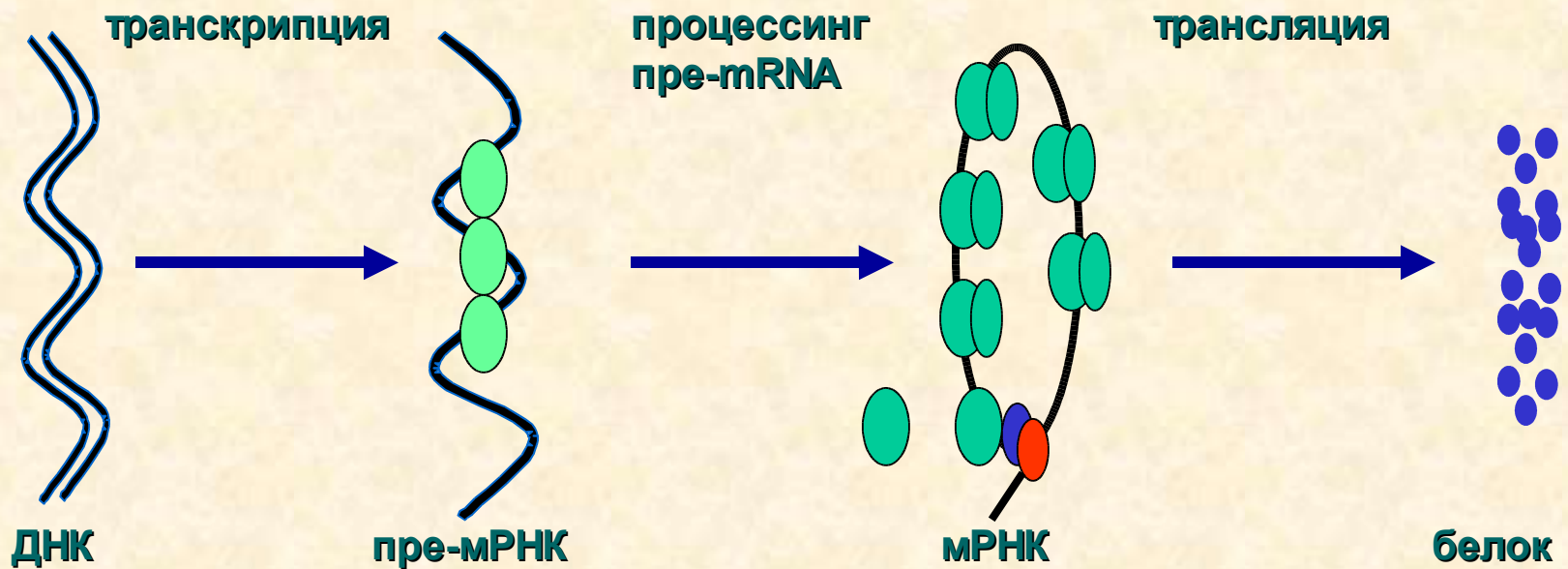
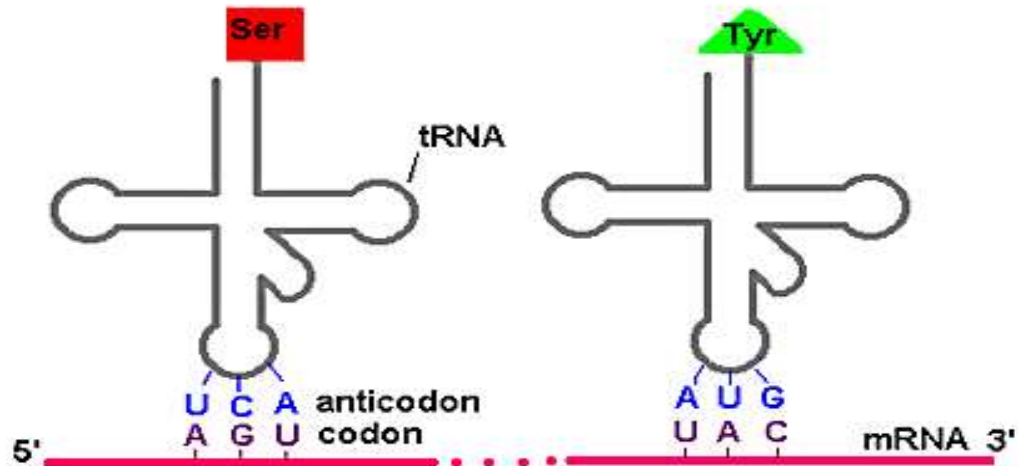


- Трансляция и трансгенез – эксперимент, компьютерный анализ и моделирование

- Алексей Владимирович Кочетов

- Трансляция – один из фундаментальных биологических процессов

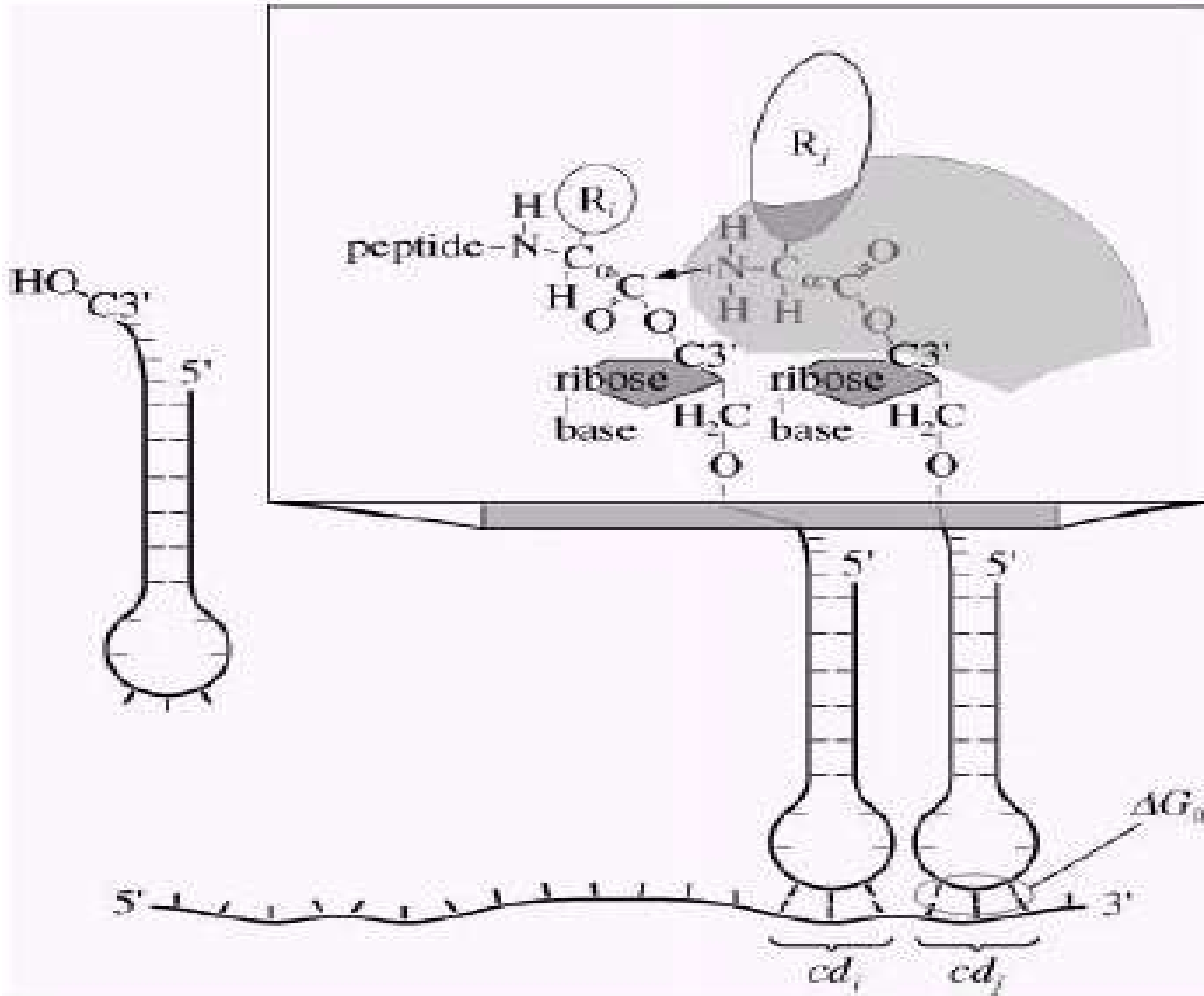




2nd base in codon

		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

The Genetic Code

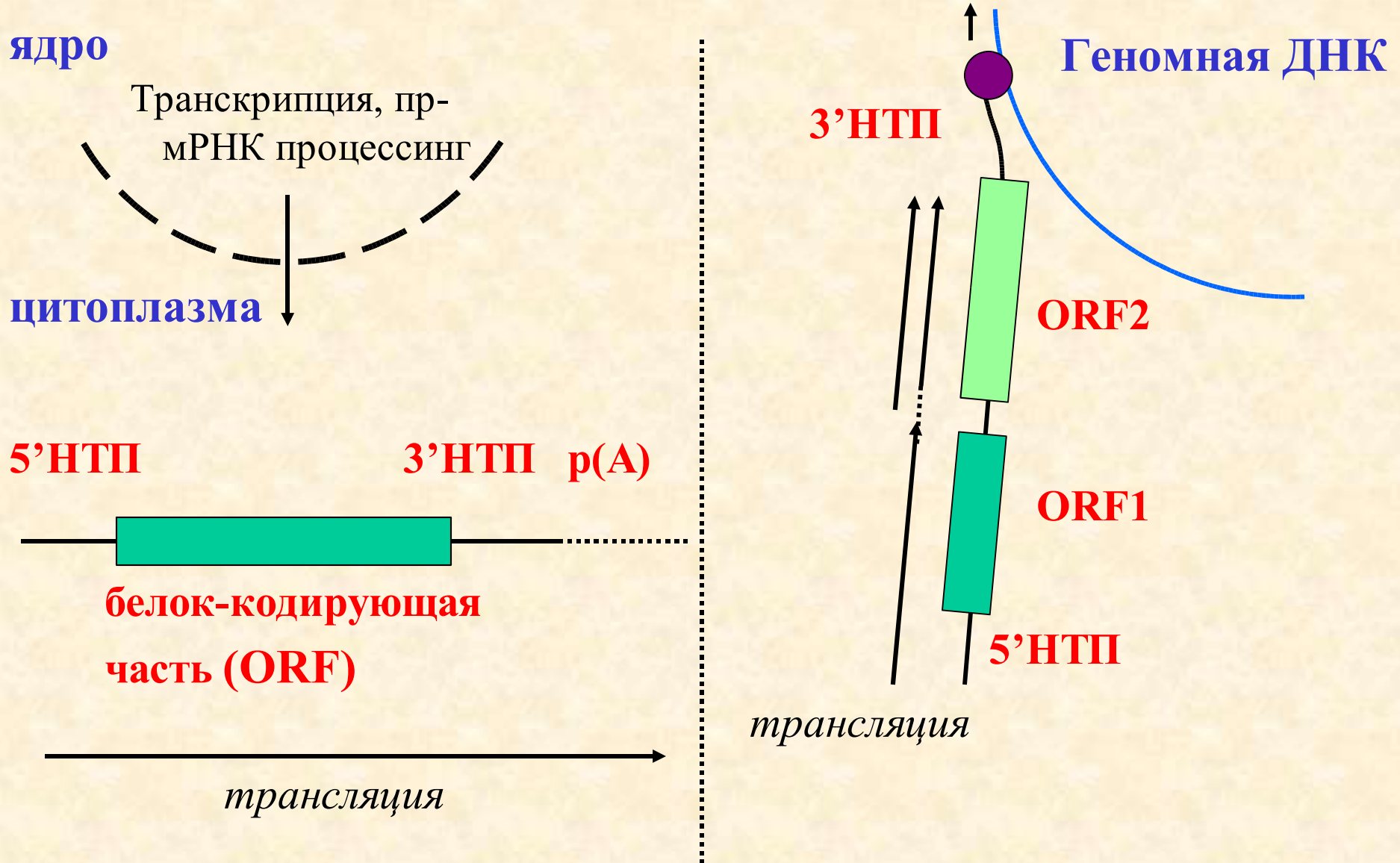


- Lehmann et al., *J. Theor. Biol.* (2000) 202, 129-144

**Структуры эукариотических и
прокариотических мРНК различны**

**Функционально наиболее сильно отличается
процесс **инициации** трансляции**

Функциональные различия между мРНК эукариот и прокариот



- Прокариотическая полицистронная мРНК

- SD ORF1 ORF2 ORF3



- **GGAGGA(N)₈₋₁₂AUG**
- сайт Ш-Д в комбинации с AUG кодоном определяют старт трансляции, возможна реинициация
- транскрипция и трансляция сопряжены

- Эукариотическая моноцистронная мРНК

- 5'UTR ORF 3'UTR poly(A)



- cap AUG UGA poly(A)

- рибосомы связываются с 5'-концом мРНК и движутся вдоль 5'НТП в поиске подходящего стартового кодона трансляции
- транскрипция и трансляция разобщены

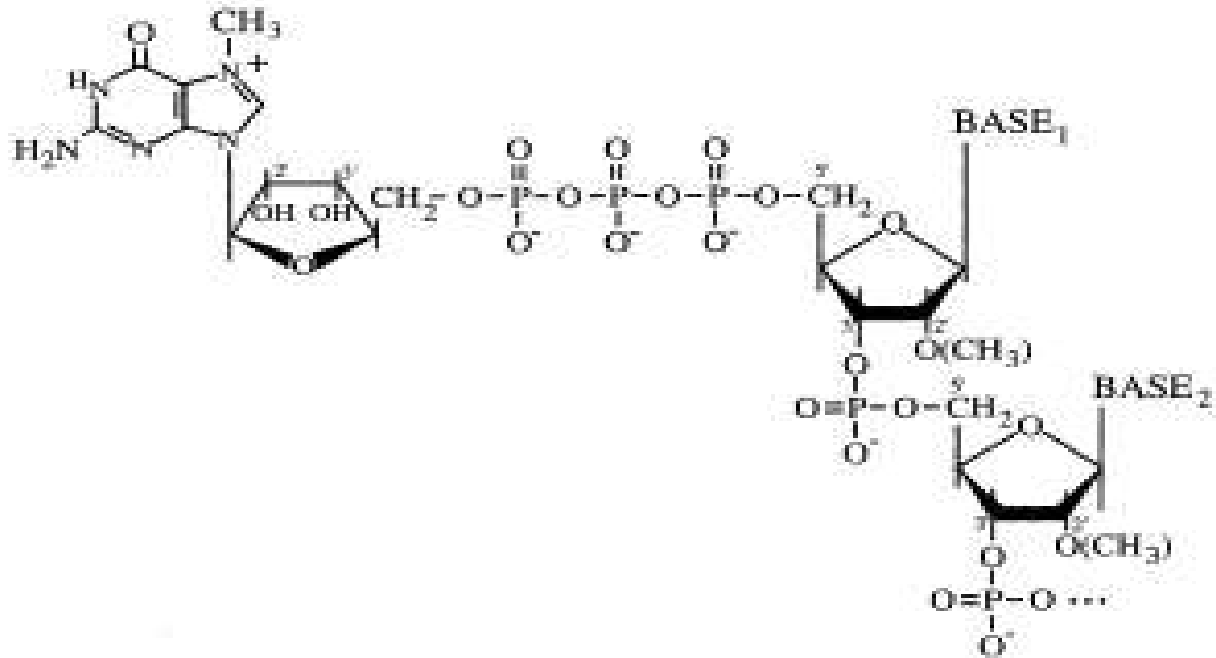


Fig. 1. The chemical structure of the 5' terminus of a 'capped' mRNA.

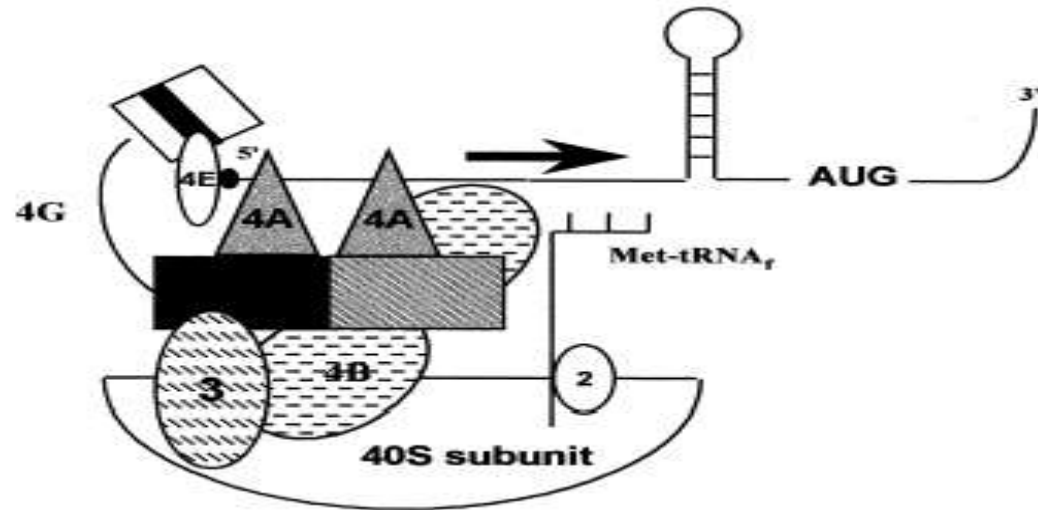
- Raught et al., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (1999) 43-57

В эукариотических клетках выделяют два механизма инициации трансляции:

- линейное сканирование

- внутренняя инициация трансляция

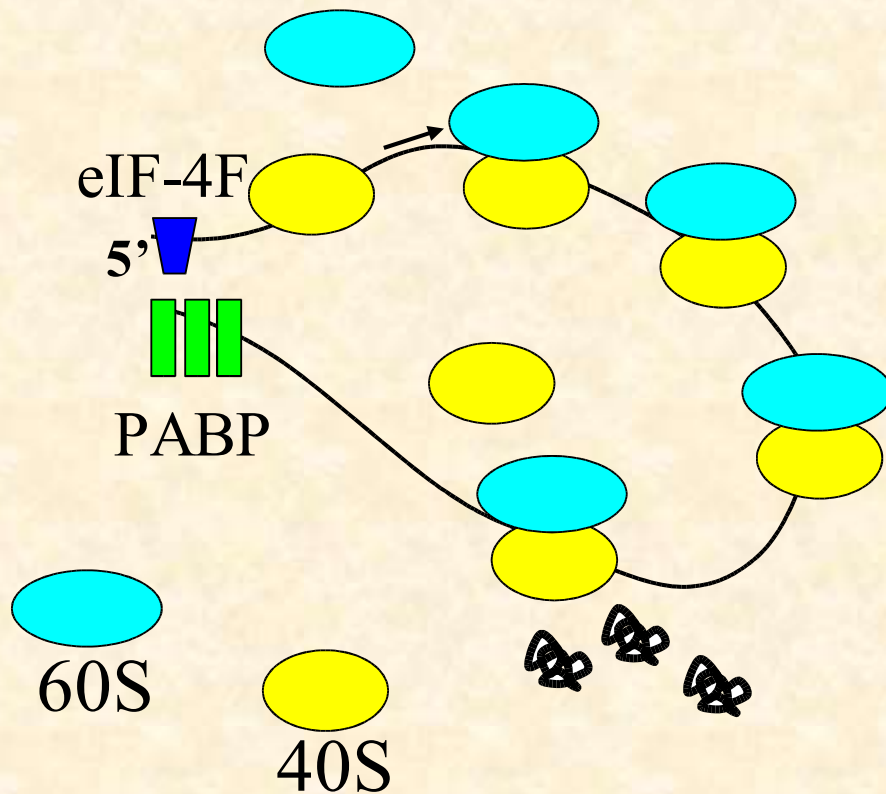
Схематическое изображение взаимодействия 48S преинициационного комплекса, eIF-4F и мРНК



Key to symbols:-



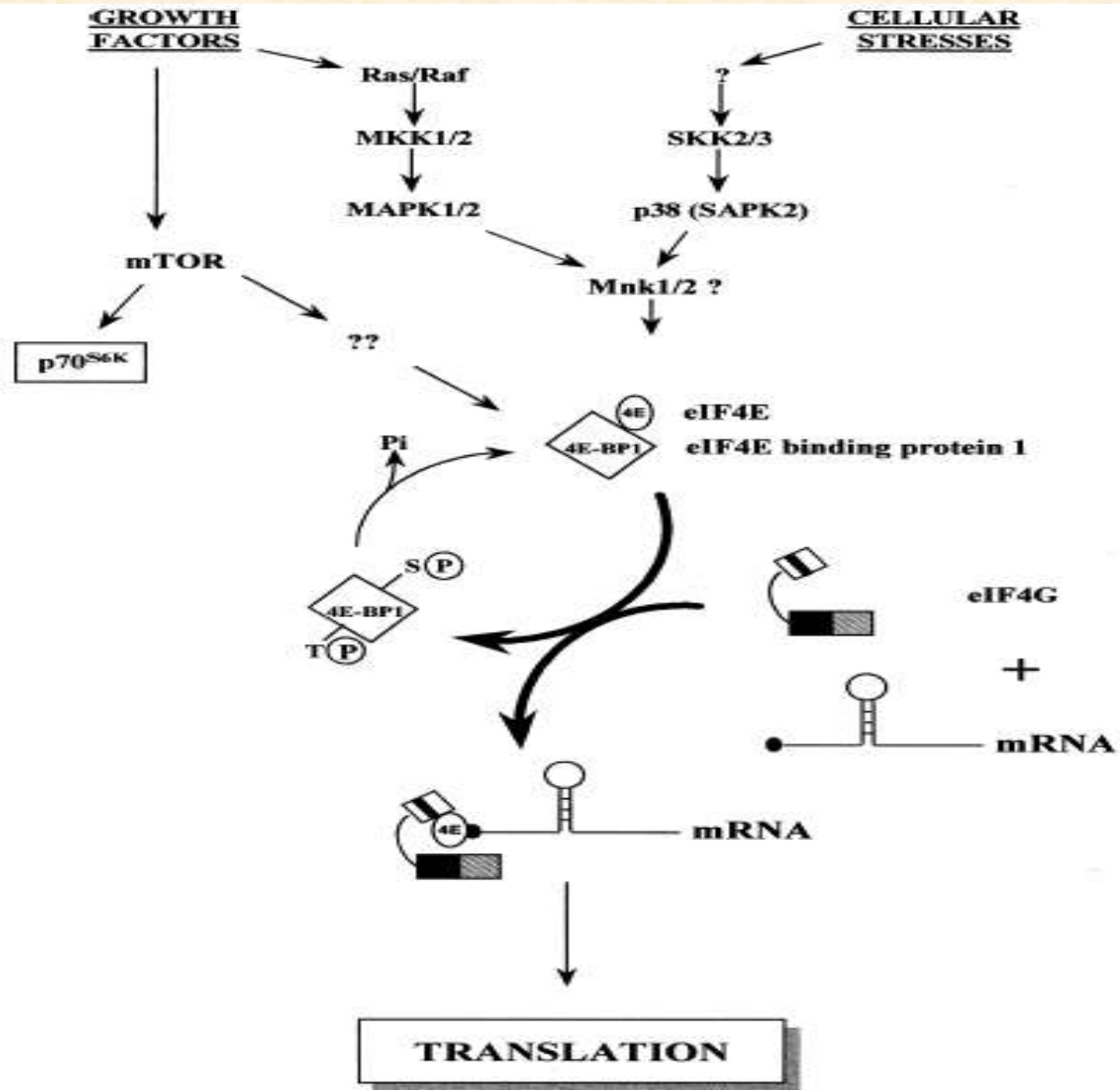
Модель “линейного сканирования”



Особенности:

- Участие кэпа и поли (А)-хвоста
- Расплетенный 5'UTR
- Роль контекста AUG кодона (-3,+4 позиции)

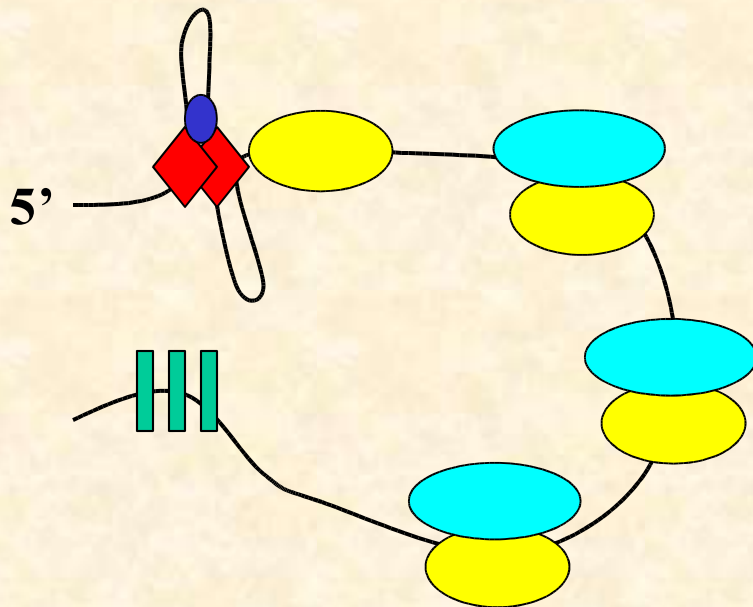
Общий контроль интенсивности трансляции



IRES (internal ribosome entry site)

IRES

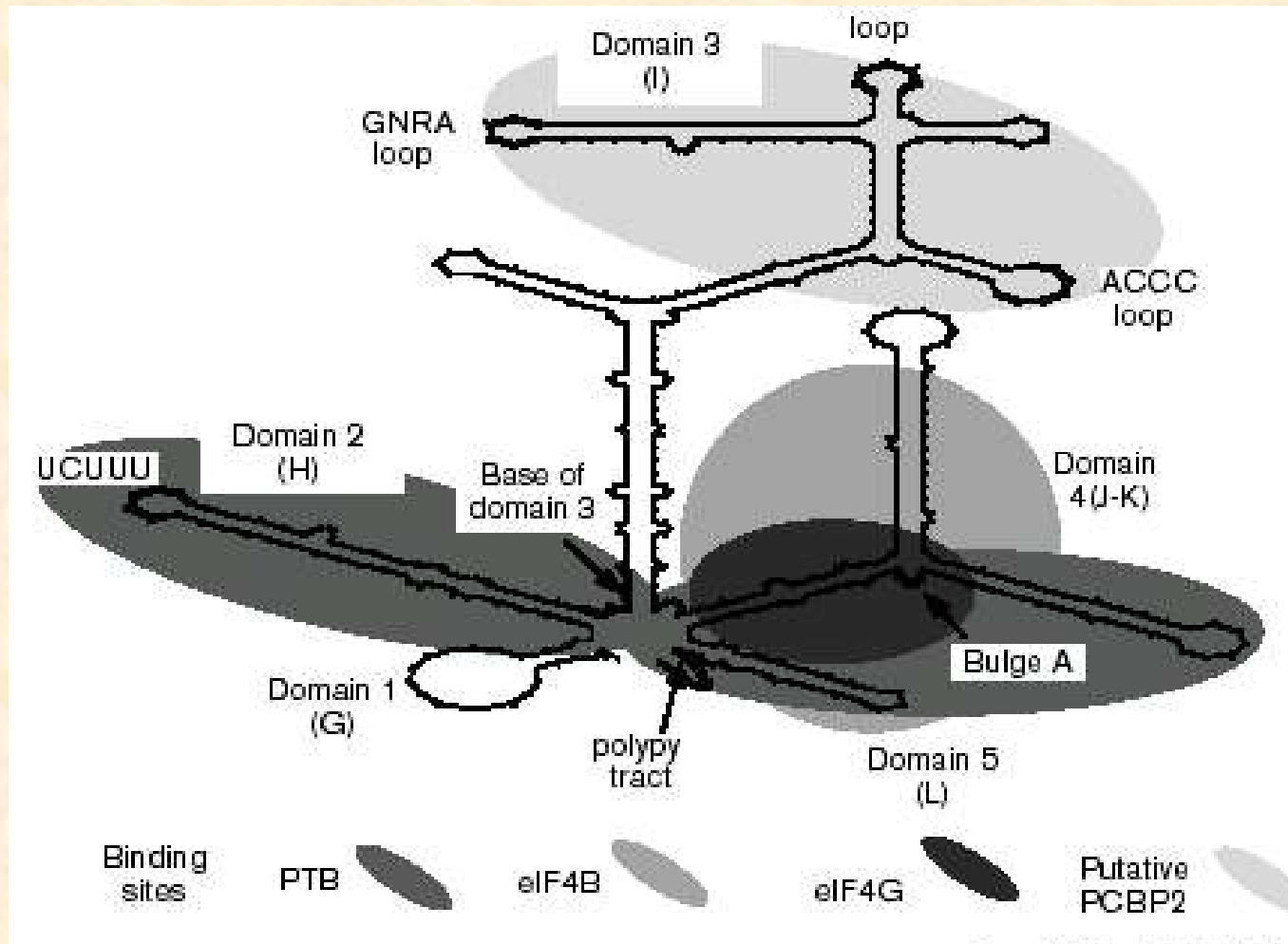
60S 40S



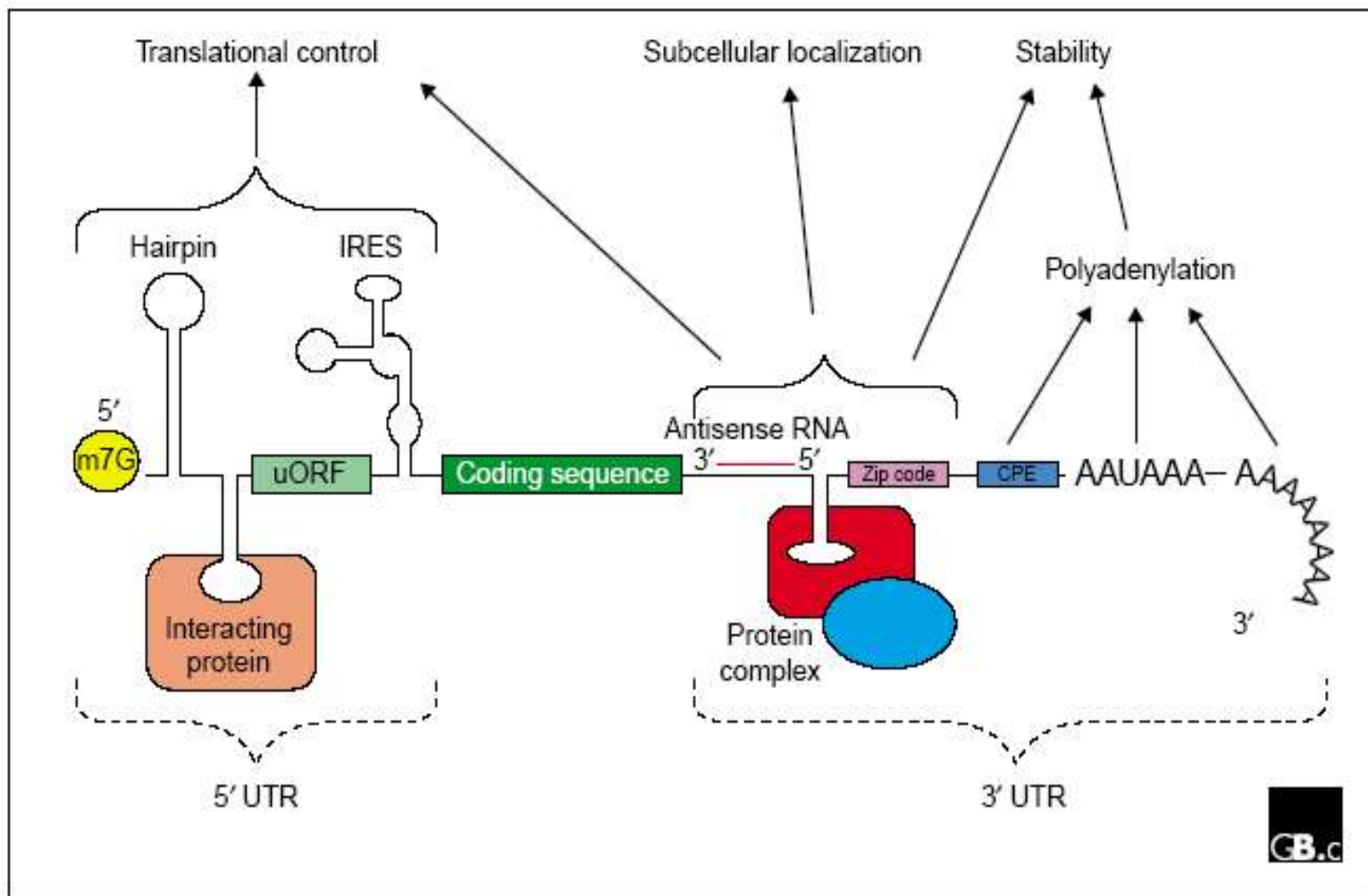
- мРНК не содержит кэпа
- 40S связывается не с 5'-концом мРНК

◆ ● Неизвестные факторы

- Модель IRES EMCV



мРНК эукариот часто содержат сигналы экспрессии



Преимущества **трансгеноза перед классическими методами генетики и селекции**

- **Возможность интродукции генов, выделенных из любых организмов**
- **Возможность переноса генов в уже существующие сорта - при сохранении всего комплекса их характеристик**
- **В перспективе - возможность создания искусственных организмов с заданным набором характеристик.**

Модификация агробιοлогическιх характеристик

- устойчивость к малотоксичным гербицидам
- устойчивость к насекомым-вредителям, грибам, вирусам и вироидам
- устойчивость к абиотическим стрессам (засоление, колебания температуры, засуха, тяжелые металлы, заморозки и т.д.)
- фиксация атмосферного азота

Улучшение качества фитопродуктов

- улучшение пищевых характеристик
(витамины, незаменимые
аминокислоты, микроэлементы)
- контроль времени созревания плодов
- контроль биохимического состава
(повышение усвояемости)

Виды генно-инженерных модификаций

- Перенос белок-кодирующих генов
- Перенос конструкций, регулирующих экспрессию генов организма-хозяина посредством косупрессии или генетического сайленсинга

Трансгенные растения табака, экспрессирующие бактериальную нуклеазу

Геномная ДНК
Serratia marcescens

ПЦР



Агробактериальный перенос

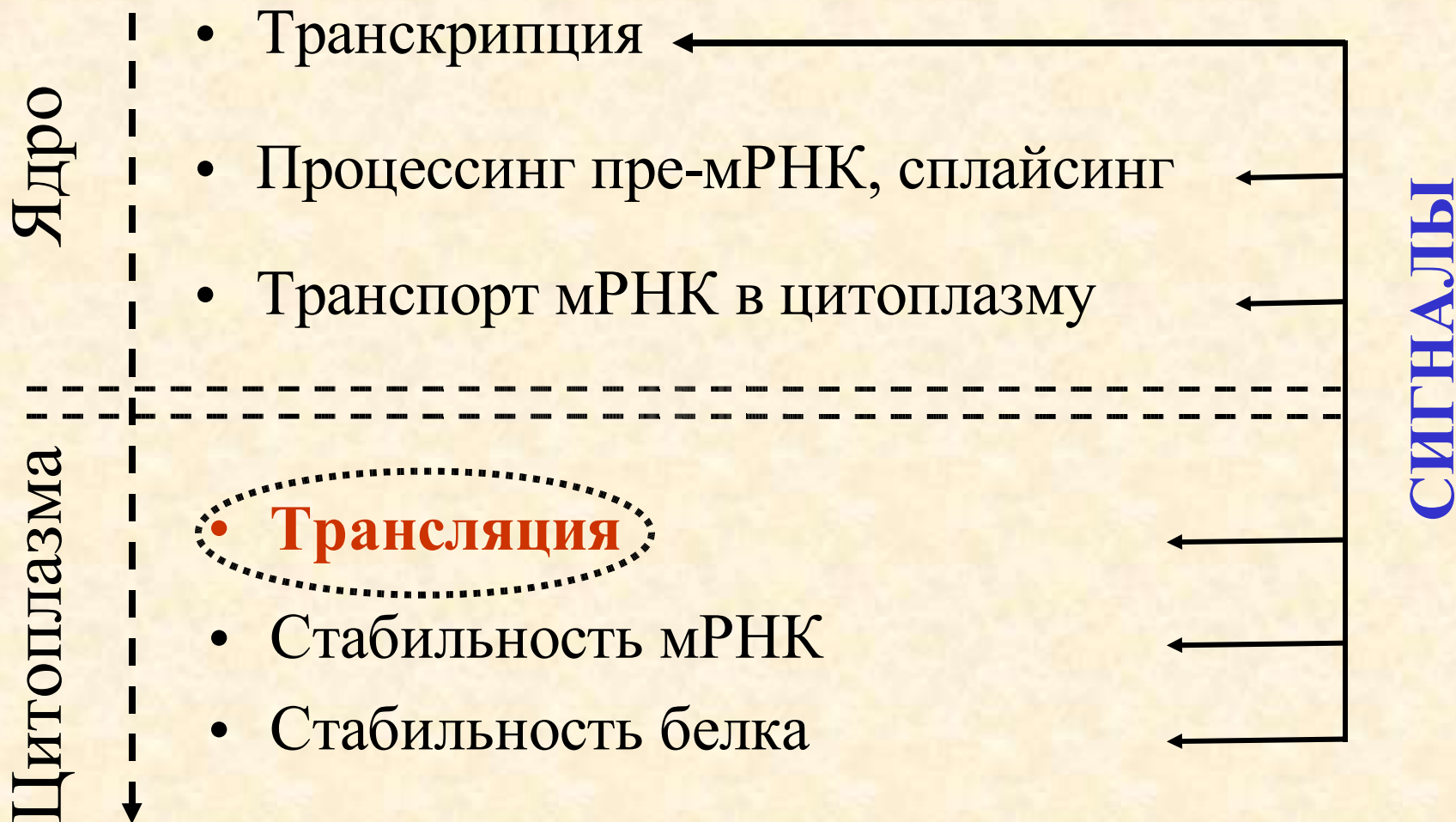
Трансформанты табака



Дизайн трансгена

- **Выбор промотора** с подходящим паттерном транскрипции
- **Оптимизация некодирующих частей мРНК** и сигналов экспрессии на посттранскрипционном уровне
- **Оптимизация белок-кодирующей последовательности**
- **Поиск и элиминация ложных сигналов сплайсинга/полиаденилирования**

Контроль экспрессии генов в клетках эукариот

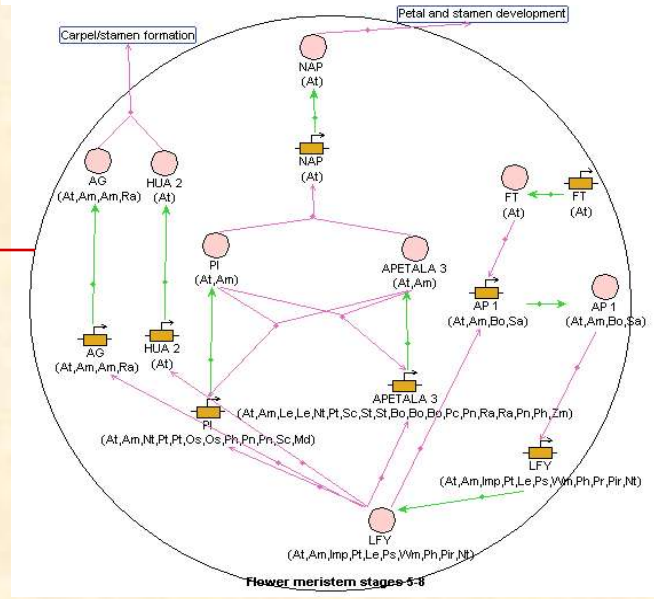
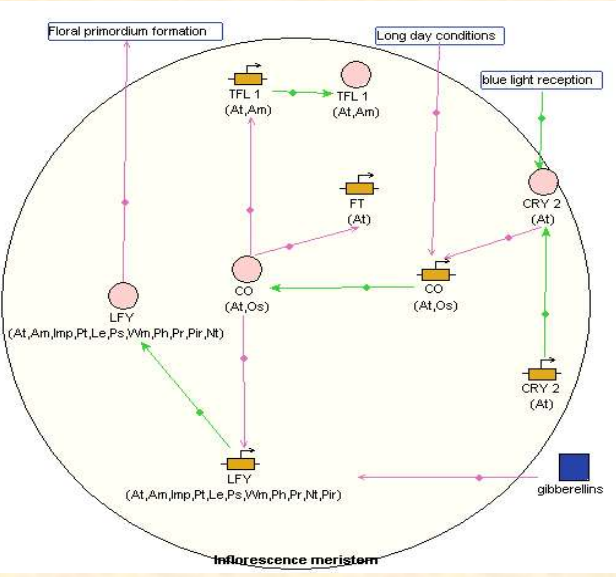
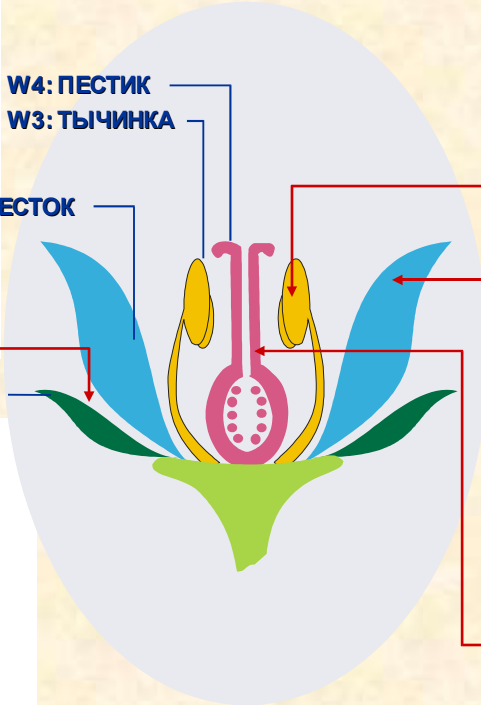
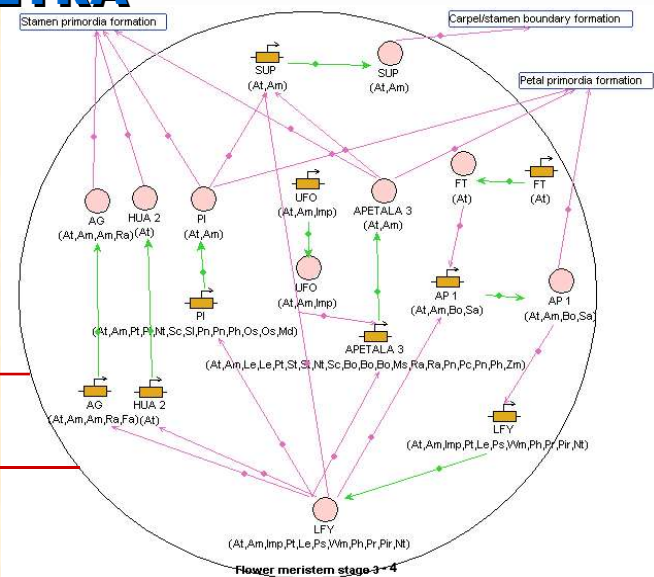
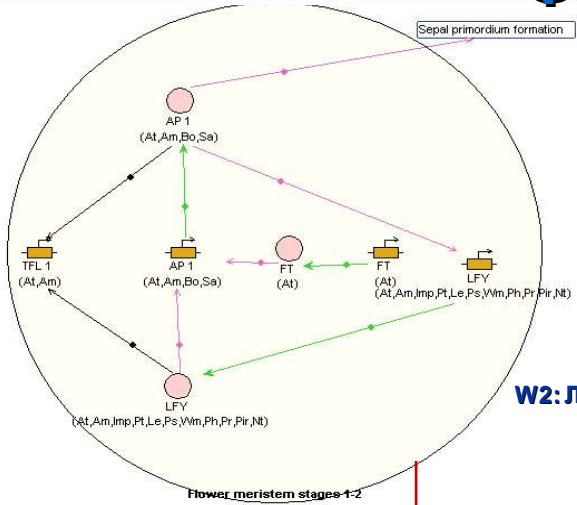


ГЕННАЯ СЕТЬ – ГРУППА ГЕНОВ, КООРДИНИРОВАННО ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ, БИОХИМИЧЕСКИХ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА

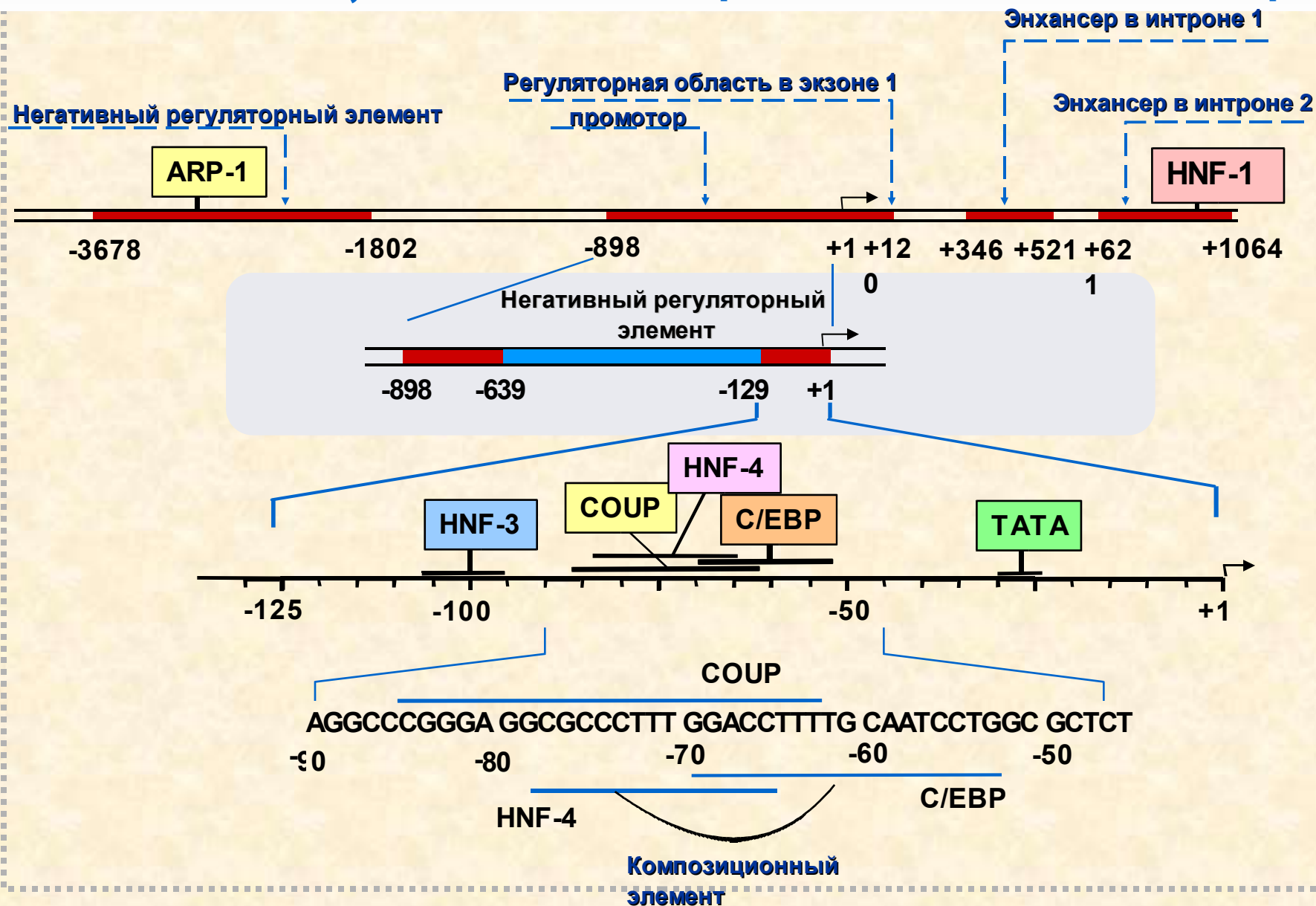
Обязательные компоненты любой генной сети:

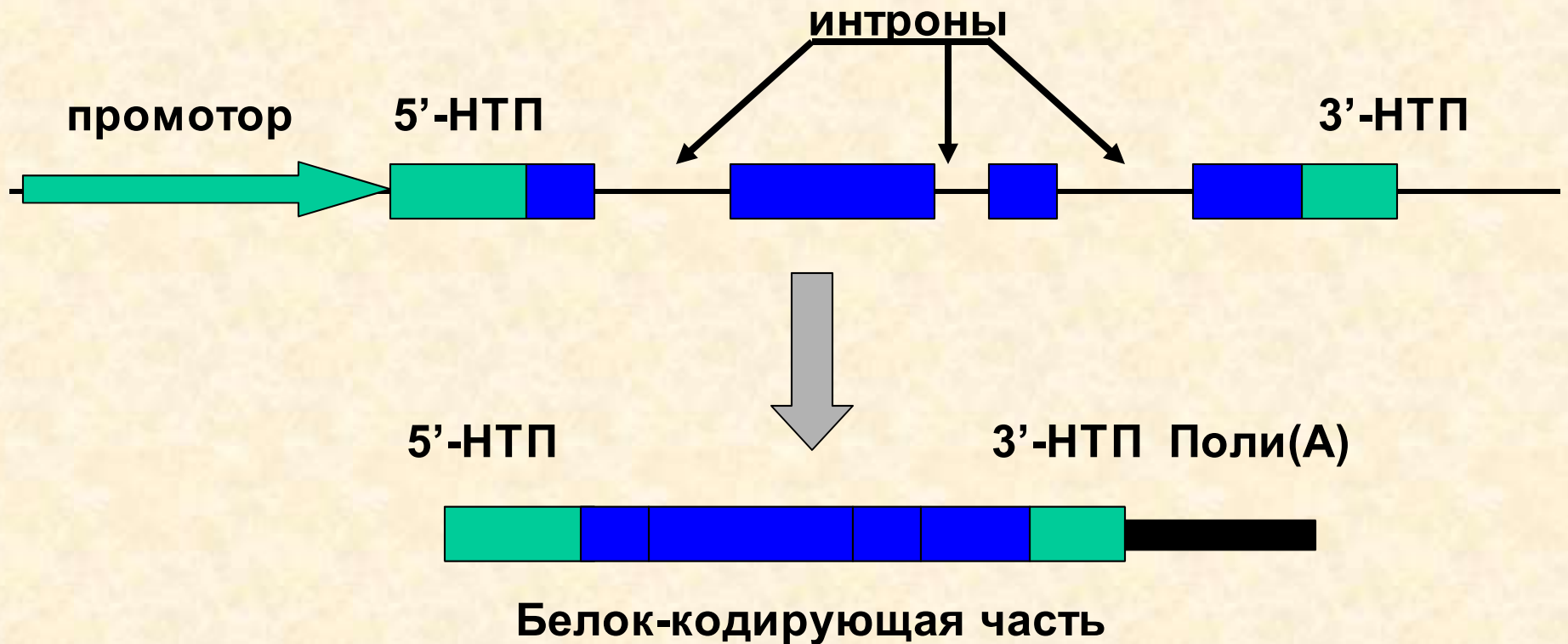
- 2. Группа координированно функционирующих генов**
- 3. Белки, кодируемые этими генами
(структурные белки, ферменты, транскрипционные факторы и т.д.)**
- 4. Пути передачи сигналов**
- 5. Регуляторные контуры: отрицательные и положительные обратные связи**
- 6. Внешние сигналы, гормоны, метаболиты и т.д.**

БАЗА ДАННЫХ GENE NET: ФРАГМЕНТ ГЕННОЙ СЕТИ ФОРМИРОВАНИЕ ЦВЕТКА



БАЗА ДАННЫХ TRRD: ОРГАНИЗАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ РАЙОНОВ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПАТТЕРН ТРАНСКРИПЦИИ



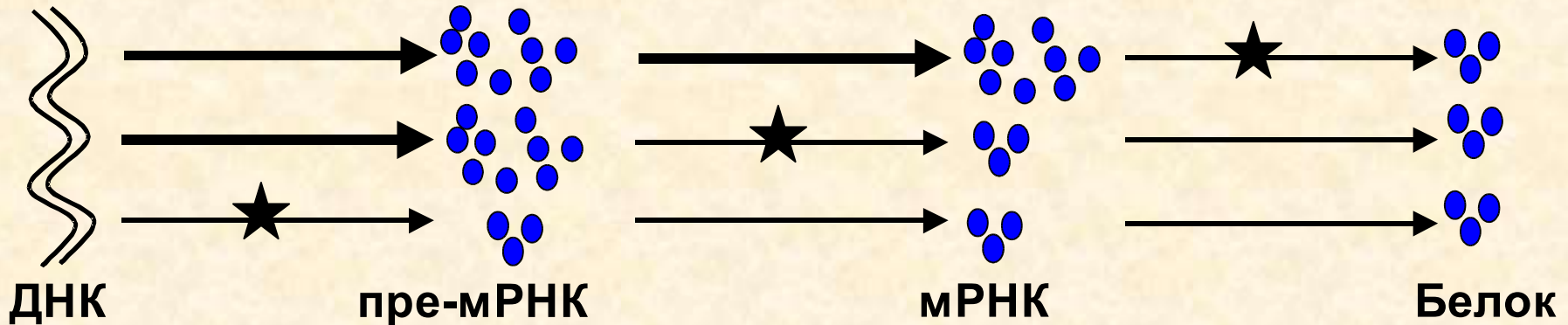
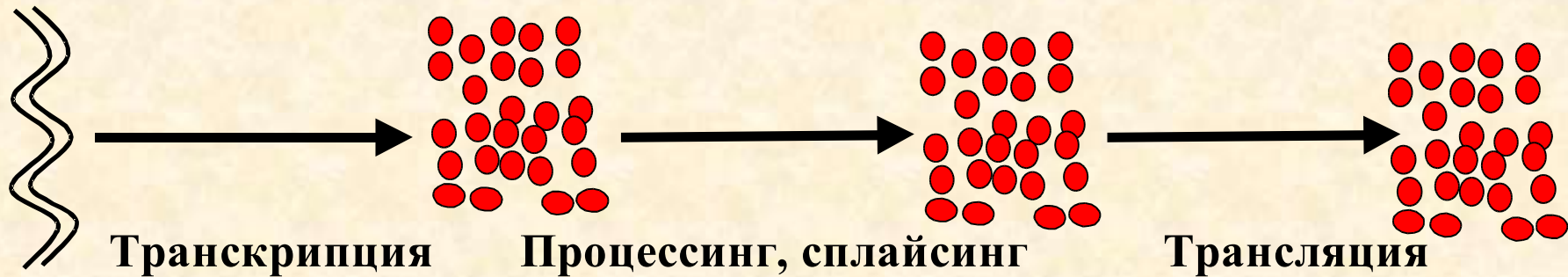


Для трансгенеза обычно используют только белок-кодирующую часть чужеродного гена



Концепция «лимитирующего звена» в приложении к процессу экспрессии

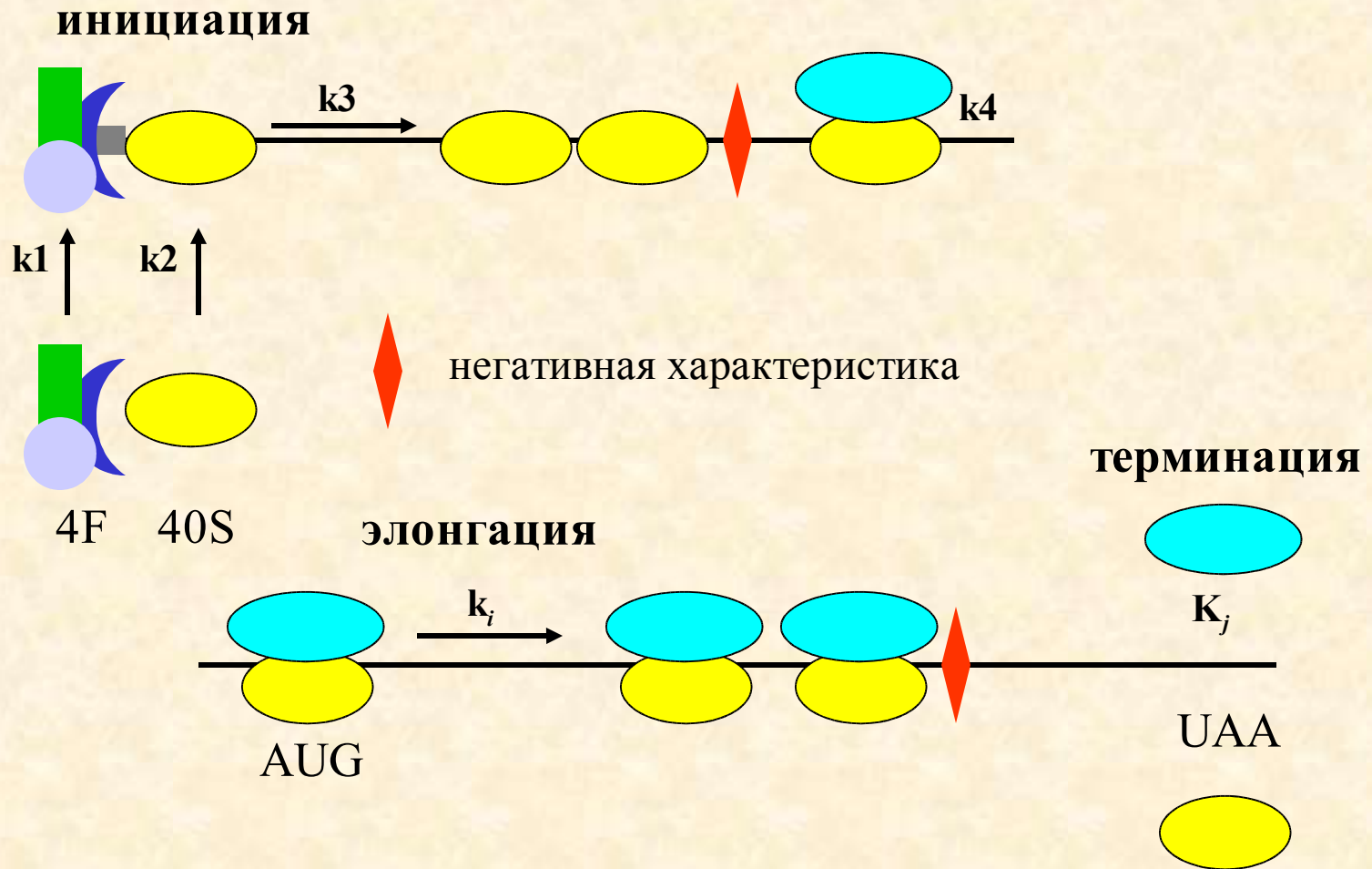
Высокий уровень экспрессии

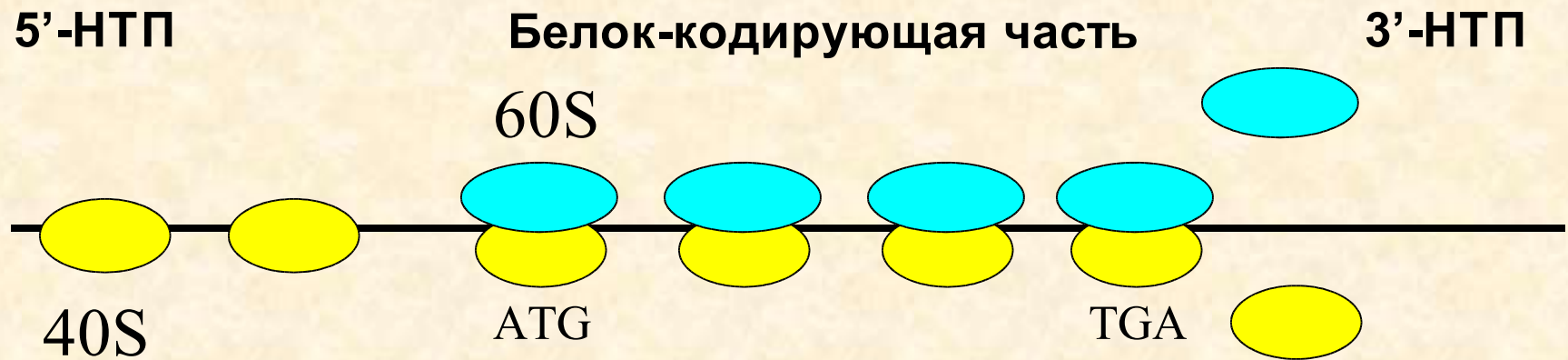


Низкий уровень экспрессии (★ - низкоэффективные стадии)

**2. Модификация структуры генов
организма-донора для
достижения максимальной
эффективности трансляции в
клетках организма-реципиента**

Активность мРНК различна и определяется совокупной эффективностью разных этапов процесса трансляции





5'-НТП: отсутствие стабильной вторичной структуры, оптимизированный сайт инициации трансляции, при необходимости – встройка трансляционного энхансера

Белок-кодирующая часть – для достижения высокого уровня экспрессии необходима замена синонимических кодонов на варианты, характерные для генов организма - реципиента

3'-НТП: оптимизированный сайт терминации трансляции, при необходимости – встройка трансляционного энхансера или сигнала, увеличивающего цитоплазматическую стабильность мРНК

ИНТЕРФЕЙС ПРОГРАММЫ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ мРНК

(<http://www.mgs.bionet.nsc.ru>)

Predicting High/Low mRNA expression of a monocot plant gene

Input DNA Sequence:

from Screen:

ggaattggga ggaggtgggg gggggatggg ggaggtaggg ggtggggata tgggtgatga

from DB:

Bases Available:

SRS5 from Heidelberg (EMBL) By ID

from File:

Обзор...

[File formats](#)

Execute

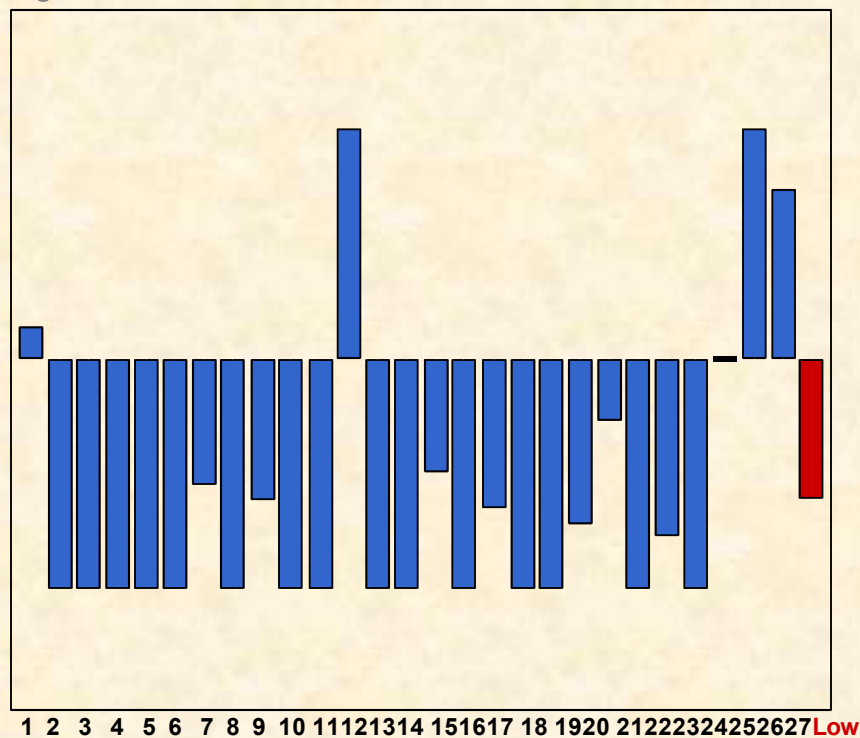
Reset form

[Example](#)

[Related Paper](#)

ПРИМЕР ПРЕДСКАЗАНИЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ мРНК ГЕНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ

High



Low

Data is:

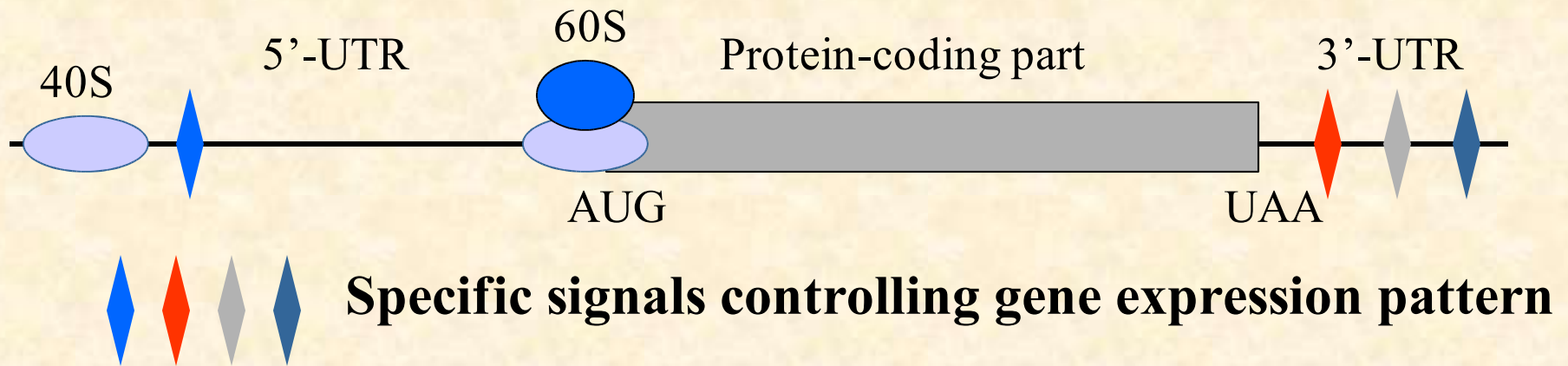
TTCAACAAC TGTATTATCTC TATGAACAGT TCCTTTGATG AAGAACACAA
AGTGAAAGTT GCTGTCTTTA TAACCAGGAT TTGGTAATTC CCATTGTTTC

Prediction is mean of the Expert decisions = **-0.598938** that means **Low**.

Expert [Estimate*Weight=Decision]'s are following:

1. Translation INCREASES with DECREASING the Leader length $0.137257 * 5 = 0.686285$
2. Translation INCREASES with DECREASING [T] content $-1 * 5 = -5$
3. Translation INCREASES with DECREASING [AUG]:[-AUG] disbalance $-1 * 5 = -5$
4. Translation INCREASES with INCREASING [A]:[T] ratio $-1 * 5 = -5$
5. Translation INCREASES with INCREASING [AUG]:[-AUG] ratio $-1 * 5 = -5$
6. Translation INCREASES with DECREASING [A]:[T] disbalance $-1 * 5 = -5$
7. Translation INCREASES with DECREASING [AUG] content $-0.537042 * 5 = -2.68521$
8. Translation INCREASES with DECREASING [AUG] framed $-1 * 5 = -5$
9. Translation INCREASES with DECREASING [AUG] optimized $-0.623815 * 5 = -3.11908$
10. Translation INCREASES depends on the "-3 position" rule $-1 * 5 = -5$
11. Translation INCREASES with DECREASING [AUG] "-3"-ruled $-1 * 5 = -5$
12. Translation INCREASES with DECREASING [K] content of [-17:-1] $1 * 5 = 5$
13. Translation INCREASES with DECREASING [KB] content of [-17:-1] $-1 * 5 = -5$
14. Translation INCREASES with DECREASING High-consensus matches $-1 * 5 = -5$
15. Translation INCREASES with DECREASING Low-consensus matches $-0.487738 * 5 = -2.43869$
16. Translation INCREASES with INCREASING High-ShortFreqMatr $-1 * 5 = -5$
17. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 1bp-FreqRatio $-0.639225 * 5 = -3.19612$
18. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 1bp(KM)-FreqRatio $-1 * 5 = -5$
19. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 2bp(KM)-FreqRatio $-1 * 5 = -5$
20. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 3bp(KxM)-FreqRatio $-0.708711 * 5 = -3.54355$
21. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 5bp(KM)-FreqRatio $-0.264822 * 5 = -1.32411$
22. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 6bp(KM)-FreqRatio $-1 * 5 = -5$
23. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 3bp(ATGCx)-FreqRatio $-0.776691 * 5 = -3.88346$
24. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 5bp(ATGCx)-FreqRatio $-1 * 5 = -5$
25. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 3bp(KxM)-FreqRatio $-0.00717 * 5 = -0.03585$
26. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 5bp(KxM)-FreqRatio $1 * 5 = 5$
27. Translation INCREASES with INCREASING High/Low 7bp(KxM)-FreqRatio $0.736632 * 5 = 3.68316$

**мРНК часто содержат сигналы, контролирующие
эффективность трансляции и цитоплазматическую
стабильность специфическим образом**

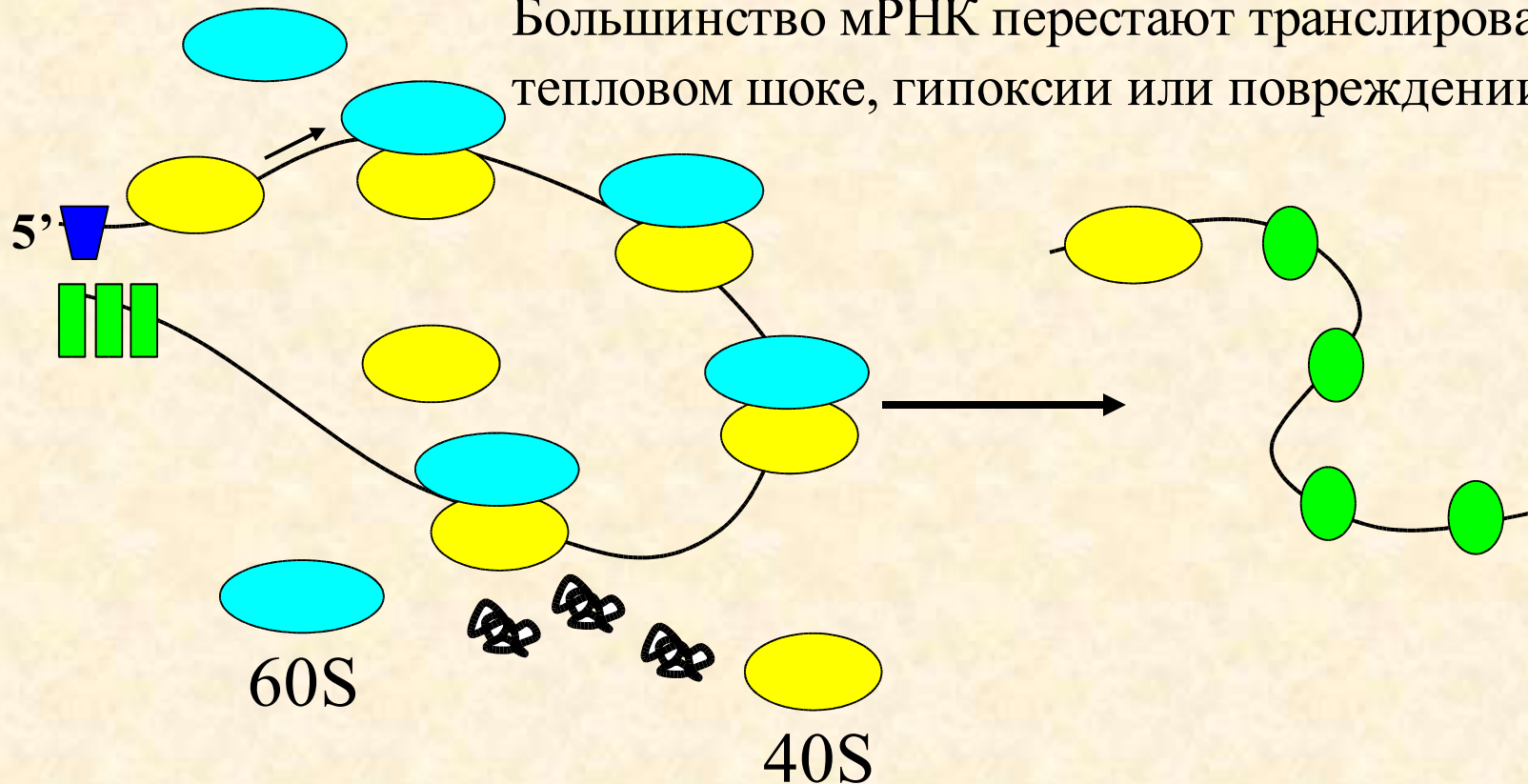


Проблемы:

1. Сигналы могут состоять как из контекстных, так и структурных элементов
2. Большинство сигналов в настоящее время не известны

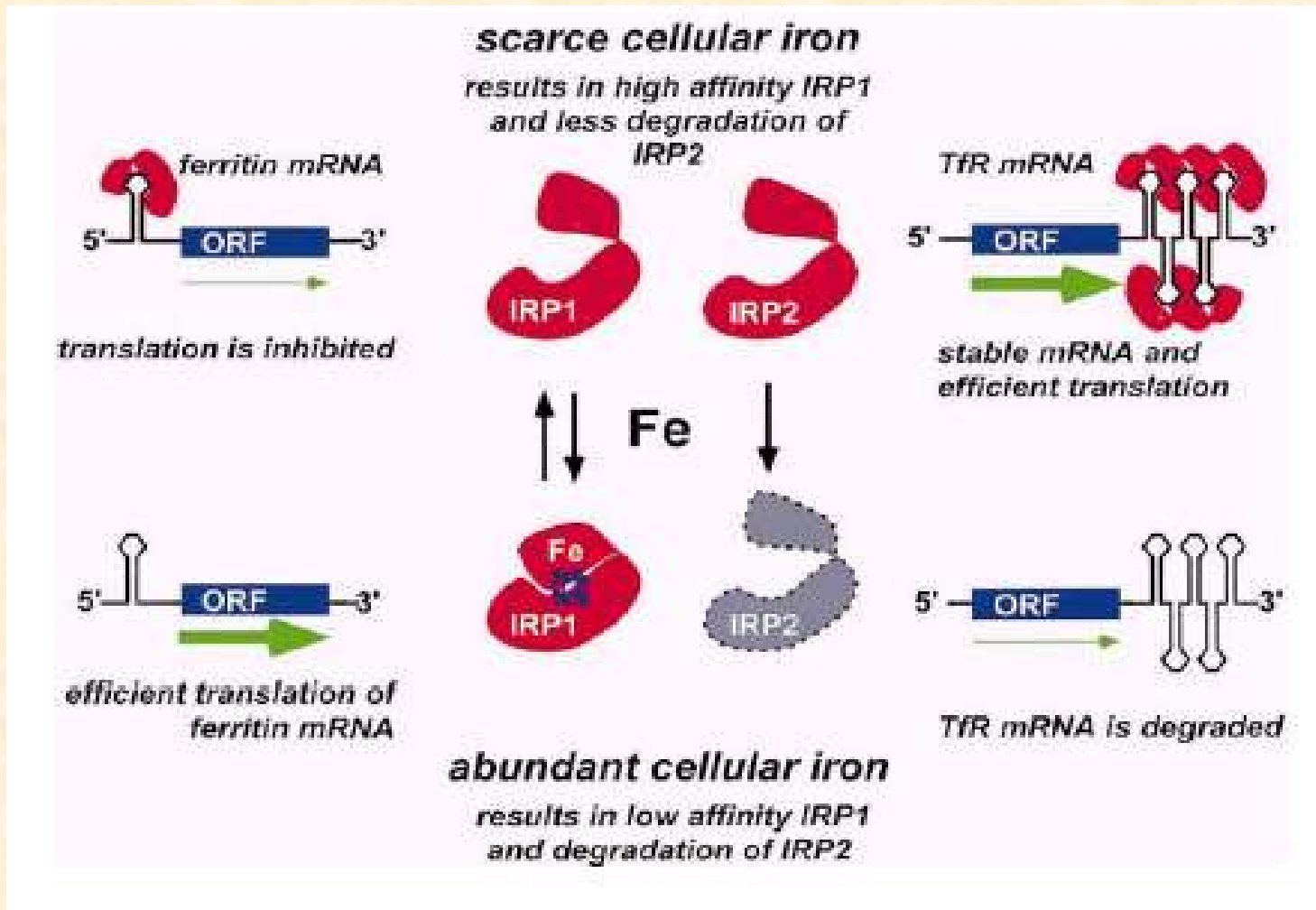
Существуют стресс-, стадие- и ткане-специфические регуляторы трансляции и цитоплазматической стабильности мРНК

Большинство мРНК перестают транслироваться при тепловом шоке, гипоксии или повреждении тканей



Интенсивная трансляция мРНК некоторых генов продолжается и при стрессе

Iron-responsive element (IRE): трансляционный контроль опосредован присутствием в среде железа



БАЗА ДАННЫХ TRSIG: ОРГАНИЗАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ РАЙОНОВ МРНК ЭУКАРИОТ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ТРАНСЛЯЦИЮ

Database on Translational Signals (TRSIG)

Database organization

Overview

Database organization

Search using

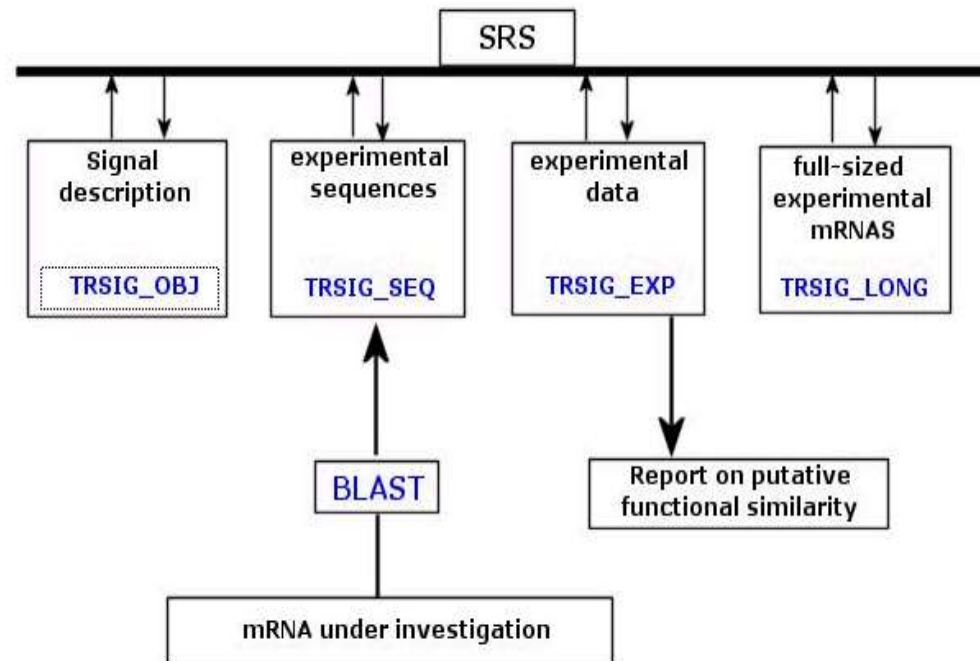
- ▶ [TRSIG_EXP](#)
- ▶ [TRSIG_LONG](#)
- ▶ [TRSIG_OBJ](#)
- ▶ [TRSIG_SEQ](#)
- ▶ [BLAST search TRSIG](#)

More about TRSIG

Members

Reference

Contact Us



Search on the similarity with TRSIG sequence data

В БД TRSIG предусмотрена возможность поиска сигналов посттранскрипционного контроля в мРНК, интересующей пользователя

Database on Translational Signals (TRSIG)

[BLAST search TRSIG](#)

[Overview](#)
[Database organization](#)
Search using
▶ [TRSIG EXP](#)
▶ [TRSIG LONG](#)
▶ [TRSIG OBJ](#)
▶ [TRSIG SEQ](#)
▶ **BLAST search TRSIG**
[More about TRSIG](#)
[Members](#)
[Reference](#)
[Contact Us](#)

Help

Enter sequence in FASTA format

from Screen (cut & paste)...

from File:

TRSIG nucleotide sequences

X dropoff value for gapped alignment (in bits):

Penalty for a nucleotide mismatch (blastn only):

Number of one-line descriptions:

Threshold for extending hits:

Expectation value (E):

Alignment view options:

Filter query sequence:

Cost to open a gap:

Cost to extend a gap:

Internet

BLAST search output

```
Sequences producing significant alignments: (bits) Value
gnl|TRSIG_SEQ|S0010 5'UTR of Rouse Sarcoma Virus 26 5e-04
gnl|TRSIG_SEQ|S0001 5'UTR of tobacco mosaic virus (omega) 26 5e-04
>gnl|TRSIG_SEQ|S0010 5'UTR of Rouse Sarcoma Virus
    Length = 101
    Score = 26.3 bits (13), Expect = 5e-04
    Identities = 13/13 (100%)
    Strand = Plus / Plus

Query: 1 caacaacaacaa 13
      |||
Sbjct: 37 caacaacaacaa 49

>gnl|TRSIG_SEQ|S0001 5'UTR of tobacco mosaic virus (omega)
    Length = 98
    Score = 26.3 bits (13), Expect = 5e-04
    Identities = 13/13 (100%)
    Strand = Plus / Plus

Query: 1 caacaacaacaa 13
      |||
Sbjct: 34 caacaacaacaa 46
```

Пример карточки БД TRSIG, содержащий структурированную информацию о трансляционном энхансере вируса табачной мозаики

Address [http://www.rtc.riken.go.jp/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-newId+-e+\[TRSIG_SEQ-id:'S0085'\]](http://www.rtc.riken.go.jp/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-newId+-e+[TRSIG_SEQ-id:'S0085'])

 [TOP PAGE](#) [QUERY](#) [RESULTS](#) [PROJECTS](#) [VIEWS](#) [DATABANKS](#) [HELP](#)

Names only

This entry is from: [TRSIG SEQ:S0085](#)

[TRSIG SEQ](#)

ID S0085
OBJID [TMV5](#)
SQ gctttattttacaacaattaccaacaacaacaacaacaacaacattaca
attactattacaatt
LONG YES
COMMENT 5'UTR of genomic RNA of TMV (translational enhancer omega)
EXPR [E0058](#)=18.5 [E0059](#)=152
END

SRS 6.1.3 | [feedback](#)