

Краткий комментарий к лекции «Трансляция и транскрипция: эксперимент, компьютерный анализ и моделирование» (Кочетов А.В.).

СЛАЙД 2. Трансляция – один из основных фундаментальных процессов живой клетки. Функцию хранителя генетической информации выполняет ДНК, РНК играет роль посредника между геномом и белок-синтезирующим аппаратом, белки выполняют подавляющее большинство жизненных функций клетки. Трансляция – это процесс перехода генетической информации от мРНК к белку, и в этом качестве изучение ее законов безусловно необходимо для создания сколь-нибудь внятного представления о структуре клетки.

СЛАЙД 3. Основное содержание процесса трансляции заключается в следующем: в структуре мРНК расположена белок-кодирующая область, несущая информацию о структуре белка. Эта информация представляет собой непрерывную последовательность тринуклеотидных сочетаний – кодонов, генетический код – то есть соответствие кодонов аминокислотам – приведено здесь в виде таблицы. Напомню Вам, что триплетных комбинаций из 4 нуклеотидов может быть 64, три из них являются терминаторами, а каждой из 20 аминокислот соответствует от одного до 6 кодонов. В чем заключается это соответствие? Основные элементы трансляционной машины, это рибосома – сложный РНК-белковый комплекс и тРНК – посредники между пулом свободных аминокислот и трансляционным аппаратом. В структуре тРНК выделяют так называемый антикодон – триплет, комплементарный кодону и способный взаимодействовать с ним в силу этой своей комплементарности. Специальные ферменты – аминоацил тРНК-синтетазы – распознают «свои» тРНК, соответствующие каждой аминокислоте, и осуществляют связывание аминокислот и тРНК, в силу чего такие аминоацилированные тРНК несут аминокислоты. В этом, собственно, уже заключается связь между генетическим кодом – представленным антикодоном тРНК, и аминокислотой, с этой тРНК сцепленной.

СЛАЙД 4. Далее, роль рибосомы заключается в обеспечении контакта между кодонами на мРНК и антикодонами тРНК, а также снятии аминокислот с тРНК и линковке их в аминокислотную последовательность. Для этого в структуре рибосомы есть два центра – аминоацильный (А) и пептидилный (Р). тРНК с синтезируемой аминокислотной цепью расположена в Р-центре, в А-центр поступает аминоацилированная тРНК, комплементарная следующему кодону. После этого аминокислотная последовательность отсоединяется от тРНК в Р-центре и переносится на новопришедшую тРНК, удлиняясь при этом на одну аминокислоту. тРНК из А-центра уходит, рибосома сдвигается вдоль мРНК на один кодон, и ситуация повторяется. В результате получается аминокислотная последовательность, соответствующая последовательности кодонов в мРНК и, соответственно, гене, которая укладывается в рабочую конформацию и начинает выполнять свою функцию.

Это – в самых общих чертах – описание сути процесса трансляции.

СЛАЙД 5. Структуры про- и эукариотических мРНК различны.

СЛАЙД 6. Теперь давайте подробнее остановимся на связи между структурой мРНК и процессом трансляции. На рисунке представлены про- и эукариотические мРНК. Как Вам, наверное, известно, зрелая эукариотическая мРНК состоит из трех частей: 5'-нетранслируемого района или лидера, кодирующей части (которая начинается со стартового кодона трансляции и заканчивается кодоном-терминатором), и 3'-нетранслируемого района (иногда называемого трейлером). Соответственно, процесс трансляции также делится на три этапа: инициация, элонгация и терминация. Каждый из районов мРНК выполняет в соответствующем процессе трансляции определенную роль, о чем я вкратце и расскажу.

СЛАЙД 7. Этот процесс весьма существенен, так как в составе мРНК нет специальных кодонов для начала процесса трансляции, эту роль играет метиониновый ATG кодон, а эта комбинация нуклеотидов присутствует и в некодирующих районах, и в кодирующей части в разных рамках считывания. **Поэтому проблема выбора того самого особенного ATG из множества имеющихся, не тривиальна.**

Первое, о чем нужно сказать: инициация трансляции в про- и эукариотах качественно различна, и это различие обеспечивает существенную разницу в структуре их геномов в целом.

Прокариотические мРНК содержат специальный сигнал, с которым взаимодействуют рибосомы в поиске сайта инициации трансляции: так называемый, сайт Шайна-Дальгарно. Это короткая последовательность (5-6 нуклеотидов), похожая на GGAGGA и расположенная на расстоянии 6-10 нуклеотидов выше стартового кодона трансляции белок-кодирующей части. Как ее распознает рибосома? – опять же, используя комплементарные взаимодействия: в составе консервативного 3'-конца 16S рибосомной РНК, входящей в состав 30S субъединицы рибосомы, есть комплементарный участок, который и выполняет роль детектора сигнала. Именно комбинация AUG кодона и сайта Шайна-Дальгарно обозначает для рибосомы начало трансляции. Нужно отметить, что 30S субъединица рибосомы распознает AUG кодон с помощью инициаторной метиониновой тРНК – именно антикодон этой тРНК является детектором.

Вторая характеристика прокариот, несвойственная эукариотам – оперонная структура мРНК, то есть в составе многих мРНК находятся две и более белок-кодирующие последовательности разных белков. Рибосома распознает сайт инициации трансляции в начале матрицы (комбинацию сайта Ш-Д и AUG кодона) и транслирует проксимальную белок-кодирующую последовательность, затем часть рибосом диссоциирует с матрицы, а часть может реиницировать трансляцию на следующей кодирующей последовательности. Альтернативно, в межцистронном промежутке может располагаться независимый сайт инициации трансляции. Тогда рибосомы будут садиться в межцистронном промежутке.

В совокупности, около половины генов *E. coli* входят в состав оперонов. Это дает определенные возможности для контроля экспрессии генов – например, гены одной метаболической цепи транскрибируются с одного промотора, а соотношение белков, считываемых с одной полицистронной мРНК, может определяться структурой межцистронных стыков.

СЛАЙД 8

Что касается эукариотических генов, то там ситуация другая. Во-первых, в эук. мРНК нет никакого аналога сайта Ш.-Д. – соответствующая этому сайту область в эукариотической 18S рибосомной РНК отсутствует. Во-вторых, эукариотические мРНК моноцистронны и содержат только одну белок-кодирующую рамку. В экспериментах показано, что при трансляции модельной полицистронной матрицы в клетках эукариот дистальные цистроны почти не транслируются. Таким образом, структура мРНК про- и эукариот и особенности трансляционных аппаратов этих таксонов отражаются и на структуре генома. Инициация трансляции в клетках эукариот – вопрос – как и большинство описанных – неоднозначный.

СЛАЙД 9

Существенными характеристиками эук. матриц являются специфические модификации – на 5'конце у них расположен так называемый кэп – инвертированный гуанин, а на 3'конце зрелой молекулы мРНК расположен поли(А)-хвост из нескольких сотен нуклеотидов. На этом рисунке представлена структура кэпа – видно, что вместо обычно 3'-5' концевой связи между сахарофосфатным остовом здесь сформирована перевернутая – 5'-5'.

СЛАЙД 10

Механизмы инициации трансляции эукариотических мРНК.

СЛАЙД 11. Линейное сканирование.

Кэп сайт является меткой, по которой рибосомы распознают большинство мРНК в качестве матрицы для трансляции: есть и другие механизмы, открытые в последнее время, но этот является одним из основных. На этом рисунке представлена схема взаимодействия трансляционного аппарата эукариотической клетки и мРНК: считается, что с кэпом связан фактор инициации трансляции 4F, состоящий из трех белков – кэп-связывающего фактора 4E, РНК-геликазы 4A и белка 4G. 40S субъединица рибосомы также несет факторы инициации трансляции и метиониновую тРНК, антикодон которой способен распознать AUG кодон. И малая субъединица рибосомы, и фактор инициации трансляции 4A обладают ограниченной геликазной активностью и способны расплетать вторичную структуру мРНК, которая может формироваться вследствие комплементарных взаимодействий.

СЛАЙД 12.

Считается, что большинство мРНК транслируются по механизму линейного сканирования: ее последняя модификация выглядит примерно так. мРНК представляет собой кольцо – ее 5' и 3' концы сближены за счет белок-белкового взаимодействия между поли(А)-связывающим белком и кэп-связывающим фактором 4F. Полагают, что это способствует рециркуляции рибосом – то есть после терминации трансляции субъединицы рибосом оказываются вблизи 5'конца и – после реактивации – могут снова участвовать в инициации.

Согласно модели линейного сканирования, 40S субъединица рибосомы движется от 5'конца вдоль лидерной последовательности до тех пор, пока не встретит подходящий AUG кодон. «Подходящий» в данном случае означает то, что вероятность его распознавания в качестве сайта инициации трансляции

зависит от контекста – например, у млекопитающих особое значение имеют аденин в –3 положении перед AUG и гуанин в плюс четвертом положении. Если контекст другой, часто 40S субъединиц его не распознают и продолжают сканирование в поиске другого AUG.

СЛАЙД 13.

На следующем рисунке изображен механизм общего контроля трансляции. Под воздействием стресса, гормонов и т.п. срабатывают регуляторные каскады, активирующие белок 4E-BP. Этот белок обладает высокой аффинностью к компоненту фактора инициации трансляции 4F – белку 4E, чья роль заключается в распознавании кэпа. Если этот белок выведен из оборота, трансляция большинства мРНК останавливается. В этой связи следует отметить, что мРНК, содержащие сайт внутренней инициации трансляции не подвержены этому механизму, так как не содержат кэпа и их трансляция не зависит от этого белка.

СЛАЙД 14. Не так давно стало известно, что возможны и другие механизмы инициации трансляции, отличные от линейного сканирования. На этом рисунке приведен механизм внутренней инициации трансляции, открытый у пикорнавирусов – у них мРНК содержит длинный – до 800 нуклеотидов, высокоструктурированный и насыщенный AUG кодонами лидер, поэтому эффективная инициация трансляции с помощью линейного сканирования невозможна. Показано, что 5'НТП таких мРНК формирует сложную структуру, функционально замещающую кэп и обеспечивающую посадку 40S субъединиц рибосомы в непосредственной близости от стартового кодона трансляции. При этом между местом посадки рибосомы и стартом трансляции нет ни стабильных шпилек, ни паразитных AUG кодонов.

СЛАЙД 15. На этом рисунке изображена модель сайта внутренней инициации трансляции одного из пикорнавирусов. Видно, что эта структура очень сложна. Однако, в последнее время найдены другие варианты сайтов внутренней инициации трансляции со значительно менее сложной структурой, так что ни механизмы работы, ни структура этих сайтов до конца не известны.

СЛАЙД 16.

Таким образом, эукариотические мРНК характеризуются сложной структурой, содержащей как неспецифические сигналы и регуляторные элементы (кэп, поли (А)-хвост, вторичная структура, контекст стартового кодона трансляции), так и различные специфические сигналы, взаимодействующие с регуляторными факторами. Большинство сигналов в настоящее время скорее всего не известны.

СЛАЙД 17.

Теперь остановимся на трансгенезе, втором основном тезисе этой лекции. Вам должно быть известно, что трансгенез – это перенос генов из одного организма в другой. У трансгенеза есть ряд важных преимуществ перед классическими методами селекции. В первую очередь, это отсутствие барьеров для трансгенеза – организм-донор и организм-реципиент могут принадлежать к любым таксонам, поскольку генетический код универсален.

СЛАЙД 18.

Каковы могут быть области применения трансгенеза? В первую очередь, это сельское хозяйство. Трансгенез может быть использован для улучшения агробιοлогическιх характеристик, например стрессοустοιчивοсти. Кроме того, эта технология может применяться (и применяется) для улучшения качества фитοпродуктов.

СЛАЙД 20.

Виды генно-инженерных модификаций: перенос белок-кодирующих генов и антисмысловых конструкций – супрессоров.

СЛАЙД 21.

На этом слайде приведен пример генно-инженерной работы, выполненной в нашем институте. В растения табака были перенесены гены, кодирующие секреторные нуклеазы. Эти гены были выделены из млекопитающих и бактерий. Кодирующая часть – в данном случае, гена нуклеазы из *Serratia marcescens* – была перенесена под управление промотора, работающего в клетках растений. Кроме того, в конструкции применен ген устойчивости к антибиотику канамицину, поэтому трансформанты, несущие такую конструкцию, можно отбирать на селективных средах. В дальнейшем такие растения были получены и оказалось, что у них нуклеазная активность значительно выше, чем в контроле. Эксперименты также показали значительно более высокую устойчивость к вирусной инфекции – по-видимому, нуклеаза в межклеточном пространстве способна противодействовать проникновению вируса.

СЛАЙД 22.

Однако, далеко не все генно-инженерные эксперименты оказываются успешными, потому что существует большая разница в видоспецифической организации генов и простой перенос из одного организма в другой часто к экспрессии не приводит. Например: несмотря на универсальность генетического кода, этот код вырожден, то есть одну и ту же аминокислоту могут кодировать несколько синонимических кодонов. Эффективность декодирования этих кодонов зависит от количеств соответствующих тРНК, которые могут различаться у разных организмов. Что будет сказываться на трансляционной активности мРНК трансгена. Таким образом, для оптимизации экспрессии трансгена нужно провести определенную процедуру, которую можно назвать дизайном трансгена. Этот процесс может включать несколько стадий, на которых осуществляется последовательный подбор регуляторных элементов и внесение изменений в нуклеотидную последовательность чужеродного генетического материала. Эти стадии собственно и перечислены на слайде.

СЛАЙД 23.

В заголовок лекции вынесено два ключевых слова – трансляция и трансгенез. Знание параметров трансляции необходимо не только потому, что это – обязательный этап в экспрессии гена, но и потому, что на этом уровне работают многочисленные специфические сигналы, контролирующие паттерн экспрессии гена. Знание этих сигналов необходимо как для подбора эффективных регуляторных элементов при дизайне структуры трансгена, так и для того, чтобы избежать переноса нежелательных регуляторных сигналов.

СЛАЙД 24.

Чем биоинформатика может помочь специалистам в генной инженерии растений? Во-первых, в том, что можно назвать дизайном генетически-модифицированного организма. Я имею в виду технологию генных сетей, позволяющую переносить не отдельные гены, а генные цепи или даже небольшие сети, интегрировать их в регуляторные контуры организма – конечно, на уровне математических моделей, но другого способа просто не существует. Кроме того генные сети позволяют выбирать гены мишени для достижения того или иного фенотипического эффекта: с помощью генно-инженерных подходов можно либо усилить экспрессию, либо ингибировать ее.

СЛАЙД 25.

На этом слайде приведены примеры генной сети развития цветка, разработанной в лаборатории теоретической генетики. С помощью этих закономерностей можно выбирать гены мишени и модифицировать сроки цветения, форму цветка и т.д. Это все показано экспериментально.

СЛАЙД 26.

На этом слайде приведен другой пример использования методов биоинформатики для решения генно-инженерных задач: в лаборатории теоретической генетики была разработана база данных, содержащая информацию о промоторах и транскрипционных сигналах генов эукариот. Эта БД позволяет подбирать нуклеотидные последовательности, обеспечивающие требуемый паттерн транскрипции трансгена. Помимо других возможных областей применения, разумеется.

СЛАЙД 27.

Каким образом генные инженеры пытаются избежать проблем, связанных с потенциальным присутствием в ДНК трансгена сигналов, неадекватно работающих в клетках организма-реципиента? Самый просто и широко применяемый способ – использование только той части чужеродного гена, которая кодирует белок. Все остальные части берутся из генов организма-реципиента, для подбора можно использовать те ресурсы, которые я упоминал – БД TRRD, например. Однако и это не дает гарантии эффективной экспрессии: белок-кодирующая часть может нести комбинации нуклеотидов, воспринимаемые аппаратом экспрессии организма-реципиента как сигналы сплайсинга, полиаденилирования и т.д.

СЛАЙД 28.

Вы, наверное, знакомы с концепцией «лимитирующего звена», она же модель «бутылочного горлышка». Суть ее в следующем: если процесс состоит из нескольких последовательных этапов, то конечная эффективность определяется скоростью прохождения минимально эффективной стадии.

СЛАЙД 29.

Это в полной мере относится и к процессу экспрессии гена. Транскрипция, процессинг пре-мРНК, трансляция, а также не показанные здесь моменты цитоплазматической стабильности мРНК и белка заканчиваются наработкой

функционально активного белка, это – итоговый результат процесса экспрессии гена. Низкая эффективность одной из стадий в такой системе не может быть компенсирована за счет гиперактивности на другой стадии, так как получается то самое «бутылочное горлышко».

СЛАЙД 29.

Поэтому оптимизация процесса трансляции абсолютно необходима – это равноправный компонент общей схемы, от которого зависит конечный результат.

СЛАЙД 30.

Проблема, как это обычно бывает в биологии, достаточно сложна. В слове «трансляция» заключено несколько подпроцессов – инициация, элонгация, терминация, каждый из которых в свою очередь состоит из нескольких стадий.

Известно, что эукариотические мРНК различаются по интенсивности трансляции – так, если внести в систему трансляции *in vitro* две мРНК, то скорость наработки белка может различаться во много раз. Почему так происходит? – эффективность трансляции зависит от характеристик матрицы. Каждый из многочисленных этапов трансляции происходит с определенной скоростью – например, взаимодействие фактора 4F и кэпа, связывание с малой субъединицей рибосомы, движение рибосомы по лидерной последовательности, распознавание AUG кодона – это процессы, скорость которых зависит от нуклеотидной последовательности и ее характеристик. Аналогичным образом варьирует скорость элонгации и терминации трансляции.

Тот факт, что далеко не все такие характеристики известны, не позволяет предсказывать трансляционную активность мРНК с абсолютной точностью, хотя некоторые такие подходы уже разработаны. В принципе, знание всех констант скоростей реакций и концентраций компонентов трансляционного процесса может позволить осуществить полное предсказание параметров трансляции, хотя решение такой задачи вряд ли достижимо. По-видимому, значительно более эффективным является учет лимитирующих параметров и построение системы для предсказания трансляционной активности на их основе.

СЛАЙД 31.

Эмпирически была получена некоторая информация об особенностях нуклеотидной последовательности, влияющих на эффективность трансляции эукариотических мРНК. Однако эта информация недостаточна для предсказания трансляционной активности.

СЛАЙДЫ 32-33.

В качестве примера использования методов биоинформатики для решения задач геной инженерии, связанных с оптимизацией экспрессии на стадии трансляции, я приведу компьютерную систему *Leader_RNA*, предназначенную для оценки трансляционной активности 5'-НТП. Система основана на той же самой концепции лимитирующего звена: мы предположили, что если конечный продукт экспрессии – белок – нарабатывается интенсивно, то все стадии экспресс (включая трансляцию) происходят с высокой скоростью и нуклеотидные последовательности оптимизированы.

На слайдах приведен интерфейс программы *Leader_RNA*, разработанной в

лаборатории теоретической генетики ИЦиГ для предсказания трансляционной активности эукариотических мРНК по структуре их 5'-нетранслируемого района. Система создана на основе принципов «лимитирующего звена» и «усредненного распознавания» - оценка трансляционной активности осуществляется с использованием контекстных характеристик мРНК, достоверно различных у высоко- и низкоэкспрессирующихся генов. Нормированные параметры суммируются что дает некую усредненную оценку трансляционной активности (слайд 33). Эта система позволяет с приличной точностью оценивать принадлежность мРНК к высоко- или низкоактивным, хотя метод «усредненного распознавания» не очень хорош для предсказания активности индивидуальной мРНК и скорее предназначен для сравнения групп.

СЛАЙД 34.

Другая задача молекулярной генетики посттранскрипционного контроля экспрессии, которая может решаться с помощью методов биоинформатики, это поиск специфических сигналов экспрессии, контролируемых отдельные гены.

СЛАЙД 35.

На рисунке изображен один из примеров такого рода контроля – контроля трансляционной активности мРНК в условиях стрессов при помощи до сих пор не описанных стресс-специфических трансляционных энхансеров.

СЛАЙД 36.

Другой пример такого рода - механизм контроля экспрессии нескольких генов, регулируемых поступлением железа. Сенсорная молекула - Iron Responsive Protein – изменяет конформацию в зависимости от наличия в клетке железа. В мРНК генов, контролируемых этим фактором, есть специальный сайт связывания, размещенный в непосредственной близости от кэпа. Если IRP активен, он связывается с этим сигналом и ингибирует связывание фактора инициации трансляции 4F и кэпа. После этого мРНК выводится из трансляционного процесса, так как рибосомы перестают считать ее матрицей. Если железо появляется, IRP диссоциирует и трансляция возобновляется.

СЛАЙДЫ 37-40.

В лаборатории теоретической генетики ИЦиГ создана БД трансляционных сигналов (TRSIG), в которой содержится информация о различных сигналах, локализованных в мРНК и регулирующих трансляционную активность или цитоплазматическую стабильность матрицы. БД создана на основе SRS и состоит из 4 связанных баз данных – объектов (описание сигнала), экспериментов (описание эксперимента), экспериментальных последовательностей и полноразмерных экспериментальных последовательностей (последнее важно для изучения мРНК, так как эти молекулы формируют сложные вторичные структуры). TRSIG снабжена модулем, позволяющим проводить поиск гомологичных участков между БД экспериментальных последовательностей и мРНК, интересующей пользователя. Это позволяет генерировать проверяемые гипотезы о наличии в матрице потенциальных трансляционных сигналов.

