مدل‌سازی و بررسی نظری تغییرچارچوب ریبوزومی برنامه‌ریزی‌شده در فرآیند ترجمه

مهرآرا، کاوه[1]؛ چیت سازها، میثم[1]؛ محمد رفیعی، فرشید[1]

[1]دانشکده فیزیک دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان ، بلوار پروفسور یوسف ثبوتی، زنجان

چکیده

فرایند ترجمه‌ی ژن به پروتئین توسط ریبوزوم‌ها، انجام می‌شود. در شرایط طبیعی احتمال بروز خطا حین فرایند ترجمه بسیار کم است. با این وجود، خطای لغزش یا تغییرچارچوب در حین ترجمه‌ی ژنومِ بسیاری از ویروس‌ها و سنتز پروتئین‌های مورد نیاز آن‌ها، اهمیت بسزایی دارد. آزمایش‌های تک‌مولکولی و بلورشناسی مسیر پیچیده‌ای را برای حرکت ریبوزوم پیشنهاد می‌کنند. از این رو، برای مطالعه‌ی بیشتر بر رفتار ریبوزوم در شرایط مختلف، به ارائه‌ی مدلی نیاز است که توصیفی ساده و جامع از سازوکار حرکت ریبوزوم ارائه دهد. در این مقاله، مدلی برای مطالعه‌ی فرایند ترجمه در حضور دورشته‌ای RNA با در نظر گرفتن احتمال تغییرچارچوب ارائه می‌کنیم.

Modeling and theoretical investigation of programmed ribosomal frameshifting in the translation process

Mehrara, Kaveh[1]; Chitsazha, Meysam[1]; Mohammad-Rafiee, Farshid[1]

[1] Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan

Abstract

The process of gene-to-protein translation is done by ribosomes. Under normal circumstances, the probability of occurring errors during the translation process is very low. Nevertheless, the slippage or frameshift error during the translation of the genome of many viruses and the synthesis of their required proteins is very important. Single molecule experiments and crystallography suggest a complex pathway for ribosome movement. Therefore, for further study on the behavior of ribosome in different conditions, it is necessary to present a model that provides a simple and comprehensive description of the mechanism of ribosome movement. In this article, we propose a model to study the translation process in the presence of the double-stranded region, considering the possibility of frameshifting.

مقدمه

سنتز پروتئین، ترجمه‌ای غیرمستقیم از ٤ نوع نوکلئوتید در mRNA، به ۲۰ نوع آمینواسید در پروتئین است. این فرآیند توسط موتور مولکولی ریبوزوم انجام می‌شود. ریبوزوم با خواندن آرایه‌های سه‌تایی از نوکلئوتیدها، آمینواسیدی را متناظر با آن، به رشته‌ی پلی‌پپتیدی پروتئین اضافه می‌کند. این آرایه‌های سه تایی بر روی mRNA، کُدان نامیده می‌شوند. با قرار گرفتن ریبوزوم در چارچوب ترجمه، فرآیند ترجمه، از اولین کدان آغاز و از کدانی به کدان دیگر، انجام می‌شود [۱]. هر چند فرایند ترجمه‌ی پروتئین فرآیندی بسیار دقیق است، اما احتمال لغزش ریبوزوم روی رشته‌ی mRNA در حین ترجمه وجود دارد. با لغزش ریبوزوم، ریبوزوم از چارچوب اولیه‌ی ترجمه خود خارج می‌شود و در چارچوبی متفاوت، آرایه‌ای متفاوت از نوکلئوتید را برای ترجمه می‌بیند و پروتئینی متفاوت با پروتئین اصلی تولید می‌کند [۲].

در ویروس‌ها تغییر چارچوب در گستره‌ی وسیعی دیده می‌شود. تغییر چارچوب، به ویروس‌ها کمک می‌کند تا از یک mRNA دو یا چند نوع پروتئین مختلف را به نسبتی خاص تولید کنند [۳]. اولین مشاهده‌ها از پدیده‌ی تغییر چارچوب در ویروس HIV ، حکایت از

ناحیه‌ای لغزننده داشت که ریبوزوم بر روی آن دچار تغییر چارچوب می‌شد. این ناحیه لغزنده دارای آرایه‌ای ۷ نوکلئوتیدی، به شکل XXXYYYZ است، که در آن X می‌تواند هر نوع نوکلئوتیدی باشد، Y می‌تواند A یا U باشد و Z در یوکاریوت‌ها G نیست [٤]. همچنین تحقیقات دیگر نشان داد که ناحیه لغزنده، قبل از یک گره‌ی دو رشته‌ای قرار گرفته است که به آن ساختار دوم mRNA گفته می‌شود. وجود این گره‌ی دورشته‌ای در پایین‌دستِ ناحیه‌ی لغزنده، عامل مهمی در تغییر چارچوب است [۲و۵]. آنچه از این مشاهدات دریافت می‌شود این است که مجموعه‌ای از عوامل در یک ناحیه از مسیر ترجمه‌ی ریبوزوم، پدیده‌ای مهم را در فرایند تولید پروتئین ویروس‌ها باعث می‌شود که به آن تغییر چارچوب ریبوزومی برنامه-ریزی شده گفته می‌شود. در این پژوهش با ارائه مدلی مکانیکی از آنچه در مقیاس بسیار کوچک رخ می‌دهد تغییر چارچوب ریبوزومی را مورد بررسی قرار می‌دهیم. با توجه به این نکته که تغییر چارچوب ترجمه در حین حرکت ریبوزوم رخ می‌دهد، ابتدا به شرح چرخه‌ی ترجمه‌ی ریبوزوم و مدل‌های ارائه شده برای آن می‌پردازیم. مدلی برای تغییر چارچوب ریبوزوم در حین حرکت ارائه می‌دهیم و سپس اثر وجود ناحیه‌ی لغزنده و گره دورشته‌ای mRNA را به آن می‌افزاییم.

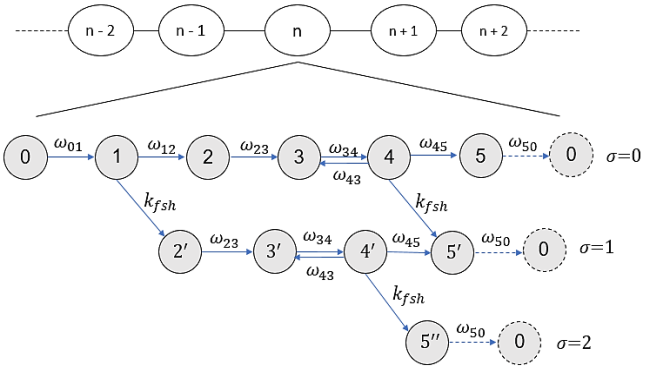
تحول چرخه حرکتی ریبوزوم با تغییرچارچوب

در تغییر چارچوب ریبوزومی، حرکت ریبوزوم مولد پدیده‌ی تغییر چارچوب خواهد بود. در سال ۲۰۰۹ رامکریشان و همکاران برای مطالعه چرخه حرکتی ریبوزوم و نشان دادن عملکرد آن در ترجمه، چرخه حرکتی ریبوزوم را در ١٦ مرحله توصیف کردند [٦]. شکیبا و همکاران بر این اساس، برای سادگی و درک بهتر آن چه در فرآیند ترجمه می‌گذرد، این نتایج تجربی را در مدلی ٦ مرحله‌ای خلاصه کردند [۷]. هر مرحله از این مدل، متناظر با چند مرحله از مدل رامکریشنان است و نرخ‌های تحول در آن، از نتایج تجربی بدست آمده است. ما از مدل ساده شده‌ی چرخه حرکتی ریبوزوم که توسط شکیبا و همکاران ارائه شده است به عنوان یک مدل اولیه بهره خواهیم برد و در ادامه تغییر چارچوب را به آن اضافه خواهیم کرد.

مطالعات تجربی زیادی برای آشکارسازی رخداد تغییر چارچوب در حین حرکت ریبوزوم انجام شده است. براساس آنچه که گزارش شده است، تغییر چارچوب، طی دو مرحله، امکان اتفاق افتادن دارد: ۱) مرحله جایگزینی: در این مرحله tRNA جایگاه A به tRNA جایگاه P متصل می‌شود و آمینواسید جایگاه A با رشته پلی‌پپتیدی جایگاه P پیوند کوالانی ایجاد می‌کند. این جابه‌جایی tRNAها موجب تغییر شکل ساختاری در ریبوزوم می‌شود و ریبوزوم ۹ آنگستروم رشته mRNA را به داخل می‌کشد. این حرکت ریبوزوم در ناحیه لغزنده و به موجب تنش ایجاد شده از سوی گره دورشته‌ای، مستعد تغییرچارچوب خواهد بود. ۲) مرحله چرخش زیرواحد بزرگ ریبوزوم: هنگامی که زیر واحد کوچک می‌چرخد، ریبوزوم به حالت چرخیده می‌رود و tRNAها در این زیر واحد از جایگاه A و P به ترتیب به جایگاه P و E در زیر واحد بزرگ متصل می‌شوند. هنگامی که زیر واحد بزرگ ریبوزوم به اندازه ٦ آنگستروم می‌چرخد و به حالت اولیه باز می‌گردد، این تغییر حالت موجب کشیده شدن ۲ جفت باز از توالی mRNA به داخل کانال ترجمه می‌شود. این مرحله از حرکت ریبوزوم به همراه تنش ایجاد شده در حالت ساختاری تغییر چارچوب را محتمل می‌نماید.

با درنظر گرفتن این دو حالتِ ممکن برای تغییرچارچوب در فرآیند ترجمه، می‌توان نمایشِ مدل تغییرچارچوب ریبوزوم در فرآیند ترجمه را در شکل ۱ نشان داد. ریبوزوم در حالت صفر، جایگاه A آن خالی می‌باشد و با اتصال aatRNA مناسب در جایگاه A به حالت ۱ می‌رود. در حالت ۱ با هیدرولیز GDP و تغییر شکل و جداشدن فاکتور EF-Tu مرحله جایگزینی انجام می‌شود و به حالت ۲ می‌رود. در این مرحله با توجه به احتمال تغییرچارچوب ریبوزوم، ۲ مسیر برای ریبوزوم وجود دارد، مسیر تغییر چارچوب $\sigma = ۱$ و مسیر بدون تغییر چارچوب $\sigma = ۰$. در حالت ۲ چرخه ترجمه با انتقال رشته پپتیدی به tRNA جایگاه A ادامه می‌یابد. در حالت ۳ زیر واحد کوچک نسبت به زیر واحد بزرگ می‌چرخد و ریبوزوم به حالت چرخیده می‌رود. در این حالت چرخش زیر واحد کوچک حالت هیبریدی تشکیل می‌دهد که به موجب آن tRNAها از جایگاه A و P در زیر واحد بزرگ به جایگاه P و E متصل می‌شوند. این حالت هیبریدی ناپایدار است و ریبوزوم در چرخه

ترجمه بین این دو حالت تغییر می‌کند. در حالت ٤ (حالت هیبریدی) با هیدرولیز GDP زیر واحد بزرگ نسبت به زیر واحد کوچک می‌چرخد و ریبوزوم از حالت هیبریدی خارج می‌شود. این چرخش mRNA را به داخل کانال می‌کشد و حرکت ریبوزوم انجام می‌شود. همچنین این حرکت ریبوزوم باعث می‌شود در این مرحله احتمال تغییر چارچوب داشته باشیم، درنتیجه یک مسیر با $\sigma = ۱$ برای تغییر چارچوب و مسیر دیگر با $\sigma = ۰$ بدون تغییر چارچوب خواهد بود. در نهایت حالت ٥ با خارج شدن tRNA از جایگاه E و جداشدن فاکتور EF-G چرخه ترجمه کامل می‌شود.



شکل ۱: این تصویر شامل چرخه ترجمه ریبوزوم می‌باشد. مسیرهای ناشی از رخ دادن تغییر چارچوب در مراحل ۲⟵۱ و ٥⟵٤ نشان داده شده‌اند و پارامتر σ مرتبه تغییر چارچوب در هر مسیر ترجمه است.

تغییر چهارچوب در حضور ساختارهای محرک

لغزش و تغییر چارچوب به خودی خود برای ریبوزوم محتمل است اما حرکت ریبوزوم در ناحیه لغزنده، آن را مستعد تغییر چارچوب می‌کند. حضور مانع بر حرکت ریبوزوم در این ناحیه شرایط تغییر چارچوب را مساعدتر و احتمال آن را بیشتر می‌کند. برای به نظم آوردن و منسجم کردن فرایند مدل‌سازی تغییر چارچوب، تمام حالت‌های ممکن از این پدیده را به صورت یک گروه از رویدادها بررسی می‌کنیم.

۱. تغییر چارچوب بدون حضور عوامل محرک:

در حالت اول ریبوزوم در ناحیه عادی توالی mRNA فرآیند ترجمه را با دقتی بالا انجام می‌دهد، در این توالی احتمال خطای ترجمه به ازای هر کدان ۳×۱۰^{-٥} می‌باشد [۳]. از این رو نرخ تغییر چارچوب را به ازای هر کدان می‌توانیم $k_{fsh} = k_0 = 9 \times 10^{-5}\ \frac{1}{s}$ حساب کنیم.

۲. تغییر چارچوب در حضور **ناحیه ی لغزنده**:

در حالت دوم، برای افزودن اثر ناحیه‌ی لغزنده به مدل نرخ لغزشی وابسته به مکان را برای حرکت ریبوزوم در نظر می‌گیریم که با ورود ریبوزوم به ناحیه‌ی لغزنده افزایش و با خروج از ناحیه‌ی لغزنده کاهش می‌یابد. در این حرکت نرخ تغییر چارچوب با قرار گرفتن بیشتر بر روی ناحیه لغزنده بیشتر می‌شود تا جایی که تمام ناحیه لغزنده در جایگاه‌های A و P قرار گیرد و نرخ لغزش به بیشینه مقدار خود برسد. بنابراین برای نرخ تغییر چارچوب در این حالت رابطه $k_{fsh} = k_{ss}e^{-|n-N_z|}$ را خواهیم داشت، در این رابطه n مکان نوکلئوتید اول جایگاه A ریبوزوم است و n_z مکان نوکلئوتید Z در آرایه توالی لغزنده می‌باشد، در نتیجه هنگامی که ریبوزوم به این نوکلئوتید در جایگاه A می‌رسد یعنی $n = n_z$، بیشترین مقدار نرخ تغییر چارچوب حاصل می‌شود. در ادامه، با عبورِ ناحیه‌ی لغزنده از جایگاه‌های A و P ریبوزوم، احتمال تغییر چارچوب کاهش می‌یابد در نتیجه می‌توان نرخ تغییر چارچوب را با رابطه $k_{fsh} = k_{ss}e^{|n-N_z|}$ نشان داد که اثر عبور از ناحیه لغزنده را با کاهش نمایی در نرخ تغییر چارچوب نشان می‌دهد.

۳. تغییر چارچوب در حضورساختار گره پایین دست:

قرار گرفتن گره‌ی دورشته‌ای درمقابل ریبوزوم، موجب اضافه شدن اثر انرژی جفت بازهای دورشته‌ای در تغییر چارچوب ریبوزوم می‌شود. تنش ایجاد شده از باز شدن جفت بازهای گره‌ی دو رشته‌ای می‌تواند باعث تغییر چارچوب ریبوزوم شود، بنابراین رابطه نرخ تغییر چارچوب در این حالت $k_{fsh} = k_0 e^{+\gamma_{fsh}\Delta G_{local}}$ خواهد بود، در این رابطه ΔG_{local} مربوط به انرژی گره‌های دورشته‌ای است که ریبوزوم آن را باز می‌کند و γ_{fsh} پارامتر مربوط به منحنی انرژی و سد پتانسیل این فرآیند است.

٤. تغییر چارچوب در حضور ناحیه لغزنده و ساختار گره‌ی پایین دست:

در این حالت، همزمان با آنکه ریبوزوم در ناحیه لغزنده قرار دارد، گره‌ی دورشته‌ای را مقابل خود دارد. همانند حالت قبل به خاطر تنش ایجاد شده از باز شدن گره‌ها و نیز ناحیه لغزنده، مستعد تغییر

چارچوب می‌شود. از ورود ناحیه لغزنده در جایگاه ترجمه ریبوزوم و همچنین سهم انرژی گره‌های دورشته‌ای رابطه $k_{fsh} = k_{ss}e^{-|n-N_z|}e^{+\gamma_{fsh}\Delta G_{local}}$ را بدست می‌آوریم. هنگامی که ریبوزم در حال عبور از ناحیه لغزنده است و دو رشته‌ای مقابل آن قرار دارد، ریبوزوم با عبور از ناحیه و درگیری با مانع شاهد کاهش مقدار تغییر چارچوب خواهد بود. رابطه $k_{fsh} = k_{ss}e^{|n-N_z|}e^{+\gamma\Delta G_{local}}$ نرخ تغییر چارچوب را در این وضعیت توصیف می‌کند و کاهش نرخ تغییر چارچوب را به صورت نمایی نشان می‌دهد.

تمامی این حالت‌ها در مکانی معین از توالی mRNA رخ می‌دهند، این وابستگی به مکان ما را ملزم می‌کند که برای یک توضیح جامع از آنچه که در تغییر چارچوب ریبوزوم رخ می‌دهد یک معادله وابسته به مکان برای آن تعریف کنیم. در نتیجه از جمع بر روی تمامی این حالت‌ها، برای حرکت ریبوزوم در توالی لغزنده و ناحیه پایین دست آن، نرخ تغییر چارچوب به صورت زیر نوشته می‌شود:

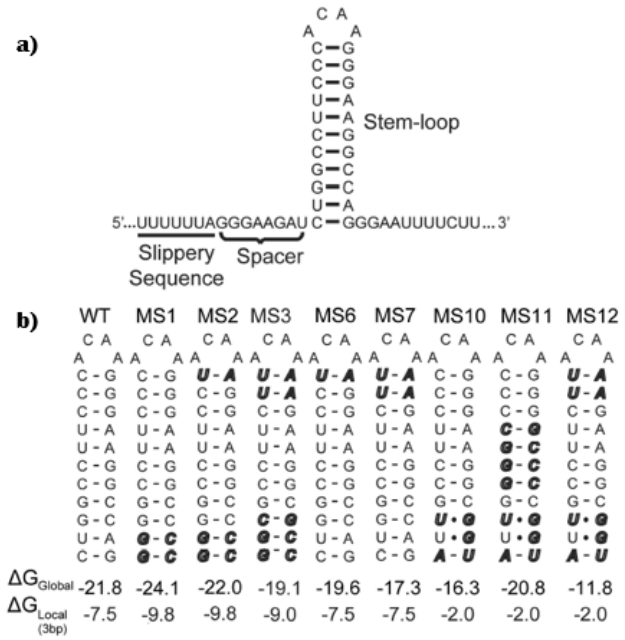
(۱)

$$k_{FSH} = \{k_0 + (k_{slip} + k_0)e^{-\lambda|n-n_s|}[\Theta(n-n_s+7) - \Theta(n-n_s-7)]\}e^{\gamma_{FSH}\beta\Delta G}$$

این رابطه وابسته به مکان ریبوزوم است.

تنظیم و هماهنگ سازی نرخ تغییرچارچوب

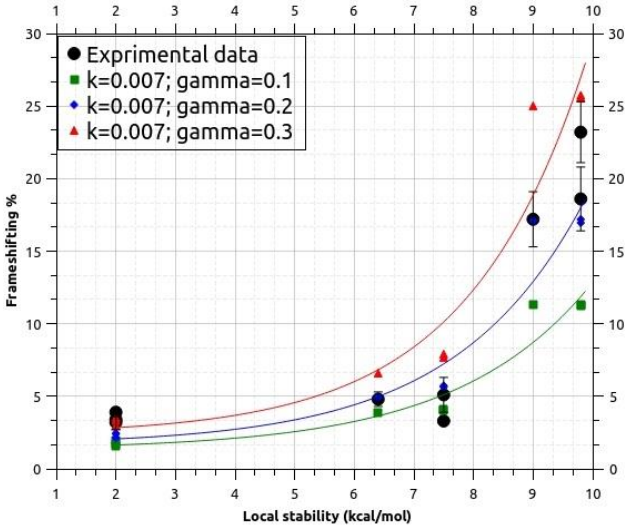
با استفاده از مدل ارائه شده در قسمت قبل، شبیه‌سازی حرکت ریبوزوم روی رشته‌ی mRNA را با استفاده از الگوریتم گیلسپی انجام داده‌ایم. در رابطه (۱) برای تعریف نرخ تغییر چارچوب پارامترهای آزاد k_{ss} و γ_{fsh} تعریف شد. از آنجا که پدیده تغییر چارچوب در ابعاد آنگستروم از حرکت رخ می‌دهد، فقدان نتایج تجربی در اندازه‌گیری این مقادیر وجود دارد. برای آنکه بتوانیم این مقادیر مدل را تا جای ممکن به واقعیت نزدیک کنیم، از نتایج تجربی استفاده می‌کنیم. به عبارت دیگر این دو متغیر را به طور قاعده‌مند، چنان تغییر می‌دهیم که استوکیومتری دو نوع پروتئین تولید شده با مقادیر گزارش شده‌ی تجربی همخوانی داشته باشد. برای این تنظیم از نتایج تجربی مربوط به ساختار دوم mRNA ویروس HIV-1 استفاده کرده‌ایم [۸]. در شکل ۲a ساختار دوم HIV-1 نشان داده شده است. همچنین با تغییر جفت بازها در ناحیه گره دورشته‌ای mRNA انرژی کل ساختار و نیز انرژی گره‌های ابتدایی را تغییر داده‌اند (شکل ۲b). انرژی‌ها با استفاده از پارامترهای نزدیکترین همسایه محاسبه شده‌اند [۹]. اندازه‌گیری‌ها از درصد تغییر چارچوب بیان می‌کند که انرژی ۳ الی ٤ گره اول دو رشته‌ای mRNA با درصد تغییر چارچوب ارتباط دارد. با استفاده از این داده‌ها و تکرار فرآیند آزمایش با استفاده از مدل وابسته به مکان ترجمه ریبوزوم، می‌توانیم به مقداری از پارامترهای آزاد مدل برسیم که با نتایج تجربی تنظیم شده باشد.



شکل ۲: a) نمایش کلی از ناحیه‌ی لغزنده و قسمت پایین دست ویروس HIV-1. b) نمونه‌های ازمایشگاهی از ناحیه ساقه و حلقه است که با تغییر جفت بازهای آن انرژی کل ساختار و انرژی ناحیه ابتدایی آن تغییر کرده‌اند. مقادیر انرژی در واحد (kcal/mol) می‌باشند [۸].

در شکل ۳ نتایج مربوط به شبیه‌سازی این آزمایش نشان داده شده است که با مقادیر $k_{ss} = ۰.۰۰۷\ (S^{-1})$، و γ=۰,۱، ۰,۲، ۰,۳ بدست آمده است. این شبیه‌سازی برای تعیین این دو متغیر آزاد در بازه ۰,۰۰۰۱ الی ۰,۰۱ برای k_{ss} و بازه ۰,۱ الی ۱ برای γ انجام شده است که مطلوب‌ترین نتیجه در شکل نشان داده شده است. مقدار γ=۰,۳ در این نمودار هم‌خوانی نزدیکی با نتایج تجربی دارد.

از این رو می‌توان گفت رفتار ریبوزوم در فرآیند تغییر چارچوب از سازوکار چرخ دنده گرمایی پیروی می‌کند.



شکل ۳: در این نمودار نقاط سبز، آبی و قرمز مربوط به نتایج شبیه‌سازی مدل وابسته به مکان ترجمه ریبوزوم می‌باشد و نقاط سیاه مربوط به نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از مرجع [۸] است. محور افقی انرژی ۳ جفت باز ابتدایی دورشته‌ای mRNA و محور عمودی درصد تغییر چارچوب را نشان می‌دهد.

مرجع‌ها

[۱] B. Alberts *et al*., "*Molecular Biology of the Cell*"; 5th edition, Garland Science Press. (2007).

[۲] J.F. Atkins *et al*., *Nucl. Acids Res.* **44,** 7007 (2016).

[۳] J.F. Atkins *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 1192 (1972).

[٤] T. Jacks *et al*., *Nature* **21**, 280 (1988).

[٥] P. R. Bhatt, *et al*., *Science* **372**, 1306 (2021).

[٦] T. M. Schmeing and V. Ramakrishnan, *Nature* **461**, 1234 (2009).

[٧] B. Shakiba *et al*., *J. Chem. Phys.* **145**, 025101 (2016).

[٨] K. D. Mouzakis *et al*., *Nucleic Acids Res.* **41,** 1901 (2013).

[٩] T. Xia *et al*., *Biochem.* **37,** 14719 (1998).