

Последний смысловой кодон и поли(А)-хвост мРНК регулируют терминацию трансляции эукариот

Бизяев Н. *, Шувалов А., Салман А., Егорова Т., Шувалова Е., Алкалаева Е.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

* bizyaev@eimb.ru

Ключевые слова: трансляция; терминация; стоп-кодон; сквозное прочтение; факторы терминации; регуляция трансляции; поли(А)-хвост; контекст мРНК

Мотивация и цель: Когда рибосома достигает стоп-кодона, то обычно происходит завершение синтеза белка – терминация трансляции. Однако за счет распознавания стоп-кодона частично комплементарной тРНК на стоп-кодоне может происходить продолжение элонгации трансляции, т. е. сквозное прочтение стоп-кодона. Вероятно, конкуренция терминации трансляции и сквозного прочтения обусловлена влиянием окружения, в котором находится стоп-кодон. Особенно сильное влияние такого окружения стоп-кодона на терминацию трансляции обнаружено у некоторых инфузорий, в генетическом коде которых все три стоп-кодона могут кодировать аминокислоты. Для предсказания событий, происходящих на стоп-кодоне, Л.Л. Киселевым была предложена гипотеза о существовании «третьего генетического кода» [1]. В рамках развития этой концепции мы изучили, как такие структурные элементы мРНК, как последний смысловой кодон и поли(А)-хвост, влияют на эффективность эукариотической терминации трансляции. Ранее для бактерий было показано, что на стоп-кодонах, следующих за кодонами пролина и глицина, наблюдается значительное понижение эффективности терминации трансляции [2]. Однако для эукариот этот вопрос остается неизученным. Роль поли(А)-хвоста в инициации трансляции и стабильности мРНК хорошо исследована. Кроме того, в нашей лаборатории было показано, что белок, связывающийся с поли(А)-хвостом (PABP), стимулирует терминацию трансляции [3]. Полученные нами данные о влиянии этих элементов мРНК на терминацию трансляции указывают на то, что обе эти структуры являются важными регуляторами терминации трансляции. Дальнейшее систематическое изучение механизмов, лежащих в основе их работы, позволит по последовательности мРНК предсказывать эффективность протекания терминации трансляции на стоп-кодонах.

Методы и алгоритмы: Для изучения влияния 5'-контекста стоп-кодона на эффективность терминации трансляции мы использовали очищенные рибосомные комплексы, остановленные на стоп-кодоне (претерминационные комплексы), которые были собраны на мРНК с различными кодонами, предшествующими стоп-кодонам, и длиной поли(А)-хвоста. Такие комплексы были использованы для оценки эффективности высвобождения синтезируемого белка или пептида в ходе терминации трансляции. Высвобождение в ходе терминации трансляции длинного белка изучали с помощью Termi-Luc анализа [4], тогда как высвобождение короткого пептида, моделирующего этот процесс на короткой рамке считывания (uORF), – в реконструированной системе эукариотической трансляции [5].

Результаты: Мы обнаружили, что последний смысловой кодон в кодирующей последовательности может определять скорость эукариотической терминации трансляции белка. Так, при высвобождении длинного пептида скорость

терминации была снижена на глициновых кодонах. А на пролиновых кодонах у эукариот, в отличие от бактерий, скорость терминации трансляции была снижена только на одном из двух изученных кодонов. Интересно, что, кроме сниженной скорости терминации трансляции, на всех кодонах глицина было обнаружено уменьшение стабильности претерминационного комплекса. Таким образом, кодон глицина перед стоп-кодоном не является оптимальным для реакции терминации трансляции длинного белка. Однако в другой системе, где тестировали высвобождение короткого пептида, мы не наблюдали влияния глицина и пролина как последних смысловых кодонов на скорость терминации трансляции. Ранее, при изучении влияния поли(А)-хвоста на эффективность терминации трансляции было обнаружено, что вместе с его удлинением увеличивается эффективность терминации. В рамках данной работы нам удалось установить, что на короткой кодирующей последовательности присутствие поли(А)-хвоста не стимулировало терминацию трансляции, если последним смысловым кодоном были кодоны глицина или пролина.

Выводы: Последовательность последнего смыслового кодона и длина поли(А)-хвоста являются контекстными детерминантами эффективности эукариотической терминации трансляции. Эффекты этих детерминант также модулируются дополнительными факторами, такими как присутствие РАВР и длина синтезируемого пептида. Это указывает на важность комплексного понимания локального окружения, в котором находится стоп-кодон, для успешного предсказания, продолжится или завершится на нем синтез белка.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00382, <https://rscf.ru/project/23-24-00382/>.

The last sense codon and the poly(A) tail of mRNA regulate the termination of eukaryotic translation

Biziaev N.*, Shuvalov A., Salman A., Egorova T., Shuvalova E., Alkalaeva E.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

* bizyaev@eimb.ru

Key words: translation; termination; stop codon; readthrough; release factors; translational control; poly(A) tail; mRNA context

Motivation and Aim: When a ribosome reaches a stop codon, protein synthesis usually ends, which is called translation termination. However, in certain cases, translation elongation may continue at the stop codon due to the recognition of the stop codon by a partially complementary tRNA, a phenomenon referred to as readthrough. The competition between translation termination and readthrough is likely to be influenced by the surrounding context of the stop codon. Notably, in some ciliates, where all three stop codons can encode amino acids, the context surrounding stop codons exerts a particularly strong influence. To predict events occurring at the stop codon, L.L. Kiselev proposed a hypothesis about the existence of a “third genetic code” [1]. As part of the development of this concept, we studied how such structural elements of mRNA as the last sense codon and the poly(A) tail affect the efficiency of eukaryotic translation termination. While previous research in bacteria has demonstrated a significant decrease in translation termination efficiency at stop codons following proline and glycine codons [2], this phenomenon remains unexplored in eukaryotes. Furthermore, the role of the poly(A) tail in translation initiation and mRNA stability has been extensively studied. In

addition, our laboratory has shown that poly(A)-binding protein (PABP) stimulates translation termination [3]. Our data indicate that both the last sense codon and the poly(A) tail serve as important regulators of translation termination in eukaryotes. Further systematic investigation into the mechanisms underlying the functioning of mRNA structural elements in translation termination will enable the prediction of translation termination efficiency at stop codons based on mRNA sequence.

Methods and Algorithms: To study the effect of the 5' stop codon context on translation termination efficiency, we used purified ribosomal complexes frozen at the stop codon (pretermination complexes). These complexes were assembled on mRNAs with varying last sense codons and poly(A) tail lengths. Such complexes were used to evaluate the release efficiency of the synthesized protein or peptide during translation termination. For the analysis of the release of a long protein, we utilized Termi-Luc analysis [4] while the release of a short peptide, mimicking this process on a short reading frame (uORF), was studied within a reconstructed eukaryotic translation system [5].

Results: We found that the last sense codon within a coding sequence can determine the rate of eukaryotic termination of protein translation. Specifically, we observed a reduction in termination rate at glycine codons upon the release of a long peptide. Furthermore, unlike in bacteria, where translation termination efficiency is reduced at any proline codon, in eukaryotes, this reduction was observed only at one of the two studied proline codons. Interestingly, in addition to the diminished termination rate, there was a decrease in the stability of the pretermination complex at all glycine codons. Thus, the glycine codon before the stop codon is not optimal for the translation termination reaction of a long protein. However, in another experimental system focusing on the release of a short peptide, we did not observe any effect of glycine and proline as the last sense codons on the rate of translation termination. Furthermore, our previous studies on the effect of the poly(A) tail on translation termination efficiency indicated that the length of the poly(A) tail correlates with increased termination efficiency. Our current work demonstrates that, in the context of a short coding sequence, the presence of a poly(A) tail does not stimulate translation termination when the last sense codon is either glycine or proline.

Conclusion: The sequence of the last sense codon and the length of the poly(A) tail emerge as contextual determinants influencing the efficiency of eukaryotic translation termination. Moreover, these determinants are subject to modulation by additional factors, including the presence of PABP and the length of the synthesized peptide. This indicates the importance of a comprehensive understanding of the local context surrounding a stop codon to accurately predict whether protein synthesis will persist or terminate at that point.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-24-00382), <https://rscf.ru/project/23-24-00382/>.

Список литературы/References

1. Kiselev L.L. The third genetic code. *Priroda*. 2006;9:3-9 (in Russian)
2. Pierson W.E. et al. Uniformity of Peptide Release Is Maintained by Methylation of Release Factors. *Cell Rep*. 2016;17(1):11-18
3. Ivanov A. et al. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(16):7766-7776
4. Susorov D., Egri S., Korostelev A.A. Termi-Luc: a versatile assay to monitor full-protein release from ribosomes. *RNA*. 2020;26(12):2044-2050
5. Alkalaeva E.Z. et al. *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell*. 2006;125(6):1125-1136