

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů
Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Petra Miletínová

Nekanonická úloha tRNA v translaci
Noncanonical role of tRNA in translation

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: Mgr. Leoš Valášek, Ph.D.

Praha, 2022

..

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,

Podpis

Poděkování

Chtěla bych velice poděkovat vedoucímu práce Leoši Shivaya Valáškoví, za jeho ochotu, čas a velkorysý přístup. Především bych ale chtěla vyjádřit velký dík, že mi umožnil být v naprosto unikátním prostředí, které dokázal se svým týmem vytvořit. Dík patří všem členům, především Zuzaně Pavlíkové, která je mi celou dobu velkou inspirací, a to nejen na vědecké úrovni. Za její čas strávený nad mými dotazy, které byly vždy zodpovězeny s důslednou pečlivostí.

Abstrakt

Překlad je pro buňku zásadní proces, který probíhá nepřetržitě a bez něhož by nebylo života. Buňky se převážně nacházejí v proměnlivém prostředí, a proto musí být schopny rychle se přizpůsobovat neustále se měnícím podmínkám. Změny genové exprese vyžadující úpravu buněčného transkriptomu jsou časově i energeticky náročné. Buňky si za účelem rychlé adaptace na proměnlivé podmínky vyvinuly řadu regulačních mechanismů na úrovni proteosyntézy. Kanonickou cestu translace lze rozdělit na iniciační, elongační, terminační a recyklační fázi, z nichž prakticky každá je předmětem specifické regulace. Jednou z klíčových složek procesu translace je molekula tRNA, která je funkčně velmi rozmanitá. Kromě její zásadní úlohy při přenosu aminokyselin do místa ribozomu během syntézy proteinů, hraje také klíčovou roli v procesech, které regulují translaci na několika úrovních. Jako taková dále rozšiřuje repertoár regulačních nástrojů, které buňka může využít. Většina těchto regulačních procesů probíhá na úrovni iniciace nebo terminace translace, čímž řídí nejen množství a načasování syntézy nově syntetizovaného polypeptidu, ale také jeho funkční vlastnosti. Tato práce poskytuje vhled do strukturní a funkční rozmanitosti molekuly tRNA. Představuje také přehled kontrolních mechanismů, jichž se tRNA účastní mimo svou kanonickou úlohu během translace.

Klíčová slova: terminace translace, pročítání stop kodonu, tRNA, iniciace translace, mRNA, otevřený čtecí rámec

Abstract

Translation is fundamental process for the cell, which is continuous and without which there would be no life. Cells are predominantly found in a variable environment and, therefore, must be able to quickly adapt to ever-changing conditions. Since alterations of gene expression requiring changes of the cellular transcriptom are both time and energy consuming, for swift adaptions cells evolved numerous means of regulation at the level of proteosynthesis. The canonical pathway of translation can be divided into initiation, elongation, termination and recycling phases, practically each of which is a subject of specific regulation. One of the key components in the translation process is the tRNA molecule, which is a functionally very diverse. Besides its fundamental involvement in delivering amino acid residues to the ribosome during initiation and elongation phases, it also plays a crucial, somewhat unexpected role in translational control processes at various levels. As such, it further expands the repertoire of regulatory tools the cell can employ. Most of these regulatory processes operate at the level of translation initiation or termination, thereby controlling not only the amount and timing of synthesis of the newly synthesized polypeptide but also its functional properties. This work provides

insight into the structural and functional diversity of the tRNA molecule. It also presents the overview of the control mechanisms the tRNA is involved in, in addition to its canonical role during translation.

Keywords: translation termination, stop codon readthrough, tRNA, translation initiation, open reading frame

Seznam použitých zkratk

A- místo – akceptorové místo

aaRS- aminoacyl-tRNA syntetáza

ACE-tRNA- tRNA s editovaným antikodonem

ANG- angiogenin

COS- Cos buňky

CPC1- funkční analog GCN4 u *Neurospora crassa*

DMD- duchennova muskulární dystrofie

EF-Tu- bakteriální elongační faktor

eIF3- eukaryotický iniciační faktor 3

eRF1- eukaryotický uvolňovací faktor 1

eRF2- eukaryotický uvolňovací faktor 2

GCN4- eukaryotický transkripční aktivátor

GTP- guanosintrifosfát

IBV- virus infekční bronchitidy

MLD- doména podobná struktuře mRNA

mRNA – mediátorová RNA

o-aaRS- ortogonální aminoacyl-tRNA syntetáza

ORF- otevřený čtecí rámec

o-tRNA- ortogonální tRNA

P- místo – peptidické místo

PK- pseudoknot

pre-tRNA- prekurzorová tRNA

PRF- programovaný posun čtecího rámce

PTC- předčasné terminační kodony

RF1- uvolňovací faktor 1

RF2- uvolňovací faktor 2

SmpB- malý RNA vazebný protein

ssRNA- jednovláknová RNA

sup-tRNA- supresorová tRNA

tiRNA- stresem indukované tRNA fragmenty

TLD- doména podobná struktuře tRNA

TLS- struktura podobná tRNA

tmRNA- transferová-mediátorová RNA

tRF- fragmenty odvozené od tRNA

tRNA – transferová RNA

tRNA^{Asn}- asparagin tRNA

tRNA^{Leu}- leucin- tRNA

tRNA^{Thr}- threonin-tRNA

tRNA^{Tyr}- tyrosin-tRNA

tRNA^{Val}- valin- tRNA

TYMV- virus žluté mozaiky

UPD- pseudoknotová doména

ψ- pseudouridin

Obsah

1	Úvod	1
	Regulační mechanismy v nichž tRNA zastává nezbytnou úlohu	4
2	Iniciace translace na nekanonickém start kodonu	4
2.1	tRNA účast při iniciaci na nekanonickém start kodonu.....	4
2.2	Evidence iniciace na nekanonickém start kodonu	5
2.3	Uměle vytvořená regulace iniciace na nekanonickém start kodonu	5
3	Ribozomální posun čtecího rámce (ribosomal frameshift)	7
3.1	Programovaný ribozomální -1 posun čtecího rámce (-1 PRF)	7
3.1.1	Vliv “slippery site“ na -1 ribozomální posun čtecího rámce.....	8
3.1.2	Vliv sekundární struktury pseudoknotu -1 ribozomální posun čtecího rámce	8
3.2	Programovaný +1 ribozomální posun čtecího rámce (+1 PRF)	9
3.2.1	Role +1 PRF v regulaci exprese bakteriálního genu prfb.....	9
3.2.2	Role +1 PRF v regulaci exprese Ty elementů.....	9
3.2.3	Role +1 PRF v regulaci exprese antizymu	10
4	Pročítání stop kodonu	11
4.1	Faktory ovlivňující účinnost pročítání stop kodonu	12
4.1.1	Role okolní sekvence - 3'kontext.....	12
4.1.2	Role eukaryotického iniciačního faktoru eIF3	13
4.1.3	Role aminoglykosidů v pročítání předčasných terminačních kodonů (PTC)	14
5	Supresorová tRNA	15
5.1	Možné využití sup-tRNA v terapii	16
	tRNA jako hlavní regulační komponenta	18
6	Transferová-mediátorová RNA (tmRNA).....	18
6.1	tm-RNA v komplexu s ribozomem.....	18
7	Struktury podobné molekule tRNA	21
7.1	Struktura TLS viru žluté mozaiky	21
7.2	TYMV-TLS účast v translaci	23
8	Fragmenty odvozené od tRNA (tRF).....	24
8.1	Stresem indukované tRF (tiRNA)	25
8.1.1	tiRNA a iniciační faktor eIF2 α	25

9	Misacylace specifických non-methionyl tRNA.....	26
10	Závěr.....	28
11	Literatura.....	30

1 Úvod

Během translace v buňce dochází k dekodování informace uložené v sekvenci nukleotidů do sekvence aminokyselin. Pro tento proces buňka používá pravidel označovaných jako genetický kód. Sekvence je čtena po skupině tří po sobě jdoucích nukleotidů (kodonu). Dnes je známo 20 odlišných aminokyselin jako základních stavebních jednotek bílkovin. Ne všechny kodony jsou určeny k překladu a zároveň jsou některé aminokyseliny specifické pro více než jeden triplet nukleotidů. Tuto skutečnost označujeme jako degenerovaný genetický kód. V principu sekvence nukleotidů může být překládána ve třech čtecích rámcích v závislosti, na kterém z nukleotidů v tripletu začne daný překlad. Ovšem pouze jeden z nich kóduje požadovaný protein. Této skutečnosti je využíváno v procesu zvaném ribozomální posun čtecího rámce (angl. ribosomal frameshift) (Weiss et al., 1987), kterému se věnuje jedna z kapitol této práce. Pro výše zmíněný nukleotidový triplet je užíván výraz kodon. Kodon není přímo rozeznáván danou aminokyselinou, ale dochází k tomu prostřednictvím adaptorové molekuly, která je schopna rozeznávat a vázat jak kodon, tak danou aminokyselinu. Tyto adaptorové molekuly označujeme jako transferové RNA (tRNA). Transferová RNA nese ve své struktuře sekvenci tří po sobě jdoucích nukleotidů, které jsou komplementární k sekvenci obsažené v kodonu. Tuto sekvenci označujeme jako antikodon. Na druhé straně tRNA molekuly se nachází krátký jednovláknový úsek s 3' koncem molekuly tRNA. To je oblast, kde dochází k vazbě aminokyseliny odpovídající danému antikodonu za pomoci enzymu aminoacyl-tRNA syntetázy, která přiřazuje aminokyselinu specifickou pro danou tRNA (Dever et al., 2018). Za určitých podmínek může docházet k misacylaci methionyl-tRNA syntetázy a k vazbě methioninu na tRNA, která je nespecifická pro tuto aminokyselinu. Tento proces bude diskutován v poslední kapitole této práce.

U prokaryot translace probíhá kotranskripčně, kdy na jednom konci vznikající mRNA již probíhá translace, kdežto u eukaryot je tento proces oddělen a k translaci dochází až postranskripčně v cytoplasmě. Translace je rozdělena do čtyř kroků: iniciace, elongace, terminace a recyklace. Během iniciace dochází k rozpoznání start kodonů AUG danou iniciační tRNA (Merrick & Pavitt, 2018). Ovšem vedle kanonické iniciace translace na AUG kodonu může docházet i k iniciaci na kodonech s jinou sekvencí nukleotidů tzv. blíže příbuzných start kodonech. Touto regulací se bude zabývat kapitola s názvem iniciace translace na nekanonickém start kodonu (Zitomer et al., 1984).

Po iniciaci translace následuje elongace, při které dochází k pohybu ribozomu po molekule mRNA a k překladu nukleotidové sekvence, za pomoci tRNA molekuly nesoucí patřičnou aminokyselinu, což umožňuje vzniku nově syntetizovaného proteinu (Dever et al., 2018). Během syntézy může docházet k zablokování ribozomu a tím i k přerušení tvorby nově vznikajícího proteinu. Pro řešení této situace,

kteřá mŕže bĕhem syntĕzy nastat, vyuŕiva bakteriální buŕka funkce transferov-mediatorov RNA (tmRNA), kter je schopna docílit uvolnn zastaveného ribozomu a nsledn degradaci nefunknho proteinu (Fu et al., 2011). Jak konkrtn vypadá struktura tmRNA a jakým mechanismem docílí terminace translace, si pblzme v druhé polovině této práce. U eukaryot v případě zablokování ribozomu dochází k aktivaci tzv. non-stop decay (NSD). Souast NSD je proteinov komplex, kter je schopn interakce se zablokovm ribozomem a zároveň rekrutuje exosom potebn k degradaci nefunkční mRNA (Vasudevan et al., 2002). Mechanismu NSD se tato práce dále věnovat nebude. Předposledním krokem translace je terminace, při které dochází k rozeznn jednoho ze tří stop kodonŕ (UGA, UAG, UAA) za pomoci terminačního faktoru a nslednm uvolnn nov vzniklého proteinového řetězce (Hellen, 2018). Bĕhem terminace ovsem mŕže docházet k protn stop kodonu (angl. translational readthrough) a tm tedy přířazení aminokyseliny na stop kodon a pokračování syntĕzy proteinu (Hirsh, 1971; Weiner & Weber, 1973). Tomuto procesu se venuje první kapitola této práce. V zveru translace dochází k recyklaci ribozomŕ, kdy dojde za ŕcasti faktorŕ k disociaci mal a velk podjednotky ribozomu, a tedy i k moŕznosti jejich potencionln reasociace a opetovn ŕcasti v procesu translace.

U vsech dosavad popsaných organismŕ je tRNA přepisována ve formě pre-tRNA a následuje několik krokŕ, bĕhem kterých je tRNA zpracována a připravena k její funkci bĕhem translace. Bakterie často k přepisu tRNA vyuŕivj polycistronní transkript, kter je dále řtpen na jednotliv pre-tRNA. Oproti tomu u eukaryot a archea dochází k přepisu samostatných transkriptŕ jednotlivých pre-tRNA. Transkripci tRNA katalyzuje RNA polymeráza, konkrtn eukaryotní organismy vyuŕivj pro tento proces RNA polymerázu III.

Přeměna pre-tRNA na maturovanou tRNA obsahuje 5 krokŕ (Jarrous et al., 2021). V prvním kroku dojde k vystřzen tzv. 5'leader sekvence na 5'konci pre-tRNA a v následujícím druhm kroku dojde k sestřhu 3'konce pre-tRNA molekuly. V třetím kroku dochází k přidn sekvence nukleotidŕ CCA na 3'konci pre-tRNA. K tomuto kroku dochází u vsech nm známých eukaryotních organismŕ. Na rozdíl od některých bakterií a arche kde k přidn této sekvence nedochází, ale je jř kódována v transkriptu na místě, za kterm dochází k sestřzen 3'konce pre-tRNA molekuly. Na tomto místě bude docházet k připojen aminokyseliny na jř maturovanou tRNA. Bĕhem následujícího kroku dochází k modifikaci několika nukleotidŕ pre-tRNA, čímŕ dochází ke zmn pŕvodnch dusíkatých bází. Mezi nejastj modifikace patří přeměna adeninu (A) na pseudouridin (ψ), přeměna uridinu na dihydrouridin (D) a přeměna adeninu na inosin (I). Mimo tyto zkladn modifikace mŕže docházet dále aŕ ke 100 dalm modifikcm. V patm kroku dojde k vystřzen intronu vt části eukaryotick a archealn pre-tRNA. V ojedinělých případech i bakteriální pre-tRNA obsahuje intronovou sekvenci, kter je stejn jako u ekaryot a archea vystřzena.

Takto upravená maturovaná tRNA je připravena k tzv. nabití příslušnou aminokyselinou. U eukaryot dochází k maturování tRNA v jádře a poté je exportována do cytoplazmy kde jsou aminokyseliny připojovány k tRNA prostřednictvím acylové vazby. K této vazbě dochází mezi karboxylovou skupinou příbuzné aminokyseliny a 3' hydroxylem na 3' konci tRNA a tím dochází k vzniku aminoacyl-tRNA. Molekula tRNA nesoucí aminoacylovou vazbu se označuje jako nabitá. Nabíjení je katalyzováno prostřednictvím enzymu aminoacyl-tRNA syntetázy (aaRS). Každá aminokyselina má svou vlastní aminoacyl-tRNA syntetázu, která rozpoznává konkrétní aminokyselinu (Rubio Gomez & Ibba, 2020). Ovšem buňka může za určitých podmínek profitovat i z procesu misacylace kdy dochází k vazbě jiné aminokyseliny na danou tRNA než té kanonické. Tomuto mechanismu se bude věnovat poslední kapitola této práce.

Regulační mechanismy v nichž tRNA zastává nezbytnou úlohu

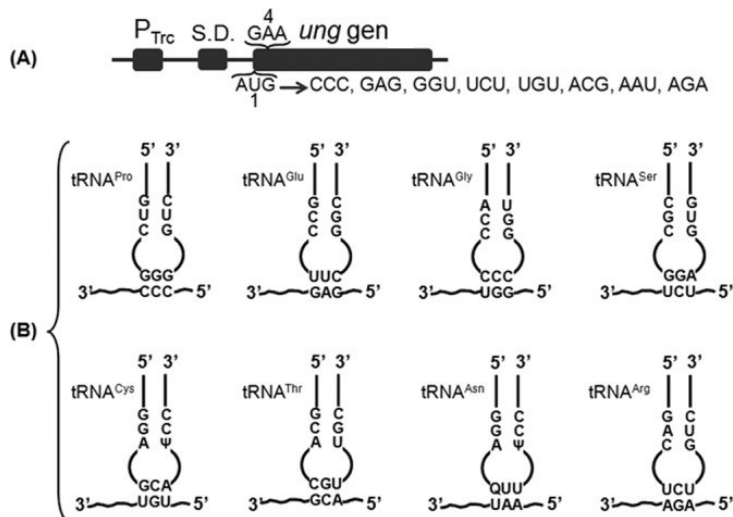
2 Iniclace translace na nekanonickém start kodonu

Po dlouhou dobu bylo uznáváno, že iniciace translace u eukaryot výhradně začíná na AUG start kodonu. Ovšem v posledních deseti letech vzrůstá evidence o tzv. non-AUG iniciaci, kdy translace začíná na jiné než AUG sekvenci. Možnost iniciovat translaci na nekanonickém kodonu buňce umožňuje rozšířit její proteomický repertoár a otevírá nové možnosti v terapeutickém přístupu. Proces výběru start kodonu je regulován na několika úrovních, pomocí sekvenčních či strukturních prvků mRNA a iniciačních faktorů. Podstatnou úlohu samozřejmě hraje i schopnost iniciační tRNA^{Met} iniciovat translaci na různých nekanonických kodonech. Byly provedeny i experimenty, kdy k iniciaci docházelo dokonce i s pomocí některých elongačních tRNA. Jedna z prvních evidencí o zahájení translace na jiném start kodonu byla učiněna během experimentů se *Saccharomyces cerevisiae*, kde byla pozorována iniciace na kodonech UUG a AUA (Zitomer et al., 1984).

2.1 tRNA účast při iniciaci na nekanonickém start kodonu

Podstatná část výzkumu non-AUG iniciace spočívá ve sledování schopnosti elongačních tRNA iniciovat translaci. Samhita, Laasya et al. sledovali schopnost elongační tRNA iniciovat translaci v buňkách *E. coli*, kde depletovali 75% buněčné iniciační tRNA. Pro své experimenty připravili konstrukty mRNA kódující sekvenci genu uracil DNA glykosylázy a pro každý konstrukt zvolili rozdílnou sekvenci start kodonu. V buňkách poté expimovali tuto reportérovou mRNA a zároveň tRNA s odpovídající sekvencí antikodonu k dané iniciační sekvenci mRNA (Obr. 1). Výsledky ukázaly, že největší účinnost na iniciaci translace měla tRNA^{Thr} a nejmenší tRNA^{Asn}. V sekvenci antikodonové smyčky u všech sledovaných elongačních tRNA se vyskytuje pár nukleotidů G-C. Následovala tedy otázka, zdali tato sekvence ovlivňuje schopnost elongační tRNA iniciovat translaci. Bohužel z těchto výsledků se nedá vyvodit jasný závěr. Je tedy možné, že role G-C páru je závislá na širším sekvenčním kontextu či dalších vlastnostech tRNA. Stejně tak je tu možnost, že preference dané elongační tRNA v iniciaci spočívá v jejím zvýšeném množství v porovnání s ostatními tRNA (Samhita et al., 2013).

Další ukázkou je tRNA^{Leu} a její aktivita při non-AUG iniciaci v T-lymfocytech. V rámci imunitní odpovědi T-lymfocyty syntetizují krátké polypeptidy, které pak prezentují skrze histokompatibilní komplex na svém povrchu, aby mohlo dále docházet k rozvíjení imunitní odpovědi. T-buňky pro syntézu těchto krátkých polypeptidů využívají translaci iniciovanou na CUG start kodonu. Bylo ukázáno, že k této iniciaci využívají tRNA^{Leu} ve spolupráci s iniciačním faktorem 2 (eIF2) (Starck et al., 2012).



Obrázek 1. Schéma mutagenese start kodonu AUG genu *ung*. A) Konstrukty kódující *ung* gen s odlišnými start kodony; B) elongační tRNA s odpovídajícími start kodony (Samhita et al., 2013).

2.2 Evidence iniciace na nekanonickém start kodonu

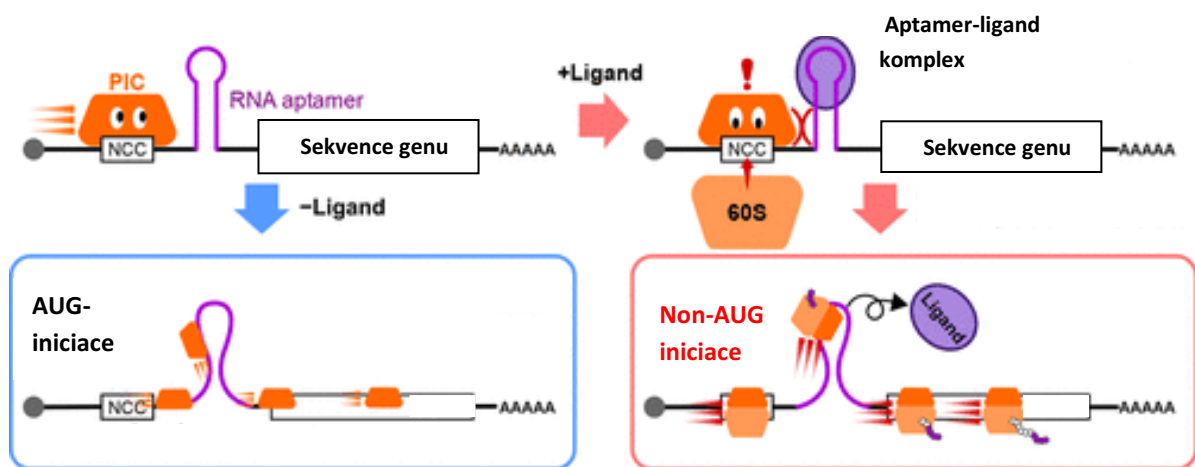
Studie uskutečněná na buňkách COS¹ se snažila popsat efektivitu iniciace translace v závislosti na sekvenci start kodonu. Pro tento experiment byly vytvořeny konstrukty se sekvencí kódující protein preproinsulin s odlišnými start kodony. Na základě *in vitro* translace, s použitím těchto konstruktů, došli k závěru, že nejúčinnější start kodon, mimo kanonický AUG, nese sekvenci GUG, který prokazoval i stejnou závislost na okolní sekvenci jako kodon AUG (Kozak, 1989). Sněť kukuřičná *Ustilago maydis* využívá pro iniciaci translace peroxisomální formy 6-fosfoglukonát dehydrogenázy, která má sekvenci dvou blízkých příbuzných start kodonů v tandemu za sebou (AGG AUU) (Kremp et al., 2020). *Neurospora crassa* kóduje protein uplatňující se v buněčné odpovědi při limitaci zdroje histidinu. Tento protein je označován CPC1 a je funkčním analogem kvasinkového GCN4 uplatňující se v regulaci při limitaci zdrojů aminokyselin. Během této regulace je při expresi CPC1 využívána non-AUG iniciace pro translaci jeho potřebné formy (Ivanov et al., 2017).

2.3 Uměle vytvořená regulace iniciace na nekanonickém start kodonu

Riboswitche jsou elementy obsažené v sekvenci mRNA jejichž pomocí buňka reguluje genovou expresi. Jedna z prací zavádí v modelovém organismu *Saccharomyces cerevisiae* systém pro umělé řízení genové exprese. Tento systém využívá vlastností riboswitch struktury a její funkci v regulaci non-AUG iniciace. Riboswitch elementy jsou schopné vázat ligand a na základě této interakce řídit produkci proteosyntézy. Tento systém využívá navržené molekuly mRNA, které na svém začátku obsahuje

¹ *Cos buňky* Buněčné linie odvozené z buněčné linie CV-1, využívané pro transfekci a klonování

sekvenci blíže příbuzného kodonu CUG, dále pokračuje aptamerní RNA strukturou, po které následuje kódující oblast otevřeného čtecího rámce zvoleného proteinu s iniciační sekvencí AUG kodonu. V situaci, kdy nedochází k vazbě ligandu na aptamerní sekvenci, preiniciační komplex započne syntézu proteinu z kodonu AUG. V případě vazby ligandu na aptamerní strukturu dojde k její stabilizaci a ribozom tak není schopen pokračovat ve skenování sekvence mRNA. V důsledku pozastavení ribozomu, preiniciační komplex započne translaci na sekvenci blíže příbuzného start kodonu, na které byl zastaven. Následně dochází k disociaci ligandu z aptamerní struktury a dosyntetizování cíleného proteinu (obr. 2) (Horie et al., 2020).



Obrázek 2. Model non-AUG regulace proteosyntézy řízené pomocí riboswitch. “NCC” značí blíže příbuzný kodon ve stejném čtecím rámci jako cílený gen. PIC značí preiniciační komplex; 60S -ribosomální podjednotka (Horie et al., 2020).

3 Ribozomální posun čtecího rámce (ribosomal frameshift)

Během překlada genetické informace uložené v sekvenci nukleotidů do sekvence aminokyselin, se translující ribozom pohybuje po molekule mRNA a dochází k dekódování genetické informace, po třech po sobě jdoucích nukleotidech tzv. kodonech. V případě ribozomálního posunu čtecího rámce (ribosomal frameshift) právě translující ribozom "sklouzne" o +/- 1 nukleotid mRNA sekvence a tím nastane změna čtecího rámce, což má za následek vznik proteinu se zcela odlišnými vlastnostmi, oproti proteinu přeloženému dle původního čtecího rámce. Molekula tRNA se stává jedním z hlavních faktorů posunu čtecího rámce v momentě, kdy v buňce dojde k omezení aminoacylované tRNA. V tomto případě zůstane A-místo ribozomu voné díky nedostatku substrátu (aminoacylované tRNA), tRNA v P-místě ribozomu se posune do volného A-místa a dále translace pokračuje z alterantivního čtecího rámce (Caliskan et al., 2017). Zásadní vliv na posun čtecího rámce má také stupeň a počet určitých modifikací tRNA a to zejména v oblasti antikodonové smyčky (Gamper et al., 2021; Tükenmez et al., 2015). Ribozomální posun čtecího rámce může v buňce probíhat spontánně s frekvencí $<10^{-5}$, anebo být rovněž programován. Jako takový je především hojně využíván bakteriemi a viry (Craigén et al., 1985; Maia et al., 1996). Stejně jako tomu bude i v případě pročitání stop kodonu je ribozomální posun čtecího rámce využíván k expanzi své genetické informace. Ke změně čtecího rámce může docházet na základě několika signálů. Jedním z nich je specifická sekvence mRNA, která může tvořit sekundární struktury, nejčastěji pseudoknot nebo stem-loop² a v neposlední řadě je to vysoká hladina polyaminů³ (Petros et al., 2005). Jednotlivé signály indukující tento proces si popíšeme v následujících kapitolách.

3.1 Programovaný ribozomální -1 posun čtecího rámce (-1 PRF)

Programovaný ribozomální posun čtecího rámce tzv. -1 programmed ribosomal frameshifting (-1 PRF) je hojně spojován s transpozibilními elementy (retrotranspozony) a viry. Jako první objevený eukaryotický gen využívající -1 PRF k regulaci vlastní exprese je myší *Edr* gen (Shigemoto et al., 2001). U eukaryot je -1 PRF stimulováno tzv. cis-elementy, tedy specifickou sekvencí mRNA tzv. slippery site, což je heptamerický sekvenční motiv složený ze sedmi nukleotidů a oblasti sekvence formující sekundární strukturu (Farabaugh, 1996).

² *Stem-loop* sekundární struktura jednovláknové DNA nebo RNA s intramolekulárním párováním

³ *Polyaminy* organické sloučeniny s více jak dvěma aminovými skupinami

3.1.1 Vliv "slippery site" na -1 ribozomální posun čtecího rámce

Heptamerický sekvenční motiv tzv. slippery site, je sekvence složená ze sedmi nukleotidů, X XXY YYZ (X= libovolný nukleotid, Y= A/U a Z≠ G) (Dinman et al., 1991). Bylo ukázáno, že tRNA v P-místě ribozomu tvoří vazbu se sekvencí XXY a tRNA v A-místě ribozomu tvoří vazbu se sekvencí YYZ. Tato sekvence umožňuje tRNA v A a P-místě ribozomu přerušit kodon-antikodon interakci a posunout se společně s ribozomem o -1 nukleotid, kdy tRNA v P-místě ribozomu se páruje se sekvencí XXX a tRNA v A-místě ribozomu se páruje se sekvencí YYY (Dinman et al., 1991; Stapleford & Miller, 2010). V jedné studii bylo ukázáno, že hlavně identita sekvence kodonu v P-místě ribozomu, může být jedním z určujících faktorů PRF. Pro tento experiment bylo použito několik systémů: Vero buňky⁴, kvasinky a lyzáty králíčních retikulocytů. V těchto systémech pak byla měřena hladina -1 PRF na základě rozdílné sekvence na pozici kodonu, která se páruje s tRNA v P-místě ribozomu. Bylo zjištěno, že ve všech systémech kromě kvasinek byla preference pro nukleotid na všech třech pozicích kodonu v pořadí U > G > A > C. U kvasinek byla ukázána naopak nízká preference pro nukleotidy U/G. Tuto skutečnost autoři studie vysvětlují jako konsekvenci efektu rozdílné tRNA, která tuto sekvenci v P-místě dekóduje, a tedy že samotná tRNA napomáhá vzniku -1 PRF (Plant & Dinman, 2006).

3.1.2 Vliv sekundární struktury pseudoknotu na -1 ribozomální posun čtecího rámce

Nejvíce pozorovanou stimulační strukturou následující "slippery site" je struktura pseudoknotu. Na této pozici byly ukázány i jiné struktury např. jednoduchá vlásenka či případy, kde se tato struktura nenachází vůbec (Ten Dam et al., 1990). První studie poukazující na tuto strukturu byly provedeny na koronaviru IBV (Braut & Miller, 1992). Na základě několika studií bylo prokázáno, že mutace v oblasti pseudoknotu utlumují proces -1 PRF (Dinman et al., 1991; Morikawa & Bishop, 1992).

Úloha struktury pseudoknotu je působit jako energetická bariéra pro zastavení translatačního ribozomu na „slippery site“ sekvenci a umožnit tak posunutí ribozomu o -1 nukleotid překládané mRNA sekvence (Farabaugh, 1996). Tento model předpokládá, že jakýkoli motiv schopný tvořit RNA sekundární struktury je schopný indukovat děj -1 PRF (Chen et al., 1995).

Experimenty prováděné s proteinem gag-pol retroviru MMTV (virus myšního nádoru mléčné žlázy) ovšem prokázaly, že četnost -1 PRF události není pro všechny sekundární struktury stejná. V proteinu gag-pol se přirozeně vyskytuje sekvenční motiv tvořící sekundární strukturu pseudoknotu a probíhá zde -1 PRF. Tato sekvence byla mutována tak, aby tvořila pouze jednoduchou 5' vlásenku a poté byla sledována frekvence -1 PRF. Ukázalo se, že struktura jednoduché 5' vlásenky je nedostačující pro účinné -1 PRF v porovnání s -1 PRF stimulované sekvenčním kontextem pseudoknotu

⁴ Vero buňky buněčná linie odvozená z ledvinového epitelu *Cercopithecus aethiops*, používaná především ke studiu replikace virů

(Chen et al., 1995). Z tohoto pozorování vyplývá, že zásadní vlastností pseudoknotu v události -1 PRF je jeho sekundární struktura. Toto není jediný pohled na funkci pseudoknotu během -1 PRF, je zde také možnost, že tato struktura je schopna vázat komponenty translačního aparátu a tím umožnit ribozomu „sklouznout“ do -1 PRF (Chen et al., 1995).

3.2 Programovaný +1 ribozomální posun čtecího rámce (+1 PRF)

Proces +1 ribozomálního posunu čtecího rámce je využíván mnohými organismy. Mezi ně patří například regulace uvolňovacího faktoru 2 (RF2) u bakterií (Craigén & Caskey, 1986), nebo u eukaryot účast na expresi patologické formy *HTT* genu odpovědné za Huntingtonovu chorobu (Saffert et al., 2016). Během tohoto procesu se translatující ribozom posune o +1 nukleotid a tím stejně jako v případě -1 PRF dochází ke změně čtecího rámce.

3.2.1 Role +1 PRF v regulaci exprese bakteriálního genu *prfB*

Právě bakteriální gen *prfB* kódující peptid uvolňovací faktor 2 (RF2) byl prvním popsáným genem využívající +1 PRF k regulaci své exprese (Craigén et al., 1985). Během translace RF2 dojde k +1 PRF po překladu prvních 25 nukleotidů a zbytek peptidu je translatován již z nového čtecího rámce. V případě již zmíněného bakteriálního genu *prfB* se heptamerní sekvence, díky které dochází ke změně čtecího rámce, skládá z pořadí nukleotidů CUU-UGA-C. Před tímto sekvenčním motivem se nachází sekvence podobná Shine-Dalgarno (SD) sekvenci⁵, která interaguje s 16S rRNA translatujícího ribozomu (Weiss et al., 1987). Výsledky experimentů poukazují na to, že SD sekvence párující se s 16S rRNA, destabilizuje tRNA v P místě a napomáhá k urychlení +1 PRF události. Po přeložení kodonu CUU, jako kodonu pro leucin, dochází k +1 PRF a další aminokyselinou která je přiřazena na kodon GAC v +1 čtecím rámci je aspartát (Craigén et al., 1985).

3.2.2 Role +1 PRF v regulaci exprese Ty elementů

Dalším příkladem jsou Ty elementy patřící k transpozonům, nalézajících se v kvasinkách. Tyto elementy sestávají ze dvou genů *TYA* a *TYB* jejichž čtecí rámce se vzájemně překrývají. Tyto geny jsou analogy genů *gag* a *pol* metazoálních retrovirů (Adams et al., 1987; Belcourt & Farabaugh, 1990), které k jejich expresi také využívají mechanismu posunu čtecího rámce. U genů *TYA* a *TYB* dochází k posunu +1 čtecího rámce v oblasti, kde se tyto dva geny překrývají. K této události je nutná sekvence nejméně sedmi nukleotidů (CUU-AGG-C), jakožto „slippery site“, ale nebyla nalezena žádná RNA sekundární

⁵ *Shine-Dalgarno sekvence* je ribozomální vazebná sekvence mRNA (5'-AGGAGGU-3'), nacházející se u bakterií a archaea, účastní se iniciace translace

struktura sloužící k “zastavení” ribozomu, jak je tomu v případě -1 PRF mechanismu (Belcourt & Farabaugh, 1990). Model, jakým Ty elementy uskutečňují +1PRF je následovný. Kodon CUU je rozpoznán tRNA^{Leu}, která je schopna akomodace na všech šest kodonů kódujících aminokyselinu leucin (CUN a UUA/G), a to skrze nemodifikovaný uracil na třetí pozici antikodonu. Díky nemodifikovanému uracilu může docházet ke kolísavému „wobble“ párování na této pozici mezi antikodonem tRNA^{Leu}, kodonem CUU a kodonem v +1 čtecím rámci (UUA). Na základě toho může během +1 PRF docházet k posunu tRNA^{Leu} v P-místě ribozomu z kodonu CUU v 0 čtecím rámci na kodon UUA v +1 čtecím rámci a translace může dále pokračovat již v novém čtecím rámci (Belcourt & Farabaugh, 1990).

Byl ukázán případ kvasinkového retrotransposonu Ty3, který v procesu +1 PRF využívá sekvence GCG-AGU-U, v případě GCG kodonu je sekvence dekodována pomocí tRNA^{Ala} a v případě sekvence GUU je to tRNA^{Val} (Farabaugh et al., 1993). Nedochozí zde k mechanismu posunu čtecího rámce z kodonu GCG na CGA jak tomu bylo v případě Ty1 elementu. Byla prezentována hypotéza, jakým způsobem u Ty3 k +1 PRF dochází. Během elongace, kdy tRNA^{Val} ve vazbě s EF-1 α a GTP vstupuje do A-místa ribozomu, dochází k akomodaci na kodon o 1 nt vzdálený od tRNA^{Ala} nacházející se v P-místě ribozomu (Farabaugh et al., 1993). Jak k tomuto procesu dochází na molekulární úrovni, není zcela jasné, ale je pravděpodobné, že zde bude hrát roli struktura tRNA^{Ala} nebo tRNA^{Val} (Farabaugh et al., 1993). Další model naznačuje, že A báze sekvence GCG-AGU-U neleží ve stejné rovině jako zbylé báze, a proto je během akomodace tRNA^{Val} na kodon tato báze ignorována (Farabaugh et al., 1993).

3.2.3 Role +1 PRF v regulaci exprese antizymu

Dalším příkladem, který využívá procesu +1 PRF, je regulace exprese antizymu (AZ) (Matsufuji et al., 1995). Antizym interaguje s ornithin dekarboxylázou a účastní se první katalytické reakce biosyntézy polyaminů (Fong et al., 1976). Bylo popsáno, že frekvence +1 PRF antizymu je regulována hladinou polyaminů. Jejich vzrůstající hladina zvyšuje frekvenci +1 PRF, a tím dochází ke zvýšení syntézy antizymu. Následkem toho dochází ke snížení enzymu ornithin dekarboxylázy a zároveň ke snížení hladiny polyaminů (Rom & Kahana, 1994).

Sekvence kódující AZ se skládá ze dvou překrývajících se čtecích rámců. Translace druhého čtecího rámce, který se nachází +1 čtecím rámci, je nezbytná pro syntézu plně funkčního antizymu (Matsufuji et al., 1995). Nejhojněji využívanými polyaminy v savčích buňkách jsou putrescin, spermidin a spermin. Putrescin je syntetizován z ornithinu pomocí ornithin dekarboxylázy a následně postupně přeměněn na spermidin a spermin (Canellakis et al., 1979).

+1PRF události se účastní tři sekvenční elementy. Prvním je sekvence, na které dochází k posunu čtecího rámce, druhým je sekvence obsahující terminační kodon na konci prvního čtecího rámce a

poslední (třetí) je sekvenční motiv schopný formovat sekundární strukturu pseudoknotu. Heptamerní sekvence, kde dochází k posunu čtecího rámce, obsahuje nukletidy UCC-UGA-U a je u všech živočichů stejná (Ivanov et al., 2000). Studie dokázaly, že role sekundární struktury pseudoknotu je stejná jako u -1 PRF a to vytvářet energetickou bariéru pro translující ribozom (Matsufuji et al., 1995). Úloha polyaminů spočívá v destabilizování kodon-antikodonové interakce v A a P-místě ribozomu a tím umožnit posunutí o +1 nt do druhého čtecího rámce (Thompson et al., 1981).

4 Pročítání stop kodonu

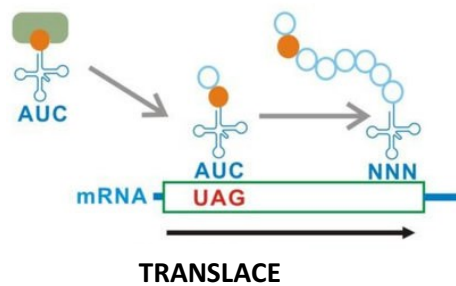
V momentě, kdy ribozom během translace rozpozná sekvenci stop kodonu, dochází k vazbě uvolňovacího faktoru (release factor- RF) a následnému ukončení translace. U bakterií i eukaryot existují dvě třídy faktorů (RFI a RFII), ale mechanismus jakým se terminace účastní je rozdílný.

Bakterie během terminace rekrutují dva uvolňovací faktory I. třídy a to RF1 a RF2, které přímo rozeznávají sekvenci stop kodonu mRNA. První faktor RF1 interaguje se stop kodonem UAA/UAG a druhý faktor RF2 interaguje se stop kodony UGA a UAA. Tyto faktory se dále v rámci terminace účastní hydrolýzy peptidyl-tRNA esterové vazby (Scolnick et al., 1968; Nakamura & Ito, 2002). U eukaryot se ukončení translace účastní heterodimer, složený ze dvou terminačních faktorů, eRF1 (třídy-I) a eRF2 (třídy-II). U eukaryot je sekvence stop kodonu (UAA, UAG a UGA) rozeznávána pouze faktorem eRF1 (Frolova et al., 1994).

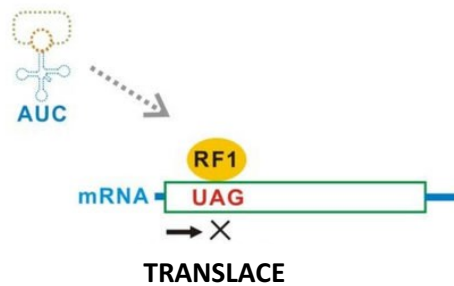
V případě pročítání stop kodonu tedy dochází místo rozpoznání této terminační sekvence pomocí RF1 nebo RF2, k akomodaci supresorové tRNA nebo near-cognate tRNA⁶ v A-místě ribozomu a tím k dekódování stop kodonu (obr.3). Na základě tohoto procesu mohou vznikat proteiny s potenciálně odlišnými biochemickými vlastnostmi. Pročítání stop kodonu může v buňce probíhat spontánně, a to s frekvencí menší než 0,1%, oproti tomu programované pročítání stop kodonu může v buňce přesahovat frekvenci 20%. Programované pročítání stop kodonu bylo poprvé popsáno u virů, kde vzhledem k jejich malému genomu tento proces napomáhá k rozšíření jejich kódovací kapacity (Hirsh, 1971; Weiner & Weber, 1973). Mezi viry využívající tohoto mechanismu patří např. virus tabákové mozaiky nebo virus Sindibis (Pelhman, 1978; Li & Rice, 1993).

⁶ *near-cognate tRNA* tRNA blíže příbuzná tRNA schopná párování se stop kodonem na dvou ze tří pozic kodon-antikodon sekvence

PROČÍTÁNÍ STOP KODONU



TERMINACE



Obrázek 3. Mechanismus pročítání UAG stop kodonu v *Escherichia coli*. A) akomodace tRNA na stop kodon UAG - pročtení stop kodonu; B) vazba uvolňovacího faktoru (RF1) na stop kodon UAG – terminace translace, (Kato, 2019).

4.1 Faktory ovlivňující účinnost pročítání stop kodonu

U většiny organismů se účinnost pročítání stop kodonu liší v závislosti na několika faktorech a některé z nich budou dále diskutovány v následujících podkapitolách. Mezi tyto faktory patří vliv okolní sekvence stop kodonu a iniciačního faktoru eIF3. Dále bylo ukázáno, že účinnost pročítání stop kodonu ovlivňují některé translační faktory, které se tohoto procesu také účastní.

4.1.1 Role okolní sekvence - 3'kontext

Identita stop kodonu je zásadním předpokladem pro jeho pročtení. Výsledky studií napomohly odhalit vliv této terminační sekvence na efektivitu a frekvenci pročítání stop kodonu. Nejvyšší potenciál v tomto kontextu prokazuje stop kodon UGA, následuje vliv sekvence UAG a nejméně efektivní na pročítání stop kodonu je sekvence UAA. Bylo prokázáno, že báze bezprostředně následující za stop kodonem (pozice +4) má zásadní vliv na účinnost pročítání stop kodonu (Cridge et al., 2018; Anzalone et al., 2019). Vliv konkrétního nukleotidu byl ukázán v pořadí C>U>G>A (Jungreis et al., 2011; Beznosková et al., 2016).

Na základě těchto pozorování se došlo k závěru, že cytosin na pozici +4 má schopnost zvyšovat pročítání terminačního signálu. To se projevilo zejména u "nejslabšího" kodonu UGA. Tento závěr je v souladu s dřívějším pozorováním, že "slabé" stop kodony jsou v kombinaci s cytosinem na pozici +4 (UGA-C a UAG-C) u savců zřídka používány jako terminační kontexty (McCaughan et al., 1995).

Jak již bylo zmíněno, není to pouze pozice +4 následující bezprostředně za stop kodonem, u které se prokázal vliv na pročítání stop kodonu. Tento efekt byl popsán i pro širší sekvenční kontext. Opět rozšiřující náhled na vliv okolní sekvence pochází ze studie virů, kde byly popsány tři hlavní sekvenční motivy stimulující pročítání stop kodonu (Beier, 2001).

Typ I zahrnuje motiv UAG-CAAUYA, typ II motiv UGA-CGG nebo UGA-CUA a type III se skládá z motivu UAG-G a “downstream” stimulující formování pseudoknot⁷ struktury RNA (Beier, 2001).

4.1.2 Role eukaryotického iniciačního faktoru eIF3

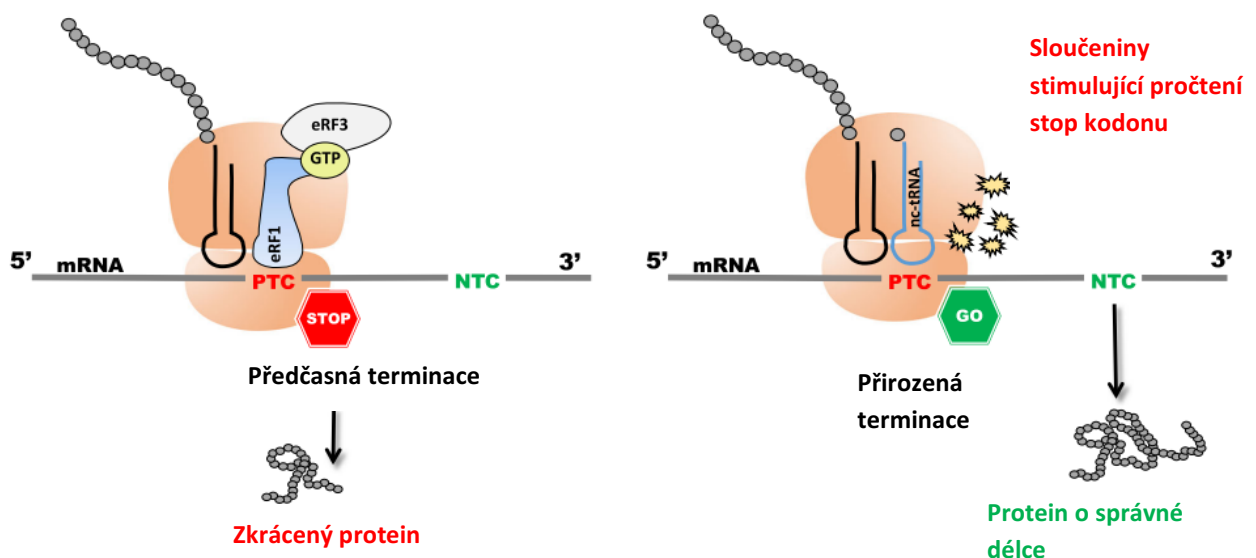
Během terminace je stop kodon rozpoznán pomocí faktoru eRF1, který vstupuje do A-místa ribozomu jako komplex s GTP vazebným proteinem eRF3. Během pročtení stop kodonu dochází ke kompetici těchto faktorů s “near-cognate-tRNA”. Vedle těchto faktorů se regulace translace účastní i iniciační faktor eIF3. Faktor eIF3 je velký proteinový komplex, skládající se z mnoha podjednotek a společně s ostatními iniciačními faktory sehraje svoji roli při náročném procesu iniciace translace (Shivaya Valasek, 2012).

Bylo ukázáno, že eIF3 přednostně zvyšuje pročitání stop kodonu v případě, kdy je stop kodon následován sekvencí, která zvyšuje účinnost tohoto procesu (Beznosková et al., 2015). Tento sekvenční kontext byl popsán v kapitole 2.3.2. Hlavní podjednotka eIF3 asociuje s 80S ribozomálním komplexem za účasti terminačních faktorů eRF1 a eRF3. To poukazuje na možnost, že eIF3 ve vazbě s 80S komplexem ribozomu tvoří pre-terminační 80S komplex a právě přítomnost eIF3 v tomto pre-terminačním komplexu zvyšuje pročitání stop kodonu (Beznosková et al., 2013). Dále experimenty ukázaly, že eIF3 napomáhá inkorporaci near-cognate-tRNA, která sama o sobě není schopná tvořit vazbu s poslední, třetí pozicí kodon-antikodonové interakce. K této vazbě pravděpodobně dochází přes interakci v dekódovacím centru ribozomu.

⁷ *Pseudoknot* sekundární struktura jednovláknové DNA nebo RNA s intramolekulárním párováním

4.1.3 Role aminoglykosidů v pročítání předčasných terminačních kodonů (PTC)

Přítomnost předčasných terminačních kodonů v kódující sekvenci má za následek nesprávné ukončení translace a tvorbu nefunkční zkrácené formy proteinu. PTC jsou častou příčinou genetických onemocnění. Jedním z příkladů je Duchennova muskulární dystrofie (DMD) způsobená nedostatkem dystrofinu, jako důsledek mutací v genu *DMD* vedoucí k vzniku PTC (García-Rodríguez et al., 2020). Pročítání stop kodonu je tak slibným nástrojem, jak obnovit translaci funkčního proteinu. Toho může být docíleno například stimulací chemickými sloučeninami, jako jsou aminoglykosidy. Prvním důkazem byl efekt streptomycinu na nápravu chybného fenotypu způsobeného nefunkčním genotypem u *E. coli* (Gorini & Kataja, 1964). Dalším příkladem je gentamicin a jeho schopnost suprese PTC v sekvenci genu kódující transmembránový protein (CFTR), jehož mutantní forma je odpovědná za onemocnění cystickou fibrózou (Bedwell et al., 1997). Aplikace aminoglykosidů při léčbě onemocnění, které je způsobené přítomností PTC se zdá slibným přístupem, ovšem má svá omezení. Aminoglykosidy jsou schopné interakce s dekódovacím centrem ribozomu a tím snižují nároky na sekvenční identitu kodon-antikodonové interakce a následného pročtení stop kodonové sekvence (obr.4) (O'Sullivan et al., 2018).

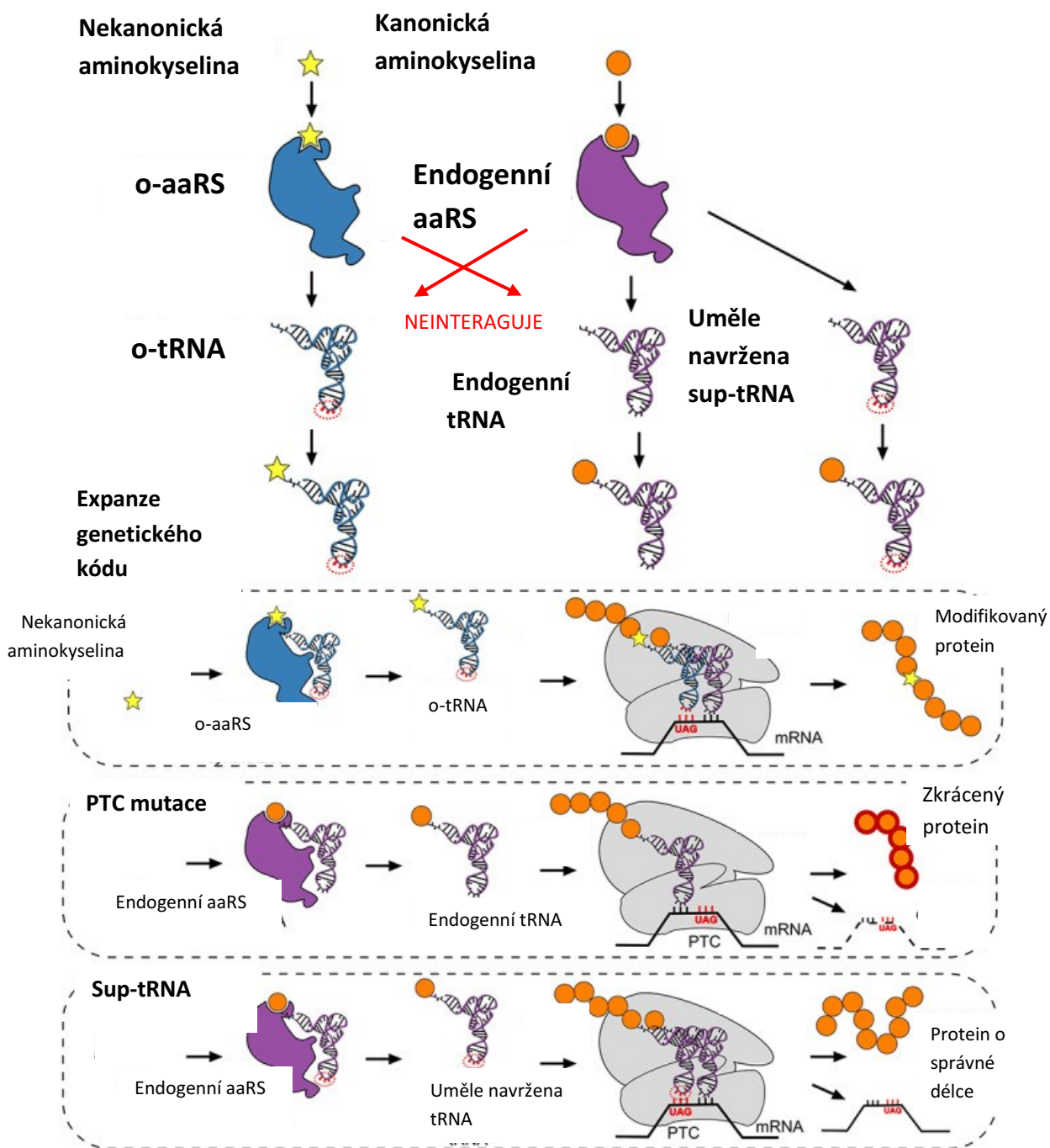


Obrázek 4. Mechanismus pročítání stop kodonu indukované aminoglykosidy. Vazba terminačního faktoru (eRF1) a (eRF3) na předčasná terminační kodon (PTC) – předčasná terminace, vznik zkráceného proteinu; B) Přítomnost sloučenin stimuluje pročtení stop kodonu – vazba blízké příbuzné tRNA (nc-tRNA), přirozená terminace, vznik proteinu o správné délce (Dabrowski et al., 2018)

5 Supresorová tRNA

Univerzální genetický kód obsahuje signální sekvence k ukončení syntézy polypeptidového řetězce tzv. stop kodony (UAA,UAG,UGA). Běžně tedy živé systémy při expresi své genetické informace využívají tyto sekvence k terminaci translace nově syntetizovaného proteinu. Napříč organismy ovšem dochází k procesu, kdy jsou tyto terminační kodony rozeznávány tzv. supresorovými tRNA (sup-tRNA). Tyto RNA jsou schopné díky své plné komplementaritě inkorporace na stop kodon, a díky tomu může také docházet k již zmíněnému pročitání stop kodonu, které je velmi efektivní. V buňce se mohou vyskytovat přirozeně (přirozené supresorové tRNA), nebo vznikat na základě mutací v genu, který danou tRNA kóduje. K této mutaci dochází obvykle v oblasti antikodonu běžné tRNA nebo v jeho blízkosti. Na základě pozice a stupně této modifikace dochází k pročitání stop kodonu (Bouadloun et al., 1986).

Jedna z prvních izolovaných supresorových tRNA byla nalezena v listech tabáku a u dospělců *Drosophila melanogaster*. Tento objev byl uskutečněn na základě experimentů prováděných v lyzátech retikulocytů a v oocytech *Xenopus laevis*, kde bylo pozorováno pročtení stop kodonu UAG pomocí sup-tRNA^{Tyr} (Bienz & Kubli, 1981, Beier et al., 1984; Beier & Grimm, 2002). Zajímavostí je, že tato tRNA izolována z dospělců *D. melanogaster* obsahuje rozdílné modifikace bazí antikodonu, podle toho z jakého vývojového stádia *Drosophily* byla daná sup-tRNA izolována (White et al., 1973; Bienz & Kubli, 1981). Konkrétně u dospělců byly izolovány izoakceptorové tRNA^{Tyr} s antikodonovou sekvencí GΨA/QΨA, tedy s modifikací pseudouridinu (Ψ) na druhé pozici v antikodonu (obr. 5) (Bienz & Kubli, 1981; Beier & Grimm, 2002). Též bylo ukázáno, že tRNA^{Tyr} s modifikací QΨA v antikodonu není schopná inkorporace na UAG stop kodon, oproti tomu tRNA^{Tyr} s modifikací GΨA v antikodonu je schopná inkorporace na UAG stop kodon (Bienz & Kubli, 1981; Beier & Grimm, 2002). Pseudouridin se účastní vazby s adeninem (v rámci antikodonu) stejně ochotně jako v původní vazbě s uracilem. Rozdíl je zde ve vodíkové vazbě mezi Ψ · A, díky které dochází pravděpodobně k lepší stabilizaci kodon-antikodonové interakce (Griffey et al., 1985). Mezi další popsané sup-tRNA schopné inkorporace na UGA stop kodon patří např. tRNA^{Trp}, tRNA^{Arg} nebo tRNA^{Cys} (Feng et al., 1990). Fearon et al. rovněž popsal na základě experimentů sledujících terminaci translace proteinu Ste6 v kvasinkách, tryptofanovou, lysinovou a tyrosinovou tRNA, které jsou schopné inkorporace na stop kodon UAG (Fearon et al., 1994).



Obrázek 6. Sup-tRNA a její využití v translaci. A) expanze genetického kódu za využití nekanonické aminokyseliny a ortogonálního páru (o-aaRS/o-tRNA); B) Syntéza neúplného proteinu v důsledku PTC; C) Pročítání PTC uměle navrženou sup-tRNA a syntéza proteinu o správné délce (Porter et al., 2021).

tRNA jako hlavní regulační komponenta

6 Transferová-mediátorová RNA (tmRNA)

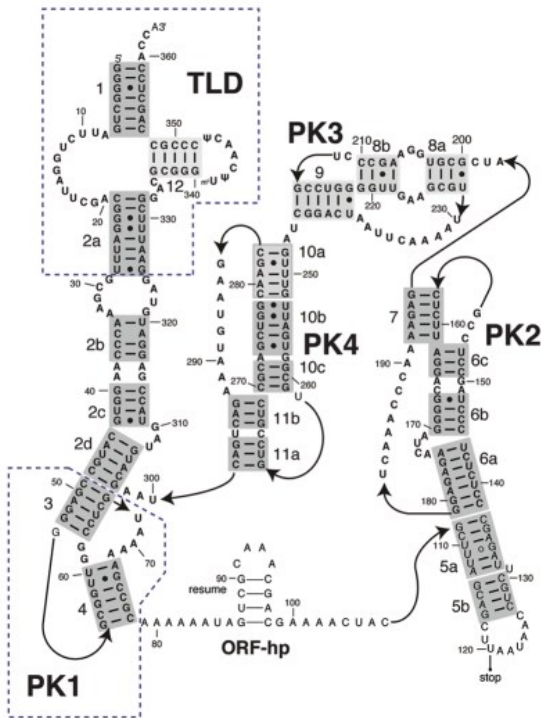
Jak je zjevné, translace je velice komplikovaný proces, který v buňce probíhá po celou dobu její existence. Je tedy jasné, že při takto náročném procesu může docházet k chybám, ale ne vždy jsou buňky v těchto situacích bezradné. Během evoluce si buňky vytvořily mechanismy, díky kterým jsou schopné se s těmito situacemi vypořádat. V této práci již byly popsány příklady, jak buňka přistupuje k tomu, když chce terminaci translace předejít. V této části práce bude představeno, jak se konkrétně bakteriální buňka vypořádává s dějem, kdy naopak k terminaci translace nedochází a je nutné ji ukončit jinak než kanonickou cestou.

V případě, kdy během terminace nedochází k rozpoznání terminační sekvence komplexem ribozomu, bakteriální buňka rekrutuje tzv. transferovou-mediátorovou tRNA (tmRNA), která napomáhá pokračující syntézu proteinu ukončit a nově vzniklý nefunkční protein určit k degradaci.

6.1 tm-RNA v komplexu s ribozomem

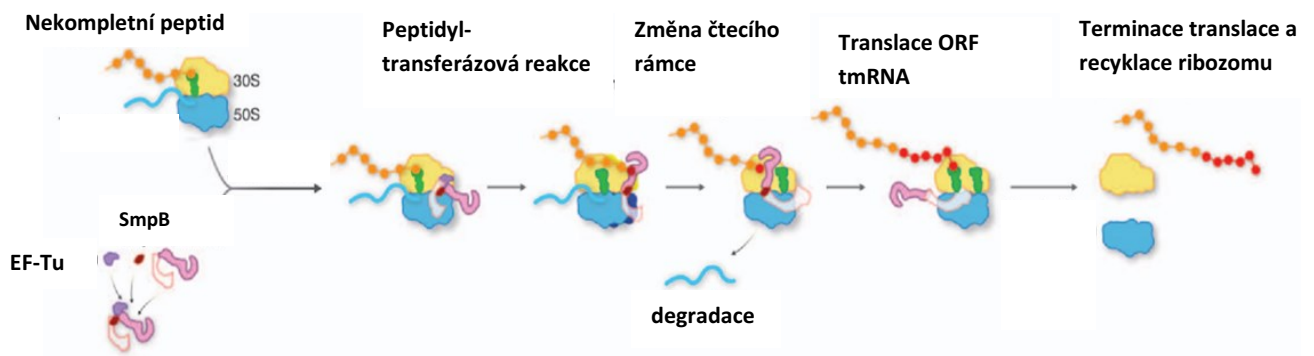
Translatující ribozom, který dosáhne 3' konce mRNA bez ukončení translace, tvoří tzv. „non-stop“ komplex. Takto „uvězněný“ ribozom podléhá mechanismu trans-translace, která má za účel kontrolu kvality proteosyntézy (Keiler et al., 1996). V tomto procesu vystupují dva hlavní hráči - tmRNA (chiméra mediátorové RNA a transferové RNA mající vlastnosti obou těchto molekul) a malý protein B (SmpB). Pokud by u bakterií k tomuto reparačnímu procesu nedocházelo, ribozomy by nemohly být recyklovány a znovu použity při iniciaci translace. Následkem by bylo toxické hromadění nefunkčních proteinů, které by mohlo vést až k usmrcení buňky.

Struktura tmRNA u *E. coli* se skládá z několika domén (obr. 7). První doménou je struktura mimikující tRNA – **TLD doména**. Tato doména napodobuje kanonickou tRNA^{Ala}, která je rozeznána alanyl-tRNA syntetázou a může tedy na ní vázat aminokyselinu alanin. Ovšem oproti kanonické tRNA^{Ala}, TLD postrádá antikodonovou smyčku a je ve vazbě s proteinem SmpB. (Fu et al., 2011). Druhou doménou je struktura podobná mRNA – **MLD doména**, která nese signální informaci pro označení proteinu k degradaci. MLD a TLD doména jsou propojeny přes čtyři pseudoknoty označené PK1 – PK4 (Fu et al., 2011).



Obrázek 7. Sekundární struktura tmRNA *E. coli*; TLD: tRNA doména; PK1-4: pseudoknoty 1-4; ORF-hp (MLD): vlásenka otevřeného čtecího rámce; značky 1-12 vedle šroubovic odkazují na standardní číslování (Fu et al., 2011).

Aminoacyl tRNA společně s proteinem SmpB vážou EF-Tu faktor a následně dochází k vazbě v A-místě ribozomu. Po akomodaci tmRNA a SmpB je prostřednictvím peptidyl-transferázové reakce přenesen nově syntetizovaný polypeptid na alanin nesoucí TLD doménu. Následně elongační faktor EF-G translokuje komplex tmRNA-SmpB z A místa do P místa ribozomu (Ramrath et al., 2012). Poté co dojde k translokaci, ribozom vymění původní mRNA za sekvenci MLD domény tmRNA a dosyntetizuje nově vznikající polypeptid, dle čtecího rámce obsaženého v této doméně. Tento krok zajistí žádoucí terminaci translace skrze stop kodonovou sekvenci a zacílí vzniklý protein k degradaci (obr. 8.) (Ramrath et al., 2012). Jakým způsobem ribozom vymění původní mRNA sekvenci za sekvenci obsaženou v tmRNA, zůstává jedním z hlavních cílů studie trans-translace. Ukazuje se, že důležitou složkou tohoto procesu je interakce mezi SmpB proteinem a nukleotidy, ležícím upstream od sekvence kodonu MLD domény (Fu et al., 2011).



Obrázek 8. Schéma trans-translačního procesu. Ribozom rozpoznává komplex tvořený tmRNA, proteinem SmpB a EF-Tu a dochází k vazbě do prázdného A-místa. Po akomodaci EF-Tu opustí ribozom a dojde skrze peptidyl-transferázovou reakci k přenosu polypeptidu na tmRNA. Poté je tmRNA společně s SmpB translokována do P-místa ribozomu, zatímco čtecí rámec translace je přesměrován na otevřený čtecí rámec (ORF) tmRNA. Translace pokračuje, dokud ribozom nedosáhne terminační sekvence stop kodonu v (ORF) tmRNA. Následuje ukončení translace, při níž se uvolní značený polypeptid k degradaci a ribozom se recykluje (Fu et al., 2011).

7 Struktury podobné molekule tRNA

V předchozí kapitole byla posána tmRNA, která disponuje vlastnostmi jak tRNA tak i mRNA molekuly. Není to ale jediný případ kdy se setkáváme se schopností molekuly mimkovat známe molekulární struktury. V roce 1970 byla objevena struktura podobná molekule tRNA u viru žluté mozaiky (TYMV) izolovaného z čínské zelí (*Brassica chinensis*) (Pinck et al., 1970). V této studii bylo ukázáno, že TLS může být aminoacylována aminoacyl-tRNA syntetázou nesoucí valin (Pinck et al., 1970). O několik dekád později experimenty s těmito jednovláknovými pozitivními RNA viry (ss RNA (+)), jakým je i TYMV, přiblížily strukturu TLS a osvětlily její účast na replikaci virového genomu RNA. Struktury podobné tRNA byly objeveny i u dalších organismů včetně savců. Mezi jejich funkce patří regulace replikace RNA, zesílení translace a účast na interakci s RNA vazebnými proteiny. TLS jsou schopné interakce s enzymy specifickými pro interakci s tRNA např. RNase P nebo CCA nukleotidyltransferázou a jsou schopné účastnit se tvorby ternárního komplexu s elongačním faktorem a GTP.

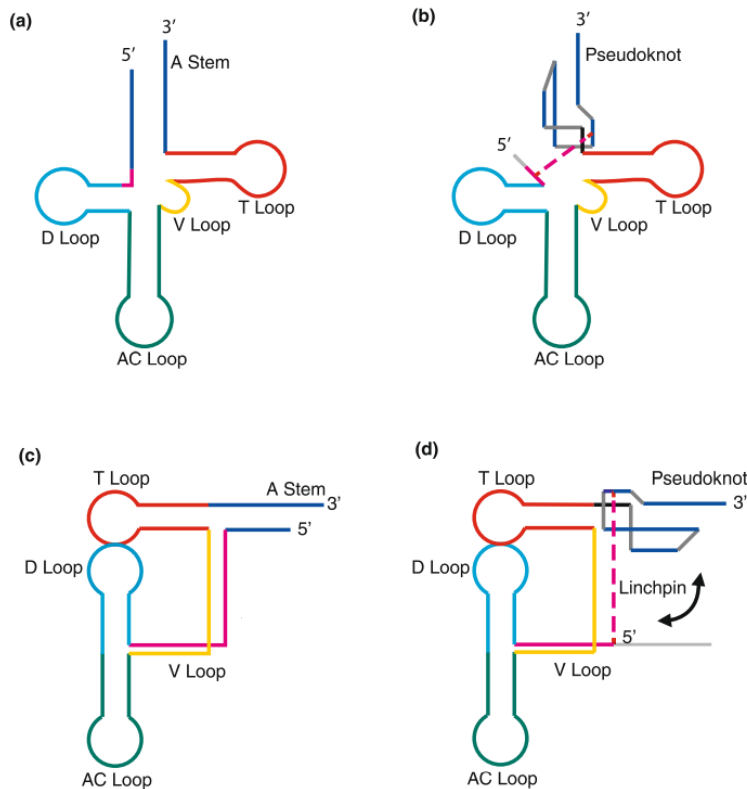
Jak již bylo vysvětleno, TLS jsou svojí strukturou podobné molekule tRNA. Nachází se zde ovšem několik odlišností na úrovni intramolekulárních interakcí (Colussi et al., 2014). Viry využívají TLS k mnoha odlišným funkcím, v kterých se účastní vazeb s molekulami rozličných forem a vlastností a tuto schopnost interakce jim umožňuje právě jejich unikátní struktura. TLS od tRNA převzala pro ni typickou 3D strukturu ve tvaru písmena L, aminoacylové rameno a antikodonovou smyčku. Tyto strukturní podobnosti umožňují TLS interagovat s enzymy specifickými pro reakce s tRNA a v neposlední řadě napomáhají k interakci s ribozomem. Virus žluté mozaiky není ale jediný čeledi *Bromoviridae*, který TLS uplatňuje v replikačním cyklu. Tento fenomén byl nalezen i u dalších zástupců této čeledi. (Barends et al., 2004). U bakterií byly nalezeny TLS, které regulují expresi aminoacyl-tRNA syntetázy (aaRS). Příkladem je MetRS, jejíž genová sekvence obsahuje alternativní čtecí rámec kódující tRNA^{Met} strukturu a při vazbě MetRS na tuto sekvenci dochází k represí vlastní exprese (Dardel et al., 1991).

7.1 Struktura TLS viru žluté mozaiky

Sekvence 3' nepřekládané oblasti (3' UTR) je viry aktivně využívána během jejich replikačního cyklu. U viru žluté mozaiky se v této 3' UTR oblasti nachází, již zmíněná sekvence TLS. V této podkapitole si krátce představíme konkrétní strukturu TYMV-TLS a její vliv na proces aminoacylace, kterých se účastní.

TYMV-TLS se skládá z několika domén a zaujímá konformaci podobnou 3D struktuře tRNA ve tvaru písmene L. Nese aminoacylovou doménu, antikodonovou smyčku, T- smyčku a D-smyčku. Stejně jako kanonická tRNA i molekula TLS má schopnost aminoacylace. Vazba s aminokyselinou je u kanonické tRNA uskutečňována na místě, kde mezi sebou páruje 5' a 3' konec tRNA molekuly. V případě

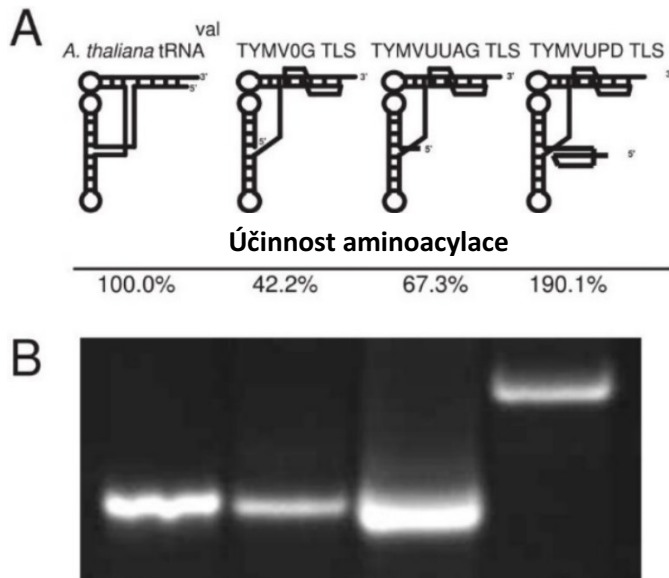
TLS nedochází k párování obou konců, daná aminokyselina se váže pouze na volný 3' konec molekuly, zatímco 5' konec je spojen se zbytkem virového genomu (Ganser et al., 2014). Tato struktura TLS tvoří na 3' konci formu pseudoknotu a nese též označení upstream pseudoknotová doména (UPD) (Obr. 9b) (Matsuda & Dreher, 2004). Sekvence na 5' konci TLS formuje tzv. „linchpin“, která má stabilizovat celkovou strukturu TLS (Obr. 9d) (Colussi et al., 2014).



Obrázek 9. Sekundární struktura tRNA (a,c) a TYMV TLS (b,d) (Colussi et al., 2014).

Posledních 82 nt TYMV virového genomu bylo označeno jako „core“ TLS. Předmětem jedné ze studií bylo, ukázat vliv okolní 5' a 3' sekvence na aminoacylaci TLS (Hammond et al., 2010). Pro experimenty byly připraveny konstrukty TYMV-TLS, které obsahovaly sekvenci dlouhou 82 nt tzv. „core“ a sekvenci o velikosti 82 nt „core“ doplněnou o délku 4 nt (TYMVUUAG TLS) směrem 5' upstream. Ukázalo se, že takto prodloužená sekvence (TYMVUUAG TLS), zvyšuje účinnost aminoacylace o 25% v porovnání s 82 nt dlouhou verzí TLS (Hammond et al., 2010). Třetí konstrukt byl prodloužen o UPD doménu, která zahrnuje celou 3' oblast TLS (TYMVUPD TLS). Takto připravený konstrukt dokázal 5x zvýšit účinnost aminoacylace než ukázaly výsledky se strukturou obsahující pouze sekvenci „core“ TLS (obr.10) (Hammond et al., 2010). Dále byla prokázána role 3' oblasti ve stabilizaci „core“ TLS. Tato oblast se účastní interakce s valin aminoacyl-tRNA syntetázou, a tím se ukazuje i celkový vliv na účinek aminoacylace (Hammond et al., 2010). Na základě těchto výsledků došli k závěru, že stabilizace „core“

kteří je odpovědné za interakci s aaRS, zvyšuje účinnost aminoacylace a tím zastává klíčovou roli během virové replikace (Hammond et al., 2010).



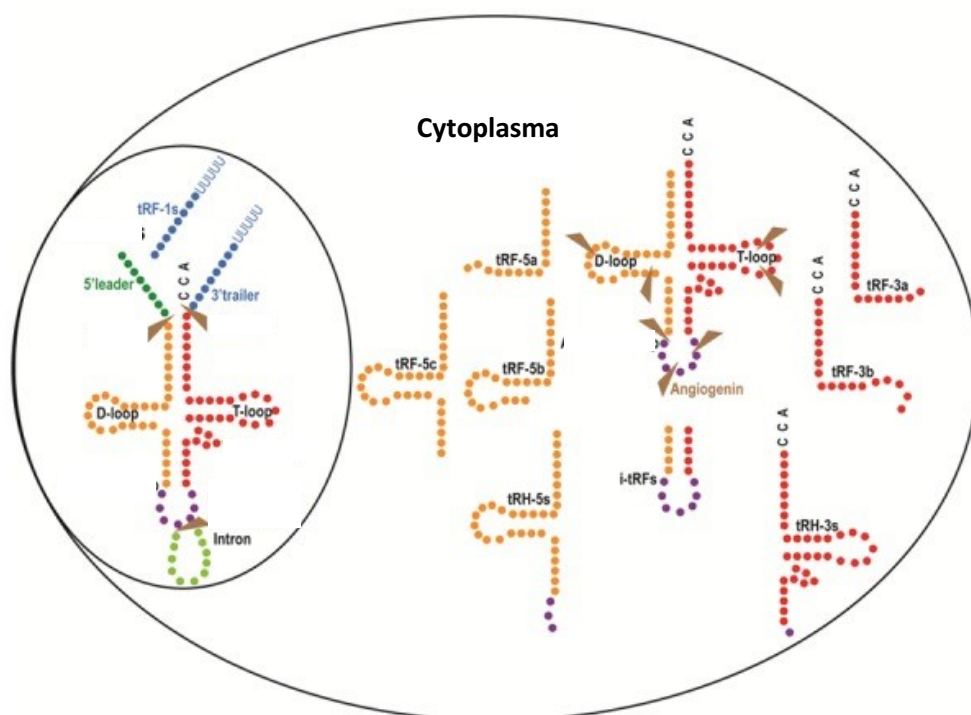
Obrázek 10. Aminoacylace tRNA^{Val} a TYMV TLS konstrukty. A, Schématická reprezentace jednotlivých struktur a jim odpovídající účinnost aminoacylace; B, nativní elektroforetický gel RNA reprezentující přítomnost jednotlivých TLS (Hammond et al., 2010).

7.2 TYMV-TLS účast v translaci

Genom TYMV kóduje tři proteiny s překrývajícím se čtecím rámcem, které jsou potřebné k jeho replikačnímu cyklu. Při translaci druhého z těchto proteinů, polyproteinu (PP), TYMV využívá mechanismu TLS na 3' konci jeho vlastního genomu. Pro překlad PP je nutná iniciace interní translace, uskutečněná vazbou TLS na start kodon tohoto proteinu a následná pseudotranslokace, čímž ribozom dokončí syntézu polyproteinu (Barends et al., 2003). Jiná studie ukázala, že iniciace translace polyproteinu probíhá spíše „leaky scanning“ mechanismem. V takovém případě nedojde k zahájení translace na prvním start kodonu, ale dochází k iniciaci translace na vzdálenějším start kodonu mRNA skvence (Matsuda, 2006). Mechanismus, jakým se TYMV-TLS účastní translace, není dnes zcela známý a zůstává předním zájmem výzkumu cíleného na viry obsahující TLS. Výzkum je soustředěn i na viry živočišné, též obsahující tyto sekvence např. RNA mengovirus, infikující myši (Salomon & Littauer, 1974).

8 Fragментy odvozené od tRNA (tRF)

Jednou z kategorií regulačních nekódujících tRNA zastávají fragmenty odvozené od tRNA (tRF), které nalzáme ve všech 3 doménách života. Regulace zahrnující tRF jsou často aktivovány během nádorových onemocnění, či stresem indukovaných onemocnění. Jejich prekurzorem může být molekula pre-tRNA, či maturovaná tRNA. Můžeme klasifikovat několik typů tRF, na základě jejich velikosti a původní sekvence od které jsou odvozeny (tRF-1, tRF-2, tRF-3, tRF-5, and i-tRF) (obr. 11) (Zhu et al., 2020). Mohou se účastnit jak postranskripční regulace, tak regulovat syntézu proteinů na úrovni translace. Jiné tRF se mohou například účastnit regulace buněčného cyklu či nervové soustavy na buněčné úrovni. Zásadní role tRF především spočívá v jejich terapeutickém využití. Výzkum využití tRF v klinické praxi se soustředí především na jejich užití v oblasti terapie rakoviny a neurologických onemocnění.



Obrázek 11. Biogeneze fragmentů (tRF). tRF na základě charakteristiky disponují rozdílnou délkou. Barvy označují původní sekvenci, od které jsou odvozeny. Zelená označuje intron přítomný u některých tRNA (Zhu et al., 2020).

8.1 Stresem indukované tRF (tiRNA)

Buněčná odpověď na stres je pro přežití buňky esenciální faktor. Rozeznáváme několik typů stresu, podle kterých buňka spouští patřičné regulační dráhy, které rekrutují odpovídající komponenty. Ve stresujících podmínkách dochází ke generování stresem indukovaných tRF (tiRNA) účastníci se stresové odpovědi. Takto vzniklé tiRNA jsou produktem části sestřižené maturované tRNA. V savčích buňkách dochází k vystřižení tiRNA z maturované tRNA, z oblasti antikodonové smyčky, které je katalyzováno specifickým enzymem angiogeninem (ANG), patřícím mezi RNázy A (Fu et al., 2009). Je možné, že k sestřihu dochází i za pomoci jiných RNáz indukovaných stresem. Tato oblast výzkumu vyžaduje ještě bližší náhled na celkový mechanismus sestřihu a formace tiRNA.

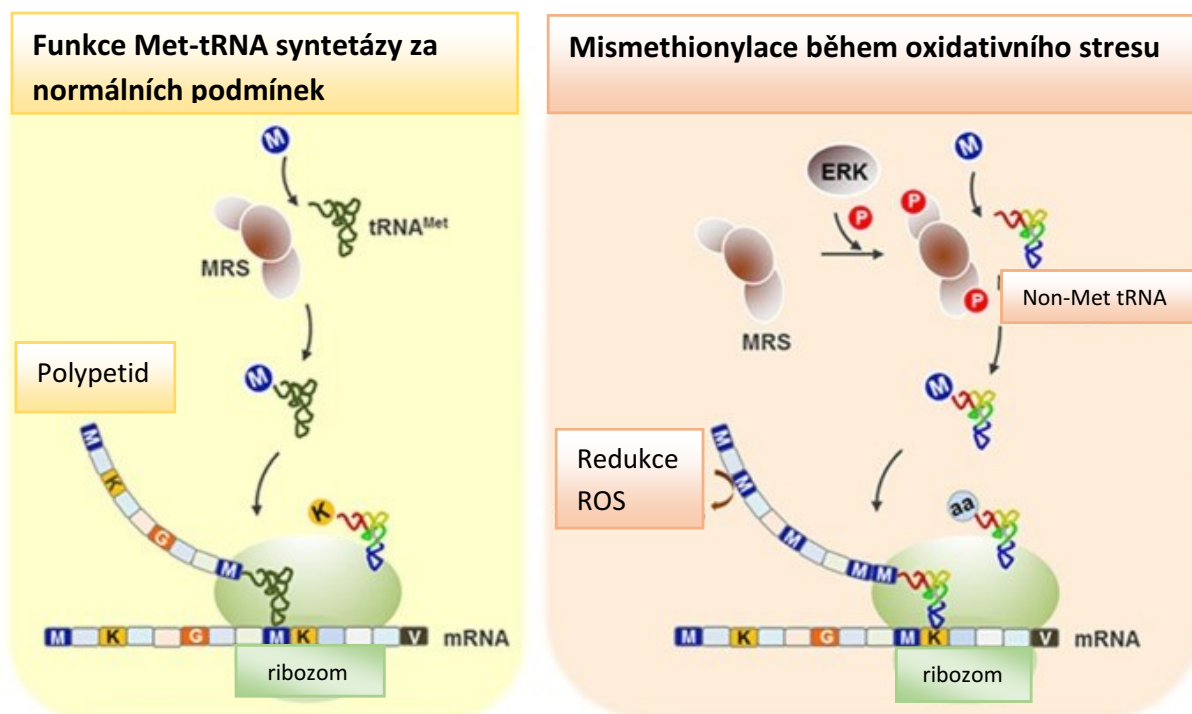
8.1.1 tiRNA a iniciační faktor eIF2 α

Dalším krokem kterým se eukaryotická buňka vypořádává se stresovými podmínkami, je inhibice translace pomocí fosforylace iniciačního faktoru eIF2 α . Fosforylace eIF2 α je běžnou součástí stresové odpovědi napříč eukaryoty (Knutsen et al., 2015). Jedna ze studií se zaměřila na roli tiRNA během fosforylace eIF2 α v myších fibroblastech (Yamasaki et al., 2009). Na základě výsledků této studie došli k závěru, že tiRNA se neúčastní aktivace fosforylace eIF2 α , oproti tomu bylo pozorováno, že eIF2 α může snížit indukci tiRNA (Yamasaki et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že tiRNA jsou schopné inhibovat proteosyntézu nezávisle na fosforylaci eIF2 α (Ivanov et al., 2011). V souladu s tímto bylo totiž ukázáno, že tiRNA jsou schopné inhibovat iniciaci translace skrze odstranění kvasinkového iniciačního faktoru eIF4G z preiniciačního komplexu. Vytěsnění eIF4G z mRNA obsahující 5' čepičku vede i k malému vytěsnění iniciačního faktoru eIF4E. Je tedy možné, že konformační změna eIF4G může způsobit snížení afinity eIF4E k 5' čepičce mRNA a tím může docházet k inhibici translace (Ivanov et al., 2011).

9 Misacylace specifických non-methionyl tRNA

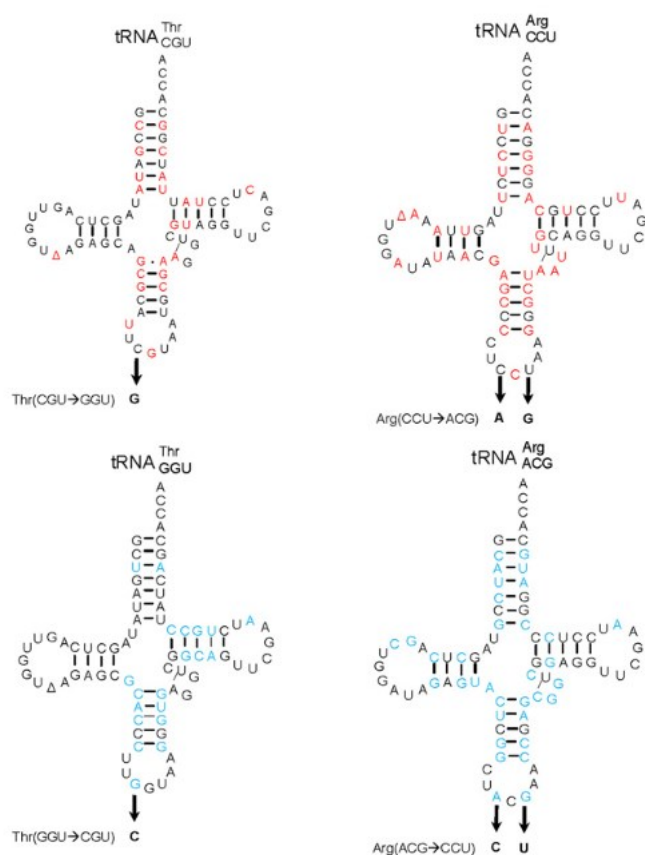
Během translace dochází k přiřazení aminokyseliny k odpovídající molekule tRNA. V tomto kroku má klíčovou úlohu aminoacyl-tRNA syntetáza (aaRS), která zprostředkovává vazbu mezi aminokyselinou a tRNA obsahující antikodonovou sekvenci odpovídající dané aminokyselině. Tato aktivita představuje zcela esenciální součást proteosyntézy i celkového chodu buňky. Ačkoli role aaRS se zdá být jasná, tak za určitých podmínek může buňka profitovat z misacylace tRNA, kdy dochází k vazbě jiné aminokyseliny na danou tRNA než té kanonické.

Například během oxidativního stresu dochází v savčích buňkách k přiřazení methioninu na jinou tRNA, která nese odpovídající UAC antikodon. Experimentálně bylo zjištěno, že k tomu dochází v případě, kdy je methionyl-tRNA syntetáza fosforylována na Ser209 a Ser825. K této fosforylaci dochází na základě extracelulárního signálu způsobeného reaktivními formami kyslíku. Takto fosforylovaná Met-tRNA syntetáza vykazuje sníženou afinitu k tRNA^{Met} a naopak zvýšenou afinitu k ostatním tRNA, což má za následek misacylaci tRNA^{Met} a v důsledku syntézu proteinů obsahujících sekvenci s vysokým množstvím methioninu. Ukázalo se, že tato regulace v konečném důsledku vede k menšímu poškození buňky a ke snížení hladiny reaktivních forem kyslíku (obr. 12) (Lee et al., 2014).



Obrázek 12. Schématický model mismethionylace během oxidativního stresu. MRS - methionyl-tRNA syntetáza; ERK- kynáza fosforylující MRS (Lee et al., 2014)

Mechanismus mismethionylace pozorujeme i u bakteriálních systémů. Studie ukázaly, že zásadním elementem, díky kterému dokáže Met-tRNA syntetáza „nabíjet“ jiné tRNA než tRNA^{Met}, je antikodonová sekvence. Byly sledovány dvě tRNA v *E. coli* účastnící se mismethionylace, a to tRNA^{Thr} a tRNA^{Arg}. V rámci experimentu byla mutována sekvence antikodonu obou těchto tRNA a následně sledován efekt na účinnost mismethionylace. Bylo zjištěno, že v případě záměny sekvence antikodonu tRNA^{Thr} z CGU na GGU a tRNA^{Arg} z CCU na ACG (obr. 12), nedocházelo k mismethionylaci vůbec. Díky těmto výsledkům je patrné, že sekvence antikodonu je zásadním elementem pro schopnost misacylace Met-tRNA syntetázy (Jones et al., 2011).



Obrázek 12. Sekvence tRNA^{Thr} a tRNA^{Arg} antikodonu. Porovnání struktury mismethionylovaných tRNA^{Thr} a tRNA^{Arg}, červená a modrá barva značí sekvenci odlišnosti (Jones et al., 2011).

10 Závěr

Primární úloha tRNA v translaci spočívá v její schopnosti připojovat aminokyseliny do vznikajícího proteinového řetězce na základě kodon-antikodonové interakce. Díky této interakci je buňka schopna překlada své genetické informace. Během iniciace translace dochází k vazbě iniciační tRNA přímo do P-místa ribozomu, kde může docházet k menší přesnosti kodon-antikodonové vazby oproti vazbě v A-místě ribozomu, kde jsou kladeny větší nároky na přesnost interakce mezi tRNA a sekvencí kodonu mRNA molekuly. Díky tomu je schopna iniciační tRNA interagovat s více antikodony a započít tak syntézu i z jiného start kodonu než AUG. Buňka je tedy schopna za určitých podmínek započít translaci na nekanonickém start kodonu a tím rozšířit variabilitu translatovaných produktů. Těmito podmínkami může být například buněčný stres. Nesprávná regulace iniciace translace z nekanonického start kodonu často vede k nádorovému bujení či neurodegenerativním onemocněním, proto zůstává i nadále v zájmu dnešního výzkumu.

Do vznikajícího polypeptidu jsou pomocí tRNA začleňovány aminokyseliny v pořadí, které určuje mRNA sekvence pročitána ribozomem. Buňky jsou schopné specifické regulace, kdy z jedné mRNA může vzniknout více odlišných produktů a to např. změnou čtecího rámce. V takovém případě může dojít k vazbě tRNA na antikodon, který není primárně určený pro vazbu s danou tRNA a to tím, že se tRNA posune po mRNA sekvenci o jeden až dva nukleotidy, což umožňuje variabilitu vznikajících polypeptidů.

Vazba dané aminokyseliny na tRNA závisí do jisté míry na její antikodonové sekvenci, kterou, společně s tRNA kostrou, rozeznávají specifické aminoacyl tRNA syntetázy. Za některých podmínek avšak může docházet k dalšímu procesu, který zvyšuje variabilitu proteomu, tzv. misacylaci. Například během oxidativního stresu může být methionin napojován na tRNA, která nese odpovídající antikodonovou sekvenci, a tím dochází k vzniku proteinů s odlišnou aminokyselinovou sekvencí, než která je zapsána v primární sekvenci genu kódující patřičný protein.

Díky specifickým vlastnostem tRNA je buňka rovněž schopna obejít vlastní terminaci translace a to skrz vazbu některých tRNA na terminační sekvenci stop kodonu (této vazby se konkrétně účastní supresorová nebo blíže příbuzná tRNA), čímž dochází k pročení stop kodonu. Zásadní vliv na schopnost tRNA pročitat daný stop kodon nese již potenciál sekvence samotného stop kodonu, ale i sekvenční struktura tRNA. Toto uplatnění tRNA při pročitání stop kodonu má velký potenciál v terapii předčasných terminačních kodonů, které jsou odpovědné za poměrně velký počet dědičných onemocnění.

Molekula tRNA je schopná účastnit se buněčných regulačních procesů i v jiných formách, než je její nejznámější forma jetelového listu. Jedním z těchto příkladů je transferová-mediátorová RNA (tmRNA), díky které je bakteriální buňka schopna ukončit translaci, pokud k terminaci přirozeně nedochází. Nejen bakterie, ale i viry využívají specifické struktury a funkce tRNA. Např. viry obsahují sekvenci obsaženou v jejich RNA genomu, která je součástí 5' konců některých virových mRNA, a je schopna napodobit strukturu tRNA. Takto pak interaguje se start kodonem na začátku sekvence kódující vlastní virový protein na téže mRNA, čímž zahájí v buňce translaci virového genomu. Během nádorových či stresem indukovaných onemocnění buňka může rovněž využívat tzv. fragmentů odvozených od tRNA molekuly. Tyto fragmenty, vznikající sestřížením pre-tRNA či maturované tRNA, jsou buňkou ať už prostřednictvím regulace translace nebo zcela mimo ní využívány např. pro umlčení transpozonů, regulaci buněčného cyklu a dalších. Pole působnosti tRNA je tedy nečekaně verzatilní a další výzkum nás jistě ještě velmi překvapí.

11 Literatura

- Adams, S. E., Mellor, J., Gull, K., Sim, R. B., Tuite, M. F., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1987). The functions and relationships of Ty-VLP proteins in yeast reflect those of mammalian retroviral proteins. *Cell* 49, 111-119.
- Aishwarya Devaraj and Kurt Fredrick, *Mol Microbiol*. 2010 Dec; 78(6): 1500–1509.
- Anzalone, A. V., Zairis, S., Lin, A. J., Rabadan, R., & Cornish, V. W. (2019). Interrogation of Eukaryotic Stop Codon Readthrough Signals by in Vitro RNA Selection. *Biochemistry*, 58(8), 1167–1178.
- Barends, S., Bink, H. H. J., van den Worm, S. H. E., Pleij, C. W. A., & Kraal, B. (2003). Entrapping ribosomes for viral translation: tRNA mimicry as a molecular Trojan horse. *Cell*, 112(1), 123–129.
- Barends, S., Rudinger-Thirion, J., Florentz, C., Giegé, R., Pleij, C. W. A., & Kraal, B. (2004). tRNA-like structure regulates translation of Brome mosaic virus RNA. *Journal of Virology*, 78(8), 4003–4010.
- Beier, H. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4767–4782.
- Beier, H. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4767–4782. <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4767>
- Beier, H., & Grimm, M. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic acids research*, 29(23), 4767–4782.
- Beier, H., Barciszewska, M., Krupp, G., Mitnacht, R., & Gross, H. J. (1984). UAG readthrough during TMV RNA translation: isolation and sequence of two tRNAs with suppressor activity from tobacco plants. *The EMBO Journal*, 3(2), 351–356.
- Belcourt, M. F., and P. J. Farabaugh. 1990. Ribosomal frameshifting in the yeast retrotransposon Ty: tRNAs induce slippage on a 7 nucleotide minimal site. *Cell* 62:339–352.
- Beznosková, P., Cuchalová, L., Wagner, S., Shoemaker, C. J., Gunišová, S., von der Haar, T., & Valášek, L. S. (2013). Translation Initiation Factors eIF3 and HCR1 Control Translation Termination and Stop Codon Read-Through in Yeast Cells. *PLoS Genetics*, 9(11), e1003962.
- Beznosková, P., Gunišová, S., & Valášek, L. S. (2016). Rules of UGA-N decoding by near-cognate tRNAs and analysis of readthrough on short uORFs in yeast. *RNA*, 22(3), 456–466.
- Bienz, M., & Kubli, E. (1981). Wild-type tRNA^{TyrG} reads the TMV RNA stop codon, but Q base-modified tRNA^{TyrQ} does not. *Nature*, 294(5837), 188–190.
- Bouadloun, F., Srichaiyo, T., Isaksson, L. A., & Björk, G. R. (1986). Influence of modification next to the anticodon in tRNA on codon context sensitivity of translational suppression and accuracy. *Journal of Bacteriology*, 166(3), 1022–1027.
- Brault, V., & Miller, W. A. (1992). Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2262–2266.
- Caliskan, N., Wohlgemuth, I., Korniy, N., Pearson, M., Peske, F., & Rodnina, M. V. (2017). Conditional Switch between Frameshifting Regimes upon Translation of dnaX mRNA. *Molecular Cell*, 66(4), 558-567.e4.

Canellakis, E. S., Viceps-Madore, D., Kyriakidis, D. A., & Heller, J. S. (1979). The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines. *Current Topics in Cellular Regulation*, *15*, 155–202.

Colussi, T. M., Costantino, D. A., Hammond, J. A., Ruehle, G. M., Nix, J. C., & Kieft, J. S. (2014). The structural basis of tRNA mimicry and conformational plasticity by a viral RNA. *Nature*, *511*(7509), 366–369.

Craigie, W. J., & Caskey, C. T. (1986). Expression of peptide chain release factor 2 requires high-efficiency frameshift. *Nature*, *322*(6076), 273–275.

Craigie, W.J., Cook, R.G., Tate, W.P., Caskey, C.T., 1985. Bacterial peptide chain release factors: conserved primary structure and possible frameshift regulation of release factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *82*,3616–3620.

Cridge, A. G., Crowe-McAuliffe, C., Mathew, S. F., & Tate, W. P. (2018). Eukaryotic translational termination efficiency is influenced by the 3' nucleotides within the ribosomal mRNA channel. *Nucleic Acids Research*, *46*(4), 1927–1944.

Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z., & Zietkiewicz, E. (2018). Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, *24*(1), 25.

Dardel F, Panvert M & Fayat G (1990) Transcription and regulation of expression of the Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase gene. *Mol Gen Genet*, *223*,121–133.

Deng, J., Ptashkin, R. N., Chen, Y., Cheng, Z., Liu, G., Phan, T., Deng, X., Zhou, J., Lee, I., Lee, Y. S., & Bao, X. (2015). Respiratory Syncytial Virus Utilizes a tRNA Fragment to Suppress Antiviral Responses Through a Novel Targeting Mechanism. *Molecular Therapy*, *23*(10), 1622–1629.

Dever, T. E., Dinman, J. D., & Green, R. (2018). Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *10*(8), a032649.

Dinman, J.D., Icho, T., and Wickner, R.B. 1991. A –1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus forms a gag-pol fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*: 174–178.

Farabaugh, P. J. (1996). Programmed translational frameshifting. *Microbiological Reviews*, *60*(1), 103–134.

Farabaugh, P. J., Zhao, H., & Vimaladithan, A. (1993). A novel programmed frameshift expresses the POL3 gene of retrotransposon Ty3 of yeast: frameshifting without tRNA slippage. *Cell*, *74*(1), 93–103.

Fearon, K., McClendon, V., Bonetti, B., & Bedwell, D. M. (1994). Premature translation termination mutations are efficiently suppressed in a highly conserved region of yeast Ste6p, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(27), 17802–17808.

Feng, Y. X., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Rein, A., & Levin, J. G. (1990). Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(22), 8860–8863.

Fong, W. F., Heller, J. S., & Canellakis, E. S. (1976). The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of putrescine to cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*, *428*(2), 456–465.

- Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegin, S., Dugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A. L., Celis, J. E., & Philippe, M. (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature*, *372*(6507), 701–703.
- Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., & Zheng, X. (2009). Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Letters*, *583*(2), 437–442.
- Fu, J., Hashem, Y., Wower, J., & Frank, J. (2011). tmRNA on its way through the ribosome: two steps of resume, and what next? *RNA Biology*, *8*(4), 586–590.
- Ganser, L. R., Mustoe, A. M., & Al-Hashimi, H. M. (2014). An RNA tertiary switch by modifying how helices are tethered. *Genome Biology*, *15*(7).
- Griffey, R. H., Davis, D., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Bax, A., Hawkins, B., & Poulter, C. D. (1985). 15N-labeled Escherichia coli tRNA^{fMet}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Tyr}, and tRNA^{Phe}. Double resonance and two-dimensional NMR of N1-labeled pseudouridine. *The Journal of biological chemistry*, *260*(17), 9734–9741.
- Hammond, J. A., Rambo, R. P., & Kieft, J. S. (2010). Multi-domain Packing in the Aminoacylatable 3' End of a Plant Viral RNA. *Journal of Molecular Biology*, *399*(3), 450–463.
- Harrell, L., Melcher, U., & Atkins, J. F. (2002). Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons. *Nucleic acids research*, *30*(9), 2011–2017.
- Hellen, C. U. T. (2018). Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(10), a032656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>
- Hirsh, D. (1971). Tryptophan transfer RNA as the UGA suppressor. *Journal of Molecular Biology*, *58*(2), 439–458.
- Horie, F., Endo, K., & Ito, K. (2020). Artificial Protein-Responsive Riboswitches Upregulate Non-AUG Translation Initiation in Yeast. *ACS synthetic biology*, *9*(7), 1623–1631.
- Chen, X., Chamorro, M., Lee, S. I., Shen, L. X., Hines, J. V., Tinoco, I., & Varmus, H. E. (1995). Structural and functional studies of retroviral RNA pseudoknots involved in ribosomal frameshifting: nucleotides at the junction of the two stems are important for efficient ribosomal frameshifting. *The EMBO Journal*, *14*(4), 842–852.
- Ivanov, I. P., Gesteland, R. F., & Atkins, J. F. (2000). Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit. *Nucleic Acids Research*, *28*(17), 3185–3196.
- Ivanov, I. P., Wei, J., Caster, S. Z., Smith, K. M., Michel, A. M., Zhang, Y., Firth, A. E., Freitag, M., Dunlap, J. C., Bell-Pedersen, D., Atkins, J. F., & Sachs, M. S. (2017). Translation Initiation from Conserved Non-AUG Codons Provides Additional Layers of Regulation and Coding Capacity. *mBio*, *8*(3), e00844-17.
- Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., & Anderson, P. (2011). Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Molecular Cell*, *43*(4), 613–623.
- Jarrous, N., Mani, D., & Ramanathan, A. (2021). Coordination of transcription and processing of tRNA. *The FEBS Journal*.

- Jones, T. E., Alexander, R. W., & Pan, T. (2011). Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(17), 6933–6938.
- Jungreis, I., Lin, M. F., Spokony, R., Chan, C. S., Negre, N., Victorsen, A., White, K. P., & Kellis, M. (2011). Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa. *Genome Research*, *21*(12), 2096–2113.
- Kato, Yusuke. (2019). Translational Control using an Expanded Genetic Code. *International Journal of Molecular Sciences*. 20. 887. 10.3390/ijms20040887.
- Keiler, K. C., Waller, P. R. H., & Sauer, R. T. (1996). Role of a Peptide Tagging System in Degradation of Proteins Synthesized from Damaged Messenger RNA. *Science*, *271*(5251), 990–993.
- Knutsen, J. H. J., Rodland, G. E., Boe, C. A., Haland, T. W., Sunnerhagen, P., Grallert, B., & Boye, E. (2015). Stress-induced inhibition of translation independently of eIF2 phosphorylation. *Journal of Cell Science*, *128*(23), 4420–4427.
- Kozak M. (1989). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular and cellular biology*, *9*(11), 5073–5080.
- Kremp, M., Bittner, E., Martorana, D., Klingenberger, A., Stehlik, T., Bölker, M., & Freitag, J. (2020). Non-AUG Translation Initiation Generates Peroxisomal Isoforms of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Fungi. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 251.
- Lee, J. Y., Kim, D. G., Kim, B.-G., Yang, W. S., Hong, J., Kang, T., Oh, Y. S., Kim, K. R., Han, B. W., Hwang, B., Kang, B., Kang, M.-S., Kim, M.-H., Kwon, N. H., & Kim, S. (2014). Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation against oxidative stresses. *Journal of Cell Science*.
- Levitz, R., Chapman, D., Amitsur, M., Green, R., Snyder, L., & Kaufmann, G. (1990). The optional *E. coli* *prf* locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease. *The EMBO Journal*, *9*(5), 1383–1389.
- Li, G., & Rice, C. M. (1993). The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *Journal of Virology*, *67*(8), 5062–5067.
- Lin, J. P., Aker, M., Sitney, K. C., & Mortimer, R. K. (1986). First position wobble in codon-anticodon pairing: amber suppression by a yeast glutamine tRNA. *Gene*, *49*(3), 383–388.
- Lueck, J. D., Yoon, J. S., Perales-Puchalt, A., Mackey, A. L., Infield, D. T., Behlke, M. A., Pope, M. R., Weiner, D. B., Skach, W. R., McCray, P. B., & Ahern, C. A. (2019). Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons. *Nature Communications*, *10*(1).
- Maia, I. G., Seron, K., Haenni, A. L., and Bernardi, F. (1996). Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Mol. Biol.* *32*, 367–391.
- Matsuda, D. (2006). Close spacing of AUG initiation codons confers dicistronic character on a eukaryotic mRNA. *RNA*, *12*(7), 1338–1349.
- Matsuda, D., & Dreher, T. W. (2004). The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer. *Virology*, *321*(1), 36–46.

- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., & Hayashi, S. (1995). Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, *80*(1), 51–60.
- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., & Hayashi, S. (1995). Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, *80*(1), 51–60.
- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., & Hayashi, S. (1995). Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, *80*(1), 51–60.
- McCaughan, K. K., Brown, C. M., Dalphin, M. E., Berry, M. J., & Tate, W. P. (1995). Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(12), 5431–5435.
- Merrick, W. C., & Pavitt, G. D. (2018). Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(12), a033092.
- Morikawa, S., & Bishop, D. H. (1992). Identification and analysis of the gag-pol ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. *Virology*, *186*(2), 389–397.
- Nakamura, Y., & Ito, K. (2002). A tripeptide discriminator for stop codon recognition. *FEBS Letters*, *514*(1), 30–33.
- Niu, J., Xue, A., Chi, Y., Xue, J., Wang, W., Zhao, Z., Fan, M., Yang, C. H., Shao, Z., Pfeffer, L. M., Wu, J., & Wu, Z.-H. (2016). Induction of miRNA-181a by genotoxic treatments promotes chemotherapeutic resistance and metastasis in breast cancer. *Oncogene*, *35*(10), 1302–1313.
- O’Sullivan, M., Poitevin, F., Sierra, R., Gati, C., Dao, E., Rao, Y., Aksit, F., Ciftci, H., Corsepis, N., Greenhouse, R., Hayes, B., Hunter, M., Liang, M., McGurk, A., Mbgam, P., Obrinsky, T., Pardo-Avila, F., Seaberg, M., Cheng, A., & Ricci, A. (2018). Aminoglycoside ribosome interactions reveal novel conformational states at ambient temperature. *Nucleic Acids Research*, *46*(18), 9793–9804.
- P. Beznosková, P., Wagner, S., Jansen, M. E., von der Haar, T., & Valášek, L. S. (2015). Translation initiation factor eIF3 promotes programmed stop codon readthrough. *Nucleic Acids Research*, *43*(10), 5099–5111.
- PELHAM, H. R. B. (1978). Leaky UAG termination codon in tobacco mosaic virus RNA. *Nature*, *272*(5652), 469–471.
- Petros LM, Howard MT, Gesteland RF, Atkins JF. Polyamine sensing during antizyme mRNA programmed frameshifting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;338:1478–1489.
- Pinck, M., Yot, P., Chapeville, F., & Duranton, H. M. (1970). Enzymatic Binding of Valine to the 3’ End of TYMV-RNA. *Nature*, *226*(5249), 954–956.
- Plant, E. P., & Dinman, J. D. (2006). Comparative study of the effects of heptameric slippery site composition on –1 frameshifting among different eukaryotic systems. *RNA*, *12*(4), 666–673.
- Porter, J. J., Heil, C. S., & Lueck, J. D. (2021). Therapeutic promise of engineered nonsense suppressor tRNAs. *WIREs RNA*, *12*(4).

- Pure, G. A., Robinson, G. W., Naumovski, L., & Friedberg, E. C. (1985). Partial suppression of an ochre mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by multicopy plasmids containing a normal yeast tRNA^{Gln} gene. *Journal of molecular biology*, 183(1), 31–42.
- Ramrath, D. J. F., Yamamoto, H., Rother, K., Wittek, D., Pech, M., Mielke, T., Loerke, J., Scheerer, P., Ivanov, P., Teraoka, Y., Shpanchenko, O., Nierhaus, K. H., & Spahn, C. M. T. (2012). The complex of tmRNA–SmpB and EF-G on translocating ribosomes. *Nature*, 485(7399), 526–529.
- Rom, E., & Kahana, C. (1994). Polyamines regulate the expression of ornithine decarboxylase antizyme in vitro by inducing ribosomal frame-shifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3959–3963.
- Rubio Gomez, M. A., & Ibba, M. (2020). Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA*, 26(8), 910–936.
- Saffert, P., Adamla, F., Schieweck, R., Atkins, J. F., & Ignatova, Z. (2016). An Expanded CAG Repeat in Huntingtin Causes +1 Frameshifting. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18505–18513.
- Salomon, R., & Littauer, U. Z. (1974). Enzymatic acylation of histidine to mengovirus RNA. *Nature*, 249(5452), 32–34.
- Samhita, L., Virumäe, K., Remme, J., & Varshney, U. (2013). Initiation with elongator tRNAs. *Journal of bacteriology*, 195(18), 4202–4209.
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., & Nirenberg, M. (1968). Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 768–774.
- Shigemoto K., Brennan, J., Walls, E., Watson, C. J., Stott, D., Rigby, P. W. J. and Reith, A. D. (2001) Identification and characterisation of a developmentally regulated mammalian gene that utilises –1 programmed ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res.*, 29, 4079–4088.
- Shivaya Valasek, L. (2012). “Ribozoomin” – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). *Current Protein & Peptide Science*, 13(4), 305–330.
- Starck, S. R., Jiang, V., Pavon-Eternod, M., Prasad, S., McCarthy, B., Pan, T., & Shastri, N. (2012). Leucine-tRNA initiates at CUG start codons for protein synthesis and presentation by MHC class I. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6089), 1719–1723.
- Temple, G. F., Dozy, A. M., Roy, K. L., & Kan, Y. W. (1982). Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature*, 296(5857), 537–540.
- Ten Dam, E. B., Pleij, C. W. A., & Bosch, L. (1990). RNA pseudoknots: Translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes*, 4(2), 121–136.
- Thompson, R. C., Dix, D. B., Gerson, R. B., & Karim, A. M. (1981). Effect of Mg²⁺ concentration, polyamines, streptomycin, and mutations in ribosomal proteins on the accuracy of the two-step selection of aminoacyl-tRNAs in protein biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), 6676–6681.
- Tükenmez, H., Xu, H., Esberg, A., & Byström, A. S. (2015). The role of wobble uridine modifications in +1 translational frameshifting in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9489–9499.

Weiner, A. M., & Weber, K. (1973). A single UGA codon functions as a natural termination signal in the coliphage Q β coat protein cistron. *Journal of Molecular Biology*, 80(4), 837–855.

Weiss R.B., Dunn, D.M., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. (1987) Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5, and +6 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 52, 687–693.

White, B. N., Teneb, G. M., Holden, J., & Suzuki, D. T. (1973). Activity of a transfer RNA modifying enzyme during the development of *Drosophila* and its relationship to the su(s) locus. *Journal of Molecular Biology*, 74(4), 635–651.

Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.-F., & Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *The Journal of Cell Biology*, 185(1), 35–42.

Young, T. S., Ahmad, I., Brock, A., & Schultz, P. G. (2009). Expanding the Genetic Repertoire of the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*†. *Biochemistry*, 48(12), 2643–2653.

Zhu, P., Yu, J., & Zhou, P. (2020). Role of tRNA-derived fragments in cancer: novel diagnostic and therapeutic targets tRFs in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(2), 393–402.

Zitomer, R. S., Walthall, D. A., Rymond, B. C., & Hollenberg, C. P. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes recognize non-AUG initiation codons. *Molecular and cellular biology*, 4(7), 1191–1197.