

CÍLENÝ POSUN ČTECÍHO RÁMCE – TRANSLACE ALTERNATIVNÍCH PRODUKTŮ

ZDENA SMÉKALOVÁ a TOMÁŠ RUML

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 3,
166 28 Praha 6
smekaloz@vscht.cz, tomas.ruml@vscht.cz

Došlo 12.3.06, přijato 11.5.06.

Klíčová slova: posun čtecího rámce, translace, ribosom,
mRNA, retrovirus

Obsah

1. Úvod
2. Typy cíleného posunu čtecího rámce
3. Mechanismus posunu čtecího rámce
 - 3.1. Cílený (+1) posun čtecího rámce u prokaryot
 - 3.2. Cílený (+1) posun čtecího rámce u eukaryot
 - 3.3. Cílený (–1) posun čtecího rámce u eukaryot
 - 3.4. Role mRNA
 - 3.5. Role modifikovaných tRNA
 - 3.6. Inhibice peptidyltransferasy
4. Uměle stimulovaný (–1) posun čtecího rámce
5. Závěr

1. Úvod

Přestože translace mRNA je velmi přesným a dobře regulovaným procesem, dochází k chybám i na této úrovni^{1–3}. K zařazení nesprávné aminokyseliny do molekuly proteinu dochází s četností nižší než $3 \cdot 10^{-3}$. Ve většině případů má záměna jedné aminokyseliny minimální vliv na funkci či aktivitu daného proteinu, což může být jedním z důvodů, proč nedošlo k vývoji přesnějšího mechanismu výběru aminoacyl-tRNA při translaci. Translační chyby se změněným smyslem mohou být způsobeny buď vazbou nesprávné aminokyseliny na tRNA pomocí aminoacyl-tRNA synthetasy nebo inkorporací nesprávné, tj. kodonu neodpovídající, tRNA do aminokyselinového (A) místa ribosomu. Taková tRNA se zpravidla páruje s kodonem pouze dvěma bázemi, což může mít v důsledku degenerovaného genetického kódu za následek zařazení strukturálně podobné (někdy i těžce) aminokyseliny vzhledem k aminokyselině kódované.

Vážnější jsou chyby vedoucí k předčasné terminaci translace, například spontánní disociací peptidyl-tRNA

z peptidového (P) místa ribosomu v důsledku zařazení nesprávné aminoacyl-tRNA. Chyby vedoucí ke změně čtecího rámce mívají rovněž fatální důsledky pro syntézu funkčního proteinu. Důvodem je kompletní změna sekvence od místa posunu a předčasná terminace v důsledku častého výskytu stop kodonů v posunutých, nekódujících čtecích rámcích. Četnost výskytu chyb v důsledku posunu čtecího rámce je nižší, asi $3 \cdot 10^{-5}$, než výskyt chyb se změněným smyslem nebo disociace peptidyl-tRNA^{2–4}.

Určité motivy mRNA účinně stimulují děje podobné translačním chybám, jejichž četnost je pak o několik řádů vyšší. Jistý podíl ribosomů pak pokračuje v translaci ve čtecím rámcí posunutém o (–1) nebo (+1) nukleotid nebo dokonce po vynechání určitého úseku mRNA. Jiné motivy mRNA stimulují pročtení stop kodonu^{2–6}. Účinnost posunu čtecího rámce se pohybuje v rozmezí od 1 % do 50 % v závislosti na strukturálních motivech mRNA, které místu posunu čtecího rámce předcházejí nebo je následují. Tyto sekvence zpomalují proces translace, a tak zvyšují pravděpodobnost posunu čtecího rámce, který je při normální rychlosti translace velmi nepravděpodobný. Jde tedy o kineticky řízené procesy².

2. Typy cíleného posunu čtecího rámce

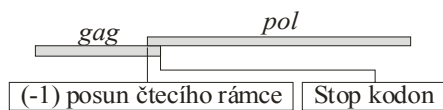
Typy posunu čtecího rámce lze klasifikovat podle mechanismu (posun o jeden nukleotid ve směru nebo proti směru translace) nebo podle polohy místa posunu v genu a s tím souvisejícího vlivu na předčasnou terminaci a vznik funkčního proteinu. Dle jejich fyziologického významu klasifikujeme posuny čtecích rámců do tří tříd².

Třída 1

K posunu čtecího rámce první třídy dochází před 3' koncem genu. Většina ribosomů překládá celý gen v jednom čtecím rámcí a k terminaci je využit stop kodon daného genu. Malé procento ribosomů však před koncem prvního genu změni čtecí rámeček a pokračuje v translaci v novém (posunutém) čtecím rámcí stovky až tisíce nukleotidů za stop kodon genu překládaného v původním čtecím rámcí. Účelem takového posunu čtecího rámce je syntéza proteinů, které sdílejí stejnou N-terminální část. C-Terminální prodloužení může způsobit pozměněnou biologickou aktivitu nebo jinak ovlivnit funkci N-terminální části.

Velmi detailně je posun čtecího rámce tohoto typu prostudován u retrovirů, kde se uplatňuje při regulaci vzájemného poměru strukturálních proteinů tvořících schránku kapsidy a retrovirových enzymů, jichž je zapotřebí řádově menší množství. Zralý virion obsahuje strukturální proteiny tvořící kapsidu: matrixový, kapsidový, nukleokapsidový, které jsou společné všem retrovirům a některé další proteiny specifické pro jednotlivé retroviry. Tyto proteiny jsou

Uspořádání genů *gag* a *pol* v genomu HIV-1 po přepisu do mRNA:



Polyproteinové prekurzory:



Obr. 1. Schematické znázornění uspořádání genů *gag* a *pol* v genomu viru lidské imunodeficiency (HIV-1); gen *gag* kóduje základní polyproteinový prekurzor Gag (A), při jehož syntéze nedochází k posunu čtecího rámce. Produkty genu *pol* jsou syntetizovány ve fúzi s produktem genu *gag* za vzniku polyproteinu Gag-Pol (B), v důsledku posunu čtecího rámce před koncem genu *gag* o jeden nukleotid zpět

ve virionu přítomny v ekvimolárním množství, neboť vznikají specifickým štěpením společného polyproteinového prekurzoru (Gag). Všechny retroviry obsahují také enzymy: proteasu, reversní transkriptasu a integrasu^{7,8}, které jsou kódovány společným genem (*pol*) a vznikají tedy také nejprve ve formě prekurzoru. Obecně, genom retrovirů obsahuje geny *gag*, *pol* (obr. 1) a *env* (kódující transmembránové glykoproteiny, které vznikají ze sestřižené RNA a nepodléhají tedy posunu čtecího rámce, proto o nich není v tomto přehledu pojednáno). U většiny retrovirů vzniká prekurzor retrovirových enzymů (z genu *pol*) ve formě fúzního produktu s polyproteinem Gag, tedy jako Gag-Pol.

Při translaci většina ribosomů využije k terminaci stop kodon genu *gag* a syntetizuje pouze polyprotein Gag. U 5–20 % ribosomů dochází před koncem genu *gag* k posunu čtecího rámce o jeden nukleotid zpět, a tak se stop kodon genu *gag* dostává mimo čtecí rámec. Tyto ribosomy pokračují v translaci genu *pol*, za vzniku fúzního polyproteinu Gag-Pol. Tento mechanismus zajišťuje stejnou N-terminální část polyproteinů Gag i Gag-Pol, která je nezbytná pro jejich inkorporaci do nezralé virové částice. Účinnost posunu čtecího rámce je u jednotlivých druhů retrovirů dána fyziologicky, a tak je zajištěn správný poměr strukturních proteinů a enzymů, jehož zachování je nezbytné pro vznik zralé infekční virové částice.

Tento typ (–1) posunu čtecího rámce se uplatňuje také při expresi minoritního kapsidového proteinu bakteriofága T7, infikujícího *Escherichia coli*². Vzniká tak alternativní forma hlavního kapsidového proteinu. Podobný jev byl pozorován např. u hlavního kapsidového proteinu bakteriofága A2 *Lactobacillus* A2 (cit.⁹).

Třída 2

Posun čtecího rámce druhé třídy má jiný účel než

první typ a výsledkem je zkrácená forma proteinu. V původním čtecím rámci vzniká funkční protein, ale ribosomy posunuté do nového čtecího rámce syntetizují kratší formu s odlišnou funkcí. Např. expresí genu *dnaX* *E. coli* v původním čtecím rámci vzniká protein DnaX, který má 640 aminokyselin a tvoří τ podjednotku DNA polymerasy III. Přibližně polovina ribosomů je po inkorporaci 430. aminokyseliny posunuta do čtecího rámce (–1), ve kterém připojí jedinou aminokyselinu a poté dojde k terminaci na kodonu UGA za vzniku γ podjednotky enzymu^{5,10}.

Třída 3

K posunu čtecího rámce třetího typu dochází krátce po iniciaci translace a pouze protein syntetizovaný v posunutém čtecím rámci je biologicky aktivní. Ribosomy, které pokračují v translaci v původním čtecím rámci, produkují nefunkční protein. Příkladem je exprese genu *prfB*, který kóduje uvolňovací faktor 2 (RF2) *E. coli*. Posun čtecího rámce zde umožňuje autoregulaci exprese genu (viz níže).

3. Mechanismus cíleného posunu čtecího rámce

Elongaci polypeptidového řetězce, při níž dochází k posunu čtecího rámce, lze zjednodušeně popsat kroky:

- vazba aminoacyl-tRNA do A (aminokyselinového) místa ribosomu,
- vznik peptidové vazby katalyzovaný peptidyltransferasou,
- translokace peptidylu z A do P (peptidového) místa ribosomu,
- uvolnění deacylované tRNA z E („exit“) místa ribosomu.

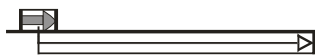
Třída 1:



Třída 2:



Třída 3:



Obr. 2. Tři třídy cíleného posunu čtecího rámce; šedé šipky v horním rámečku představují oblast mRNA (černá čára) překládanou ribosomy v původním čtecím rámci. Černé šipky ve spodních rámečcích reprezentují úsek překládaný v posunutém čtecím rámci. Translační produkty představované silnými šedými šipkami jsou syntetizovány v přebytku

Obecné principy (+1) i (–1) cíleného posunu čtecího rámce byly popsány na základě výsledků studia virů a retrotransponů (krátké úseky DNA, které se přemisťují v genetickém materiálu pomocí reversní transkriptasy). K cílenému posunu čtecího rámce je třeba dvou motivů na mRNA: tzv. „klouzavé sekvence“ mRNA, kde je posun tRNA zvýhodněn, a stimulatoru zvyšujícího účinnost celého děje pravděpodobně dočasným zastavením pohybu ribosomu. Stimulátorem bývá pomalu překládaná oblast mRNA, což mohou být: kodon pro vzácnou tRNA („hungry codon“), nedokonale rozpoznávaný stop kodon, oblast interakcí mRNA-rRNA nebo oblast sekundárních a terciárních struktur mRNA.

Dosud nejlépe odpovídá všem studovaným příkladům cílených posunů čtecího rámce tzv. integrovaný model^{11,12}. Oba typy cíleného posunu čtecího rámce (+1) i (–1) jsou řízeny kineticky a proběhnou pouze v případě, že ribosom je přechodně zastaven díky přítomnosti *cis*-signálů na mRNA (sekundární a terciární struktury mRNA vyskytující se na dané molekule). Typ posunu je ovlivněn způsobem obsazení vazebných míst ribosomu molekulami tRNA. K (–1) posunu dochází v okamžiku, kdy je P i A místo ribosomu obsazeno, zatímco k (+1) posunu dojde pouze, když A místo není obsazeno molekulou tRNA.

Lze předpokládat, že mutace nebo sloučenina ovlivňující vazbu a selekci aminoacyl-tRNA do A místa by měla ovlivnit účinnost buď (–1) nebo (+1) posunu čtecího rámce, nikdy ne obou současně. Tento předpoklad byl experimentálně ověřen, a tak byla platnost integrovaného modelu prokázána¹².

Selekce a vazba aminoacyl-tRNA

Eukaryotní elongační faktor eEF1 α , který je spolu s aminoacyl-tRNA a GTP součástí ternárního komplexu, umožňuje vazbu aminoacyl-tRNA do A místa ribosomu. Mutace zpomalující recirkulaci eEF1 α z ternárního komplexu posouvá rovnováhu ve prospěch ribosomů s obsazeným P místem a prázdným A místem, a tak zvyšuje pravděpodobnost (+1) posunu čtecího rámce. Naopak při mutaci vazebného místa pro GTP v eEF1 α setrvává ternární komplex v A místě déle, což podporuje (–1) posun čtecího rámce.

Množení tzv. kvasinkového viru („yeast killer virus“), které je závislé na (–1) posunu čtecího rámce, je inhibováno anisomycinem, tj. antibiotikem, které specificky inhibuje vstup aminoacyl-tRNA do A místa ribosomu. Předpokládá se, že anisomycin také zvyšuje účinnost opravného mechanismu v A místě, a tak se podílí na zachování původního čtecího rámce.

Vytvoření peptidové vazby a translokace

Před translokací je A i P místo ribosomu obsazeno tRNA, zatímco po translokaci je A místo volné, v místě P je peptidyl-tRNA a deacylovaná tRNA je v místě E. Sparomycin je antibiotikum inhibující tvorbu peptidové vazby, čímž prodlužuje dobu setrvání ribosomu na „klouzavé sekvenci“ s oběma místy (P i A) obsazenými tRNA. Spar-

omycin tak v souladu s integrálním modelem zvyšuje účinnost (–1) posunu čtecího rámce.

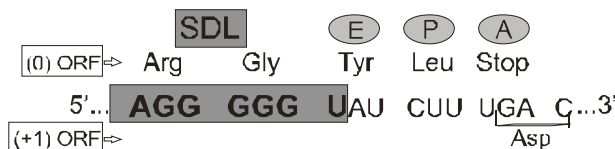
Inhibice translokace sníží množství ribosomů vhodných pro (+1) posun čtecího rámce. Množství ribosomů vhodných pro (–1) posun čtecího rámce by mělo naopak vzrůstat, neboť aminokyselinové místo zůstává obsazeno. Zjištění, že ke zvýšení účinnosti (–1) posunu nedochází, potvrzuje, že ribosom po vytvoření peptidové vazby již nemůže z termodynamického hlediska posunout čtecí rámec.

3.1. Cílený (+1) posun čtecího rámce u prokaryot

Dobře popsaným příkladem (+1) posunu čtecího rámce u prokaryot je posun nutný k translaci *prfB* genu *E. coli*, který kóduje uvolňovací faktor 2 (RF2)^{2,4,5} nutný k uvolnění nově syntetizovaného polypeptidového řetězce na stop kodonu. Aby ribosom syntetizoval aktivní RF2 správné délky, musí v pozici 26 od iniciačního kodonu zabránit terminaci posunem čtecího rámce o 1 nukleotid ve směru translace. Ribosomy pak přeloží ještě dalších 340 kodonů v novém čtecím rámci za vzniku funkčního uvolňovacího faktoru RF2. Posun čtecího rámce umožňuje autoregulační mechanismus. Pokud je hladina RF2 v buňce vysoká, převládá terminace translace *prfB* genu v důsledku vazby RF2 na UGA kodon v pozici 26 původního čtecího rámce. Vzniká tak zkrácený neaktivní protein, který je rychle degradován. Je-li hladina RF2 v buňce nízká, ribosomy překonají terminační kodon posunem čtecího rámce, což vede k produkci aktivního RF2. Pozoruhodná je účinnost tohoto jevu, jež se může pohybovat v rozmezí od 30 až do 100 %.

Analýzy mutantů se změnami v okolí místa posunu čtecího rámce *prfB* genu ukázaly, že tento jev závisí na kombinaci tří elementů (obr. 3):

- slabý terminační kodon UGA následovaný cytosinem,
- poslední smysluplný kodon původního otevřeného čtecího rámce CUU, který umožňuje slabé párování G s U v poslední pozici,



Obr. 3. Úsek mRNA genu *prfB* *E. coli*, kde dochází k posunu čtecího rámce o +1 nukleotid ve stavu, kdy se terminační kodon UGA nachází v A místě ribosomu; sekvence podobná Shine-Dalgarnově sekvenci (SDL) překrývá svým 3'-koncovým nukleotidem UAU kodon pro tyrosin, který je při posunu čtecího rámce v E místě ribosomu. Peptidová sekvence nad sekvencí mRNA odpovídá původnímu čtecímu rámci (0); nový čtecí rámec (+1) začíná aspartátem

- sekvence připomínající Shine-Dalgarnovu sekvenci (SD-like sequence, SDL).

Bylo prokázáno, že triplet UGA je nejslabším terminačním kodonem, jehož účinnost je modifikována následujícími bázemi. C v této pozici nejúčinněji zeslabuje stop signál¹³. Sekvence podobná Shine-Dalgarnově (SDL), AGG GGG, je komplementární ke 3' konci 16S rRNA stejně jako Shine-Dalgarnova sekvence, která určuje iniciaci translace. Na rozdíl od dobře prostudované Shine-Dalgarnovy sekvence, která leží před překládanou oblastí, je SDL umístěna uvnitř kódující sekvence mRNA. Poslední nukleotid SDL je totožný s prvním nukleotidem E místa ribosomu v okamžiku, kdy se terminační UGA kodon nachází v A místě téhož ribosomu (obr. 3). Bylo potvrzeno, že vzdálenost mezi SDL sekvencí a místem posunu je kritická pro zachování vysoké účinnosti posunu čtecího rámce. Vzdálenost iniciační Shine-Dalgarnovy sekvence od iniciačního místa je větší než vzdálenost SDL od místa posunu čtecího rámce, a proto dřívější hypotézy předpokládaly, že interakce SDL s komplementární sekvencí ribosomální RNA způsobuje pnutí v ribosomu, které „táhne“ peptidyl-tRNA do (+1) místa. Poslední studie však prokázaly přímou souvislost mezi obsazením E místa deacylovanou tRNA a účinností posunu čtecího rámce⁴. Interakce SDL s ribosomální RNA způsobí uvolnění deacylované tRNA z E místa, a tak na ribosomu zůstane pouze jedna tRNA, peptidyl-tRNA. Takový ribosom je pak velmi náchylný k posunu do (+1) čtecího rámce. Takto bylo prokázáno, že obsazení E místa má nezbytnou úlohu pro zachování čtecího rámce.

Výskyt SDL uvnitř kódující sekvence byl potvrzen i v *dnaX* genu *E. coli*. Vzdálenost SDL od místa posunu čtecího rámce v tomto genu je na rozdíl od výše uvedeného příkladu (pro (+1) posun) větší než vzdálenost iniciační Shine-Dalgarnovy sekvence od iniciačního kodonu, a proto její interakce s 16S rRNA stimuluje posun peptidyl-tRNA do (-1) místa. Předpokládá se, že SDL sekvence se vyskytuje i u dalších genů, které obsahují místa posunu čtecího rámce.

3.2. Cílený (+1) posun čtecího rámce u eukaryot

U eukaryot bylo popsáno několik případů posunu čtecího rámce o 1 nukleotid ve směru translace. Komplexním příkladem je (+1) posun v genu pro inhibitor (označovaný jako „antizym 1“) ornitin dekarboxylasy (ODC), která se účastní syntézy životně nezbytných polyaminů. ODC katalyzuje první krok biosyntézy polyaminů tj. přeměnu ornithinu na putrescín. Putrescín následně slouží jako prekurzor pro syntézu polyaminů spermidinu a sperminu. Vysoké koncentrace polyaminů v buňce mohou být toxické, jsou spojovány se vznikem neurologických disfunkcí, Alzheimerovy choroby či rakovinného bujení, a proto je nutný citlivý regulační mechanismus zajišťující jejich optimální koncentrace.

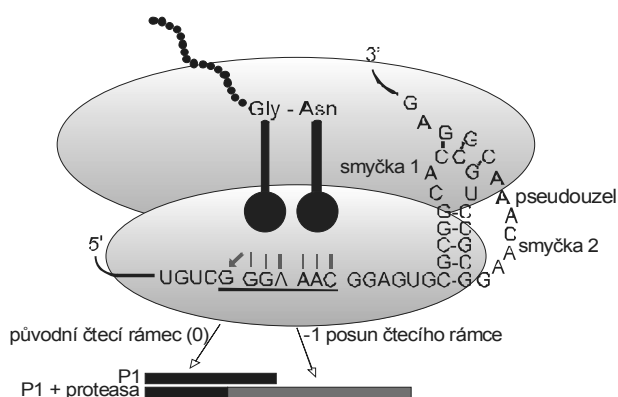
Úloha antizymu v regulaci hladiny buněčných polyaminů spočívá v jeho schopnosti vázat a inhibovat ornithin dekarboxylasu a směřovat ji k degradaci do proteasomů³.

mRNA antizymu obsahuje dva překrývající se čtecí rámce; první má dva iniciační signály, ale jeho translaci nevzniká žádný protein, zatímco druhý čtecí rámec nemá iniciační signál, ale kóduje aktivní domény antizymu. Syntéza funkčního antizymu vyžaduje iniciaci translace na jednom z iniciačních míst prvního čtecího rámce a (+1) posun čtecího rámce na kodonu, který těsně předchází stop kodonu prvního čtecího rámce. V důsledku vysoké koncentrace polyaminů (spermidin, spermin), které zvyšují účinnost takového posunu čtecího rámce až na 30 %, vzrůstá koncentrace aktivního antizymu (viz níže). Tak je zajištěn zpětnovazebný mechanismus regulace hladiny polyaminů v buňce.

Místo posunu čtecího rámce savčí mRNA pro antizym je tetraplet UCCU uvnitř sekvence 5'UCCUGA3'. Pro posun čtecího rámce je důležité, aby 3' báze tetrapletu byla zároveň první bází stop kodonu. Nezbytný je také pseudouzel (viz kap. 3.4), jehož začátek se nachází 3 nukleotidy za stop kodonem, a rovněž specifická sekvence na 5' straně místa posunu čtecího rámce. Tyto motivy mRNA kódující antizym jsou nezbytné pro posun čtecího rámce, ke kterému však v nepřítomnosti polyaminů nedochází vůbec nebo jen s minimální účinností. Zvyšování koncentrace polyaminů v buňce vede ke stimulaci posunu čtecího rámce tohoto genu a jeho účinnost může dosáhnout až 30 %. Přesný mechanismus stimulace posunu čtecího rámce polyaminy není dosud objasněn. Předpokládá se, že indukce posunu čtecího rámce je zprostředkována přímo složkami translačního aparátu buňky, například ribosomy. Je zajímavé, že tento neobvyklý způsob regulace translace – nutnost posunu čtecího rámce pro syntézu funkčního antizymu – je zachován od kvasinek po obratlovce, stejně jako sekvence, na kterých k posunu dochází¹⁴.

3.3. Cílený (-1) posun čtecího rámce u eukaryot

Cílený posun čtecího rámce o (-1) nukleotid byl popsán nejprve u retrovirů (první třída cíleného posunu čtecího rámce, viz výše), ale později také u koronaviřů, rostlinných a kvasinkových virů, bakterií a nedávno i u savčích genu *Edr*¹⁵. K tomuto posunu jsou rovněž nezbytné dva motivy mRNA, heptanukleotidová klouzavá sekvence, za níž následuje sekundární nebo terciární struktura mRNA¹⁶. Vzdálenost obou sekvencí 5–9 nukleotidů je pro účinnost posunu důležitá. Klouzavá sekvence má obecný sled nukleotidů X-XXY-YYZ, kde X mohou být jakékoli tři shodné nukleotidy, Y značí A nebo U a Z je A, U nebo C. K posunu čtecího rámce dochází, když jsou kodony XXY-YYZ obsazeny peptidyl-tRNA a aminoacyl-tRNA v odpovídajících místech ribosomu (integrováný model, viz výše). Triplet čtecího rámce jsou v textu odděleny pomlčkami. Při posunu obě tRNA simultánně přerušují párování, ribosom se posune o 1 nukleotid zpět a obě tRNA se párují v -1 ORF (XXX-YYY). První dvě báze obou antikodonů tak zůstávají spárované, což je postačující pro zařazení příslušných aminokyselin do sekvence rostoucího peptidu. Poté se vytvoří peptidová vazba, dojde k translakaci



Obr. 4. Model (-1) cíleného posunu čtecího rámce Beet western yellow viru (BWYV) s typickou „klouzavou“ sekvencí a pseudouzlem oddělenými šestinukleotidovou sekvencí⁶; nejčastější pseudouzlel se skládá ze dvou vlásenek a dvou smyček, přičemž báze druhé smyčky se mohou v některých případech párovat s bázemi první vlásenky a tvořit intramolekulární triplex (např. u HIV-1). Obdélníky ve spodní části obrázku schematicky znázorňují translační produkty původního čtecího rámce P1 a fúzní polyprotein, který je syntetizován v důsledku cíleného (-1) posunu čtecího rámce

a translace pokračuje v -1 čtecím rámci. Pravděpodobnost procesu je zvýšena přítomností sekundární nebo terciární struktury mRNA, která způsobí pozastavení ribosomu na klouzavé sekvenci^{6,17-19}. Takovou strukturou bývá nejčastěji pseudouzlel¹, viz níže (obr. 4).

3.4. Role mRNA

Pseudouzlel, prvek terciární struktury RNA^{1,20}, je obecně odvozen od prvků sekundárních struktur RNA. Pseudouzly, které se uplatňují v místech posunu čtecího rámce, jsou odvozeny od vlásenkové smyčky RNA (pseudouzly typu H) a vznikají párováním bází mezi úsekem smyčky ve vlásence a vzdálenějším jednořetězcovým úsekem téže molekuly RNA (obr. 4, cit.²¹).

Ribosomální proteiny S3, S4 a S5, které obklopují vstupní místo mRNA do ribosomálního komplexu mají helikasovou aktivitu, váží helikální oblasti mRNA a separují její řetězce při vstupu do ribosomu. Navržená teorie předpokládá, že strukturální motivy podporující posun čtecího rámce znemožňují účinnou interakci s těmito „rozplétacími“ proteiny. Zjednodušeně lze konstatovat, že struktura pseudouzlu blokuje vstup mRNA do vstupního žlábků ribosomu, protože čelní část pseudouzlu má rozměry 37×18 Å, zatímco vstupní brána do ribosomálního tunelu mezi S3, S4 a S5 proteiny je zúžena na 17×20 Å (cit.^{22,23}). Po translokaci je tak pohybu mRNA kladen značný odpor, což může vyústit v jeden z následujících dějů:

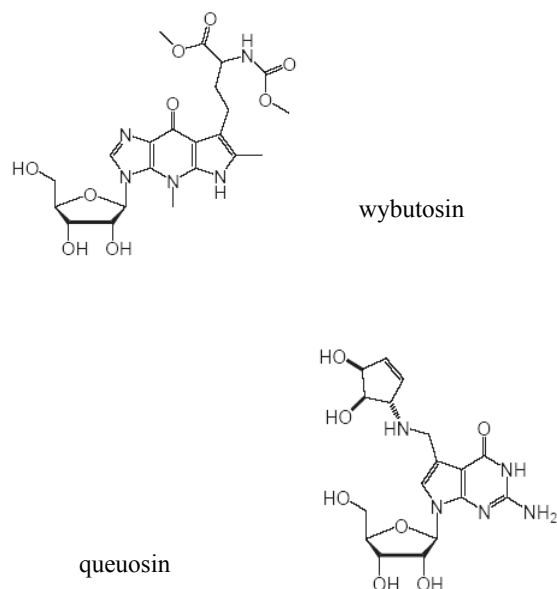
- rozpletení pseudouzlu,
- disociace komplexu ribosom a mRNA,
- (-1) posun čtecího rámce.

Dosud není objasněno, čím je řízen výběr těchto tří možností. Mechanismus posunu čtecího rámce využívá řada virů k syntéze proteinů nezbytných pro tvorbu nových virových částic. Přítomnost a stabilita pseudouzlu je významná pro účinnost posunu čtecího rámce, a proto lze očekávat, že účinného narušení struktury pseudouzlu může být v budoucnu využito k antivirové terapii¹⁶.

3.5. Role modifikovaných tRNA

V eukaryotních buňkách se vyskytují tRNA (pro Asn, Asp, His, Phe a Tyr) s modifikovanými bázemi ve 3' pozici antikodonu, např. wybutosin (Y) v případě Phe tRNA a queuosin (Q) u Asn tRNA (obr. 5). Změny modifikace bází v antikodonové smyčce tRNA mohou ovlivnit účinnost (-1) posunu čtecího rámce.

Signály pro posun čtecího rámce u retrovirů i vyšších eukaryot obsahují kodony pro tyto aminokyseliny. Bylo experimentálně prokázáno, že v buňkách infikovaných retroviry (Human T-cell Leukemia Virus, Human Immunodeficiency Virus, Rous Sarcoma Virus) většina Phe tRNA nebo Asn tRNA postrádá tyto modifikované báze v antikodonové smyčce. Phe tRNA a Asn tRNA bez modifikovaných bází se označují jako tzv. „shifty“ (od shift = posun) tRNA, protože stimulují posun čtecího rámce na klouzavých sekvencích obsahujících odpovídající kodony^{24,25}. Předpokládá se, že nepřítomnost modifikovaných bází v antikodonové smyčce přispívá k posunu čtecího rámce, neboť zde poskytuje více prostoru, což umožňuje větší flexibilitu antikodonu. Modifikace ostatních bází



Obr. 5. Struktura wybutosinu a queuosinu, nukleotidů s vysoce modifikovanými bázemi

v antikodonové smyčce hraje také důležitou úlohu v regulaci posunu čtecího rámce²⁶. Bylo také prokázáno, že mnoho nádorových buněk obsahuje vysoké hladiny těchto nemodifikovaných bází. Udržování tRNA ve vysoce modifikovaném stavu by tak mělo inhibovat nejen retroviry, ale také růst neoplazií. Tyto možnosti terapie jsou předmětem intenzivního studia^{24,27}.

3.6. Role inhibice peptidyltransferasy

Inhibitory peptidyltransferasy specificky ovlivňují účinnost (–1) cíleného posunu čtecího rámce, a tím např. i poměr polyproteinů Gag/Gag-Pol v retrovirech²⁸. Inhibitor peptidyltransferasy, sparsomycin, postačuje k zabránění propagace kvasinkových virů L-A a M1 (cit.²⁹). Mutace ribosomálního proteinu L3 a nepřítomnost proteinu L41 vede k inhibici peptidyltransferasy *Saccharomyces cerevisiae* a následně ke zvýšené účinnosti (–1) posunu čtecího rámce³⁰. Předpokládá se, že snížení aktivity peptidyltransferasy má za následek prodloužení zdržení ribosomu (> 20⁻¹ s) na „klouzavé“ sekvenci ve chvíli, kdy je P i A místo obsazeno, a tak je poskytnuto více času k posunu čtecího rámce. Celková rychlost elongace se ale nezmění, protože děj limitující rychlost je stále přítomnost aminoacyl-tRNA v A místě ribosomu (8⁻¹ s) a disociace EF-Tu-GDP z ribosomu (4⁻¹ s) – data pro ribosomy *E.coli*, u eukaryot se předpokládá analogie³⁰.

4. Uměle stimulovaný (–1) posun čtecího rámce

K posunu čtecího rámce může docházet i tehdy, když stimující strukturální elementy jsou přítomny na dvou různých RNA (*trans*-elementy). Nedávný výzkum ukázal, že oligonukleotidy komplementární k úseku začínajícímu čtvrtým nukleotidem za „klouzavou“ sekvenci zvyšují účinnost (–1) posunu čtecího rámce z bazální hladiny ~1 % až na 40 %. Tyto experimenty byly provedeny s použitím „klouzavých“ sekvencí vyskytujících se přirozeně u retrovirů. Účinnost posunu čtecího rámce na studovaných sekvencích s přirozenými stimulatory (pseudouzly) je 10–20 %. Bylo tedy prokázáno, že stimulaci posunu čtecího rámce lze navodit i použitím komplementárního oligonukleotidu, který působí jako překážka v pohybu ribosomu³¹.

Stimulace posunu čtecího rámce ve specifickém místě pomocí malých oligonukleotidů (15–25 nukleotidů) poskytuje možnost terapeutického využití. Mnoho chorob je způsobeno delecemi nebo insercemi v genech, jejichž důsledkem je nesprávný čtecí rámec. K těmto mutacím, podobně jako k ribosomálním posunům čtecího rámce, často dochází na homopolymerních úsecích^{31,32}. Oligonukleotidy by tedy teoreticky mohly být použity pro cílený posun ribosomu zpět do správného čtecího rámce.

5. Závěr

Možnost alternativního využití genetické informace cíleným posunem čtecího rámce umožňuje kontrolu genové exprese. Nejlépe je tento proces prostudován u virů, kde zajišťuje optimální poměr strukturálních proteinů kapsidy k retrovirovým enzymům. Byla také vyslovena domněnka, že by ribosomální posun čtecího rámce mohl být dalším nástrojem genetické variability, poskytující organismu evoluční výhodu např. v důsledku stimulace exprese proteinů s modifikovanými vlastnostmi, což organismu umožní obývat jak prostory původní, tak nové ekologické niky³.

Výsledky mnoha studií přesvědčivě ukázaly, že sekvence, na kterých dochází k popsáným cíleným (–1) posunům čtecího rámce, vykazují společné rysy, které je možno nalézt v databázích známých prokaryotických i eukaryotických sekvencí^{33,34}. Tímto postupem bylo identifikováno velké množství potenciálních signálů pro posun čtecího rámce, jejichž výskyt je 2–6× vyšší než náhodný. Některé z nich jsou navíc konzervativní mezi homologními geny různých druhů. Problémem zůstává nastavení vhodných parametrů vyhledávání, neboť i přes řadu úspěchů vede predikce často k falešně pozitivním výsledkům či naopak při aplikaci striktních kritérií nejsou identifikována místa, na nichž ke změně kódování skutečně dochází^{32,34,35}. Jedná se o mechanismus, který lze cíleně regulovat a představuje tak nové možnosti terapeutického zásahu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů MŠMT: 1M6837805002 a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie I*. Rosypal, Brno 1998.
2. Farabaugh P. J.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64, 131 (2000).
3. Namy O., Rousset J. P., Naphthine S., Brierley I.: *Mol. Cell* 13, 157 (2004).
4. Márquez V., Wilson D. N., Tate W. P., Triana-Alonso F., Nierhaus K. H.: *Cell* 118, 45 (2004).
5. Farabaugh P. J.: *Microbiol Rev* 60, 103 (1996).
6. Alam S. L., Atkins J. F., Gesteland R. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14177 (1999).
7. Flint S. J., Enquist L. W., Krug R. M., Racaniello V. R., Skalka A. M.: *Principles of Virology*. ASM Press, Washington DC 2000.
8. Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E.: *Retroviruses*. CSHL Press, New York 1997.
9. García P., Rodríguez I., Suárez J. E.: *J. Bacteriology* 186, 1714 (2004).
10. Larsen B., Wills N. M., Gesteland R. F., Atkins J. F.: *J. Bacteriology* 176, 6842 (1994).
11. Plant E. P., Muldoon Jacobs K. L., Harger J. W., Meskauskas A., Jacobs J. L., Barter J. J., Petrov A. N., Dimnan J. D.: *RNA* 9, 168 (2003).

12. Harger J. W., Meskauskas A., Dinman J. D.: Trends Biochem. Sci. 27, 448 (2002).
13. Tate W.P., Mansell J. B., Mannering S. A., Irvine J. H., Major L. L., Wilson D. N.: Biochemistry (Mosc) 64, 1342 (1999).
14. Ivanov I. P., Matsufuji S., Murakami Y., Gesteland R. F., Atkins J. F.: EMBO J. 19, 1907 (2000).
15. Shigemoto K., Brennan J., Walls E., Watson C. J., Stott D., Rigby P. W. J., Reith A. D.: Nucleic Acids Res. 29, 4079 (2001).
16. Dinman J. D., Richter S., Plant E. P., Tailor R. C., Hammell A. B., Rana T. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 5331 (2002).
17. Paul C. P., Barry J. K., Dinesh-Kumar S. P., Brault V., Miller W. A.: J. Mol. Biol. 310, 987 (2001).
18. Kontos H., Naphthine S., Brierley I.: Mol. Cell. Biol. 21, 8657 (2001).
19. Lopinski J. D., Dinman J. D., Bruenn J. A.: Mol. Cell. Biol. 20, 1095 (2000).
20. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, NY, USA 2002.
21. Giedroc D. P., Theimer C. A., Nixon P. L.: J. Mol. Biol. 298, 167 (2000).
22. Barry J. K., Miller W. A.: Proc Natl Acad Sci USA 99, 11133 (2002).
23. Yusupova G. Z., Yusupov M. M., Cate J. H. D., Noller H. F.: Cell 106, 233 (2001).
24. Carlson B. A., Kwon S. Y., Chamorro M., Oroszlan S., Hatfield D. L., Lee B. J.: Virology 255, 2 (1999).
25. Carlson B. A., Kwon S. Y., Lee B. J., Hatfield D.: Mol. Cells 10, 113 (2000).
26. Pande S., Vimaladithan A., Zhao H., Farabaugh P. J.: Mol. Cell. Biol. 15, 298 (1995).
27. Carlson B. A., Mushinski J. F., Henderson D. W., Kwon S. Y., Crain P. F., Lee B. J., Hatfield D. L.: Virology 279, 130 (2001).
28. Dinman J. D., Kinzy T. G.: RNA 3, 870 (1997).
29. Dinman J. D., Ruiz-Echevarria M. J., Czaplinski K., Peltz S. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 6606 (1997).
30. Meskauskas A., Harger J. W., Muldoon Jacobs K. L., Dinman J. D.: RNA 9, 982 (2003).
31. Howard M. T., Gesteland R. F., Atkins J. F.: RNA 10, 1653 (2004).
32. Olsthoorn R. C. L., Laurs M., Sohet F., Hilbers C. W., Heus H. A., Pleij C. W. A.: RNA 10, 1702 (2004).
33. Hammell A. B., Tailor R. C., Peltz S. W., Dinman J. D.: Genome Res. 9, 417 (1999).
34. Wilson G. M., Brewer G.: Genome Res. 9, 393 (1999).
35. Baranov P. V., Gurvich O. L., Fayet O., Prère M. F., Miller W. A., Gesteland R. F., Atkins J. F., Giddings M. C.: Nucleic Acids Res. 29, 264 (2001).

Z. Smékalová and T. Ruml (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Programmed Translational Frameshifting – Translation of Alternative Products**

Programmed ribosomal frameshifting, one of the alternative decoding events, occurs with the frequency significantly higher than the incidence of common translational errors of this type. In general, there are at least two motives involved in the frameshifting: the slippery sequence, where the shift of the ribosome takes place, and a cis element situated several nucleotides downstream of the slippery sequence, which enhances the event efficiency. This review is devoted to the mechanisms and examples of the frameshifting in a variety of organisms. The importance of this mechanism for their life cycle is discussed with respect to potential therapeutic applications.