



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structural diversity of frameshifting signals : reprogramming the programmed

Yu, C.H.

Citation

Yu, C. H. (2011, December 22). *Structural diversity of frameshifting signals : reprogramming the programmed*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18274>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18274>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Boodschapper RNA (mRNA), het medium dat de overdracht van erfelijke informatie van DNA naar eiwit verzorgt, wordt gedecodeerd in tripletten door ribosomen. Tijdens dit proces (translatie) is het van cruciaal belang dat het juiste leesraam gehandhaafd blijft. In sommige gevallen kunnen ribosomen gedwongen worden om hun vertaalwerk in een ander leesraam voort te zetten (ribosomal frameshifting of RF) doordat ze een stap terug of vooruit geduwd worden (-1 of $+1$ RF) door signalen die in het mRNA verborgen liggen. In dit proefschrift is gekeken naar signalen die verantwoordelijk zijn voor -1 RF.

RF is vrij zeldzaam tijdens de translatie van cellulaire mRNAs maar gebeurt regelmatig tijdens vertaling van virus mRNAs, zoals die van het SARS coronavirus of van HIV-1. Deze virus mRNAs bevatten een tweetal signalen die nodig zijn om een op de tien of zelfs tot een op de twee ribosomen naar het -1 leesraam te dirigeren. Het eerste signaal is een zogenaamde “slippery sequence” waar het ribosoom zijn uitglijer maakt, het tweede is een bepaalde structuur in het RNA die zich hier 5 tot 8 nucleotiden stroomafwaarts van bevindt. De “slippery sequence” heeft de samenstelling X.XXY.YYZ waarin X= G, A of U is en Y=A of U en Z iedere nucleotide zolang $Y \neq Z$ en de punten het oorspronkelijke leesraam aanduiden. Bijzonder efficiënte combinaties zijn bijv. UUUUUUA en AAAAAAG of UUUAAAC waarop de bijbehorende tRNAs na de shift nog steeds 3 van de 3 of 2 van de drie base paren met het codon in het -1 leesraam kunnen maken. Hoewel deze combinaties van nature al enige frameshifting opleveren $\sim 1\%$ kan de stroomafwaarts gelegen structuur deze frequentie tot wel 50 keer verhogen.

Wat is er nu zo speciaal aan die structuren? In de meeste gevallen vormt deze structuur een pseudoknoop of in enkele gevallen een reguliere haarspeld. In een pseudoknoop vormt de lus van de haarspeld ook weer een haarspeld. Deze dubbele haarspeld vouwt zich op tot een soort krakeling en vormt een uitzonderlijk lastige barrière doordat een pseudoknoop moeilijk te ontwarren is voor ribosomen. Met als gevolg dat tijdens de translocatiestap het translatieproces zodanig geblokkeerd wordt dat het tRNA op de P-site wordt verbogen en uiteindelijk onder de mechanische stress terugschuift in het -1 leesraam. Het ribosoom kan nu wel de translocatiestap uitvoeren en ondervindt nu geen last meer van de pseudoknoop. Markant gegeven is dat tijdens dit soort proeven een haarspeld met dezelfde samenstelling als de pseudoknoop van IBV niet in staat bleek om tRNA te verbuigen. Hoewel dat in overeenstemming bleek te zijn met functionele assays gedaan door datzelfde laboratorium leek dat niet te staven met het feit dat voor sommige virussen zoals HIV-1 een haarspeld voldoende is om RF te stimuleren. Lange tijd werd gedacht dat

artificiële haarspelden niet in staat waren om RF te stimuleren en werden ook verwoede pogingen gedaan om de HIV-1 haarspeld toch tot een pseudoknoop te kneden, ons inziens tevergeefs. In 2004 werd namelijk onafhankelijk van elkaar door ons en een ander lab aangetoond dat een antisense RNA oligonucleotide gebonden op 5-8 nucleotiden vanaf de “slippery site” in staat was om RF te stimuleren. Niks geen pseudoknoop nodig. Het was dan ook te voorspellen dat een artificiële haarspeld ook zou werken. In **hoofdstuk 3** van dit proefschrift laten we zien dat haarspeldvarianten van de SRV-1 gag-pro frameshifter pseudoknoop inderdaad goede stimulators van RF zijn en slechts 1.5 keer slechter dan de SRV-1 pseudoknoop. Deze proeven werden zowel *in vitro* met rabbit reticulocyte lysate (RRL) als in HeLa cellen uitgevoerd met gelijkwaardige resultaten, en tonen aan dat de haarspeld een bona fide frameshift stimulator is.

Als een haarspeld slechts 1.5 keer slechter is dan een pseudoknoop waarom vinden we in de natuur dan zo vaak pseudoknopen als frameshift stimulators en nauwelijks haarspelden? En wat is de reden dat pseudoknopen 1.5 keer beter zijn dan haarspelden in frameshifting? Het antwoord op deze laatste vraag komt uit eerdere experimenten die lieten zien dat de nucleotiden in de tweede lus van een frameshifter pseudoknoop betrokken zijn bij de vorming van een “triple helix” door middel van interacties met de basen uit de eerste stam van de pseudoknoop. Mutaties in deze “triples” kunnen de efficiëntie van een frameshifter pseudoknoop met een factor 5 tot 10 verlagen. Een voorbeeld hiervan is ook te zien in Figuur 1 van **hoofdstuk 4**. Haarspelden kunnen in theorie ook triples vormen met de nucleotiden die erna in het mRNA liggen. In de praktijk bleek dat niet het geval te zijn of in ieder geval, mochten ze wel vormen, geen bijdrage te leveren aan de RF efficiëntie. Waarschijnlijk omdat deze nucleotiden niet gefixeerd worden, zoals bij een pseudoknoop, maar te flexibel zijn. Als vuistregel kunnen we stellen dat een triple helix, zoals die van een pseudoknoop, anderhalf keer ($\text{triple}:\text{double}=1.5$) beter is dan een dubbele helix, zoals die van een haarspeld of duplex gevormd door binding van een antisense oligonucleotide.

Een andere reden voor de voorkeur voor pseudoknopen heeft wellicht te maken met verschillende vouwingsnelheden van haarspelden en pseudoknopen. Dit zou er toe kunnen leiden dat na passage van het eerste “shifted” ribosoom en voor aankomst van het volgende ribosoom, de haarspeld al wel volledig hervouwen is maar een pseudoknoop nog niet. Afhankelijk van de translatie-snelheid zou het percentage frameshifting gereguleerd kunnen worden, wat misschien een evolutionair voordeel oplevert. Op dit vlak valt er nog een hoop uit te zoeken.

Zoals gezegd, kunnen antisense RNA oligo's ook RF stimuleren, maar zijn ze voor eventuele toepassingen *in vivo* minder geschikt vanwege hun instabiele aard. Verschillende modificaties van de 2'OH of van de internucleotide band die

beschermen tegen afbraak door RNAses zijn bekend, maar vele daarvan zijn niet ideaal vanwege toxiciteit, neveneffecten (“off-target effects”), of slechte cel-opname. Een recente modificatie genaamd LNA (“locked nucleic acid”), waarbij een brug tussen de 2' zuurstof en de 4' koolstof de ribose in een gunstige 3' endo conformatie fixeert, lijkt geen van genoemde nadelen te hebben. In **hoofdstuk 4** laten we zien dat de introductie van twee LNA-modificaties in een DNA oligonucleotide voldoende is om dezelfde hoeveelheid RF te induceren als een RNA oligonucleotide. Een bijkomend voordeel van LNA is dat we de stabiliteit van de duplex kunnen variëren zonder dat we de sequentie hoeven te veranderen. Op die manier hebben we aangetoond dat de stabiliteit aan de kant waar het ribosoom de duplex nadert belangrijk is voor RF.

Hoewel de beschreven antisense oligonucleotiden in staat waren om circa 15% RF te induceren wilden we proberen om dit nivo te verhogen met het oog op eventuele toekomstige medische toepassingen. Door gebruik te maken van de kennis opgedaan bij het bestuderen van de efficiëntere pseudoknopen, hebben we oligonucleotiden ontworpen die na binding aan het mRNA een pseudoknoop nabootsen (**hoofdstuk 5**). Deze “pseudo-pseudoknopen” waren betere RF stimulators dan de lineaire antisense oligonucleotiden uit **hoofdstuk 4**. In feite bieden we een haarspeld aan waarvan een gedeelte van de lus kan hybridiseren met het mRNA en de overblijvende nucleotiden uit de lus triple interacties met de duplex kunnen vormen, zoals in een “echte” pseudoknoop. Op die manier levert een complementariteit van 6 basenparen met het mRNA al bijna 2%, en 10-11 basenparen maar liefst 25% RF op. Dit in tegenstelling tot de normale 12-18 basenparen duplexen die “slechts” 13% RF opleveren. Deze toename is gedeeltelijk toe te schrijven aan de vorming van triple interacties van de lus van de haarspeld met de eerste stam (S1).

Een bijkomend voordeel van de antisense RF assay is de mogelijkheid om modificaties te testen bijvoorbeeld zoals de LNA modificatie. Zo konden we het effect van nucleotiden in de lus bestuderen door ze geheel te vervangen door een poly-ethyleenglycol (PEG)-linker wat leidde tot een circa 1.5-voudige verlaging van RF. Een dergelijke modificatie was in een normale RF assay met alle signalen in één lang mRNA onmogelijk geweest.

Er werden ook vele pogingen gedaan om de werking van antisense oligonucleotiden in cellijnen te testen (deze staan niet beschreven in dit proefschrift). Verschillende types oligonucleotiden zoals RNA, 2'O-methyl RNA, PNA (peptide nucleic acid) en LNA-DNA hybriden werden getest in combinatie met een RF reporterconstruct of het mRNA transcript daarvan. Helaas, zonder succes. In het meest gunstige geval zagen we slechts een tweevoudige toename ten opzichte van het achtergrondsignaal. Als belangrijkste reden voor het falen van dergelijke

experimenten kunnen we aanvoeren dat het oligonucleotide niet op de juiste plek in de cel terechtkwam, met name omdat met confocale fluorescentiemicroscopie bleek dat een fluoresceïne-gemerkte oligonucleotide in de nucleus terechtkwam en niet in het cytoplasma waar de translatie plaatsvindt. In de toekomst zullen andere transfectiemethoden moeten worden gebruikt of ontwikkeld om deze oligonucleotiden wel in het cytoplasma te krijgen en te houden.

Het was al langer bekend dat de RF efficiëntie beïnvloed kan worden door tRNA en spermidine concentraties, bepaalde antibiotica of eiwitten. Deze factoren moduleren in het algemeen de werking van het ribosoom of de translatie an sich. In **hoofdstuk 6** toonden we aan dat een klein molecuul in staat is om RF te moduleren door de vorming van een pseudoknoop te stabiliseren. Dit molecuul is een bacteriële metabooliet, 7-aminomethyl-7-deazaguanine of kortweg preQ1, die normaliter betrokken is bij de biosynthese van de base queosine. PreQ1 synthese in bacteriën wordt gereguleerd door een “riboswitch”, een RNA sequentie die preQ1 kan binden en transcriptie of translatie van genen betrokken bij preQ1 synthese aan of uit kan zetten. De structuur van het preQ1-bindende gedeelte van de riboswitch, ook wel de preQ1 aptameer genoemd, is een pseudoknoop die overeenkomsten vertoont met sommige kleine frameshifter pseudoknopen. We vonden dat preQ1 aptameren van *Fusobacterium nucleatum* en *Bacillus subtilis* beide in staat waren om RF te stimuleren op een concentratie-afhankelijke manier, maar met verschillende efficiënties. Met behulp van computer-gestuurde methodes hebben we eerst de structuur van de *Fusobacterium nucleatum* aptameer gereconstrueerd op basis van *Bacillus subtilis* aptameer coördinaten.¹ Vervolgens werd ontvouwing van de aptameren met en zonder PreQ1 nagebootst door middel van Molecular Dynamics simulaties. Tot onze verrassing ontdekten we dat in *F. nucleatum* een extra nucleotide betrokken zou kunnen zijn bij de binding van preQ1. Mutatie van dit nucleotide in de *Fusobacterium* aptameer leidde tot een drastische afname van de preQ1-afhankelijke RF. Interessant genoeg, leidde de introductie van dit nucleotide in de *Bacillus* aptameer tot een enorme toename in RF. Dit is waarschijnlijk een van de weinige succesvolle voorbeelden van de ontdekking van nieuwe interacties m.b.v. computer gestuurde simulaties van een RNA-ligand complex. Daarnaast biedt dit ligand-afhankelijke RF systeem de mogelijkheid om analoga van preQ1 te testen die wellicht kunnen competieren met preQ1 binding en op die manier potentiële antibacteriële middelen kunnen worden.

Samenvattend kunnen we stellen dat we hebben aangetoond dat artificiële haarspelden wel degelijk goede RF stimulators zijn, suggererend dat de rol van de RNA structuur voornamelijk ligt in het opwerpen van een barrière voor het ribosoom. Dit werd nogmaals ondersteund door het feit dat antisense oligonucleotiden ook in

staat zijn om RF te stimuleren. De superioriteit van pseudoknopen als RF stimulators is vooral te danken aan de vorming van een triple helix. Door zogenaamde “pseudo-pseudoknopen” te maken met gestructureerde antisense RNA oligonucleotiden konden we het effect van deze triple helix inderdaad aantonen. We hebben ook laten zien dat RF in principe gereguleerd kan worden door een metaboliet op een manier die mogelijk ook in de natuur voorkomt.

Tot slot kunnen we concluderen dat het in dit proefschrift beschreven onderzoek heeft bijgedragen aan een beter begrip van de rol van RNA structuren in de stimulatie van ribosomale frameshifting. Deze kennis kan van toepassing zijn op het behandelen van ziektes die veroorzaakt worden door frameshift mutaties.

