostačující pro asociaci Rrp44 s jádrem exozómu – Rrp44 bez domény PIN se k jádru exozómu váže podstatně slaběji (Schneider *et al.*, 2009).

Inaktivace jen exonukleázové nebo jen endonukleázové aktivity je slučitelná s viabilitou, ale inaktivace obou aktivit má za následek nefunkční exozóm, a tudíž je letální. Tato skutečnost naznačuje určitou vzájemně redundantní, nicméně společně esenciální funkci obou aktivit (Schaeffer *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2009).

3 Vstup substrátu k aktivnímu místu proteinu Rrp44

RNA určená k exonukleolytické degradaci pomocí podjednotky Rrp44 může k aktivnímu místu tohoto enzymu přistupovat alespoň dvěma odlišnými způsoby, tedy z různých směrů. Tyto dva způsoby se liší především požadavkem na délku jednořetězcového konce a jsou pravděpodobně charakteristické pro určité typy substrátů (Wang *et al.*, 2007). Dvě možnosti vedení jednořetězcového vlákna znázorňuje Obr. 4.

3.1 Cesta přes PH-kruh

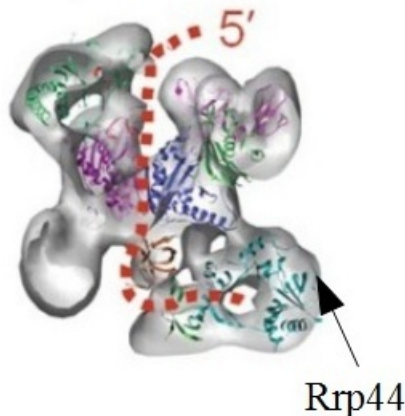
Tento způsob přístupu vyžaduje jednořetězcový přesah substrátu alespoň 15-20 nukleotidů (Wang *et al.*, 2007). Celý exozóm ale váže ideálně asi 31-33 nukleotidů jednořetězcového substrátu, Rrp44 sám o sobě váže asi 9-12 nukleotidů (při mutaci zbytků vázajících kovy v doméně PIN váže jen 8-9 nukleotidů, a to v přítomnosti i nepřítomnosti

jádra exozómu). Zbýlých přibližně 20 nukleotidů tudíž musí vázat jádro exozómu (Bonneau *et al.*, 2009).

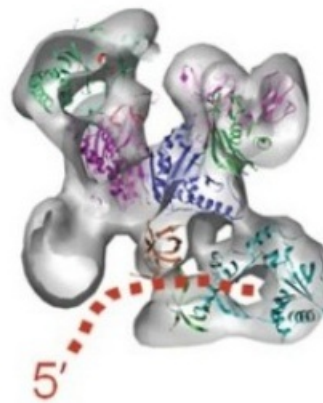
Centrální kanál tvořený PH-kruhem má poměrně konzervovanou strukturu, a díky tomu se přišlo na to, že přivádí RNA k exoribonukleáze Rrp44 a je hlavní cestou pro určité substráty. V kanálu je konzervované „vstupní místo“ (*entry site*) pro substrát a taktéž jeho „výstupní místo“ (*exit site*) a tato místa váží RNA. Předpokládá se tedy, že jednořetězcová RNA kratší než 33 nukleotidů se váže 3' koncem na exonukleázové místo Rrp44 a 5' koncem na opačnou stranu kanálu (Bonneau *et al.*, 2009).

Exozóm umí také sám rozmotávat jednoduché duplexy RNA, které mají 3' přesahující konec dostatečné délky. Tento jednořetězcový konec prochází skrz kanál a jakmile se RNA začne degradovat, díky zúženému vstupu do centrálního kanálu se sekundární struktura RNA při posouvání kanálem mechanicky rozruší, a to bez pomoci helikáz a spotřeby ATP (Bonneau *et al.*, 2009). Degradace vyžadující jednořetězcové 3' přesahy je výhodná, protože tyto přesahy mívají aberantní RNA, které jsou špatně složené nebo neschopné vázat proteinové partnery (Lorentzen *et al.*, 2008).

Cesta přes PH-kruh



Přímá cesta



Obrázek 4: Možnosti vstupu substrátu ke katalytickému místu exozómu při úpravách RNA (převzato a upraveno z Wang *et al.*, 2007).

3.2 Přímá cesta

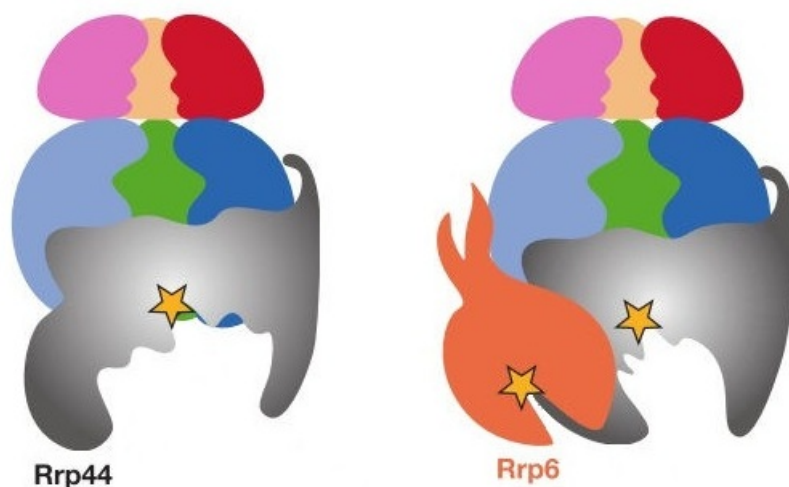
Endonukleolytické místo exozómu je přístupné i z okolního prostoru, jeho substráty tedy nemusí procházet centrálním kanálem (Bonneau *et al.*, 2009). Existence cesty, která přivádí RNA přímo z okolí k proteinu Rrp44, je pravděpodobná, poněvadž centrálním

kanálem je k Rrp44 přiváděn substrát vždy svým 3' koncem, ale Rrp44 je zřejmě schopen interagovat se substrátovým RNA i na 5' konci. Tuto skutečnost naznačuje fakt, že endonukleázová aktivita proteinu Rrp44 je stimulována 5' monofosfátem (viz kapitola 2.2.1). Vypadá to tedy, že zatímco 3' exonukleázové aktivní místo Rrp44 interaguje s 3' koncem, endonukleázové aktivní místo interaguje s 5' koncem RNA (Schaeffer *et al.*, 2009).

Tuto cestu k Rrp44 ze spodní strany komplexu pravděpodobně také využívají určité substráty, které nemají tak dlouhé jednořetězcové přesahy, aby mohly být vedeny skrz PH-kruh (Wang *et al.*, 2007).

4 Kofaktory jaderného exozómu

Základním kofaktorem jaderného exozómu je protein Rrp6. Poněvadž je, stejně jako Rrp44, funkční nukleázou, zajišťuje možná širší spektrum použití exozómu v jádře, než je tomu v cytoplazmě. Jiné nukleázy totiž s exozómem neasociují. Návrh, jak jsou nukleázy Rrp44 a Rrp6 s jádrem exozómu asociované, lze vidět na Obr. 5.



Obrázek 5: Schematické znázornění předpokládaných interakcí nukleáz s jádrem exozómu. Vlevo je znázorněn Exo10, tedy cytoplazmatický exozóm, vpravo Exo11, tedy jaderný exozóm. Hvězdičky značí katalyticky aktivní místa (převzato a upraveno z Vanacova a Stefl, 2007).

Katalyticky inaktivním interakčním partnerem Rrp6 je protein Rrp47. S exozómem dále asociuje komplex TRAMP, který exozóm rekrutuje na defektní RNA. Ke všem jaderným exozómům se také váže protein Mpp6, a další, které jsou podrobněji probrány v této kapitole.

4.1 Rrp6

Protein Rrp6 je 3'-5' exonukleáza, která je přítomna pouze v jaderné formě exozómu. K jádru exozómu se váže svou C-terminální doménou a vykazuje distributivní hydrolytickou aktivitu (Allmang *et al.*, 1999b; Burkard a Butler, 2000; Liu *et al.*, 2006; Callahan a Butler, 2008). Tato nukleáza je homologní RNáze D *E. coli* a lidskému jadernému autoantigenu PM-Scl-100, její funkce je konzervována napříč organismy (Briggs *et al.*, 1998). Hraje roli ve všech procesech využívajících jaderný exozóm, tyto procesy jsou blíže popsány v kapitole 6.1. Její chybění způsobuje letalitu za zvýšené teploty (Allmang *et al.*, 1999b).

V literatuře lze nalézt údaj, že delece genu pro exonukleázu Rrp6 v kombinaci s inaktivací exonukleázové aktivity Rrp44 není synteticky letální (Schneider *et al.*, 2009), ale má aditivní efekt při zpomalení růstu, ale taktéž údaj, že synteticky letální je, a svou funkcí se tudíž s Rrp44 částečně překrývá (Dziembowski *et al.*, 2007). Delece genu pro Rrp6 má však o něco větší efekt na zpomalení růstu než inaktivace exonukleázové aktivity Rrp44 (Schneider *et al.*, 2009).

Narozdíl od Rrp44 není exonukleázová aktivita Rrp6 přítomností exozómového komplexu inhibována, v solubilní formě vykazuje stejnou aktivitu jako v komplexu s exozómem, Rrp6 se však narozdíl od Rrp44 nepodílí na degradaci substrátů se stabilní sekundární strukturou (Liu *et al.*, 2006). Některé své funkce je protein Rrp6 schopen provádět *in vivo* i bez vazby na jádro exozómu, a to například úpravu 3' konce 5,8 S rRNA a snoRNA. Degradace jiných substrátů však vyžaduje jeho asociaci s exozómem. Jedná se především o substráty, které jsou polyadenylovány pomocí komplexu TRAMP (viz kapitola 4.3) a naváděny k exozómu. Rrp6 je v solubilní formě schopen tyto substráty deadenylovat, jejich následná degradace je však porušena, vyžaduje tedy pravděpodobně spolupráci Rrp6 se zbytkem exozómu. Při depleci Rrp44 u deletantů Rrp6 se synergisticky zvýšila akumulace takovýchto substrátů (Callahan a Butler, 2008).

4.2 Rrp47 (Lrp1)

Protein Rrp47 asociuje s Rrp6, je tedy součástí jaderného exozómového komplexu, nemá ale katalytickou aktivitu. Rrp47 není vyžadován pro expresi Rrp6 ani pro jeho asociaci s exozómem, jeho role je ale s Rrp6 spjata. Je vyžadován pro normální úpravu pre-rRNA (viz kapitola 6.1.1.1), pro syntézu snoRNA (viz kapitola 6.1.1.2) a pro normální syntézu U4 a U5 snRNA (viz kapitola 6.1.1.3), ale narozdíl od Rrp6 delece jeho genu nezpůsobuje letalitu za

zvýšené teploty. Rrp47 naopak není vyžadován pro degradaci defektní jaderné pre-mRNA (které se Rrp6 účastní), je tedy možné, že má substrátovou specifitu pouze pro stabilní RNA (Mitchell *et al.*, 2003).

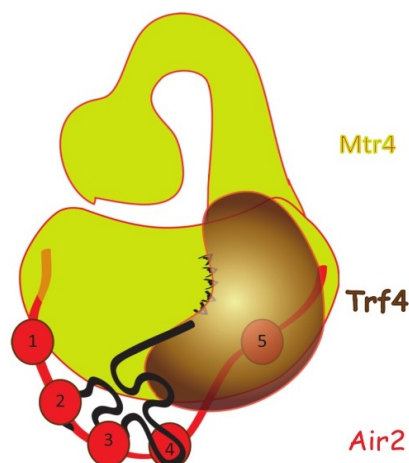
4.3 Komplex TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4 *polyadenylation complex*)

Komplex TRAMP se skládá z ATP-dependentní RNA helikázy Mtr4 (Dob1; de la Cruz *et al.*, 1998), poly(A) polymerázy Trf4 a RNA-vazebného proteinu Air2. Výrazně stimuluje degradaci strukturovaných RNA a RNA-proteinových komplexů exozómem. Je vyžadován pro procesy, kterých se účastní jaderný exozóm - hlavně pro polyadenylaci a následnou degradaci např. rRNA, snRNA a snoRNA. Dokáže také rozpoznat nesprávně složenou tRNA (viz kapitola 6.1; LaCava *et al.*, 2005; Vaňáčková *et al.*, 2005). Tvar a složení komplexu TRAMP přibližuje Obr. 6.

3'-5' helikáza Mtr4, jedna z jeho komponent, má RNA-dependentní ATPázovou aktivitu, která je efektivně stimulována některými substráty (např. tRNA), ale poly(A) substrát ji stimuluje jen slabě. Za přítomnosti ATP nebo dATP tedy dokáže rozvíjet duplexy nebo částečné duplexy substrátové RNA ve směru 3'-5'. Helikáza Mtr4 preferuje vazbu substrátů s jednořetězcovým 3' koncem a nejlépe s poly(A) sekvencí. Tyto substráty jsou podle autorů určeny pro degradaci právě proto, že je helikáza velmi silně váže, ale tento Mtr4-RNA komplex vykazuje pomalou dynamiku, helikáza je tedy v tzv. degradačním módu (Bernstein *et al.*, 2008). RNA-vazebná doména helikázy Mtr4 je esenciální pro aktivaci exozómu komplexem TRAMP (Holub *et al.*, 2012).

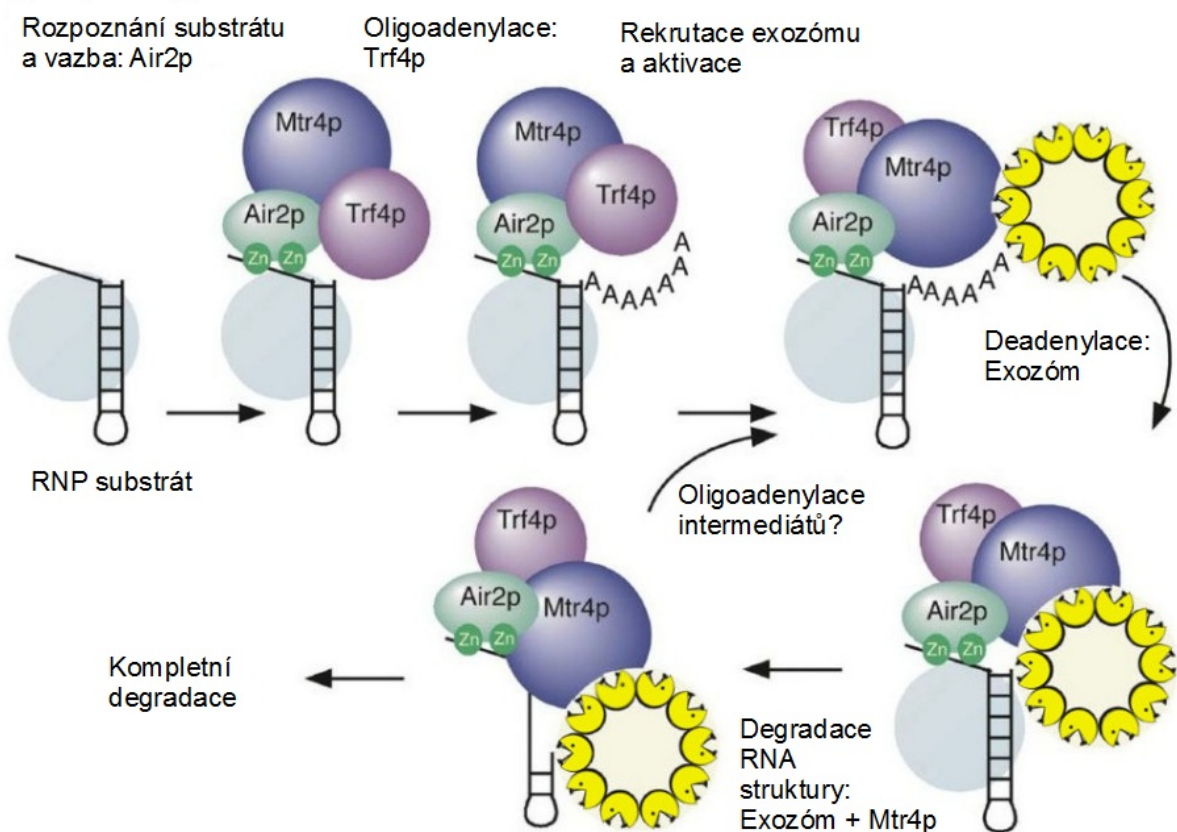
RNA-vazebný protein Air2 obsahuje několik motivů *zinc knuckle*, z nichž jeden je esenciální pro polyadenylační aktivitu komplexu TRAMP a některé z nich jsou RNA-vazebné. Air2 navíc zajišťuje spojení mezi proteiny Trf4 a Mtr4 (Holub *et al.*, 2012).

Funkce tohoto komplexu je vysvětlována dvěma různými způsoby:



Obrázek 6: Model komplexu TRAMP vázajícího RNA. Air2 zprostředkovává interakci Trf4 a Mtr4, zinc knuckle motivy 2, 3 a 4 váží substrát (převzato z Holub *et al.*, 2012).

Někteří autoři navrhují, že protein Air2 substrát (RNA, či protein v komplexu s RNA) naváže a polymeráza Trf4 přidá jednořetězcovou poly(A) sekvenci na 3' konec substrátu. Toto prodloužení umožňuje exozómu lepší přístup k substrátu. Trf4 vykazuje distributivní polymerázovou aktivitu, přidávání poly(A) je tedy pomalé a exozóm substrát stihne degradovat dřív, než se poly(A) sekvence prodlouží natolik, aby umožnila nasednutí poly(A)-vazebných proteinů a fungovala jako primer pro procesivní poly(A) polymerázu Pap1 (která naopak slouží ke stabilizaci mRNA). Tento typ polyadenylace tedy zřejmě slouží pro stimulaci degradace. Po odbourání poly(A) sekvence je pro pokračující degradaci důležitá helikáza Mtr4, která pravděpodobně rozplétá strukturované substráty na jednořetězcové a umožňuje tak exozómu efektivní degradaci. Jak polyadenylační aktivita Trf4, tak helikázová aktivita Mtr4 jsou tudíž esenciální pro aktivaci exozómu (LaCava *et al.*, 2005; Vaňáčková *et al.*, 2005). Obrazové schéma tohoto modelu je znázorněno na Obr. 7.



Obrázek 7: Jeden z modelů role komplexu TRAMP v degradaci RNA: Motivy zinc knuckle proteinu Air2 váží RNA, protein Trf4 pak substrát polyadenyluje. Rekrutace a aktivace exozómu potom vyžaduje kompletní komplex TRAMP. Aktivovaný exozóm poté rychle deadenyluje RNA a pomocí helikázy Mtr4 může penetrovat do oblastí stabilních struktur substrátu (převzato a upraveno z LaCava *et al.*, 2005).

Jiní autoři předpokládají, že komplex TRAMP přímo stimuluje hydrolytickou exonukleázovou aktivitu podjednotky Rrp6 a nikoliv exozómu, v němž Rrp6 není přítomen. Tato stimulace není závislá na ATP ani na polyadenylaci, což je v souladu s dalším tvrzením autorů, že v urychlování degradace pomocí komplexu TRAMP nehraje roli helikázová aktivita Mtr4 ani poly(A) polymerázová aktivita Trf4. Navíc autoři tvrdí, že Trf4 sice substrát polyadenyluje, ale exozóm degraduje polyadenylovaný substrát stejně účinně jako ten neadenylovaný (Callahan a Butler, 2010).

Oba návrhy se však vzájemně nemusí vylučovat. Rozdíly v těchto tvrzeních by mohly vycházet z použití odlišných substrátů. Komplex TRAMP by tedy na odlišných substrátech mohl fungovat různým způsobem.

4.4 Mpp6

Kofaktor Mpp6 je jediným proteinem *S. cerevisiae* se dvěma motivy charakteristickými pro homology fosfoproteinu 6 působícího během M-fáze (Mphosph6). Tento protein fyzicky pevně asociuje s každým jaderným exozómem. *In vitro* se silně váže na jednořetězcovou poly(U) RNA, *in vivo* zřejmě výběr vazebného místa ovlivňují další kofaktory. Delece genu *MPP6* je synteticky letální spolu s delecí genu *RRP6* nebo *RRP47*, s delecí genu pro protein Air1, ale ne s delecí genu pro Air2. Pro účinnou degradaci *non-coding* (dále jen nc) RNA je zřejmě vyžadována vzájemně zastupitelná aktivita Mpp6 a dalších kofaktorů, tyto proteiny se zřejmě účastní nasměrování exozómu (tedy Rrp44 nebo Rrp6) k substrátu, který je poté rychle degradován (viz kapitola 6.1.3 a Obr. 10). Mpp6 stejně tak hraje roli v kontrole jaderné pre-mRNA, kde pravděpodobně také pomáhá k defektním pre-mRNA exozóm nasměrovat (Milligan *et al.*, 2008).

4.5 Další kofaktory

Sekvenčně specifický RNA-vazebný protein Nrd1 interaguje s jaderným exozómem v komplexu s proteiny Nab3, Sen1 a *cap*-vazebným komplexem. Tento protein se váže na RNA a pravděpodobně ovlivňuje rozhodování exozómu, zda transkripty budou kompletně degradovány nebo jenom upravovány na 3' konci. Zřejmě nejdříve zvyšuje aktivitu exozómu - navádí ho k transkriptu, zde se ale váže do určitých míst RNA, kde vysílá pro exozóm silný

stop signál. Protože tento protein interaguje také s RNA polymerázou II, je tento proces pravděpodobně i přímo spojen s transkripcí. Studie deletantů naznačují, že se jedná o degradaci některých 3' prodloužených, tzv. *read-through* transkriptů (Vasiljeva a Buratowski, 2006). Účastní se také rozpoznání ncRNA (viz také kapitola 6.1.3 a Obr. 10; Milligan *et al.*, 2008).

Exozóm se také objevuje v komplexu s jadernými proteiny Nip7 a Nop8, které jsou oba nezbytné pro úpravu pre-RNA, ale jejich enzymatické aktivity jsou neznámé (Zanchin *et al.*, 1997; Zanchin a Goldfarb, 1999).

Kromě výše uvedených komponent exozóm asociuje také se Srp1 a Kap95, což jsou proteiny, které společně tvoří heterodimer α/β importinu. Kap95 váže exozóm k jadernému póru a usnadňuje jeho translokaci do jádra za spotřeby energie. Rrp6 zřejmě za tímto účelem obsahuje sekvenci NLS (*nuclear localization signal*) na svém C-konci. Srp1 a Kap95 se zřejmě váží na všechny jaderné exozómy, importiny i v jádře zůstávají na exozóm navázány, což může naznačovat, že jaderný exozóm možná stále osciluje mezi cytoplazmou a jádrem. Je ale také možné, že exozóm je skládán v cytoplazmě a až poté se přesunuje do jádra (Synowsky *et al.*, 2009).

5 Kofaktory cytoplazmatického exozómu

Různorodost funkcí cytoplazmatického exozómu je oproti tomu jadernému značně omezena. Možná právě proto byly identifikovány pouze dva jeho zásadní cytoplazmatické kofaktory, protein Ski7 a proteinový komplex Ski, z nichž žádný nemá nukleázovou aktivitu.

5.1 Ski7 a komplex Ski

Protein Ski7 hraje roli v 3'-5' degradaci normálních mRNA a mRNA s nesprávně ukončenou translací (viz kapitola 6.2). Vyskytuje se pouze v cytoplazmatickém exozómu a fyzicky s ním pevně asociuje pomocí své N-koncové domény. Jinou oblastí N-koncové domény se také váže na komplex Ski, který musí být intaktní, aby byl schopen interakce. Komplex Ski je tvořen RNA helikázou Ski2 a proteiny Ski3 a Ski8, a také se nachází v cytoplazmě. Interakce Ski7 s exozómem a komplexem Ski se vzájemně nevylučují a obě tyto interakce jsou nutné pro funkci proteinu Ski7 v degradaci mRNA (Widner a Wickner,

1993; Brown *et al.*, 2000; Araki *et al.*, 2001; van Hoof *et al.*, 2002; Mitchell a Tollervey, 2003).

6 Procesy, ve kterých se exozóm uplatňuje

Funkce exozómu je ve své podstatě jediná - a to degradace. Je-li však tato degradace regulovaná, může sloužit mnoha účelům. Může být degradována defektní pre-RNA ještě v jádře během transkripce, nebo mRNA již v cytoplazmě během translace. Regulovanou degradací může být ovlivněna i životnost nativní maturované mRNA. Z těchto tří uvedených procesů vyplývá, že exozóm se účastní na několika úrovních regulace genové exprese.

Úplně jinou úroveň je nedokončená degradace, která je využívána k úpravám rRNA, snRNA a snoRNA, které jsou tvořeny z dlouhých prekurzorů. Je ale důležité tuto degradaci přesně ovládat a ve správném okamžiku ji zastavit. Na stejném principu funguje i oprava defektních RNA. I zde je důležité kromě rozpoznání takové RNA také zastavení degradace v tom správném místě.

6.1 Jaderné úpravy, kontrola kvality a degradace defektních pre-RNA

Většiny procesů, kterých se účastní jaderný exozóm, se pravděpodobně účastní i všechny jeho výše uvedené jaderné kofaktory, role ne všech z nich se však prokázaly. U každého procesu budou v této práci tedy zvlášť uvedeni prokázání aktéři.

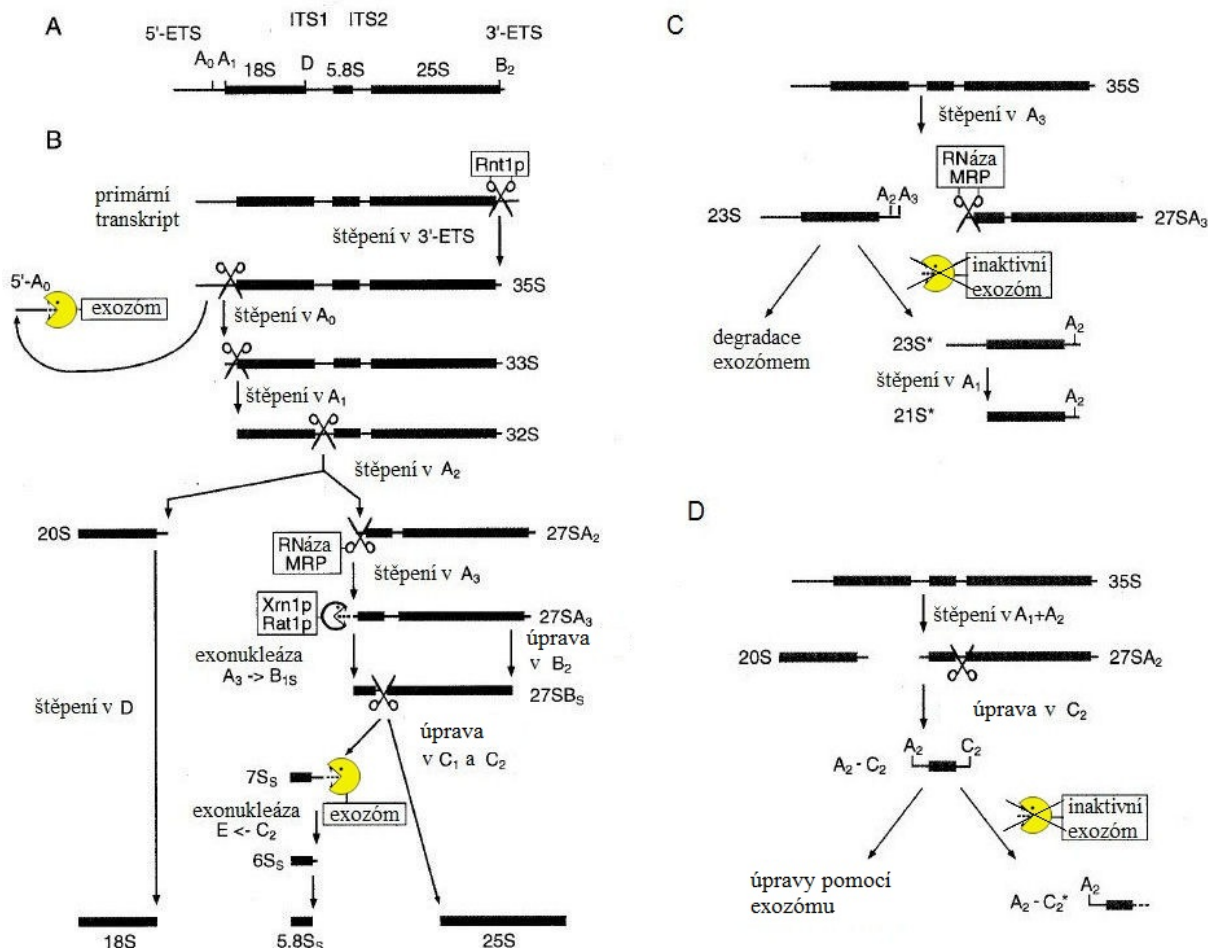
Obecně tyto procesy zahrnují úpravu 3' konce prekurzorů RNA, ale i defektních pre-mRNA, a dále degradaci defektních pre-RNA od 3' konce. Ve všech případech se jedná o exoribonukleázové štěpení.

6.1.1 Úpravy 3' konce rRNA, snoRNA, snRNA

Úpravám 3' konce těchto druhů RNA předchází vždy endonukleázové štěpení nebo sestřih, ze kterého vzniknou místa vstupu pro exonukleázy. Úpravy zahrnují alespoň dva kroky, s intermediáty prodlouženými na 3' konci, a v každém kroku se uplatňuje několik komponent exozómu, které mají odlišné funkce (Allmang *et al.*, 1999a). Úprav všech těchto RNA se účastní helikáza Mtr4, a to jako součást komplexu TRAMP (van Hoof *et al.*, 2000a; LaCava *et al.*, 2005).

6.1.1.1 Úpravy rRNA

Exozóm je esenciální pro úpravy pre-rRNA (Allmang *et al.*, 2000). Na Obr. 8B je znázorněna normální úprava rRNA u *Saccharomyces cerevisiae* z dlouhého prekurzoru rRNA (Obr. 8A).



Obrázek 8: Úpravy pre-rRNA u *Saccharomyces cerevisiae*

(A) struktura 35S pre-rRNA

(B) hlavní dráha úprav pre-rRNA

(C), (D) Úprava a degradace pre-rRNA u exozómových mutant. Inaktivace jakékoliv komponenty Exo11 způsobuje inhibici časného štěpení pre-rRNA. Hlavní intermediáty pozorované u exozómových mutant jsou produkty:

(C) inhibice štěpícího místa A₀-A₂

(D) inhibice štěpícího místa A₃ v ITS1

Dráhy v A a B se navzájem vylučují (převzato a upraveno z Allmang *et al.*, 2000).

Jaderný exozóm se uplatňuje v úpravách pre-rRNA a degradaci aberantních meziproductů úprav pre-rRNA spolu s RNA helikázou Mtr4 (komponenta komplexu TRAMP). Pro důležitost role exozómu v úpravách pre-RNA svědčí fakt, že deplece jakékoliv

komponenty Exo11 (a také Rrp47) inhibuje štěpení pre-rRNA v místech A₀, A₁, A₂ (Obr. 8C) a A₃ (Obr. 8D). V těchto buňkách tím pádem klesá hladina 32 S, 27 SA₂, 27 SA₃, 27 SB, 25 S, 20 S a 18 S pre-rRNA, a to přesto, že tyto sestřihové kroky nevyžadují 3'-5' exonukleázovou aktivitu – účinek exozómu je možná nepřímý (kontrola kvality, inhibice úprav), nebo se zde uplatňuje endonukleázová aktivita exozómu. Pro degradační aktivitu exozómu při úpravách pre-rRNA svědčí zase stabilizace určitých meziproductů (zkrácené verze 23 S, 21 S a A₂-C₂ RNA) při depleci některých z komponent Exo11 (Allmang *et al.*, 2000, Mitchell *et al.*, 2003).

K úpravě 3' konce 7 S pre-rRNA na 5,8 S rRNA jsou také nutné všechny komponenty exozómu (Exo10, ne Rrp6) spolu s RNA helikázou Mtr4 (tedy celým TRAMP komplexem). Během těchto úprav se alespoň dvakrát změní specifita exonukleázy – tzv. *hand-over* („předání“). Po vzniku intermediátu 5,8 S prodlouženého o 30 nukleotidů sekvence ITS2 (*internal transcribed spacer*) na 3' konci je pro vznik 6 S (5,8 S + 8) pre-rRNA vyžadován především protein Rrp6 spolu s Rrp47. Nicméně tento 5,8 S + 30 prodloužený intermediát je ale také v případě delece genu *RRP6* schopen se sestavovat do 60 S ribozómových podjednotek. Konečné úpravy neboli „zastřihávání“ opět zajišťují ostatní komponenty exozómu (Mitchell *et al.*, 1997; Briggs *et al.*, 1998; Allmang *et al.*, 1999a; Allmang *et al.*, 1999b; Mitchell *et al.*, 2003).

6.1.1.2 Úpravy snoRNA (*small nucleolar RNA* – malé jadéřkové RNA)

Některých kroků při maturaci snoRNA, vystřihávaných z dlouhých polycistronních prekurzorů (U14 – dicistronní), z intronů v mRNA (U18 a U24) nebo i samostatných transkriptů se účastní exozóm. Exozóm nejdříve deadenyluje 3' konce polyadenylované polymerázou Trf4 v komplexu TRAMP. I zde je potřeba helikáza Mtr4 pro umožnění degradace samotné RNA exozómem. Pro finální úpravy je potom speciálně vyžadován Rrp6 spolu s Rrp47 (Allmang *et al.*, 1999a; van Hoof *et al.*, 2000a; Mitchell *et al.*, 2003). Schéma syntézy jedné z takových snoRNA je zakresleno na Obr. 9A.

6.1.1.3 Úpravy snRNA (*small nuclear RNA* – malé jaderné RNA)

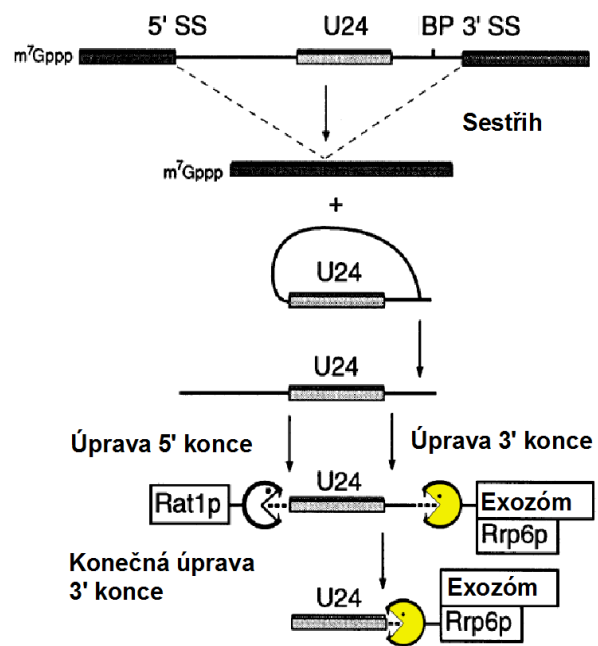
Exozóm spolu s Rrp6 a Rrp47 se účastní úprav pre-snRNA s prodlouženým 3' koncem na spliceosomální U1, U4 a U5 snRNA ve spolupráci s endoribonukleázou Rnt1 a helikázou Mtr4, tedy s komplexem TRAMP. Exozóm zde opět figuruje při deadenylaci, degradaci

3' konce a finálních úpravách (Allmang *et al.*, 1999a; van Hoof *et al.*, 2000a; Mitchell *et al.*, 2003). Nákres úprav snRNA je na Obr. 9B.

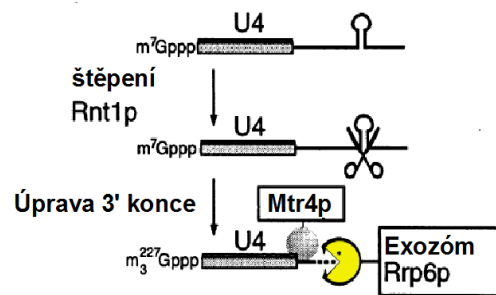
6.1.2 Degradace tRNA

Důležitou roli v rozpoznání a degradaci defektní $tRNA_i^{Met}$ hraje protein Rrp44. Rrp44 je jako jediná komponenta exozómu schopna rozpoznat hypomodifikovanou (nemetylovanou) iniciační $tRNA_i^{Met}$, poté odstraňuje čtyři přesahující nestrukturované nukleotidy na jejím 3' CCA konci. K další degradaci stabilní struktury je nutný také komplex TRAMP, který stimuluje aktivitu Rrp44. Degradace je taktéž závislá na ATP a poly(A) polymerázové aktivitě Trf4. Je možné, že Rrp44 a komplex TRAMP nejsou schopny vázat správně složenou a modifikovanou tRNA, ale jsou schopny vázat špatně složenou tRNA. Po degradaci 3' přesahujícího konce pomocí Rrp44 polymeráza Trf4 pravděpodobně přidává k substrátu jednořetězcovou poly(A) sekvenci, která umožní silnější vazbu do RNA-vazebného místa (Schneider *et al.*, 2007). Pravděpodobný model degradace tRNA znázorňuje Obr. 7.

A Syntéza U24 RNA



B Syntéza U4 RNA



Obrázek 9: Dráhy úprav snoRNA a snRNA:

(A) Úpravy U24 snoRNA: Vystřihnutí intronu z mRNA - tvorba lariátové struktury, poté linearizace (tzv. debranching) a úpravy. BP značí branch point, místo spojení lariátu, 5' a 3' exony jsou znázorněny jako tmavé boxy, konečná U24 snoRNA je znázorněna jako světlý box a zbývající část intronu jako jednoduchá čára.

(B) Úpravy U4 snRNA: Rnt1p odstříhne 3' koncovou strukturu, poté zde může nasednout exozóm a degraduje RNA ve spolupráci s helikázou Mtr4, tedy s komplexem TRAMP. Jednotlivé komponenty exozómu však nejsou pro sestřih těchto RNA esenciální, což naznačuje, že v úpravách 3' konce existují i zástupné aktivity (převzato a upraveno z Allmang *et al.*, 1999).

6.1.3 Kontrola kvality mRNA před exportem z jádra a degradace pre-RNA

Exozóm rozpoznává v jádře mRNA s aberantním 3' koncem, tedy hypoadenylovanou nebo hyperadenylovanou mRNA, zadržuje ji v místě transkripce a poté ji degraduje. Na tomto rozpoznávání spolupracují i podjednotka Rrp6 a komponenta komplexu TRAMP, helikáza Mtr4 (Hilleren *et al.*, 2001).

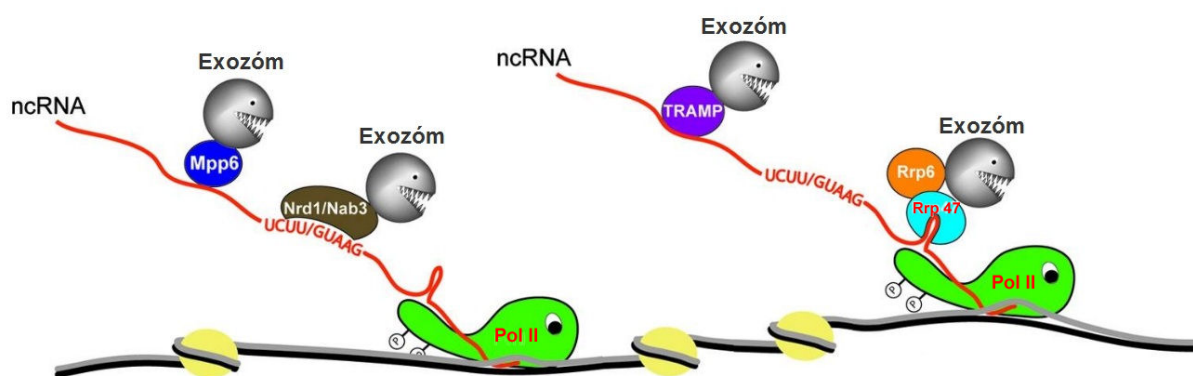
Exozóm se také účastní eliminace dlouhých 3' prodloužených pre-mRNA, tzv. *read-through* transkriptů. Exozóm spolu se svými jadernými kofaktory, především proteiny Rrp6 a Mtr4 (tedy komplexem TRAMP) tyto aberantní pre-mRNA odbourává od 3' konce. Rrp6 se i zde účastní hlavně odbourání několika posledních nukleotidů. Exozómový komplex se po odbourání prodlouženého konce zastaví v blízkosti místa (ve 3' směru), kde se u normálních pre-mRNA zahajuje polyadenylace. V tomto zastavení možná hrají roli proteiny vázané na RNA (Torchet *et al.*, 2002). V kapitole 4.5 bylo již uvedeno, že jedním z takových proteinů by mohl být Nrd1 (Vasiljeva a Buratowski, 2006). O tom, co se bude dít dál, rozhoduje jakýsi „dohlížecí“ (*surveillance*) komplex, který je citlivý na zdroj uhlíku v médiu. Jestliže je v médiu glukóza, *surveillance* komplex je aktivován a řídí exozóm k úplné degradaci transkriptu. Pro tuto degradaci je speciálně vyžadován protein Rrp6. Jestliže je v médiu jiný zdroj uhlíku, *surveillance* komplex se neaktivuje, exozóm už dále nedegraduje a pre-mRNA je polyadenylována a vzniká funkční mRNA připravená pro translaci. Glukóza je totiž bohatý zdroj uhlíku, a jestliže je tohoto zdroje dostatek, může si buňka dovolit „plýtvat“ a špatné RNA degradovat. Naopak, je-li k dispozici méně vhodný zdroj uhlíku, buňka pro změnu „šetří“ a snaží se aberantní RNA „opravit“ a ještě využít (Torchet *et al.*, 2002).

Stejně tak exozóm kontroluje i pre-mRNA s defekty sestřihu. Exo10 se zde tentokrát uplatňuje stejným způsobem jako Rrp6, i když ve větší míře než Rrp6 (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000; Torchet *et al.*, 2002). Při inhibici této degradační dráhy se zvyšuje počet sestřižených mRNA a naopak při inhibici sestřihu se zvyšuje degradační aktivita, což pravděpodobně znamená, že degradace nesestřižených pre-mRNA kompetuje se sestřihem a je možná předmětem metabolické kontroly. Degradace je také stimulována přítomností glukózy v médiu. K této 3'-5' degradační dráze existuje i alternativní dráha ve směru 3'-5' pomocí jaderné exoribonukleázy Rat1 (Johnson, 1997; Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000), tato dráha je však minoritní (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000).

Rychlá degradace mRNA obsahujících AU bohaté úseky je rovněž závislá na exozómu. Jak pouze základně vybavený exozóm (Exo10), tak exozóm obsahující ještě Rrp6 (Exo11) preferuje substráty s 3' koncovými úseky bohatými na AU (*AU-rich elements*, ARE) uvnitř

sekvencí 3' UTR (*untranslated region*). Exo11 tyto substráty ale degraduje podstatně rychleji než Exo10. Pro degradaci poly(A) substrátu už je potřebný nejméně Exo11 (Liu *et al.*, 2006).

Degradace ncRNA, tedy RNA transkribovaných z intergenových oblastí, je velmi redundantní proces, účastní se ho alespoň čtyři kofaktory – Mmp6, Rrp47, heterodimer Nrd1-Nab3 a komplex TRAMP, které směřují ncRNA alespoň ke dvěma nukleázám – Rrp6 a Rrp44. Zřejmě se zde uplatňuje kompetice těchto kofaktorů o substrát (Milligan *et al.*, 2008). Několik modelů rekrutace exozómu k ncRNA a následné degradace je vyobrazeno na Obr. 10.



Obrázek 10: K nekódujícím RNA je exozóm naváděn kotranskripčně mnoha kofaktory, což přispívá k rychlé degradaci. Navádění exozómu k těmto substrátům je pravděpodobně redundantní proces, poněvadž může být zajišťován kofaktorem Mmp6, heterodimerem Nrd1-Nab3, komplexem TRAMP nebo Rrp47. Stejně tak při degradaci mají vzájemně zástupnou funkci exonukleázy Rrp44 a Rrp6 (převzato a upraveno z Milligan *et al.*, 2008).

6.2 Cytoplazmatická degradace normálních i defektních mRNA

Cytoplazmatický exozóm především reguluje životnost maturovaných mRNA a degraduje RNA s chybami v translaci. Tři majoritní dráhy zprostředkované exozómem jsou uvedeny níže.

Cytoplazmatický exozóm ale rychle degraduje i ribozymem (endonukleolyticky) štěpenou neadenylovanou RNA po translaci. Podjednotka Rrp44 je nezbytná pro rychlou degradaci takovéto ribozymem štěpené mRNA, obě nukleázové aktivity Rrp44 jsou tyto transkripty schopny samy degradovat (Meaux a Van Hoof, 2006; Schaeffer *et al.*, 2011). Tuto dráhu pro zvláštní druh aberantní RNA nelze jednoznačně zařadit do žádné z níže uvedených kategorií.

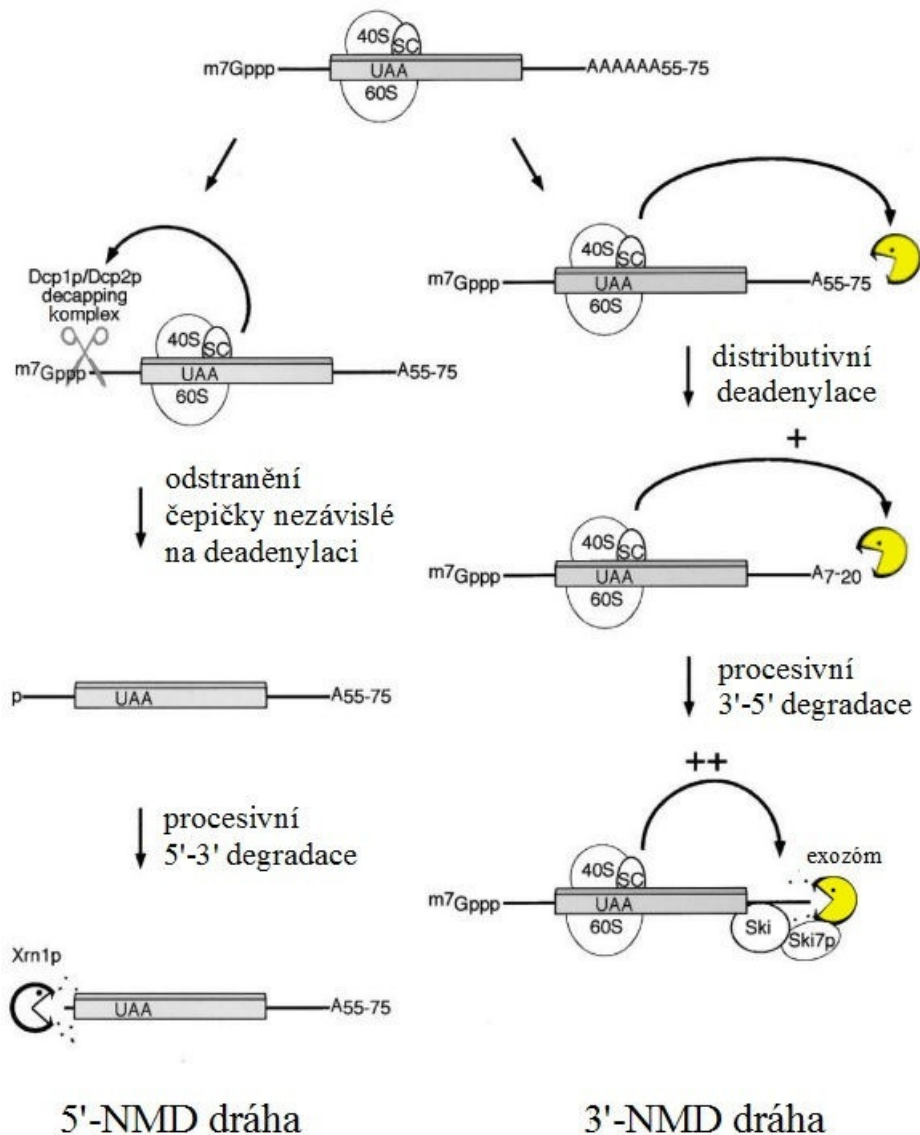
6.2.1 3'-5' degradace normálních mRNA (*exosome-mediated normal mRNA decay*)

Cytoplazmatickým exozómem zprostředkovaná degradace normálních mRNA představuje alternativní cestu k 5'-3' mRNA degradační dráze (Anderson a Parker, 1998; Araki *et al.*, 2001). Zrušení jen jedné z těchto dvou drah nevede k neživotaschopnosti, přestože degradace mRNA je esenciální pro viabilitu. Tyto dráhy jsou tedy navzájem zastupitelné, a představují základní mechanismus degradace mRNA pro buňku, poněvadž přerušení obou z nich je letální. V 3'-5' mRNA degradační dráze jsou také vyžadovány proteiny komplexu Ski Ski2, Ski3 a Ski8 (Anderson a Parker, 1998; van Hoof *et al.*, 2000b). Navíc je nutná N-koncová část Ski7, která interaguje s exozómem a komplexem Ski (viz kapitola 5.1), zatímco jeho C-koncová část v tomto typu degradace nehraje roli (Araki *et al.*, 2001; van Hoof *et al.*, 2002).

Do této dráhy se zřejmě nezapojuje endonukleázová aktivita Rrp44. Delece genu pro neesenciální 5'-3' exonukleázu Xrn1, která v cytoplazmě degraduje normální mRNA (Larimer a Stevens, 1990), totiž není v kombinaci s inaktivací endonukleázové aktivity Rrp44 synteticky letální. Naproti tomu delece genu pro Xrn1 v kombinaci s inaktivací 3' exonukleázové aktivity Rrp44 synteticky letální je, exonukleázová aktivita Rrp44 se tedy této dráhy účastní (Schneider *et al.*, 2009). Navíc i s mutací jiné komponenty 5'-3' mRNA degradační dráhy, Dcp1 (podjednotka Dcp1-Dcp2 *decapping* enzymu, který odstraňuje 5' čepičku z mRNA před degradací; Beelman *et al.*, 1996), je inaktivace exonukleázové aktivity Rrp44 synteticky letální (Schaeffer *et al.*, 2011).

6.2.2 3'-NMD dráha (*nonsense-mediated decay*)

Exozóm se účastní i degradace mRNA s předčasným terminačním kodónem (PTC - *premature termination codon*). Tato 3'-NMD dráha je alternativní cestou ke klasické 5'-NMD dráze. Schéma obou těchto alternativních drah NMD je znázorněno na Obr. 11. 3'-NMD dráha je narozdíl od 5'-NMD nezávislá na funkci *decapping* enzymu Dcp1. Vyžaduje ale helikázu Upf1 (neboli Nam7, která je součástí komplexu targetujícího transkripty, tzv. *surveillance* komplexu; Sheth a Parker, 2006). Nutnou součástí 3'-NMD dráhy je distributivní deadenylace, která deadenyluje substrát na oligoadenylovanou formu. Poté je mRNA procesivně degradována. Pro rychlou procesivní 3'-5' degradaci v 3'-NMD dráze jsou vyžadovány cytoplazmatický exozóm a komplex Ski (obsahující RNA helikázu Ski2) spolu s proteinem Ski7 (Mitchell a Tollervey, 2003).



Obrázek 11: Schéma kvasinkové dráhy NMD

Rozpoznání předčasných terminačních kodónů zahrnuje interakce mezi ribozómem a „dohlížecím“ komplexem (SC - surveillance complex). Nesprávná terminace spouští dráhu NMD. V 5'-NMD dráze je rychle odstraněna čepička, což odhalí mRNA pro 5'-3' degradaci pomocí Xrn1. V 3'-NMD dráze je mRNA nejdříve deadenylována na oligoadenylovaný intermediát se 7-20 nukleotidů dlouhým poly(A) koncem. Následuje procesivní 3'-5' degradace cytoplazmatickým exozómem za pomoci komplexu Ski. Deadenylace a degradace v dráze NMD je rychlejší než u divokého typu mRNA (převzato a upraveno z Mitchell a Tollervey, 2003).

Tyto poznatky ukazují, že ve 3'-NMD dráze a v obecném 3' obratu RNA (3' turnover) funguje stejný enzymatický aparát, ale jeho aktivita je výrazně zesílena na transkriptech obsahujících PTC (Mitchell a Tollervey, 2003).

3'-NMD dráha (narozdíl od obecného 3' obratu) je blokována inhibicí translace, z čehož vyplývá, že k degradaci transkriptů obsahujících PTC je vyžadována probíhající

translace. Spíše než počáteční kontrola mRNA zde tedy pravděpodobně funguje nepřetržitá kontrola kompetence substrátu pro 3'-NMD dráhu (Mitchell a Tollervey, 2003).

6.2.3 Degradace nonstop mRNA (*nonstop decay*)

Nonstop mRNA (mRNA bez stop kodónu) jsou cytoplazmatickým exozómem rychle degradovány ve směru 3'-5', tedy od poly(A) konce. Tato degradace vyžaduje kofaktory - C-koncovou GTPázovou doménu Ski7 a komplex Ski obsahující Ski2, Ski3 a Ski8 (van Hoof *et al.*, 2002). Této dráhy se naopak neúčastní enzymy jiných cytoplazmatických degradačních drah, například exonukleáza Xrn1, helikáza Upf1 nebo odstraňovač čepičky Dcp1 (Frischmeyer *et al.*, 2002).

Pro tuto degradaci je také vyžadována probíhající translace. Obecně substráty pro nonstop dráhu vznikají jako důsledek snížení přesnosti translace a nesprávného přečtení terminačních tripletů ribozómem (*read-through*, tzv. „pročtení“ ribozómu). Degradace těchto transkriptů je velmi pravděpodobně regulována, podobně jako degradace *read-through* transkriptů v jádře, viz kapitola 6.1.3. Pro nonstop dráhu jsou substrátem mnohé fyziologické transkripty, které jsou předčasně polyadenylovány (Frischmeyer *et al.*, 2002).

Nonstop mRNA efektivně degradují exonukleázová i endonukleázová aktivita Rrp44, ani jedna z nich ale pro degradaci nonstop mRNA sama o sobě není nezbytná – inaktivace jedné z nich stabilitu nonstop mRNA neovlivní, alespoň jedna z nich je však k degradaci nonstop mRNA vyžadována. Obě aktivity působí ve stejném kroku nonstop dráhy. Můžeme tedy nonstop dráhu zařadit k endonukleázou zprostředkovaným drahám (Schaeffer *et al.*, 2011).

7 Závěr

Cílem této práce bylo popsat složení exozómového komplexu a jeho nejdůležitější interakční partnery a dále shrnout dosavadní poznatky o nejvýznamnějších rolích tohoto komplexu v buňce.

Jaderný exozóm se účastní úprav rRNA, snoRNA a snRNA, dále degraduje různé defektní tRNA, rozpoznává a štěpí i defektní pre-RNA, a to RNA s aberantním 3' koncem, 3' prodloužené RNA, RNA s defekty sestřihu, RNA bohaté na A a U úseky a nekódující RNA.

Cytoplazmatický exozóm potom degraduje mRNA, které tvoří nesprávně dlouhé proteiny, tedy RNA bez stop kodónu nebo s předčasně se vyskytujícím stop kodónem. Dále také degraduje normální mRNA, které už splnily svou funkci, a ribozymem štěpené mRNA.

Exozóm se tedy účastní regulace hladiny jednotlivých RNA - kontroluje jejich způsobilost k předurčeným funkcím, reguluje jejich životnost. Účastní se i maturace některých z nich. Je tedy i důležitým nástrojem genové exprese.

Komplex je stejně jako všechny jeho základní části nezbytný pro život a růst buňky, a proto se mu věnuje posledních patnáct let, tedy od jeho objevu, ve výzkumu velká pozornost. Ve chvíli, kdy byl objeven, se zřejmě nepočítalo s tím, že bude zastávat tolik rozmanitých životně důležitých funkcí, a to jak v jádře, tak v cytoplazmě. Je to bezpochyby jedna z nejdůležitějších degradačních komponent v buňce, ne-li ta nejdůležitější.

Seznam použité literatury

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., & Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO Journal*, 18(19), 5399-410.

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., & Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes & Development*, 13(16), 2148-58.

Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E., & Tollervey, D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Research*, 28(8), 1684-91.

Anderson, J. S. J., & Parker, R. (1998). 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. *The EMBO Journal*, 17(5), 1497-1506.

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

Beelman, C. A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T. E., Hatfield, L., Fortner, D. M., & Parker, R. (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature*, 382(6592), 642-6.

Bernstein, J., Patterson, D. N., Wilson, G. M., & Toth, E. A. (2008). Characterization of the essential activities of *Saccharomyces cerevisiae* Mtr4p, a 3'→5' helicase partner of the nuclear exosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4930-42.

Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., & Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell*, 139(3), 547-59.

Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., & Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell*, 102(6), 765-75.

Briggs, M. W., Burkard, K. T., & Butler, J. S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5,8 S rRNA 3' end formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13255-63.

Brown, J. T., Bai, X., & Johnson, A. W. (2000). The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA (New York, N.Y.)*, 6(3), 449-57.

Burkard, K. T., & Butler, J. S. (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 604-16.

- Callahan, K. P., & Butler, J. S. (2008).** Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Research*, 36(21), 6645-55.
- Callahan, K. P., & Butler, J. S. (2010).** TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3540-7.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., & Linder, P. (1998).** Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(4), 1128-40.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., & Séraphin, B. (2007).** a single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(1), 15-22.
- Frischmeyer, P. A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerío, A. L., Parker, R., & Dietz, H. C. (2002).** An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2258-61.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., & Jensen, T. H. (2001).** Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature*, 413(6855), 538-42.
- Holub, P., Lalakova, J., Cerna, H., Pasulka, J., Sarazova, M., Hrazdilova, K., Arce, M. S., Hobor, F., Stefl, R., & Vanacova, S. (2012).** Air2p is critical for the assembly and RNA-binding of the TRAMP complex and the KOW domain of Mtr4p is crucial for exosome activation. *Nucleic Acids Research*, 1-15.
- Johnson, A. W. (1997).** Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 6122-30.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., & Tollervey, D. (2005).** RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, 121(5), 713-24.
- Larimer, F. W., & Stevens, A. (1990).** Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'→3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene*, 95(1), 85-90.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., & Séraphin, B. (2008).** Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature*, 456(7224), 993-6.
- Lima, C. D., & Januszyk, K. (2010).** Structural components and architectures of RNA exosomes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 702, 9-28.
- Liu, Q., Greimann, J. C., & Lima, C. D. (2006).** Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, 127(6), 1223-37.
- Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., & Conti, E. (2008).** Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Molecular Cell*, 29(6), 717-28.

- Luz, J. S., Tavares, J. R., Gonzales, F. A., Santos, M. C. T., & Oliveira, C. C. (2007).** Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* exosome architecture and of the RNA binding activity of Rrp40p. *Biochimie*, *89*(5), 686-91.
- Meaux, S., & Van Hoof, A. (2006).** Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. *RNA (New York, N.Y.)*, *12*(7), 1323-37.
- Milligan, L., Decourty, L., Saveanu, C., Rappsilber, J., Ceulemans, H., Jacquier, A., & Tollervey, D. (2008).** a yeast exosome cofactor, Mpp6, functions in RNA surveillance and in the degradation of noncoding RNA transcripts. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(17), 5446-57.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., & Tollervey, D. (1997).** The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, *91*(4), 457-66.
- Mitchell, P., & Tollervey, D. (2003).** An NMD Pathway in Yeast Involving Accelerated Deadenylation and Exosome-Mediated 3'→5' Degradation. *Yeast*, *11*(5), 1405-1413.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., & Tollervey, D. (2003).** Rrp47p Is an Exosome-Associated Protein Required for the 3J Processing of Stable RNAs. *Society*, *23*(19), 6982-6992.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F. P., Dastidar, E. G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C. M. & van Hoof, A. (2009).** The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(1), 56-62.
- Schaeffer, D., & van Hoof, A. (2011).** Different nuclease requirements for exosome-mediated degradation of normal and nonstop mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(6), 2366–2371.
- Schneider, C., Anderson, J. T., & Tollervey, D. (2007).** The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition. *Molecular Cell*, *27*(2), 324-31.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., & Tollervey, D. (2009).** The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Research*, *37*(4), 1127-40.
- Sheth, U., & Parker, R. (2006).** Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell*, *125*(6), 1095-109.
- Shiomi, T., Fukushima, K., Suzuki, N., Nakashima, N., Noguchi, E., & Nishimoto, T. (1998).** Human dis3p, which binds to either GTP- or GDP-Ran, complements *Saccharomyces cerevisiae* dis3. *The Journal of Biochemistry* *123*(5), 883-90.
- Synowsky, S. A., van Wijk, M., Raijmakers, R., & Heck, A. J. R. (2009).** Comparative multiplexed mass spectrometric analyses of endogenously expressed yeast nuclear and cytoplasmic exosomes. *Journal of Molecular Biology*, *385*(4), 1300-13.

- Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., & Tollervey, D. (2002).** Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Molecular Cell*, 9(6), 1285-96.
- van Hoof, A., Lennertz, P., & Parker, R. (2000a).** Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 441-52.
- van Hoof, A., Staples, R. R., Baker, R. E., & Parker, R. (2000b).** Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 8230-43.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., & Parker, R. (2002).** Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2262-4.
- Vaňáčová, Š., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., & Keller, W. (2005).** a new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biology*, 3(6), 986-997.
- Vanacova, S., & Stefl, R. (2007).** The exosome and RNA quality control in the nucleus. *EMBO Reports*, 8(7), 651-7.
- Vasiljeva, L., & Buratowski, S. (2006).** Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Molecular Cell*, 21(2), 239-48.
- Wang, H.-W., Wang, J., Ding, F., Callahan, K., Bratkowski, M. A., Butler, J. S., Nogales, E., & Ke A. (2007).** Architecture of the yeast Rrp44 exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3' end processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16844-9.
- Widner, W.R., & Wickner, R. B. (1993).** Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7), 4331-41.
- Zanchin, N.I., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., & Goldfarb, D. S. (1997).** *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5001-15.
- Zanchin, N. I., & Goldfarb, D. S. (1999).** Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1518-25.