

Genetická podstata inkorporácie selénu do proteínov v bunkách baktérií

MARIÁN MAČOR - JOZEF GRONES

SÚHRN. Inkorporácia mikroelementov do bunkových proteínov je závislá od mnohých regulačných faktorov v priebehu translačného procesu. Jedným z významných mikroelementov je selén inkorporovaný do selenoproteínov. Reguláciou syntézy selenoproteínov na úrovni translácie sa zaoberá táto prehľadová práca.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: genetický kód; selenoproteín; supresorové mutácie; translácia

Bunky živých organizmov sú charakterizované dvomi základnými faktormi, ktoré si navzájom protirečia; prvým je presnosť a druhým flexibilita. Všetky procesy, ktoré sa podieľajú na prenose genetickej informácie z DNA do proteínov, teda celý translačný aparát, je veľmi pružný. Pružnosť takýchto procesov závisí od rozmanitosti, konformácie štruktúr a komplexnosti zložiek zúčastňujúcich sa na týchto procesoch. Pružnosť je charakterizovaná tromi základnými vlastnosťami, ktoré sprevádzajú centrálnu dogmu molekulárnej biológie. Patria sem rozdelenie na zmysluplné a na nezmyselné kodóny, zachovanie čítacieho rámca a nakoniec sekvenčné čítanie molekuly mRNA [1,2].

V tomto článku sa pokúsime diskutovať o troch procesoch, ktoré treba pokladať za výnimku z vyššie uvedených pravidiel. Pôjde o transláciu cez terminačný kodón, posun čítacieho rámca a obídenie skupiny kodónov. Tieto spôsoby je nevyhnutné považovať za alternatívnu cestu čítania genetického kódu [3,4].

V tejto stati sa zaoberáme existenciou alternatívnej cesty čítania genetického kódu u *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Určite tieto procesy podobným spôsobom prebiehajú aj u kvasiniek, rastlín, živočíchov a čiastočne aj u retrovirusov a retrotranspozónov [3,4].

RNDr. Marián Mačor, CSc., Doc. RNDr. Jozef Grones, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.

Génové produkty zahrnuté v biosyntéze selenocysteínu

Mnohé enzýmové reakcie sú závislé od prítomnosti niektorých kovov, ako je železo, molybdén, nikel, kobalt a selén, ktoré sú kofaktormi enzýmových reakcií.

Selén v bunkách živých organizmov sa vyskytuje viazaný na cysteín a selenocysteín. Selenocysteín je jednou z integrálnych súčastí enzýmu glutatiónperoxidázy, ktorý sa zúčastňuje pri intracelulárnom opravnom mechanizme oxidačných poškodení v bunke. Selén je tiež prítomný v 5'-jódotyroníndeamináze, v selenoproteíne P a ďalších selenoproteínoch. V poslednom období sa ukazuje, že selenoproteíny majú podstatný pozitívny vplyv na imunitný systém vyšších organizmov [5-7].

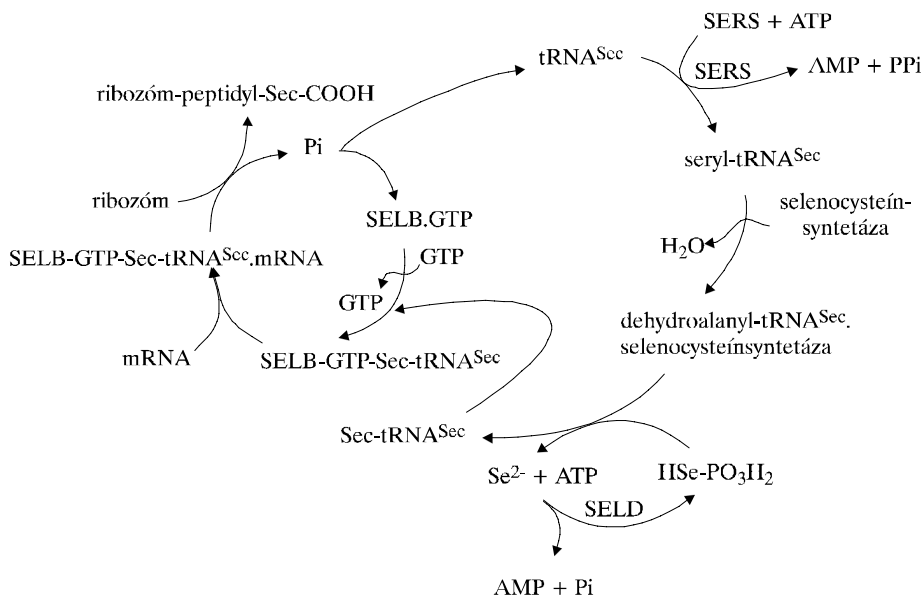
Nevyhnutnosť prítomnosti selénu pri degradácii kyseliny mravčej bola zistená už v roku 1954, ale trvalo takmer 30 rokov, než sa zistila skutočná príčina [8]. Selén sa inkorporuje do troch enzýmov, formátdehydrogenáz (FDH - 3 izoenzýmy: FDH_H, FDH_N, FDH_O). Pri syntéze proteínov FDH sa selenocysteín ako aminokyselina inkorporuje do proteínu v mieste kodónu UGA na mRNA. Prítomnosť selenocysteínu v izoenzýmoch FDH bola dokázaná použitím rádioaktívne značeného selénu (⁷⁵Se) [9,10]. Biosyntézy selenocysteínu sa zúčastňuje niekoľko génov (tab. 1).

Mutanty s porušenou formátdehydrogenázou vykazujú poruchy v biosyntéze alebo v inkorporácii selenocysteínu do proteínového reťazca. Selenocysteínsyntetáza [EC 4.2.1] je produktom génu *selA*. Enzým je homodekamér zložený z peptidov s molekulovou hmotnosťou 50000. Vytvára väzbu medzi aminoskupinami v piatich molekulách seryl-tRNA^{Sec} s karboxylovou skupinou enzýmu pyridoxal-5'-fosfátu. Elimináciou molekuly vody vzniká selenocysteyl-tRNA^{Sec}, pričom aktiváciu selénu zabezpečuje selenofosfátsyntetáza, ktorá je kódovaná génom *selD* [11-15].

TAB. 1. Gény kódujúce enzýmy zúčastňujúce sa pri biosyntéze selenocysteínu.
TAB. 1. Genes encoding enzymes participating in the biosynthesis of selenocysteine.

Gén ¹		Génový produkt ²	Umiestnenie na chromozóme ³ [min]
<i>selA</i>	<i>fdhA</i>	selenocysteínsyntetáza	80,4
<i>selB</i>	<i>fdhA</i>	selenocysteyl-tRNA ^{Sec} - špecifický elongačný faktor	80,4
<i>selC</i>	<i>fdhC</i>	tRNA ^{Sec}	82,4
<i>selD</i>	<i>fdhB</i>	selenofosfátsyntetáza	38,5

1 - gene, 2 - gene product, 3 - location on chromosome [min].



OBR. 1. Cesta biosyntézy selenocysteínu a spôsob jeho inkorporácie do proteínov.
FIG. 1. Biosynthetic pathway of selenocysteine and the mode of its incorporation into proteins.

Selenofosfátsyntetáza [EC 6.5.1] je monomérny proteín s molekulovou hmotnosťou 37000. Na N-terminálnom konci proteínu je primárna štruktúra -Cys-17-Gly-Cys-19- (v pozícii 17 je cysteinylový zvyšok) nevyhnutná pre katalytickú aktivitu enzýmu [16]. Selenocysteyl-t-RNA^{Sec} pre dekódujúci proces na ribozóme vyžaduje špecifický translačný faktor SELB. Faktor SELB je funkčne homologický s elongačným faktorom (EF-Tu) [17]. SELB má schopnosť viazať sa a špecificky rozoznávať štruktúru nachádzajúcu sa na molekule mRNA kódujúcej prokaryotické selenoproteíny [16]. Gény *sel* sú exprimované konštitutívne, čím organizmus reaguje na potrebu selénu pre syntézu formátdehydrogenáz [17,18] (obr. 1).

Supresia terminačných kodónov

U prokaryotických a eukaryotických organizmov je terminácia syntézy polypeptidového reťazca signalizovaná jedným z troch terminačných kodónov: UAA (ochre), UAG (amber) a UGA (opal). Keď komplex uvoľňujúcich translačných faktorov na mRNA rozozná terminačný kodón, dochádza k uvoľneniu polypeptidového reťazca. Ak je terminačný kodón na ribozóme

v mieste A (alebo v jeho tesnej blízkosti) rozpoznávaný príslušným uvoľňovacím faktorom, dochádza k hydrolýze peptidu z peptidyl-tRNA v ribozomálnom mieste P [11].

V bunkách *E. coli* riadia termináciu dva špecifické uvoľňujúce faktory: uvoľňujúci faktor 1 (RF1) katalyzuje termináciu na kodónoch UAA a UAG, a uvoľňujúci faktor 2 (RF2) katalyzuje termináciu na kodónoch UAA a UGA [19]. Faktor RF1 je kódovaný génom *prfA*, ktorý bol na chromozóme DNA *E. coli* mapovaný v oblasti 27. minúty. Mutácie v tomto gène spôsobujú supresie dvoch nezmyselných kodónov [20]. Gén *prfB* kóduje faktor RF2 mapovaný v oblasti 62. minúty na chromozóme baktérie *E. coli*. Mutácie v tomto gène supresujú nezmyselné kodóny UGA [21]. Niektoré z týchto mutácií sú letálne [22]. Tretí uvoľňujúci faktor (RF3) je kódovaný génom *tos* a bol mapovaný v oblasti 99. minúty na chromozóme *E. coli*. Faktor RF3 stimuluje aktivitu faktorov RF1 aj RF2 [23] a potláča (supresuje) všetky tri nezmyselné kodóny [24-26].

Pri supresii terminačných kodónov súťažia uvoľňovacie faktory a supresorové tRNA o terminačné kodóny. Mutácia uvoľňovacieho faktora spôsobí zdržanie uvoľnenia polypeptidového reťazca z ribozómu, čím sa umožní inkorporácia aminokyseliny do proteínu v mieste terminácie.

Pri nezmyselnej supresii (terminačný kodón je rozpoznávaný špecifickou tRNA) dochádza k začleneniu aminokyselín a pri posunovej supresii (frameshift suppression) dochádza k posunu translačného aparátu do rôznych čítacích rámcov v polohách +1 alebo -1.

Úloha ribozómov pri supresii

Interakcia uvoľňovacích faktorov s ribozómami je nevyhnutná pre uvoľnenie polypeptidového reťazca. Viazanie uvoľňovacích faktorov nastáva medzi dvomi podjednotkami ribozómu [27,28]. Faktory RF1 a RF2 sa môžu viazať priamo na terminačný kodón, pričom na väzbe sa podieľa aj 16S rRNA [29,30]. V tejto oblasti dochádza k priamemu párovaniu báz s terminačným kodónom UGA a vytvára sa helikálna štruktúra, čo je signálom pre termináciu v prítomnosti faktora RF2 [29]. Helikálna štruktúra hrá významnú úlohu pri translácii všetkých troch terminačných kodónov [31]. Ak sa v mutovanej bunke syntetizujú príslušné tRNA, supresujú aj terminačné kodóny UAA a UAG. V tomto prípade ribozómy fungujú ako supersupresory [32].

Niektoré vytvorené supresorové mutácie ukazujú, že ak mutácia zasiahla supresiu UAG, zníži sa účinnosť supresie a mutácie. V prípade zasiahnutia

supresie UGA sa účinnosť supresie zvýši. Výsledky naznačujú, že uvoľňovacie faktory RF1 a RF2 súťažia o doménu na rRNA. Zmena na 16S rRNA môže znižovať účinnosť viazania RF1 voči RF2. Experimentálne poznatky potvrdili, že oba faktory sa viažu na rozdielne väzbové miesta [33].

Nezmyselná supresia

Nezmyselné (nonsense) supresory tRNA s modifikáciou v antikodóne pri väzbe na kodón na miesto ukončenia terminačného peptidového reťazca inzertujú aminokyselinu [34]. V bunkách *E. coli* bolo generovaných 5 supresorov, rozpoznávajúcich kodón UAG. Sú to supresory pre gény *supD*, *supE*, *supF*, *supP* a *supT*, ktoré namiesto terminačného kodónu začleňujú do polypeptidového reťazca serín, glutamín, tyrozín, leucín alebo glycín [35].

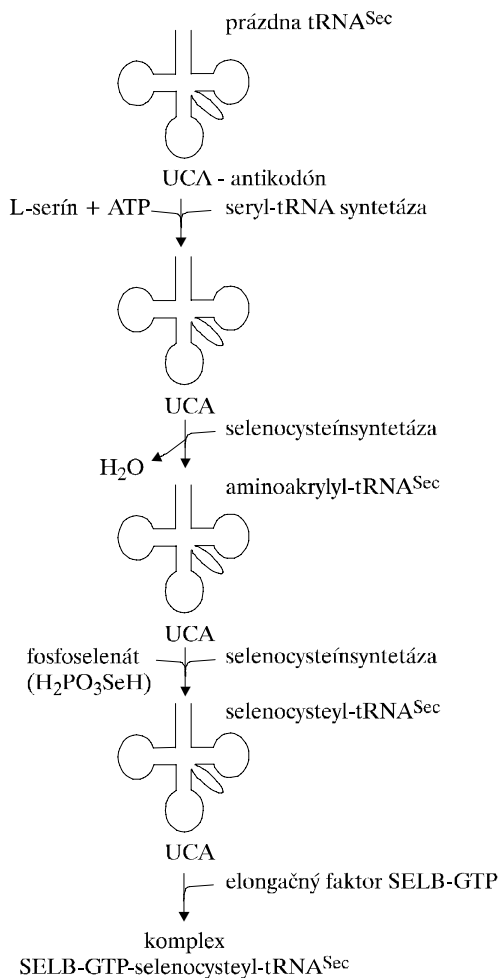
Gén *supG* kóduje supresorovú tRNA, ktorá rozoznáva nielen kodón UAG, ale aj kodón UAA a začleňuje v ich mieste polypeptidového reťazca lyzín. Metódou s využitím amber supresorovej tRNA sa včlení do želaného miesta v polypeptidovom reťazci iná aminokyselina, pričom vzniká nový mutant [36].

V bunkách *E. coli* boli zistené dva druhy supresorov odvodené od produktu génu *trpT* a to Su7 (*supU*), kde antikodón CCA bol modifikovaný na ACU, čo spôsobí schopnosť rozpoznať tento kodón ako UGA pre tryptofán [37]. U druhého supresora Su9 nastala substitúcia guanínu za adenín v pozícii 24, čo umožnilo tRNA^{Trp} čítať kodón UGA s vysokou účinnosťou [28,37]. Bolo zistené, že ako u *E. coli*, tak aj u *S. typhimurium* môže byť kodón UGA čítaný aj prirodzenou nemutovanou tRNA^{Trp}, ale s pomerne nízkou účinnosťou [38].

tRNA^{Sec} produkovaná génom *selC* prednostne rozpoznáva kodóny UGA u *Enterobacteriaceae*. Táto RNA umožňuje inkorporáciu selenocysteínov [39], nesie antikodón ACU zodpovedajúci kodónu UGA a má najdlhšiu variabilnú slučku (22 ribonukleotidov). Pomocou seryl-tRNA syntetázy je na ňu najskôr prenesený L-serín a tento je prenesený na aminoakryl-tRNA^{Sec} a potom až na selenocysteyl-tRNA^{Sec} [17] (obr. 2).

Vplyv nukleotidov v okolí terminačného kodónu na supresiu

Na účinnosť nezmyselnej supresie majú významný vplyv nukleotidy nachádzajúce sa v okolí terminačného kodónu na 3'-, ako aj na 5'-konci. Pri zvýšenom počte purínových nukleotidov dochádza k výraznému zvýšeniu



OBR. 2. Proces zaraďovania selenocysteínu do ribozómu.

FIG. 2. Shifting of selenocysteine into ribosome.

hladiny supresie a naopak, v prípade väčšieho počtu pyrimidínových nukleotidov hladina supresie výrazne poklesne [40,41].

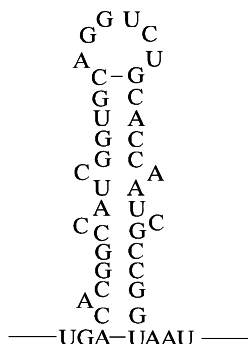
Rossi a Roth [40] dokázali, že účinnosť supresie kodónu UAG pre amber supresorovú tRNA *supE* výrazne zvýši zmena nukleotidu, ktorý nasleduje po UAG. Dôležitú úlohu hrá nukleotid nasledujúci v polohe 3' a to v poradí: adenín, guanín, cytozín a uracil [42,43]. Nukleotidy na 5'-konci majú buď malý, alebo žiadny efekt na supresiu UGA. Purínové nukleotidy zvyšujú stabilitu párovania kodón-antikodón oveľa viac ako pyrimidínové nukleotidy.

Čítanie terminačného kodónu

Terminačný kodón môže stratiť svoju pôvodnú funkciu. Na mieste je otázka, ako uvoľňujúci faktor (RF2) rozpoznáva, kedy má ukončiť tvorbu polypeptidového reťazca a kedy inkorporovať aminokyselínu. Pri translácii dve tRNA

rozpoznávajú terminačný kodón UGA ako kodón pre tryptofán (tRNA^{Trp}), alebo selenocysteín (tRNA^{Sec}). Ukázalo sa, že ak je na 3'-konci kodónu UGA adenín, umožní to inkorporáciu tryptofánu [9,35]. Oveľa zložitejšie je to v prípade selenocysteínu. U *E. coli* pozorovali vznik špecifického komplexu selenocysteínu s kodónom UGA, ktorý umožňuje, aby kodón UGA nebol čítaný ako terminačný [44]. Tento kodón je 40 nukleotidov dlhý a vytvára špecifickú vlásoknicovú štruktúru (stem-and-loop). V bunkách *E. coli*

v génoch *fdhF* a *fdnG* [44-46] na molekule mRNA pre vytvorenie formátdehydrogenázy H a N (obsahujú selenocysteín) je táto štruktúra umiestnená za kodónom UGA. Ak sa takýto špecifický kodón inzertuje napr. do génu *lacZ*, dochádza k následnej inkorporácii selenocysteínu do korešpondujúceho peptidu [44,47]. Podmienkou je prítomnosť jednoduchých derivátov selénu v kultivačnom médiu (obr. 3).



OBR. 3. Vlásoknicová štruktúra mRNA tvorená zo 40 nukleotidov, ktorá umožňuje terminačný kodón UGA čítať ako kodón pre selenocysteín.

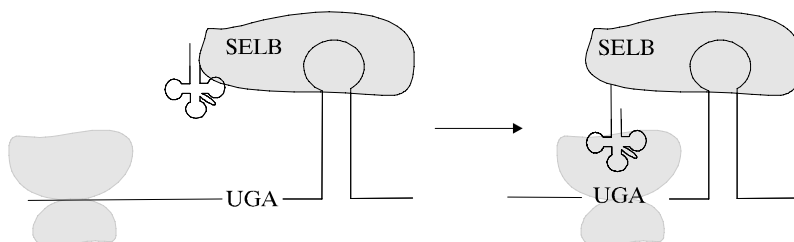
FIG. 3. The loop structure of 40 nucleotides which facilitates reading of the terminatory UGA codon as a codon for selenocysteine.

Unikátna sekundárna štruktúra mRNA je esenciálna pre inkorporáciu selenocysteínu. Každá časť vlásoknicovej štruktúry je vysoko špecifická a závisí od správneho ohnutia a veľkosti [48]. Oblasť očka (loop) vlásoknice slúži ako rozpoznávací časť pre proteín SELB, čo je špecifický elongačný faktor, ktorý môže transportovať selenocysteín-tRNA^{Sec} do ribozómu a tým alternuje elongačný faktor Tu [10].

Mechanizmus inkorporácie selenocysteínu riadenej UGA

Selenocysteínový špecifický elongačný faktor (SELB) spolu s GTP tvorí komplex so selenocysteínyl-tRNA^{Sec}. Vytvorený komplex sa viaže na vlásoknicovú štruktúru kodónu UGA na molekule mRNA. Ribozóm postupuje z 5'-konca molekuly mRNA, pričom čiastočne rozpleť vlásoknicovú štruktúru. Keď sa do ribozómového miesta A dostane kodón UGA, dochádza k naviazaniu selenocysteínyl-tRNA^{Sec} do pozície antikodónu. Nie je celkom jasné, ako dochádza k súťaženiu medzi inkorporáciou selenocysteínu a uvoľňovacím faktorom RF2 pri rozpoznávaní kodónu UGA. Predpokladá

sa, že kodón UGA je zakrytý vlásočnicovou štruktúrou mRNA, ktorá je v komplexe so SELB a tRNA^{Sec}. Na takýto zakrytý kodón UGA sa zo stereických dôvodov nemôže naviazať faktor RF2 a ukončiť transláciu [49] (obr. 4).



OBR. 4. Vázba elongačného faktora SELB s naviazanou selenocysteinyln-tRNA^{Sec} na vlásočnicovú štruktúru mRNA umožňuje kodón UGA čítať ako kodón pre selenocystein.

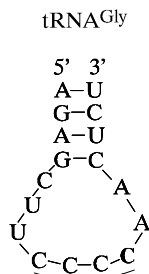
FIG. 4. Binding of the elongation factor SELB with bound selenocysteinyln-tRNA^{Sec} to the loop in mRNA facilitates reading the UGA codon as a codon for selenocysteine.

Posunová supresia (frameshift suppression)

Jednou z ďalších možných alternatív, ako obísť terminačný kodón, je posun čítacieho aparátu do rozdielnych čítacích rámcov (+1 alebo -1). Takýto posun sa môže odohrať v tesnej blízkosti terminačného kodónu, alebo na ktoromkoľvek mieste molekuly mRNA. Väčšina prípadov translačného posunu je spojená s posunom ribozómu dopredu alebo dozadu o 1 nukleotid od čítacieho rámca iniciačného kodónu [4].

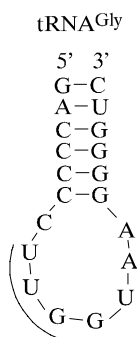
Pred časom sa dokázalo, že posun môže byť spôsobený aj obídením väčšieho úseku (niekoľkých nukleotidov) na molekule mRNA (bypass) [1,50]. Posun môže byť buď naprogramovaný, alebo náhodný, a zväčša je odpoveďou na špecifické signály z mRNA [4,51]. Pri programovanom posune sa zachováva tripletové kódovanie [4], ktoré sa môže výrazne zmeniť mutáciou v géne [51]. Mutácie v translačnom aparáte, ktoré spôsobujú posun, sa zistia na základe ich schopnosti kompenzovať (supresovať) defekt spôsobený posunom mutácie na kódujúcej úrovni. Preto ich označujeme ako posunové supresory [51,52]. Posunové supresory sú zmenené tRNA, ktoré príležitostne indikujú posun čítacích rámcov. Sú rozdelené do nasledujúcich skupín:

Prvú skupinu tvoria supresorové tRNA s posunom čítacieho rámca o 1 nukleotid v smere transkripcie. Vedľa báz antikodónu je inzertovaná štvrtá báza, napr. guanín pri génoch *sufA* a *sufB* a cytozín pri géne *sufD* [52] (obr. 5).



OBR. 5. Štruktúra tRNA pri supresorovej mutácii s inzerciou štvrtej bázy vedľa antikodónu.

FIG. 5. Structure of tRNA at a suppression mutation with an insertion of a fourth base in the vicinity of the anticodon.



OBR. 6. Štruktúra tRNA pri supresorovej mutácii s inzerciou cytozínu nielen do samotného antikodónu, ale aj mimo neho.

FIG. 6. Structure of tRNA at a suppression mutation with an insertion of cytosine not only to the anticodon but also outside of it.

V druhej skupine supresorových tRNA s posunom čítacieho rámca o 1 nukleotid v smere transkripcie sa inzertuje cytozín nielen do samotného antikodónu, ale aj mimo neho. Tento supresor rozoznáva štandardný triplet ACC a spôsobuje translokáciu ribozómu cez štyri bázy [53]. Takýto kodón rozpoznáva tRNA s osemnukleotidovou antikodónovou slučkou, ktorá sa páruje aj so štyrmi alebo tromi bázami (obr. 6).

Na 3'-konci molekuly tRNA sa nachádza triplet CCA, ktorý slúži ako miesto na naviazanie aminokyseliny. V mieste CCA sa pozorovali mutácie, ktoré zmenili kodón na GCA alebo ACA [54]. Interakcia kodón CCA na tRNA slúži ako kotvenie na prvom alebo druhom alternatívnom mieste 23S rRNA. Narušenie tejto interakcie môže spôsobiť chybné párovanie básových párov kodón-antikodón. U opísaných mutantov sa prejaví posun a následne čítanie terminačného kodónu v prospech novej aminokyseliny [54].

tRNA s modifikovaným nukleotidom –1–metylguanozín (m^1G) je jedným z evolučne najstabilnejším z nukleotidov v pozícii 37 na tRNA, ktoré čítajú kodóny začínajúce cytozínom napr. tRNA^{Pro}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Arg} [55]. Metyláza, ktorá metyluje guanozín, je kódovaná génom *trmD* [56]. Metylácia bázy zároveň bráni párovaniu medzi guanozínom a cytozínom. Metylácia je dôležitá pre uchovanie čítacieho rámca [57]. U týchto mutantov bola zistená translokácia ribozómu cez 4 bázy.

Všetky ribozómové mutanty zvyšujú frekvenciu posunu +1 a -1 a môžu teda pôsobiť ako supresory terminačných kodónov. Mutácie sa môžu dotýkať ribozómových proteínov alebo ribozómovej RNA. Mutanty *ramA* (*rpsD*) v ribozómovom proteíne S4 sú nezmyselné supresory posunových mutácií [58] podobne ako *rpsE* a *rpsL*, u ktorých sa zmena dotýka ribozómových proteínov S5 a L7/12 [16,24,59,60]. V mutante G517 je mutácia v 530. nukleotide na 16S rRNA, ktorá sa dotýka väzby tRNA v A a P mieste ribozómu [59]. Podobne je to aj u mutantov G2253 a U2555 [24].

Limitovaná koncentrácia aminoacyl-tRNA tiež pomáha posunu čítacieho rámca v heptanukleotide v tzv. „hladnom kodóne“ [61,62]. Pozícia tohto kodónu určuje smer posunu. V sekvencii GCCAAGC je „hladným kodónom“ pre lyzín AAG, čo vytvára pravostranný posun a u sekvencie CTTCAAG dochádza k ľavostrannému posunu. Posun vzniká iba vtedy, keď vhodná aminoacyl-tRNA je v limitovanom množstve. Takýmto spôsobom môžu ribozómy posunúť terminačné kodóny, aby neprišlo k ukončeniu syntézy peptidového reťazca.

Regulačné mechanizmy translácie

Z vyššie opísaných možností vyplýva, že terminačný kodón nie je tolerovaný buď nezmyselnou supresiou, posunovou supresiou alebo obídením skupiny nukleotidov. Uvedené tri spôsoby sa prejavajú najmä vtedy, keď je translačný aparát mutovaný. V divom type buniek sa môžu tieto procesy vyskytovať a všetko závisí od regulačných procesov zabezpečujúcich expresiu génu na úrovni mRNA. Fyziologické podmienky, ktoré môžu prednostne vplývať na niektorý z týchto súťaživých elementov, môžu tiež vplývať na reguláciu spomenutých procesov.

a) Translácia cez terminačný kodón

Kodón UGA (opal) bol prvýkrát opísaný u bakteriofága Q β pri štúdiu hlavného kapsidového proteínu [36]. Kodón UGA terminuje syntézu obalového proteínu. V prípade, ak je kodón čítaný tRNA^{Trp}, proteosyntéza pre-

bieha ďalej a syntetizuje sa aj malý kapsidový proteín IIB. Takýmto mechanizmom čítania kodónu UGA sa reguluje pomer oboch syntetizovaných proteínov tvoriacich kapsid [63-65]. Terminačný kodón UGA reguluje aj začleňovanie selénu cez tRNA^{Sec} v prítomnosti regulačného proteínu SELB [44].

b) Posunová translácia

Príkladom posunovej translácie je syntéza uvoľňovacieho faktora (RF2), ktorý je kódovaný génom *prfB* v autogénnom regulačnom mechanizme [66]. Na jednej strane je úlohou proteínu RF2 rozoznávať terminačný kodón UGA (opal), na druhej strane syntéza RF2 vyžaduje posun pre prekonanie kodónu UGA génu *prfB* v pozícii 26 (obr. 7).

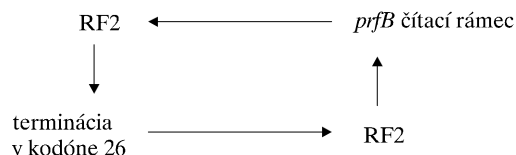
Shine-Dalgarno
miesto spiace kodóny

- AUG - --- AGG GGG UAU CUU UGA C UAC --- UGA -
 22 23 24 25 26 398

OBR. 7. Poradie nukleotidov na mRNA génu *prfB* so spiacim terminačným kodónom UGA.

FIG. 7. Nucleotide sequence of mRNA of the *prfB* gene with a sleeping UGA termination codon.

Kodón UGA sa formuje ako „spiace miesto“ pre posun čítacieho rámca o 1 nukleotid v smere transkripcie, kde faktor RF2 môže regulovať svoju vlastnú tvorbu a to buď termináciou, alebo posunom (obr. 8).



OBR. 8. Regulácia syntézy proteínu *prfB* proteínom RF2 pri posunovej supresii.

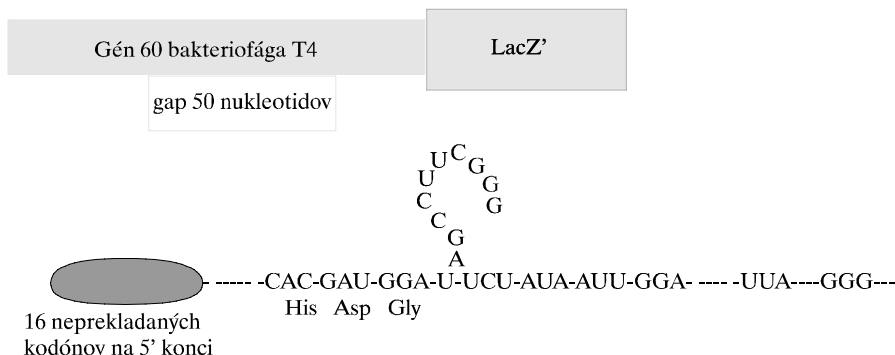
FIG. 8. Regulation of the *prfB* protein synthesis by RF2 protein at frameshift suppression.

Keď je prítomné dostatočné množstvo faktora RF2, syntéza sa ukončí na terminačnom kodóne UGA. Ak je hladina faktora RF2 nízka, posun čítacieho rámca sa môže výrazne zvýšiť. Umožňujú to dve štruktúry na molekule mRNA. Prvá štruktúra je v mieste CUU UGA (kľzavé pohyblivé miesto), v ktorom sa môže odohrať posun čítacieho rámca o 1 nukleotid v smere tran-

skripcie [66]. Druhá štruktúra je Shine-Dalgarnova sekvencia AGG GGG. Pri triplete z kľavého miesta kodónu CUU sa zvyšuje tendencia k posunu čítacieho rámca [67].

c) Obchádzka pri translácii

Jedným z možných spôsobov obídenia terminačného kodónu okrem metódy prešmyknutia sa jednotlivých nukleotidov a preskokom cez niekoľko nukleotidov je, že všetky translačné proteíny obchádzajú veľký úsek na molekule mRNA (bypassing). Prvýkrát bol tento mechanizmus potvrdený na géne 60 bakteriofága T4 (gén kóduje podjednotku DNA topoizomerázy) [61,68]. V tomto prípade bunkový translačný aparát obchádza medzeru 50 nukleotidov (obr. 9).



OBR. 9. Translácia na mRNA pre DNA topoizomerázu, pri ktorej sa obchádza 50 nukleotidov.
FIG. 9. Translation of the DNA topoisomerase m RNA by bypassing 50 nucleotides.

Zaujímavé je, že proces prebieha s vysokou účinnosťou (takmer 100 %). Štruktúra mRNA vo vnútri „gapu“ je stimulačným signálom [69]. Kľúčom k takémuto regulačnému mechanizmu môže byť terminačný kodón UAG lokalizovaný na začiatku v neprekladanej oblasti, pretože pre samotný bypassing je prítomnosť tohoto kodónu v danej oblasti nevyhnutne potrebná. V prípade, že sa tento kodón číta ako terminačný, bypassing je výrazne zredukovaný [68]. Teda to, či príde, alebo nepríde k obchádzke závisí od toho, či faktor RF1 rozozná kodón UAG ako terminačný alebo ako zmysluplný. Fyziologické podmienky a bunkové faktory znižujúce účinnosť jeho rozpoznania znižujú zároveň aj účinnosť obchádzky. Medzi takéto faktory možno počítať zníženie koncentrácie faktora RF1, zníženú aktivitu faktora

RF1, zvýšenú súťaživosť supresorov a pod. Iný príklad obchádzky je gén *trpR* *E. coli*, ktorý kóduje represor regulácie biosyntézy a transportu tryptofánu [1,2]. Na rozdiel od predošlého prípadu na obídenie 55 nukleotidov namiesto štruktúry na mRNA je nevyhnutný špecifický segment 15 nukleotidov v géne *trpR* a nešpecifický 5'-koniec dlhší ako 10 kodónov.

Záver

Špecifické štruktúry, primárna, sekundárna a terciárna štruktúra mRNA patria medzi faktory, ktoré ovplyvňujú a podieľajú sa na procese translácie. Výrazný vplyv na transláciu má aj špecifická vlásočnicová štruktúra mRNA (stem-and-loop) nevyhnutná pre inkorporáciu aminokyselín riadenú UGA, medzi ktoré patrí aj atypický selenocysteín [44]. Špecifické štruktúry hrajú rozhodujúcu úlohu pri obchádzke cez veľké segmenty mRNA. V prípade inkorporácie selenocysteínu v mieste UGA sú potrebné aj iné štruktúry, ako napr. špecifický elongačný faktor SELB a špecifická transferová RNA (tRNA^{Sec}) [39].

Rôznorodosť procesov čítania genetického kódu zvyšuje schopnosť buniek regulovať produkciu rôznych proteínov. Experimenty potvrdili, že nesmierne dôležitú úlohu regulácie translácie hrá aj terminačný kodón. V celom procese proti sebe stoja uvoľňujúce faktory (RF1 a RF2) a tRNA. Skutočnosť, že jedna alebo druhá štruktúra rozoznáva terminačný kodón potvrdzuje, že tieto procesy musia byť dômyselne kontrolované. Keďže translačný aparát je veľmi flexibilný, umožňuje realizovať genetickú informáciu rôznymi alternatívnymi cestami. Predpokladáme, že musia existovať aj ďalšie doteraz nepoznané gény, ktoré dôsledne regulujú tieto procesy. Doteraz známe spôsoby obchádzania všetkých štruktúr mRNA v procese translácie označujeme spoločným pojmom „translačný intrón“ [1].

Pri riadenej inkorporácii selenocysteínu do genetického kodónu UGA v bunkách *E. coli* boli identifikované dve špecifické translačné štruktúry [39]. Kodón UGA môžeme považovať za „bio-homonymum“, pretože faktor RF2 interaguje buď s tRNA^{Trp}, alebo tRNA^{Sec}. Pri tejto interakcii dochádza buď k terminácii polypeptidového reťazca, alebo k inkorporácii tryptofánu, resp. selenocysteínu. Nukleotid na 3'-konci kodónu UGA určuje, či bude rozpoznávaný ako faktor RF2, tRNA^{Trp} a existencia unikátnej „stem-and-loop“ štruktúry umožňuje, aby bol rozpoznávaný ako tRNA^{Sec} s následnou inkorporáciou selenocysteínu za podpory špecifického elongačného faktora SELB [39].

Literatúra

1. ENGELBERG-KULKA, H. - BENHAR, I. - SCHOULAKER-SCHWARZ, R.: Translational introns: an additional regulatory element interrupting the linear expression on a gene. *Trends in Biochemical Sciences*, 18, 1993, s. 294-296.
2. ENGELBERG-KULKA, H. - SCHOULAKER-SCHWARZ, R.: Regulatory implications of translational frameshifting in cellular gene expression. *Molecular Microbiology*, 11, 1994, s. 3-8.
3. FAREBAUGHT, P. J.: Alternative reading of the genetic code. *Cell*, 74, 1993, s. 591-596.
4. PARKER, J.: Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiological Reviews*, 53, 1989, s. 273-596.
5. GRONES, J. - MAČOR, M. - SIEKEL, P. - BILASKÁ, V.: Schopnosť *Escherichia coli* a *Lactobacillus* spp. akumulovať selén v biologicky využiteľnej forme. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 38, 1999, s. 45-53.
6. GRONES, J. - MAČOR, M.: Schopnosť baktérií viazať a premieňať selén na biologicky významnú formu. *Chemické listy*, 94, 2000, s. 129-131.
7. BARON, C. J. - HEIDER, J. - BÖCK, A.: Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 1993, s. 4181-4185.
8. HEIDER, J. - BÖCK, A.: Selenium metabolism in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 35, 1993, s. 71-109.
9. COX, J. C. - EDWARDS, E. S. - DE MOSS, J. A.: Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 145, 1981, s. 1317-1324.
10. ENOCH, H. G. - LESTER, R. L.: The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 1975, s. 6693-6705.
11. LEIFELDER, W. - FORCHHAMMER, K. - ZINONI, F. - SAWERS, G. - MADANT-BERTHELOT, M. A. - BÖCK, A.: *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *Journal of Bacteriology*, 170, 1988, s. 540-546.
12. ROTHER, M. - WILTING, R. - COMMANS, S. - BÖCK, A.: Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Journal of Molecular Biology*, 299, 2000, s. 351-358.
13. THANBICHLER, M. - BÖCK, A. - GOODY, R. S.: Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 2000, s. 20458-20466.
14. KROMAYER, M. - WILTING, R. - TORMAY, P. - BÖCK, A.: Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Journal of Molecular Biology*, 262, 1996, s. 413-420.
15. AMMER, E. S. - SARIOGLU, H. - LOTTSPREECH, F. - HOLMGREN, A. - BÖCK, A.: High-level expression in *Escherichia coli* of selenocysteine-containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterial-type SECIS elements and co-expression with the *selA*, *selB* and *selC* genes. *Journal of Molecular Biology*, 292, 1999, s. 1003-1016.
16. KIM, I. Y. - VERES, Z. - STADTMAN, T. C.: Biochemical analysis of *Escherichia coli* selenophosphate synthetase mutants: Lysine-20 is essential for catalytic activity and cysteine-17/19 for 8-azido-ATP derivation. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 1992, s. 19650-19654.
17. FORCHHAMMER, K. - LEINFELDER, W. - BÖCK, A.: Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature (London)*, 342, 1989, s. 453-456.

18. SAWERS, G. J. - HEIDER, J. - ZEHELEIN, E. - BÖCK, A.: Expression and operon structure of the sel genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium containing formate dehydrogenase isoenzyme. *Journal of Bacteriology*, 173, 1991, s. 4983-4993.
19. SCOLNICK, E. - TOMPKINS, R. - CASKEY, T. - NIRENBERG, M.: Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61, 1968, s. 768-774.
20. RYDEN, M. - MURPHY, J. - MARTIN, R. - ISAKSON, L. - GALLANT, J.: Mapping and complementation studies of the gene for release factor 1. *Journal of Bacteriology*, 168, 1986, s. 1066-1069.
21. KAWAKAMI, K. - INADA, T. - NAKAMURA, Y.: Conditionally lethal and recessive UGA-suppressor mutations in the *prfB* gene encoding peptide chain release factor 2 of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170, 1988, s. 5378-5381.
22. GOLDSTAIN, J. L. - CASKEY, C. T.: Peptide chain termination: effect of proteins on ribosomal binding of release factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 67, 1970, s. 537-543.
23. GREGORY, S. T. - LIEBERMAN, K. R. - DAHLBERG, A. E.: Mutations in the peptide transferase region of *E. coli* 23S rRNA affecting translational accuracy. *Nucleic Acids Research*, 22, 1994, s. 279-292.
24. MULLER, S. - HEIDER, J. - BÖCK, A.: The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 168, 1997, s. 421-427.
25. THANBICHLER, M. - NEUHIERL, B. - BÖCK, A.: S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 1999, s. 662-665.
26. CRAIGEN, W. J. - LEE, C. C. - CASKEY, C. T.: Recent advances in peptide chain termination. *Molecular Microbiology*, 4, 1990, s. 861-865.
27. COMMANS, S. - BÖCK, A.: Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 1999, s. 335-351.
28. GORINGER, H. U. - MURODA, E. J. - HIAZI, K. A. - DAHLBERG, A. E.: Mutations in 16S rRNA that affect UGA (stop codon) - directed translation termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 1991, s. 6603-6607.
29. MURGOLA, E. J. - HUAZI, K. A. - GORINGER, H. U. - DAHLBERG, A. E.: Mutant 16S ribosomal RNA: a codon-specific translation suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1988, s. 4162-4165.
30. PRESCOTT, C. L. - KRABBE, L. - NIERHAUS, K.: Ribosomes containing the C 1054 - deletion mutation in *E. coli* 16S rRNA act as suppressors of all three nonsense codons. *Nucleic Acids Research*, 19, 1991, s. 5281-5283.
31. BÖCK, A.: Biosynthesis of selenoproteins--an overview. *Biofactors*, 11, 2000, s. 77-78.
32. PRESCOTT, C. D. - KORNAU, H. C.: Mutations in *E. coli* 16S rRNA that enhance and decrease the activity of a suppressor tRNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 1992, s. 1567-1571.
33. TATE, W. P. - MC CAUGHAN, K. K. - KASTNES, B. - TROTMAN, C. - STOFFLER, G. - STOFFLER-MEILICKE, M.: Interaction of the release factor with the *Escherichia coli* ribosome: inhibition of the 30S subunit domain by specific antibodies. *Biochemistry International*, 17, 1988, s. 179-186.
34. NORMANLY, J. - MASSON, J. M. - KLEINA, L. G. - ABELSON, J. - MILLER, J. H.: Construction of two *Escherichia coli* amber suppression genes tRNA^{Phe} CUA end tRNA^{Cys} CUA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 1986, s. 65548-6552.
35. KOPELOWITZ, J. - HAMPE, C. - GOLDMAN, R. - RECHES, M. - ENGELBERG-KULKA, H.:

- Influence of codon context on UGA suppression and readthrough. *Journal of Molecular Biology*, 225, 1992, s. 261-269.
36. CORNISH, V. W. - BENSON, D. R. - ALTENBACH, C. A. - HIDEG, K. - HUBBELL, W. L. - SCHULZ, P. G.: Site-specific incorporation of biophysical probe into proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 1994, s. 2910-2914.
 37. RAFTERY, L. A. - EGAM, J. B. - CLINE, S. W. - YARUS, M.: Defined set of cloned termination suppressors: in vivo activity of isogenic UAG, UAA and UGA suppressor tRNA. *Journal of Bacteriology*, 150, 1984, s. 849-859.
 38. WEINER, A. M. - WEBER, K.: Natural readthrough at the UGA termination signal of Q β coat cistron. *Nature (London) New Biology*, 234, 1971, s. 206-209.
 39. BOCK, A. - FORCHHAMMER, K. - HEIDER, J. - BARON, C.: Selenoprotein synthesis: an expression of the genetic code. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 1991, s. 463-467.
 40. BOSSI, L. - ROTH, J. R.: The influence of codon context on genetic code translation. *Nature (London)*, 286, 1980, s. 123-127.
 41. BUCKINGHAM, R. H. - SORENSEN, P. - PAGEL, F. T. - HIJAZI, K. A. - MINS, B. H. - BRECHENEIR-BAEY, D. - MURGALA, E. J.: Third position base changes in codon 5' and 3' adjacent UGA codon's affect UGA suppression in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1050, 1990, s. 259-262.
 42. PHILLIPS-JONES, M. K. - WATSON, F. J. - MARTIN, R.: The 3' codon context effect on UGA suppressor tRNA is different in *Escherichia coli* and human cells. *Journal of Molecular Biology*, 233, 1993, s. 1-6.
 43. DASSLER, T. - MAIER, T. - WINTERHALTER, C. - BÖCK, A.: Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Molecular Microbiology*, 36, 2000, s. 1101-1112.
 44. ZINONI, F. - HEIDER, J. - BÖCK, A.: Feature of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1990, s. 4660-4664.
 45. WANG, Y. - BÖCK, A. - NEUHIERL, B.: Acquisition of selenium tolerance by a selenium non-accumulating *Astragalus* species via selection. *Biofactors*, 9, 1999, s. 3-10.
 46. SUPPMANN, S. - PERSSON, B. C. - BÖCK, A.: Dynamics and efficiency in vivo of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *EMBO Journal*, 18, 1999, s. 2284-2293.
 47. CHEN, G. F. T. - FANG, L. - INOUE, M.: Effect of the relative position of the UGA codon to the unique secondary structure in the fdhF mRNA on its decoding by selenocysteinyl tRNA in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1993, s. 23128-23131.
 48. HEIDER, J. - BARON, C. - BÖCK, A.: Coding from a distance dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO Journal*, 11, 1992, s. 3759-3766.
 49. BARON, C. - HEIDER, J. - BÖCK, A.: Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 1993, s. 4181-4185.
 50. BENHAR, I. - ENGELBERG-KULKA, H.: Frameshifting in the expression of the *Escherichia coli trpR* gene by the bypassing of a segment of its coding sequence. *Cell*, 72, 1993, s. 121-130.
 51. ATKINS, J. F. - WEISS, R. B. - THOMPSON, S. - GESFELAND, R. F.: Towards a genetic dissection of the bases of triplet decoding and its natural subversion: programmed reading frame shifts and hops. *Annual Review of Genetics*, 25, 1991, s. 201-228.
 52. TOTH, J. R.: Frameshift suppression. *Cell*, 24, 1986, s. 601-602.
 53. BOSSI, L. - SMITH, D. M.: Suppressor sufl: a novel type of tRNA mutant that induces trans-

- lational frameshifting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *81*, 1984, s. 6105-6109.
54. O'CONNOR, M. - WILLIS, N. M. - BOSSI, L. - GESTELAND, R. F. - ATKINS, J. F.: Functional tRNA with altered 3' ends. EMBO Journal, *12*, 1993, s. 2559-2566.
 55. BJORK, G. R. - ERICSON, J. V. - GUSFASSON, C. E. D. - HAGERVALL, T. G. - JONSSON, Y. H. - WIKSTROM, P. M.: Transfer RNA modification. Annual Review of Biochemistry, *56*, 1987, s. 263-287.
 56. BJORK, G. R. - WIKSTROM, P. M. - BYSTROM, A. S.: Prevention of translational frameshifting by the modified nucleotide 1-methylguanosine. Science, *244*, 1989, s. 986-989.
 57. HAGERVALL, T. G. - TUOKY, T. M. F. - ATKINS, J. F. - BJORK, G. R.: Deficiency of 1-methylguanosine in tRNA from *Salmonella typhimurium* induces frameshifting by quadruplet translocation. Journal of Molecular Biology, *232*, 1993, s. 756-765.
 58. ATKINS, J. F. - ELSEVIERS, D. - GORINI, L.: Low activity of β -galactosidase in frameshift mutants of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *69*, 1972, s. 1192-1195.
 59. O'CONNOR, M. - GORINGER, H. U. - DAHLBERG, A. E.: A ribosomal ambiguity mutation in the 530 loop of *E. coli* 16S rRNA. Nucleic Acids Research, *20*, 1992, s. 4221-4227.
 60. NEUHIERL, B. - THANBICHLER, M. - LOTTSPREICH, F. - BÖCK, A.: A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. Journal of Biological Chemistry, *274*, 1999, s. 5407-5414.
 61. GALLANT, J. A. - LINDSLEY, D.: Leftward ribosome frameshifting at a hungry codon. Journal of Molecular Biology, *223*, 1992, s. 31-40.
 62. LINDSLEY, D. - GALLANT, J.: On the directional specificity of ribosome frameshifting at a „hungry“ codon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *90*, 1993, s. 5469-5473.
 63. ENGELBERG-KULKA, H.: UGA suppression by normal tRNA^{Trp} in *Escherichia coli*: codon context effects. Nucleic Acids Research, *9*, 1981, s. 983-991.
 64. WILTING, R. - VAMVAKIDOU, K. - BÖCK, A.: Functional expression in *Escherichia coli* of the *Haemophilus influenzae* gene coding for selenocysteine-containing selenophosphate synthetase. Archives of Microbiology, *169*, 1998, s. 71-75.
 65. HUTTENHOFER A. - HEIDER, J. - BÖCK, A.: Interaction of the *Escherichia coli* fdhF mRNA hairpin promoting selenocysteine incorporation with the ribosome. Nucleic Acids Research, *24*, 1996, s. 3903-3910.
 66. CRAIGEN, W. J. - COOK, R. G. - TAKE, W. P. - CASKEY, C. T.: Bacterial peptide chain release factors: converted primary structure and possible frameshift regulatory of release factor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *82*, 1985, s. 3616-3620.
 67. CURRAN, J. F.: Analysis of effects of tRNA-messenger stability on frameshift frequency at the *Escherichia coli* RF2 programmed frameshift site. Nucleic Acids Research, *21*, 1993, s. 1837-1843.
 68. WEISS, R. B. - HUANG W. M. - DUN, D. M.: A nascent peptide is required for ribosomal bypass of the coding gap in bacteriophage T4 gene 60. Cell, *62*, 1990, s. 117-126.
 69. GESTLAND, R. F. - WEISS, R. B. - ATKINSON, J. F.: Recording: reprogrammed genetic decoding. Science, *257*, 1992, s. 1640-1641.

Do redakcie došlo 22.11.2000.

Genetic basis of selenium incorporation into proteins in bacterial cells

MAČOR, M. - GRONES, J.: Bull. potrav. Výsk., 40, 2001, p. 101-118.

SUMMARY. Incorporation of microelements into cell proteins is dependent on several regulatory factors during translation. An important microelement is selenium, which is incorporated in selenoproteins. This review deals with the regulation of selenoprotein synthesis at the level of translation.

KEYWORDS: genetic code; selenoprotein; suppression mutation; translation