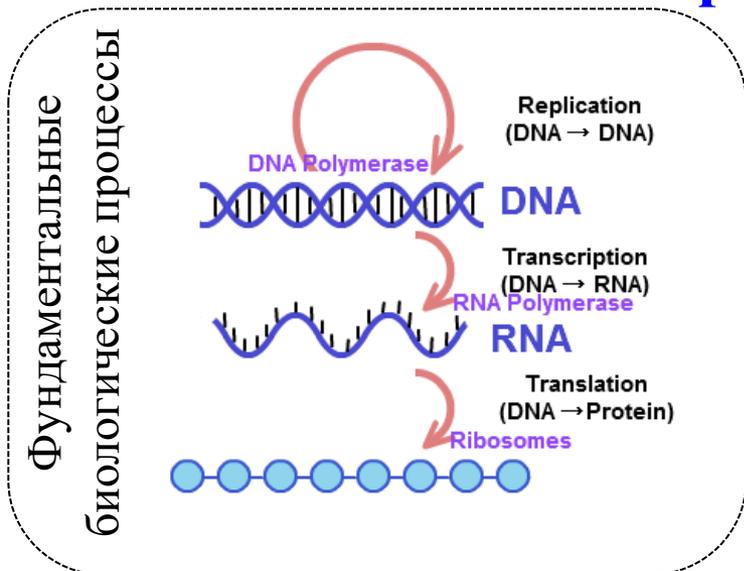
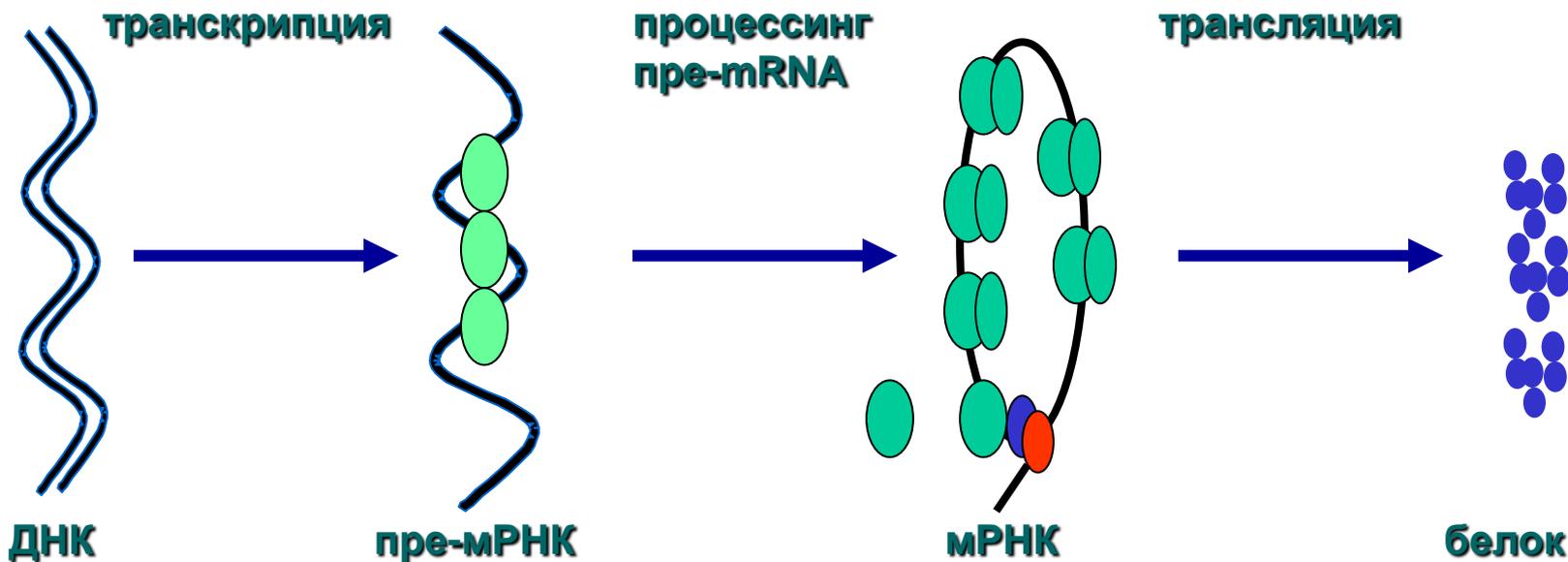


Трансляция – один из фундаментальных биологических процессов



Трансляция – это процесс перехода генетической информации от мРНК к белку = процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК, осуществляемый рибосомой.

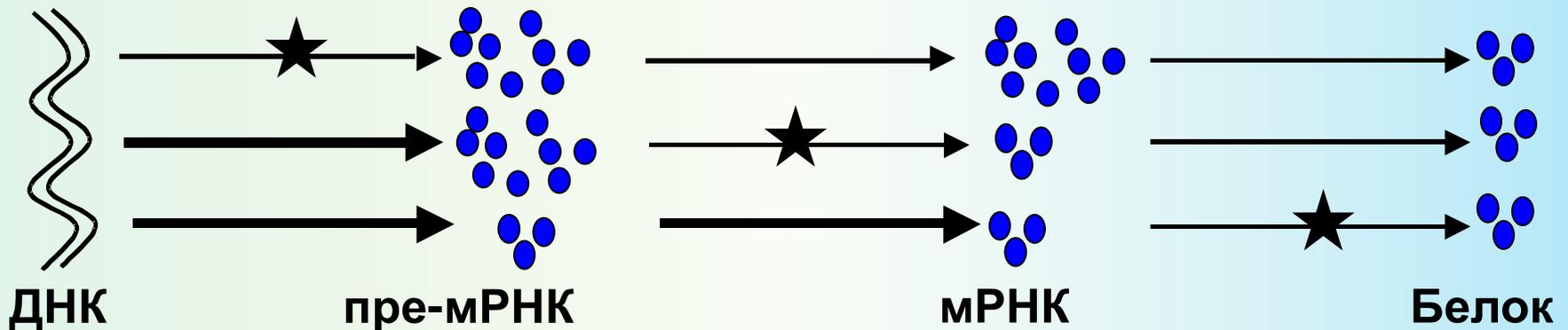


Концепция «лимитирующего звена» в приложении к процессу экспрессии

Высокий уровень экспрессии: высокоэффективны все стадии



Низкий уровень экспрессии (★ - низкоэффективные стадии)



Основные участники процесса трансляции

Информация

1. мРНК

2. Рибосома – сложный РНК-белковый комплекс

3. Транспортные РНК (тРНК) – посредники между пулом свободных аминокислот и трансляционным аппаратом

4. Аминоацил тРНК-синтетазы – распознают «свои» тРНК, соответствующие каждой аминокислоте, и осуществляют связывание аминокислот и тРНК,

5. Регуляторные белки – факторы инициации, элонгации, терминации и др.

Аппарат, считывающий
информацию



Генетический код – соответствие кодонов и аминокислот

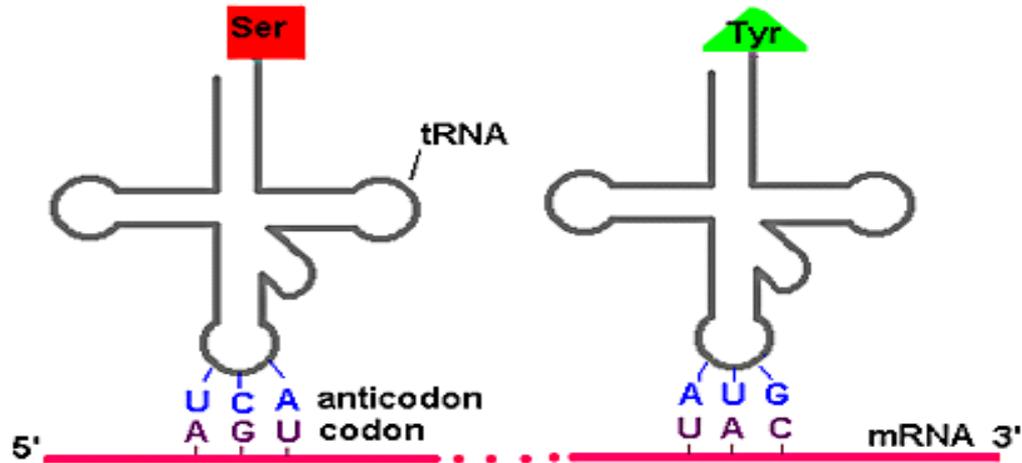
Кодон – тринуклеотид на мРНК. Кодон может соответствовать аминокислоте либо стоп-кодону

		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
	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

- Число тринуклеотидных комбинаций из 4 нуклеотидов = равно 64 (4^3)
- Три кодона являются нонсенс-кодонами и выполняют функцию терминаторов трансляции
- Каждой из 20 аминокислот соответствует от одного до шести кодонов.
- Кодоны, кодирующие одну аминокислоту, называются синонимическими

Транспортные РНК (тРНК)

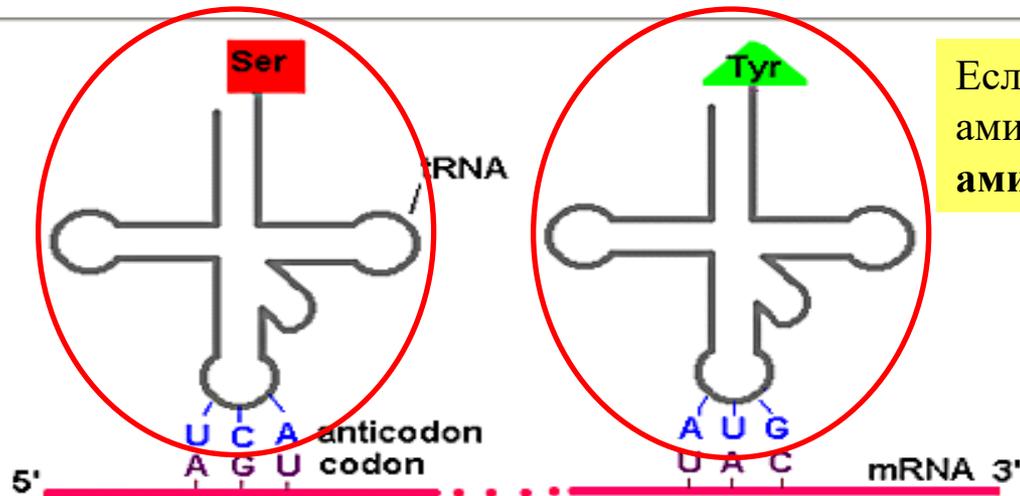
распознают кодоны в белок-кодирующих последовательностях мРНК с помощью комплементарных взаимодействий, в которых участвуют антикодоны.



Кодон – тринуклеотид на матричной РНК, соответствующий либо аминокислоте либо стоп-кодону

Транспортные РНК (тРНК)

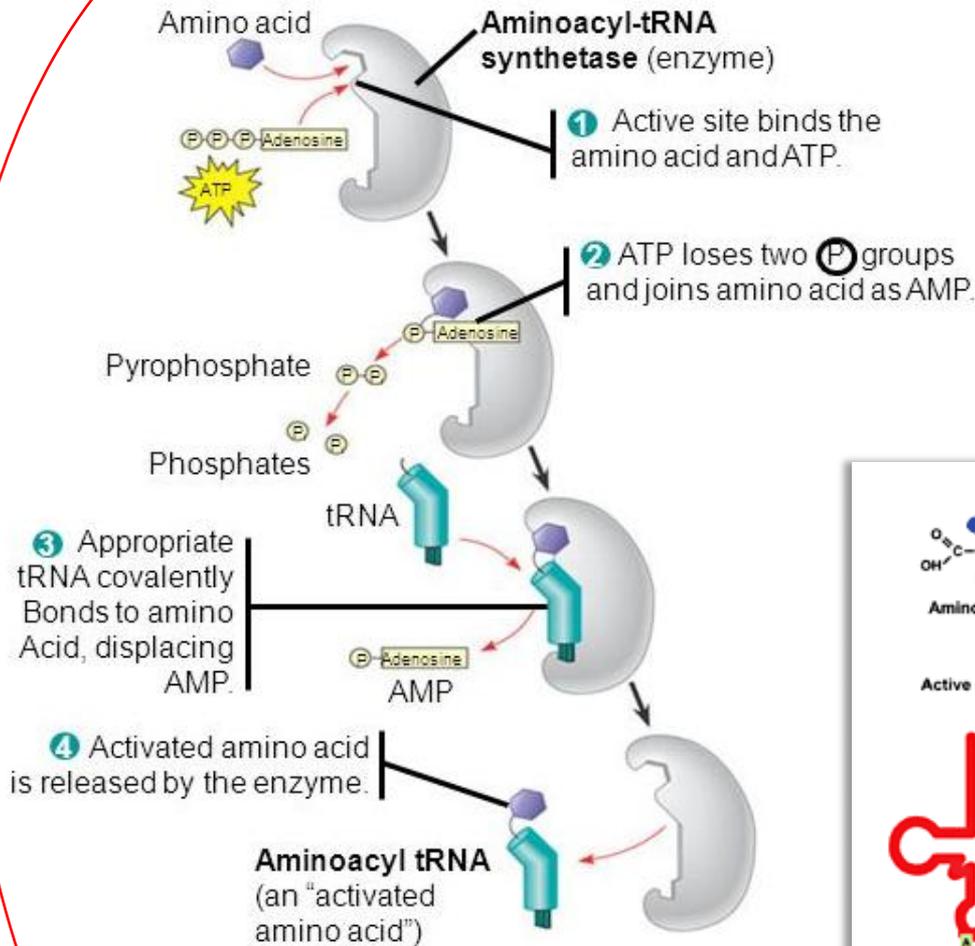
распознают кодоны в белок-кодирующих последовательностях мРНК с помощью комплементарных взаимодействий, в которых участвуют антикодоны.



Если тРНК загружена аминокислотой, ее называют **аминоацил-тРНК**.

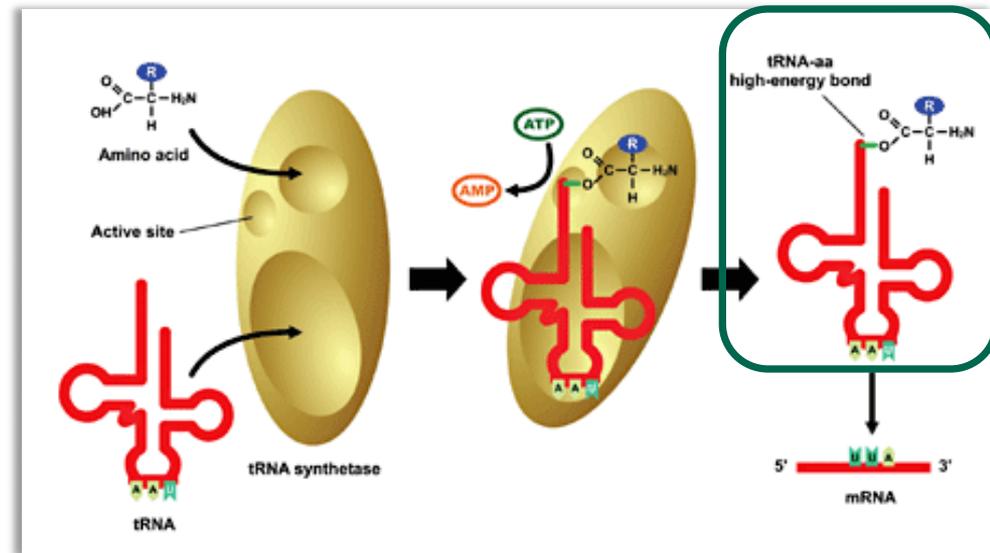
Кодон – тринуклеотид на матричной РНК, соответствующий либо аминокислоте либо стоп-кодону

Функция фермента аминоксил-тРНК-синтетазы:



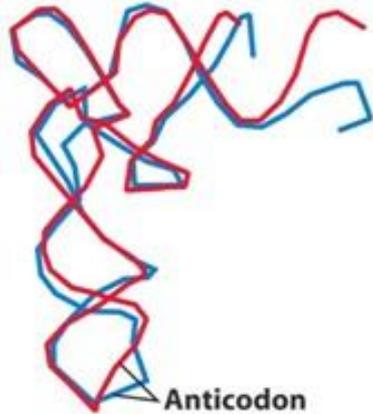
Аминоацил-тРНК

= Аминокислота прикреплена сложноэфирной связью своей карбоксильной группы к 2' или 3'-гидроксильной группе рибозы 3'-концевого нуклеотида тРНК (это всегда аденин)



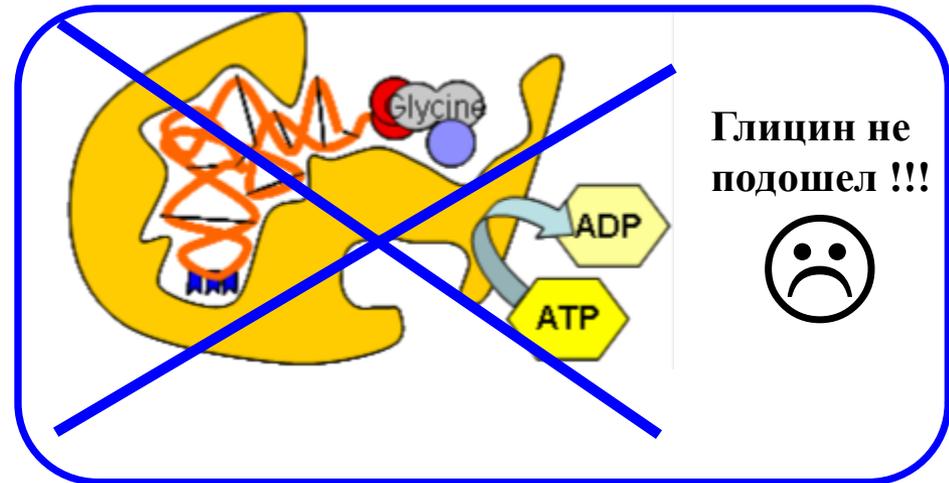
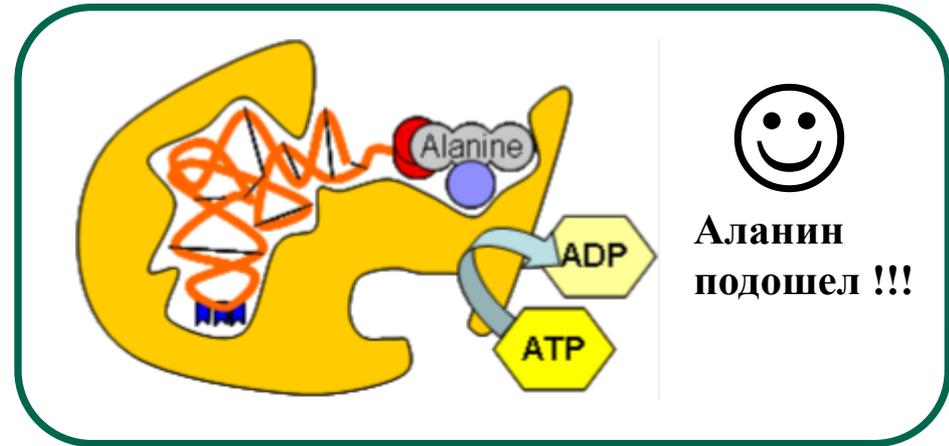
Аминоацил тРНК-синтетазы – распознают «свои» тРНК, соответствующие каждой аминокислоте, и осуществляют связывание аминокислот и тРНК, в силу чего такие аминокислотированные тРНК несут аминокислоты. В этом заключается связь между генетическим кодом – представленным антикодоном тРНК и аминокислотой, с этой тРНК сцепленной

Аминоацил-тРНК-синтетаза: специфичность



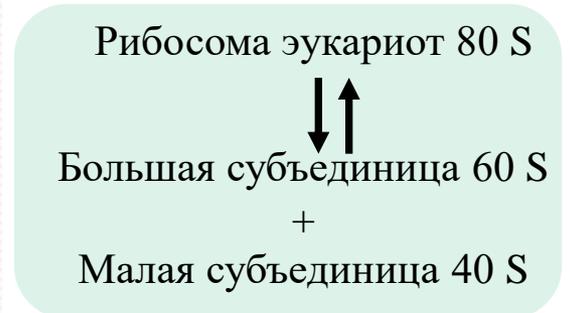
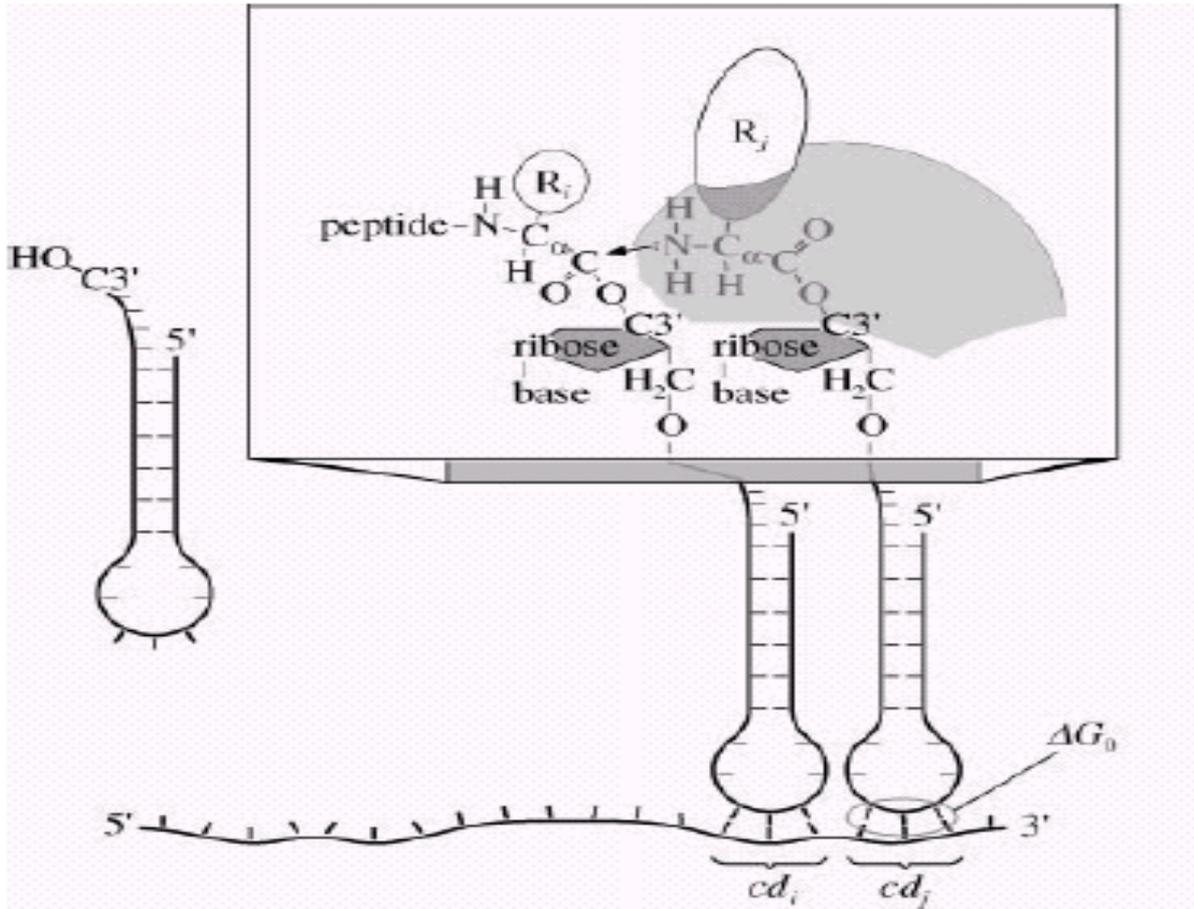
Каждая тРНК имеет уникальную третичную структуру.

Фермент **аминоацил-тРНК-синтетаза** распознает определенную тРНК и специфичен к «своей» аминокислоте. Всего насчитывается (по крайней мере) 20 **аминоацил-тРНК-синтетаз** (по числу аминокислот). Каждый фермент распознает одну аминокислоту и все тРНК, к которым эта аминокислота может быть присоединена.



Рибосомы

Функция - обеспечение правильного контакта между кодонами на мРНК и антикодонами соответствующих тРНК, а также собственно в синтезе белка из аминокислот



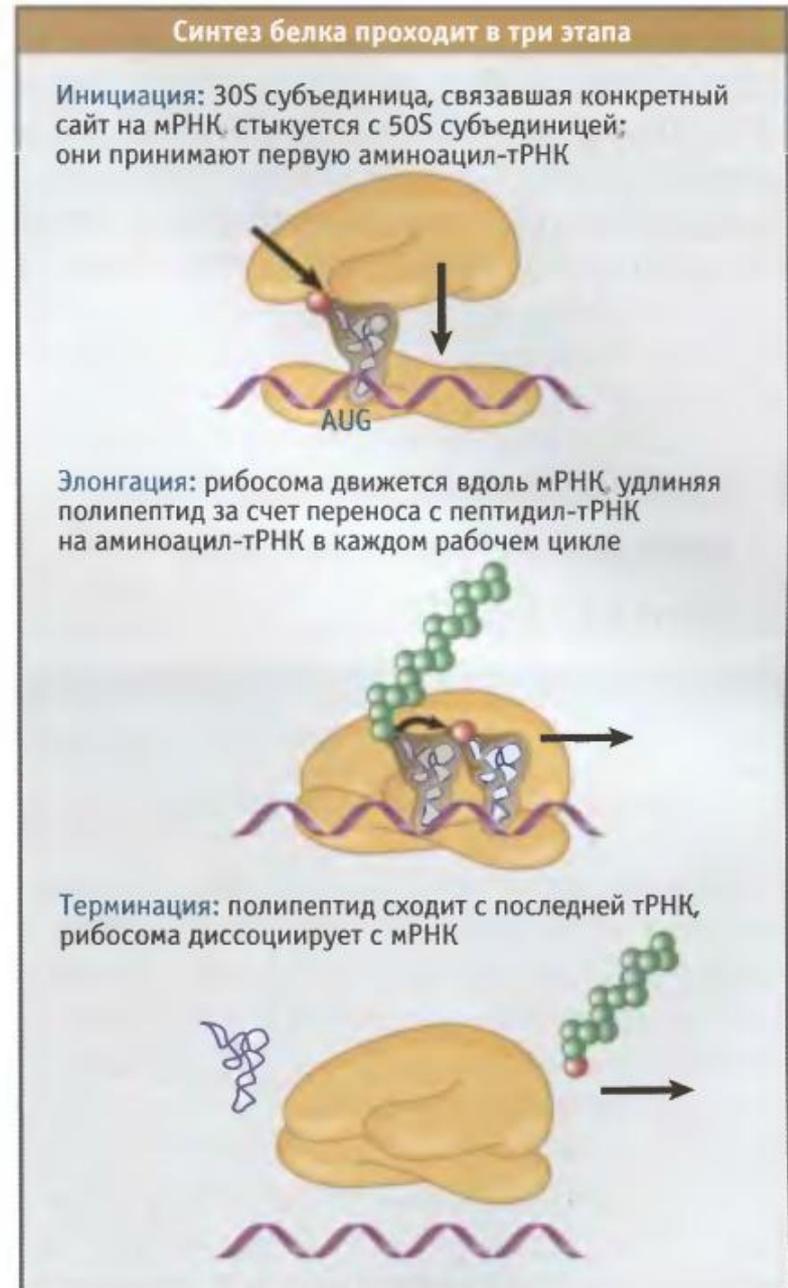
Синтез белка проходит в три этапа: схематическое представление (прокариоты)

Инициация – система реакций, ведущих к образованию пептидной связи между первыми двумя аминокислотными остатками нового полипептида

Элонгация – все, что происходит с растущим пептидом за время образования всех пептидных связей. На каждом шаге элонгации рибосома, совершая один цикл, добавляет к растущему пептиду одно новое звено

Терминация – все реакции, направленные на освобождение синтезированного пептида и освобождению рибосомы с мРНК

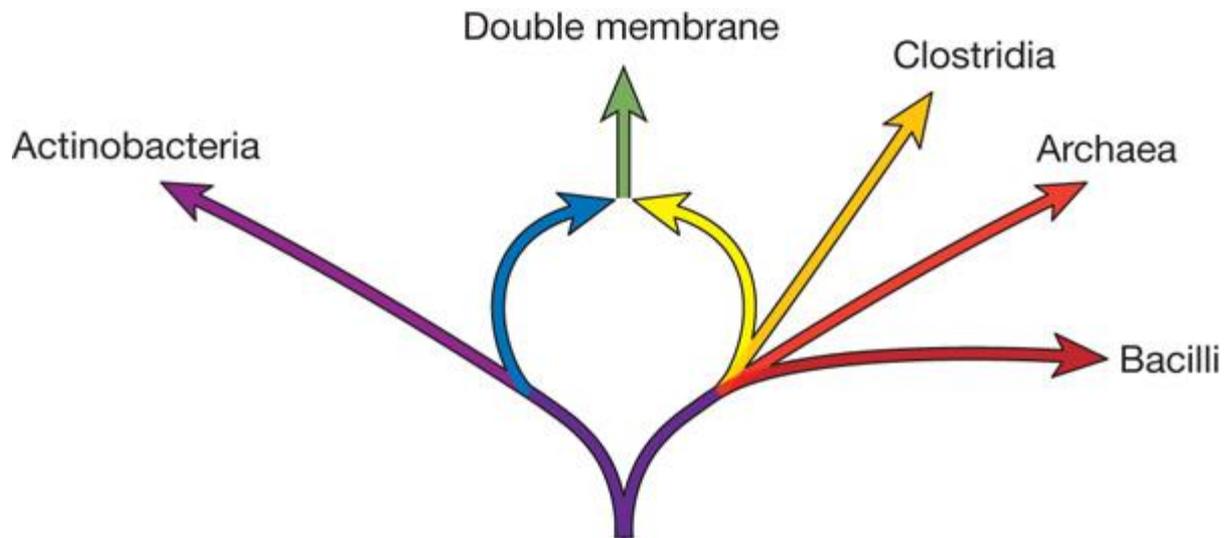
Льюин Б. Гены, 2012 г. С.163



Структуры мРНК и процесс трансляции у прокариот и эукариот имеют свои отличительные особенности.

Функционально наиболее сильно отличается процесс **инициации трансляции**

Прокариоты

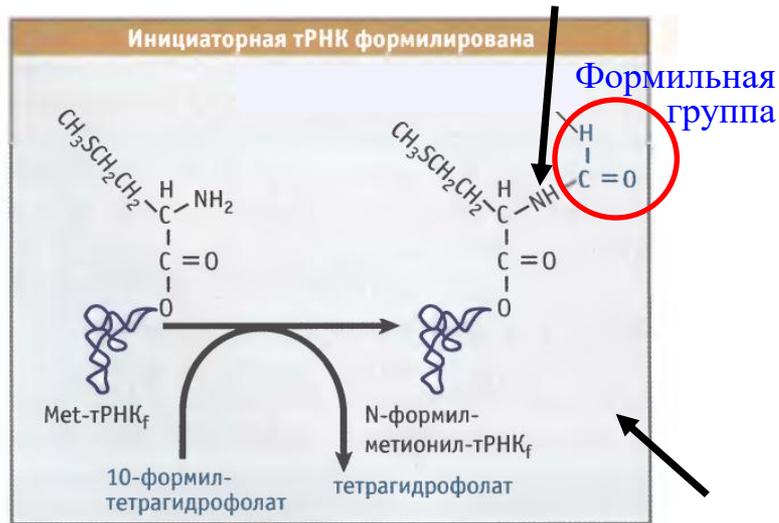


Прокариоты: особая инициаторная тРНК (fMet-тРНК)

закладывает первое звено полипептида

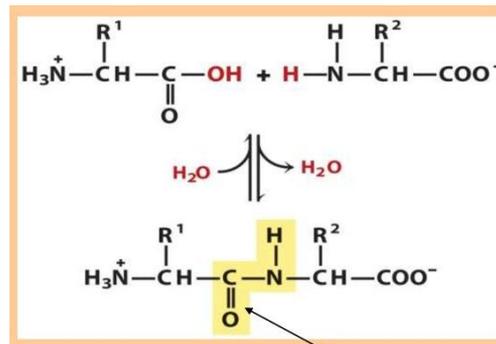
Синтез всех белков начинается с одной и той же аминокислоты – метионина. Сигналом к началу синтеза полипептидной цепи служит иницирующий кодон **AUG**, обозначающий начало открытой рамки считывания. У бактерий, помимо **AUG**, используются также триплеты **GUG** и **UUG**

Блокированная аминогруппа



На стадии инициации трансляции и на стадии элонгации трансляции участвуют разные метиониновые тРНК.

У бактерий, а также в органеллах эукариот метионин инициаторной тРНК имеет формилированную аминогруппу. Этот комплекс обозначается как **fMet-тРНК**

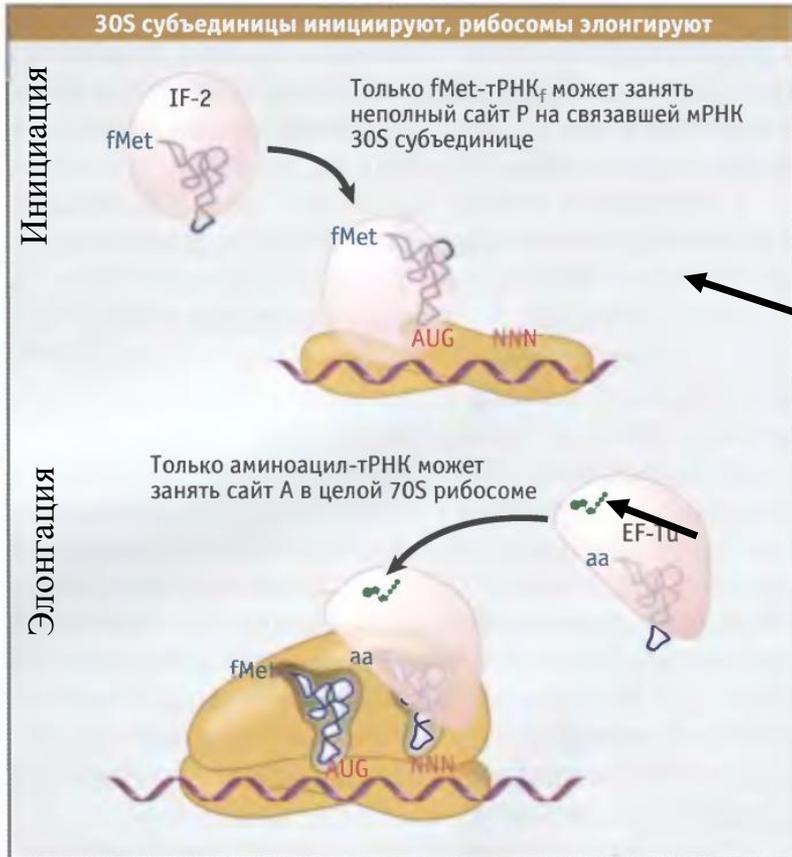


Как у прокариот, так и у эукариот:

пептидная связь – ковалентная связь, которая образуется между азотом аминогруппы одной аминокислоты и углеродом карбоксильной группы другой аминокислоты.

Прокариоты: факторы инициации

У бактерий есть три фактора инициации: **IF-1**, **IF-2**, **IF-3**. Без этих факторов ни мРНК, ни тРНК, не могут вступить в комплекс инициации.

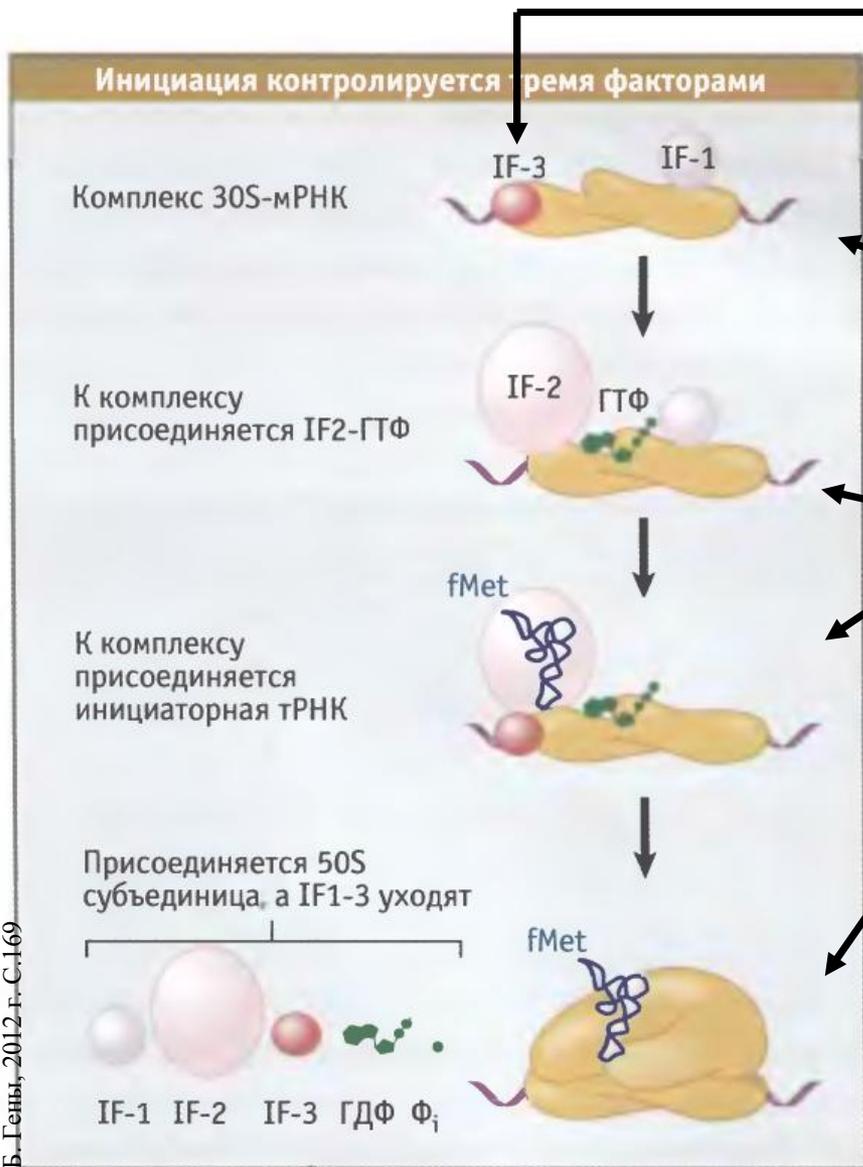


IF-2 связывает инициаторную fMet-тРНК и позволяет ей занять неполный сайт Р на малой субъединице рибосомы.

Напротив, в ходе элонгации

EF-Tu, который помещает аминоксил-тРНК в сайт А, совсем не умеет связывать fMet-тРНК, что исключает ее использование.

Прокариоты: роль факторов инициации (IF-1, IF-2, IF-3)



IF-3 связывается с поверхностью 30S субъединицы неподалеку от сайта А. Он необходим для связывания 30S субъединицы с мРНК и противодействует ассоциации 30S и 50S субъединиц рибосом.

IF-1 связывается с 30S субъединицами в уже сформированном комплексе 30S-мРНК. IF-1 связывается с сайтом А, не позволяя аминокил-тРНК занять этот сайт.

IF-2 приносит особую инициаторную тРНК (fMet-тРНК) и контролирует ее вхождение в рибосому.

IF-2 обладает ГТФазной активностью (но только в комплексе с рибосомой).

ГТФ гидролизуется в тот момент, когда 50S субъединица присоединяется к комплексу инициации с образованием полной рибосомы, что приводит к изменению конформации субъединиц, способствуя их превращению в активную рибосому.

После того, как к комплексу присоединяется 50S субъединица, все факторы инициации уходят, а ГТФ расщепляется.

Особенности трансляции у прокариот: сайт Шайна-Дальгарно (SD) в комбинации с AUG кодоном определяют старт трансляции

- Прокариотическая полицистронная мРНК

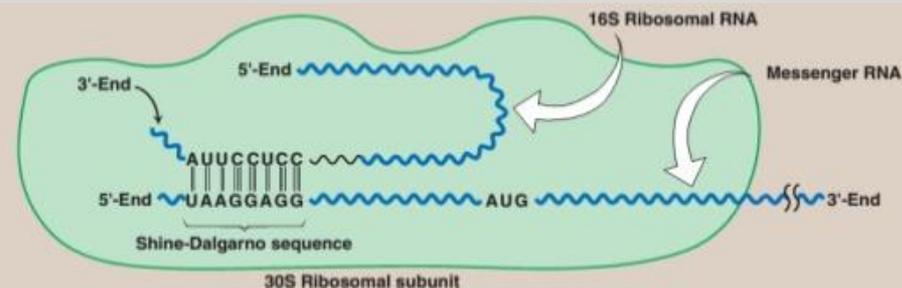
- Ш-Д ORF1 ORF2 ORF3



- **GGAGGA(N)₈₋₁₂AUG**

- сайт Шайна-Дальгарно (Ш-Д) в комбинации с AUG кодоном определяют старт трансляции, возможна реинициация

У прокариот в составе нуклеотидной последовательности консервативного 3'-конца 16S рибосомной РНК, входящей в состав 30S субъединицы рибосомы, есть комплементарный участок, который и выполняет роль детектора сигнала Шайна-Дальгарно. Именно комбинация AUG кодона и сайта Шайна-Дальгарно обозначает для прокариотической рибосомы начало трансляции. Старт трансляции распознается комплексом 30S субъединицы рибосомы и метиониновой тРНК, антикодон которой является в данном случае детектором кодона AUG.

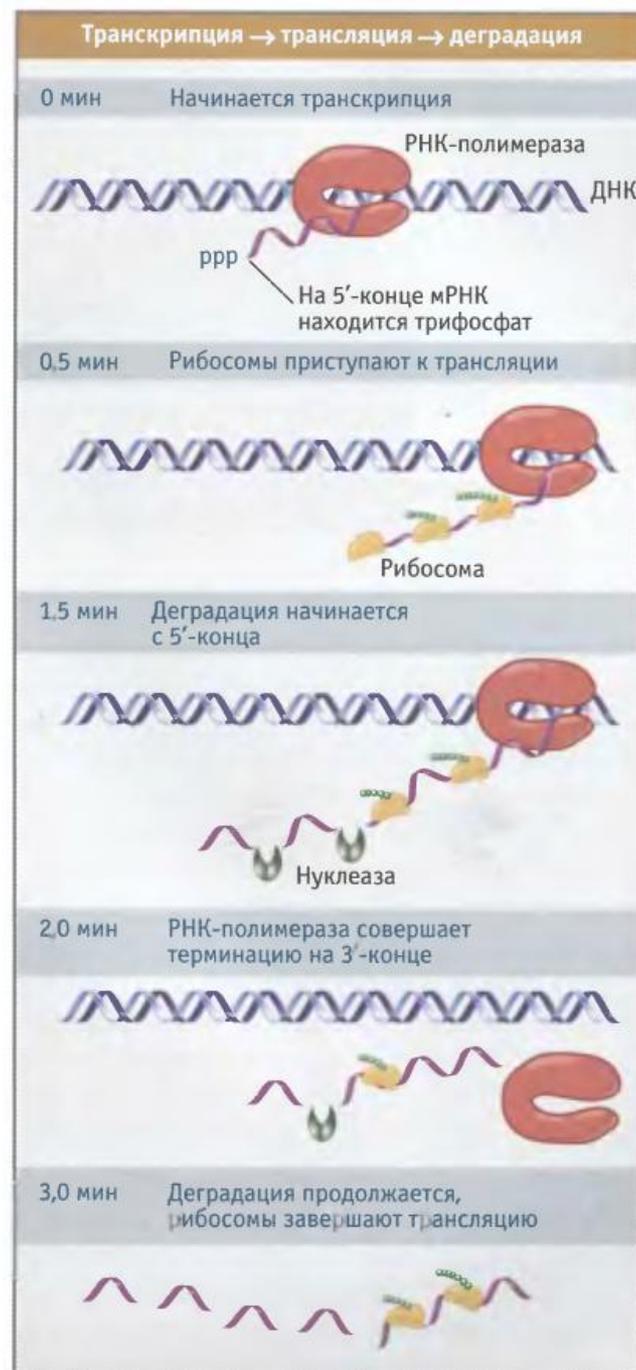
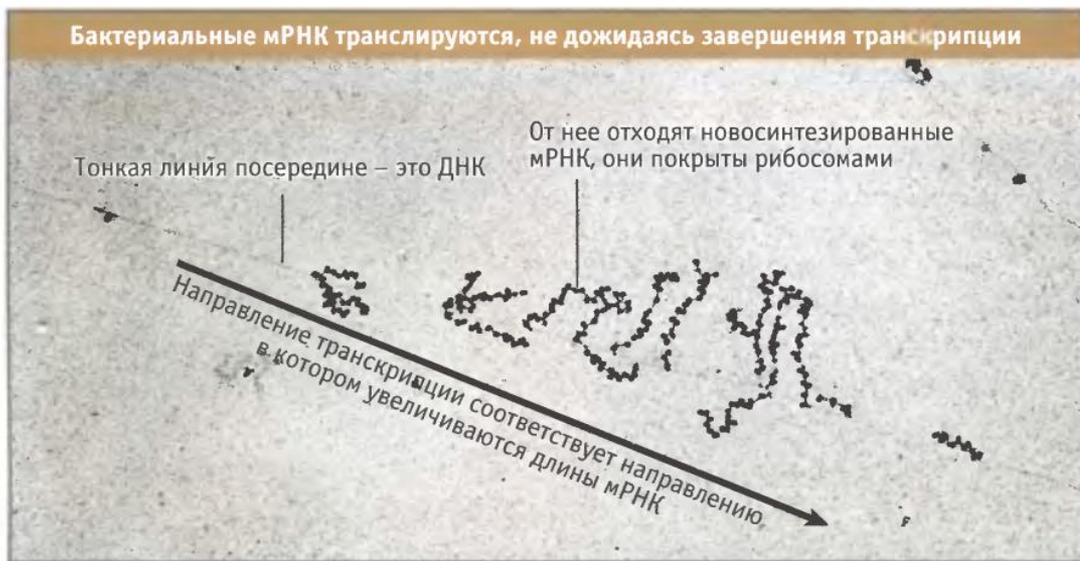


У эукариот нет сайта Ш-Д. У эукариот 40S субъединица рибосомы связывается с 5'-кэпированным концом мРНК, который находится в комплексе с eIF-4 и начинает передвигаться вдоль мРНК до тех пор, пока не встретит AUG кодон.

Особенности трансляции у прокариот: транскрипция и трансляция сопряжены

Как только появляется мРНК, рибосома прикрепляется к 5'-концу и начинает трансляцию еще до того, как заканчивается синтез оставшейся части РНК. Рибосомы продолжают транслировать мРНК, пока она сохраняет свою целостность.

Дегградация мРНК начинается сразу же после трансляции и, скорее всего, начинается в течение минуты после начала транскрипции. 5-конец мРНК начинает дегградировать еще до того, как 3-конец был синтезирован, либо транслирован. Скорость дегградации примерно в два раза ниже скорости транскрипции или трансляции



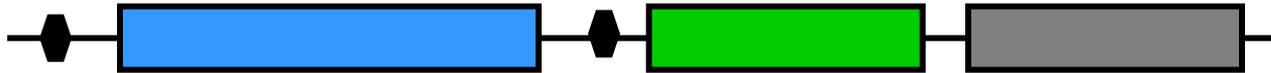
Единицы транскрипции у бактерий можно увидеть

Льюин Б. Гены, 2012 г. С.143-144.

Особенности трансляции у прокариот: оперонная структура мРНК

- Прокариотическая полицистронная мРНК

- Ш-Д ORF1 Ш-Д ORF2 ORF3



- в составе многих мРНК находятся две и более открытые рамки считывания, кодирующие аминокислотные 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 некоторая часть может реиницировать трансляцию на следующей кодирующей последовательности.

Альтернативно, в межцистронном промежутке может располагаться независимый сайт инициации трансляции – то есть выше стартового кодона AUG второй белок-кодирующей последовательности расположен сайт Шайна-Дальгарно. Тогда часть рибосом будут садиться во внутреннем участке (межцистронном промежутке) и транслировать второй кодирующий участок.

мРНК, в составе которых содержатся несколько белок-кодирующих последовательностей, называются **полицистронной**.

Элемент генома, в составе которого несколько белок-кодирующих последовательностей расположены под транскрипционным контролем одного промотора, называется **опероном**.

Особенности процесса трансляции у прокариот

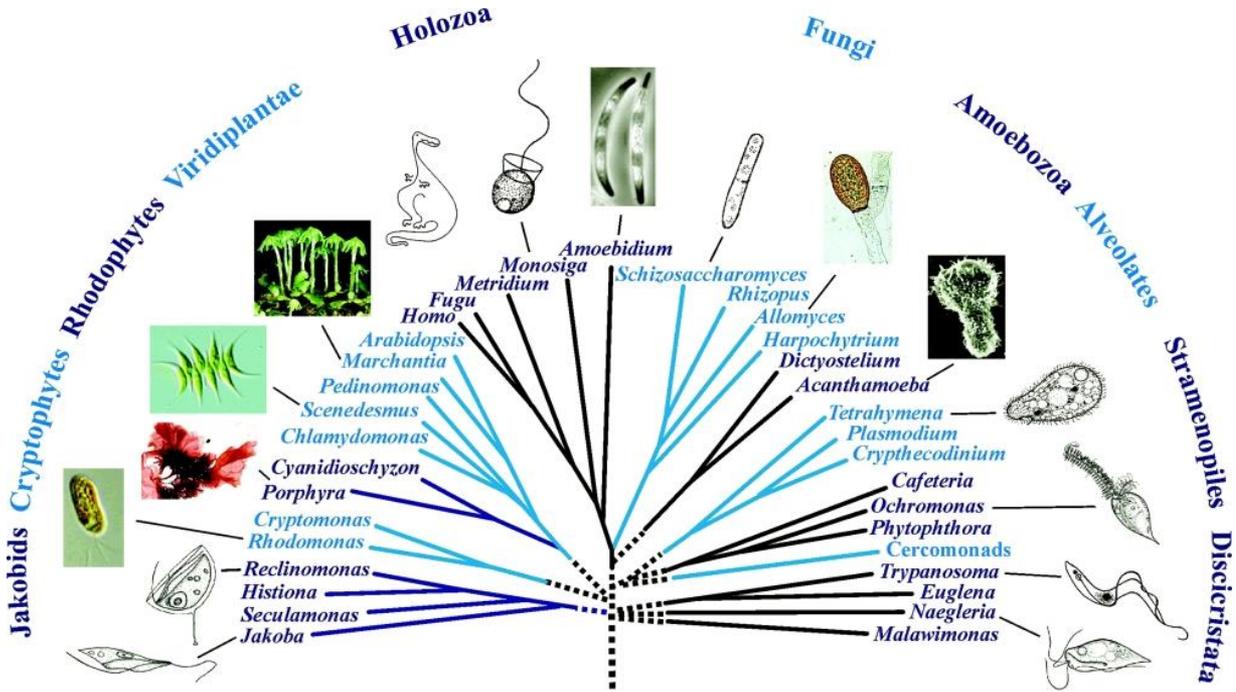
1. Особая инициаторная тРНК (fMet-тРНК) закладывает первое звено полипептида
2. Участие факторов инициации (IF-1, IF-2, IF-3)
3. Сайт Шайна-Дальгарно (SD) в комбинации с AUG кодоном определяют старт трансляции
4. Транскрипция и трансляция сопряжены
5. мРНК имеет оперонную структуру

Повторение

Структуры мРНК и процесс трансляции у прокариот и эукариот имеют свои отличительные особенности.

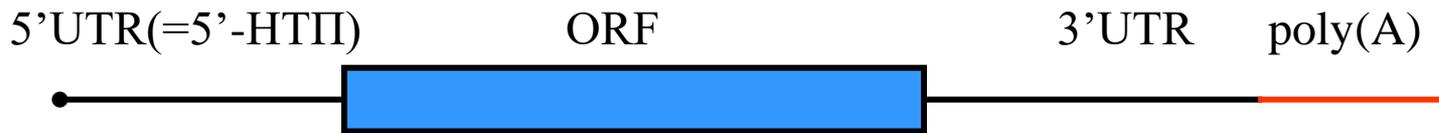
Функционально наиболее сильно отличается процесс **инициации трансляции**

Эукариоты



Особенности трансляции у эукариот

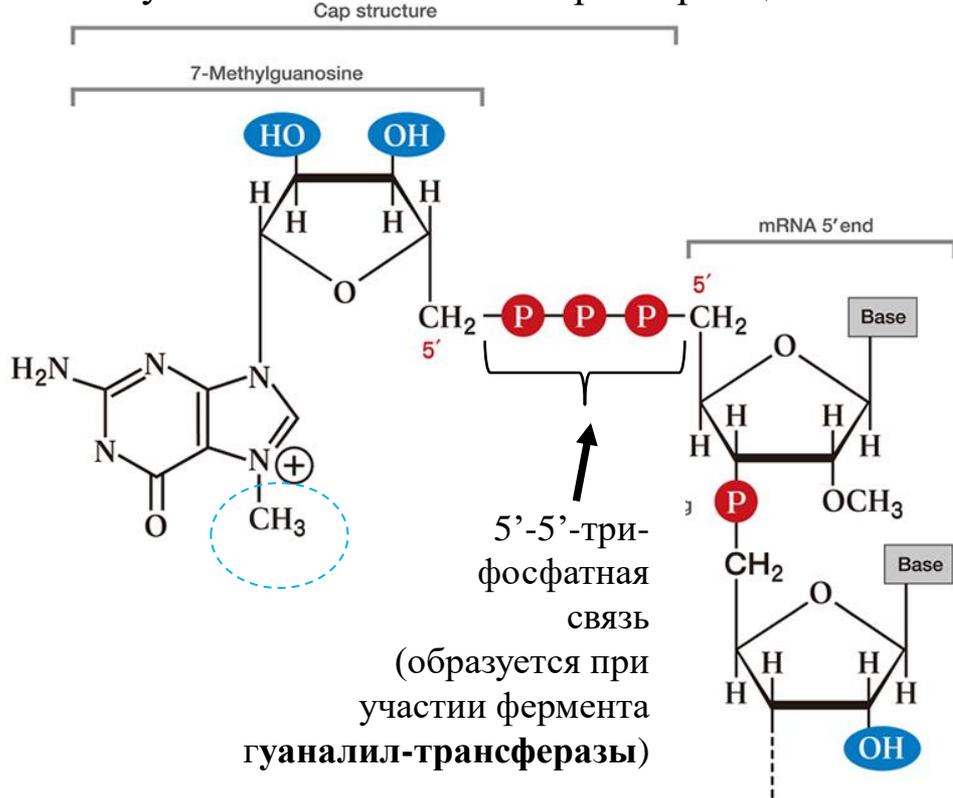
- Эукариотическая моноцистронная мРНК



- cap AUG UGA poly(A)
- Транскрипция и трансляция разобщены (ядро – цитоплазма)
- мРНК имеет 5'-кэп
- мРНК имеет поли-А тракт (100-200 оснований поли(А) на 3'-конце)
- Число вспомогательных факторов больше
- Другой способ стыковки малой субъединицы рибосомы с сайтом связывания в мРНК: рибосомы связываются с 5'-концом мРНК и движутся вдоль 5'-НТП в поиске подходящего стартового кодона трансляции

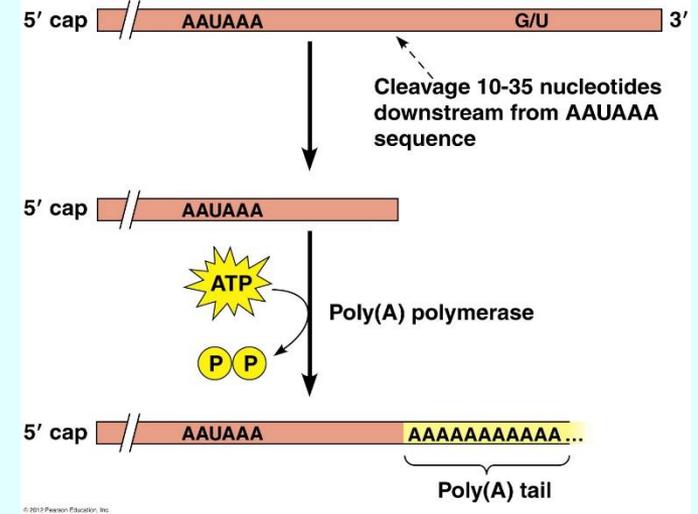
Особенности трансляции у эукариот: 5'-кэп и поли(А)

5'-кэп (7-метилгуанозин) добавляется к исходной молекуле РНК после начала транскрипции



Гуанозин присоединяется к 5'-концу РНК в противоположной всем нуклеотидам ориентации.
+ Метильная группа добавляется в 7-ю позицию концевому гуанину (при участии фермента **гуанин-7-метилтрансферазы**)

К ядерному транскрипту после транскрипции добавляется участок поли(А) длиной около 200 нуклеотидов



Функции поли(А):

- 1) Защищает от деградации
- 2) Связывается с поли(А)-связывающим белком (**РАВР**, poly(A)-binding protein)

Функции 5'-кэпа:

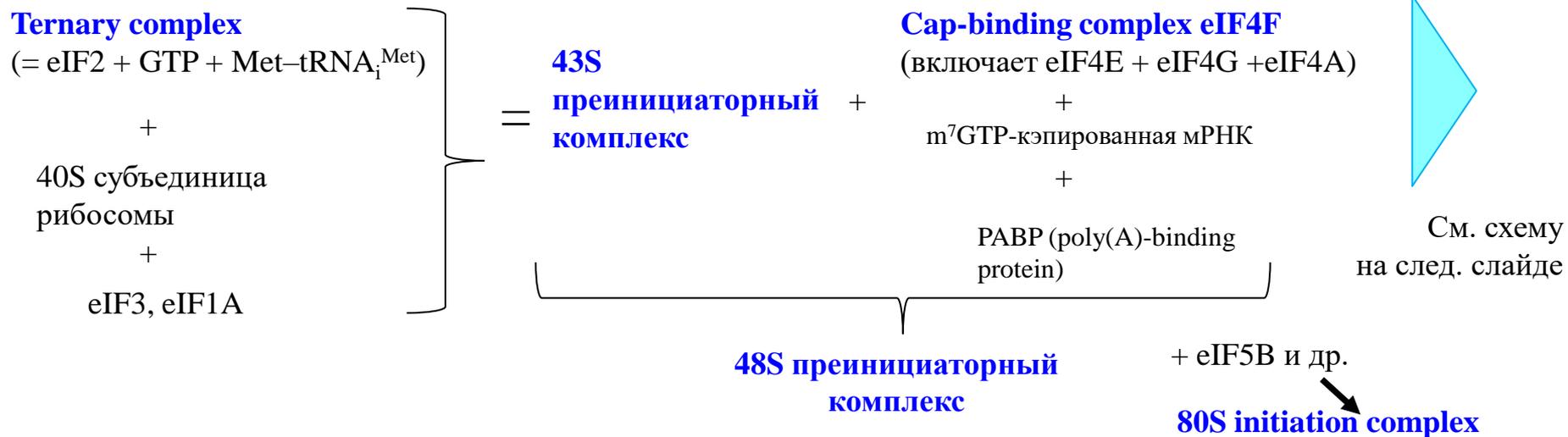
- 1) Защищает от деградации
- 2) Опознается факторами инициации

Эукариоты: факторы инициации

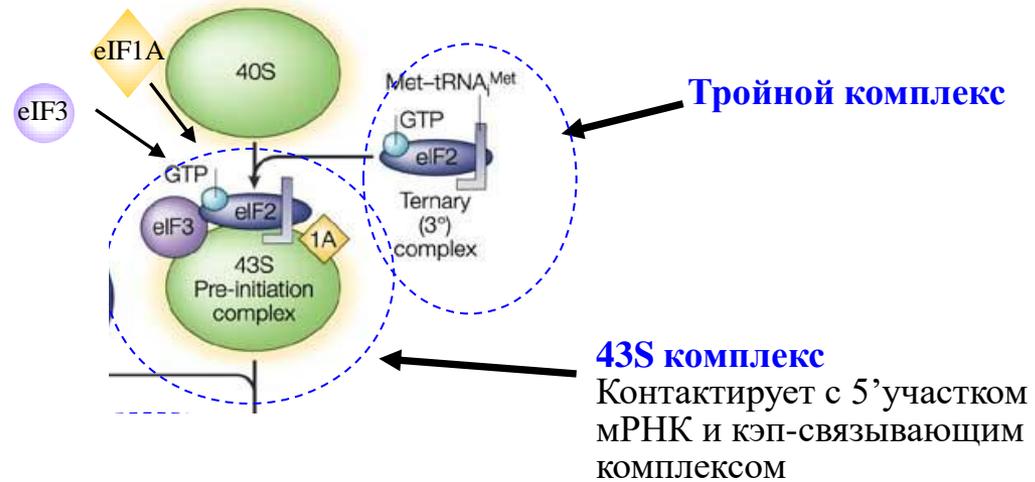
У эукариот изучено 12 факторов инициации.

Они имеют обозначения eIF1, eIF2 и т.д. (eukaryotic translation initiation factor 1,...).

eIFs функционируют в составе комплексов:



Схематическое изображение этапов формирования инициаторного комплекса у эукариот. (Pathway of translation initiation in eukaryotes).

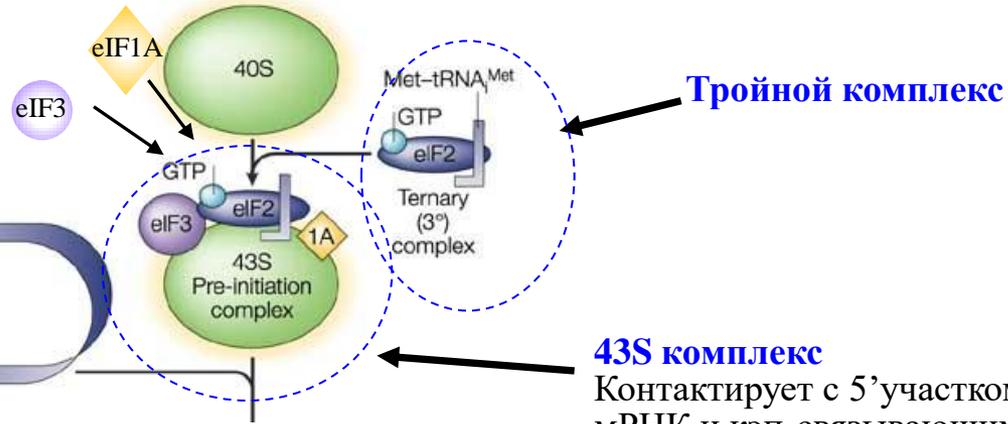


Схематическое изображение этапов формирования инициаторного комплекса у эукариот. (Pathway of translation initiation in eukaryotes).

Инициация

Элонгация

Кэп-связывающий комплекс eIF4F (A, E, G)



eIF4G -
белок-адаптер
(связывает
PABP и
eIF4E)
стимулирует
хеликазу
eIF4A)

eIF4E -
связывает
метилованный
кэп

eIF4A -
хеликаза,
расплетающая
5'-конец мРНК
(на
дальнейших
стадиях
совместно с
eIF4B)

Тройной комплекс

43S комплекс

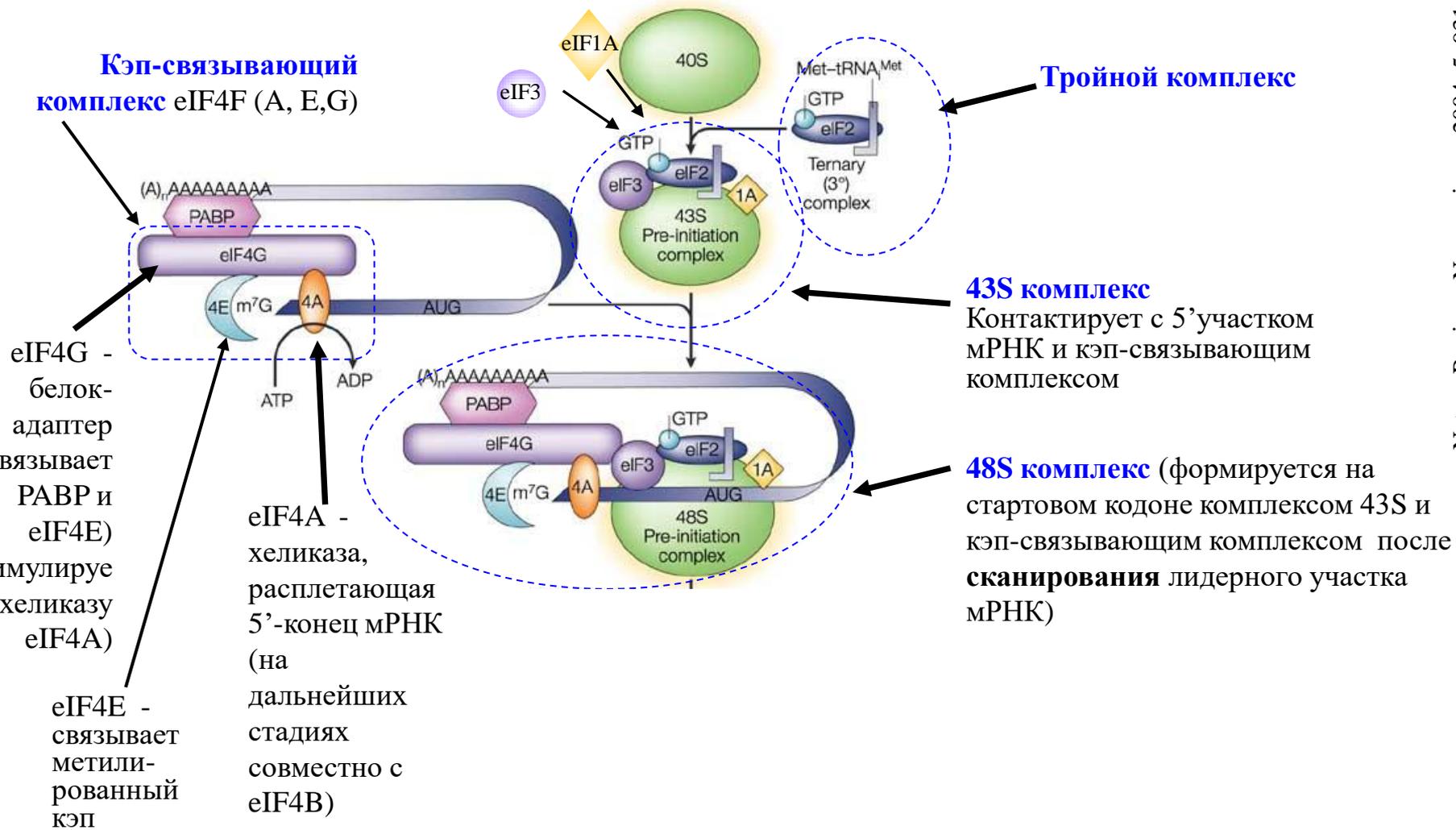
Контактирует с 5' участком
мРНК и кэп-связывающим
комплексом

Схематическое изображение этапов формирования инициаторного комплекса у эукариот. (Pathway of translation initiation in eukaryotes).

Инициация

Элонгация

Кэп-связывающий комплекс eIF4F (A, E, G)



Тройной комплекс

43S комплекс

Контактирует с 5' участком мРНК и кэп-связывающим комплексом

48S комплекс (формируется на стартовом кодоне комплексом 43S и кэп-связывающим комплексом после сканирования лидерного участка мРНК)

eIF4G - белок-адаптер (связывает PABP и eIF4E) стимулирует хеликазу eIF4A)

eIF4A - хеликаза, расплетающая 5'-конец мРНК (на дальнейших стадиях совместно с eIF4B)

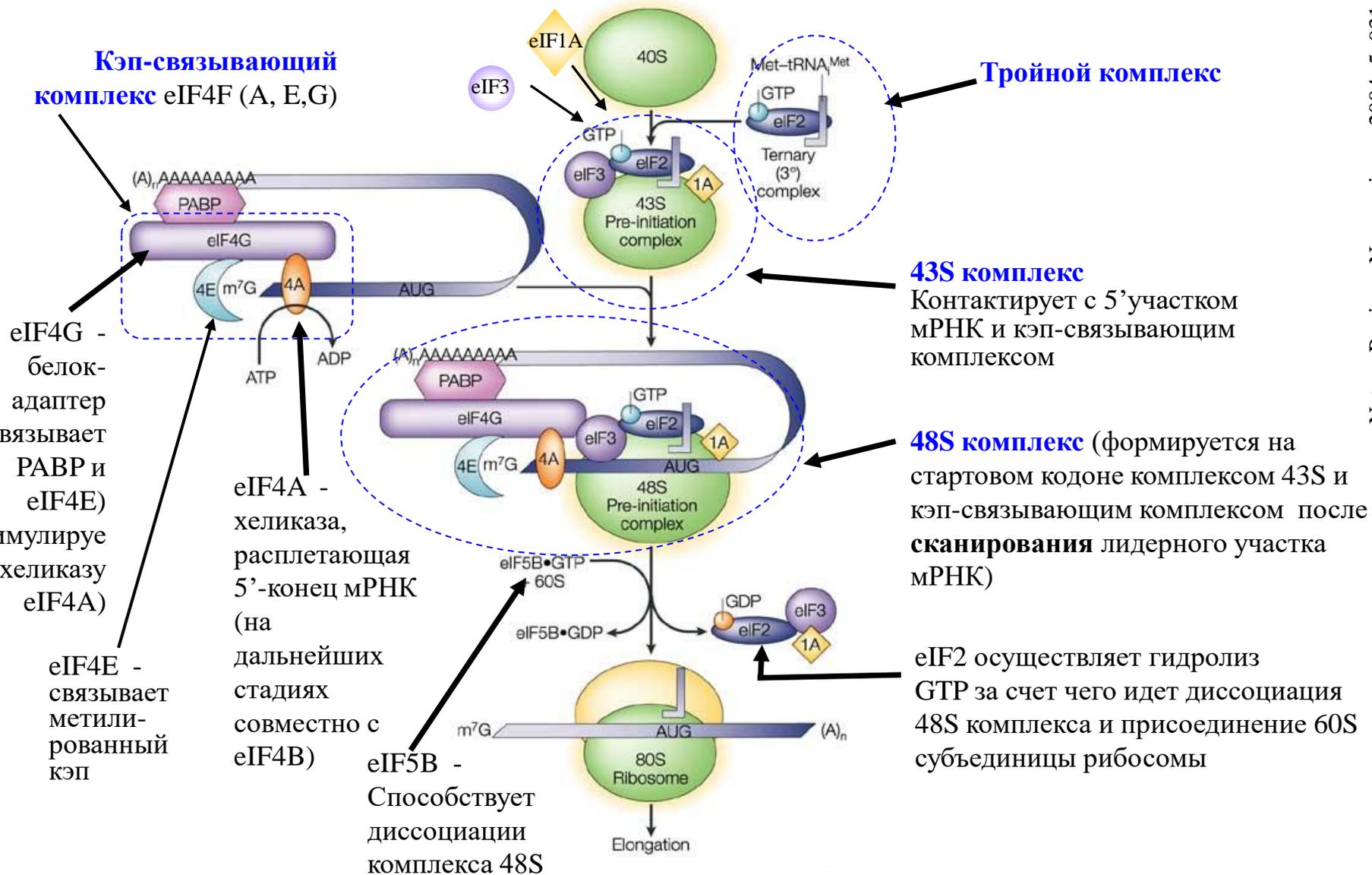
eIF4E - связывает метилированный кэп

Схематическое изображение этапов формирования инициаторного комплекса у эукариот. (Pathway of translation initiation in eukaryotes).

Инициация

Элонгация

Кэп-связывающий комплекс eIF4F (A, E, G)



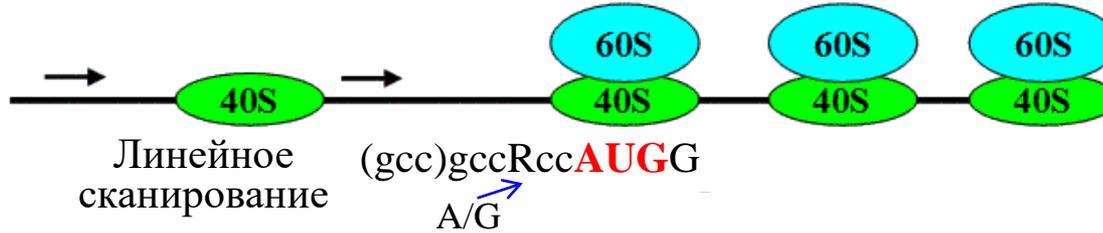
ЭУКАРИОТЫ: способ стыковки малых субъединиц рибосом со своими сайтами связывания в мРНК.

В эукариотических клетках выделяют два механизма инициации трансляции:

- линейное сканирование**
- внутренняя инициация трансляция (при участии IRES)**

Линейное сканирование

Контекстные характеристики лидерной последовательности мРНК (5'-НТП), влияющие на эффективность трансляции: Консенсусная последовательность Козак



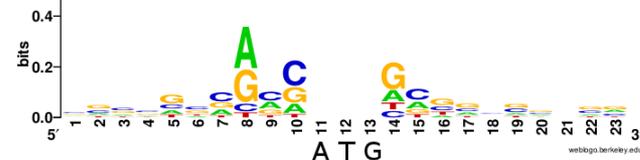
Консенсусная последовательность Козак (последовательность Козак = *Kozak consensus sequence*) впервые описана Marilyn Kozak* в 1986 году на основе анализа 699 последовательностей разных видов позвоночных: human, cow, cat, dog, chicken, guinea pig, hamster, mouse, pig, rabbit, sheep, and xenopus

* Мэрилин Козак (род.1943), профессор биохимии университета штата Нью-Джерси.

Оптимальный контекст стартового кодона мРНК у разных эукариотических таксонов различен:

Оптимальным для инициации трансляции контекстом стартового кодона у млекопитающих является NNNPuNNAUGG (Pu = A либо G)

Оптимальный контекст для мРНК человека



10 000 последовательностей мРНК человека

Контекстные характеристики лидерной последовательности мРНК (5'-НТП), влияющие на эффективность трансляции у разных эукариотических таксонов

Млекопитающие: NNN**Pu**NN**AUGG**

↑
↑
↑
 -3 +1 +4

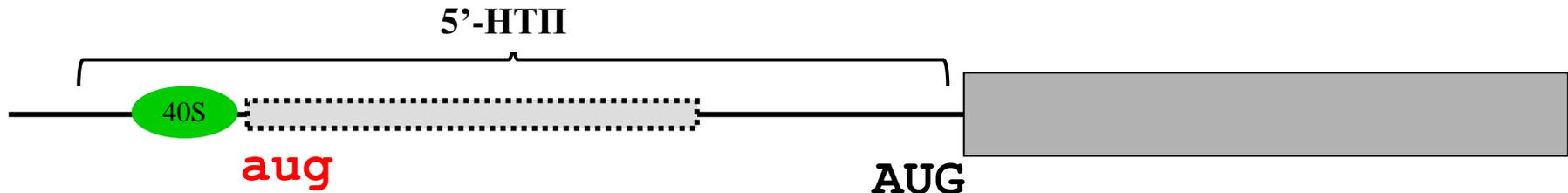
Consensus and anticonsensus sequences of start codon contexts of eukaryotic mRNAs

	Организм/Таксон															
	<i>A.thaliana</i>				<i>Liliopsida</i> (Однодольные растения)				<i>Arthropoda</i> (Членистоногие)				<i>H.sapiens</i>			
Позиция	-3	-2	-1	+4	-3	-2	-1	+4	-3	-2	-1	+4	-3	-2	-1	+4
Консенсус	Pu	A	A	G	Pu	C	C	G	Pu	A	A	—	Pu	C	C	G
Антиконсенсус	Pu	notA	notA	notG	Pu	notC	notC	notG	Pu	notA	notA	—	Pu	notC	notC	notG

Pu, purine (A либо G); Py, pyrimidine (C либо T).

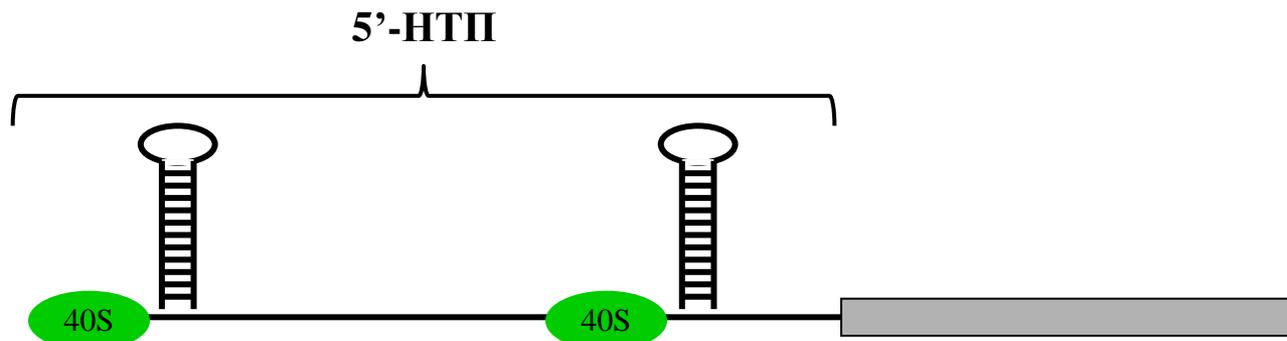
Контекстные характеристики лидерной последовательности мРНК (5'-НТП), влияющие на эффективность трансляции

Не оптимальная ситуация: наличие в 5'-НТП добавочного AUG кодона (в отсутствии оптимального контекста) приводит к задержке инициаторного комплекса и **снижает** эффективность трансляции с основного AUG кодона



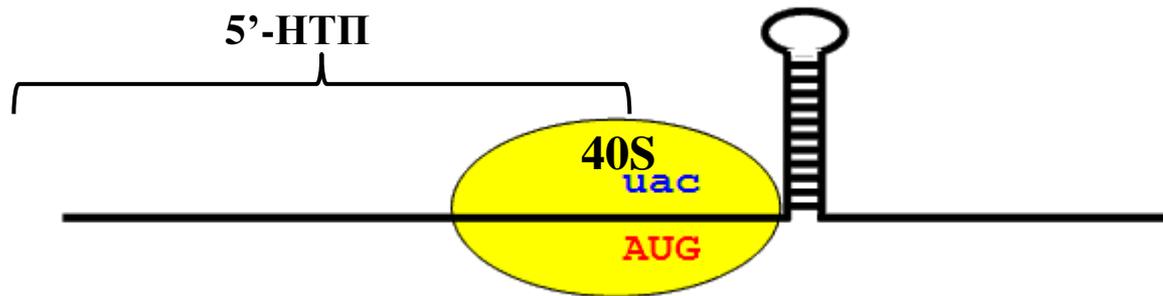
Механизм - добавочные AUG-кодоны в составе 5'-НТП могут распознаваться как альтернативные сайты инициации трансляции, что снижает трансляцию основной рамки считывания

Не оптимальная ситуация: Стабильная вторичная структура в районе 5'-НТП мРНК взаимодействует с eIF-4F (=кэп-связывающий комплекс) и 40S субъединицей рибосомы и **ингибирует** инициацию трансляции



Контекстные характеристики лидерной последовательности мРНК (5'-НТП), влияющие на эффективность трансляции

Дополнительный позитивный фактор: наличие шпилечной структуры ниже AUG кодона (на расстоянии 11-17 нуклеотидов) приводит к задержке инициаторного комплекса и **повышает** эффективность трансляции с данного AUG кодона



!!! Возможно существуют и другие характеристики, компенсирующие отсутствие оптимального контекста стартового кодона.

Программа, предсказывающая наличие шпилечной структуры ниже AUG кодона:

AUG_hairpin: program for prediction of a downstream hairpin potentially increasing initiation of translation at start AUG codon in a suboptimal context.

http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/aug_hairpin/

Результат работы программы AUG_hairpin: предсказание шпилечной структуры ниже AUG кодона

http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/aug_hairpin/

AUG_hairpin: program for prediction of a downstream hairpin potentially increasing initiation of translation at start AUG codon in a suboptimal context.

It has been experimentally shown that a downstream hairpin in certain positions with respect to start codon could compensate in part for the suboptimal AUG context (Kozak, 1990; see Tutorial for details). Basing on this observation, AUG_hairpin program predicts the stem-loop structures whose 5' borders are located within the critical region (from 11th to 18th nucleotides by default; the borders can be adjusted)

[Tutorial](#)

Enter nucleotide sequence of 5'-untranslated region (preferably 10 nucleotides upstream the start AUG codon; do not include AUG).
Notes: (plain sequence or FASTA-format may be used; no gaps are allowed; only a,t,g,c symbols may be used).

aaa

Выберите файл | Файл не выбран

Enter the 5'-end segment of a nucleotide sequence of a protein coding region (~100 nucleotides starting from the start AUG codon)

augugcugacguuuacugggaaaggaccscaauauggggaccccuagcgcgcgacuggaucgscgugaiaucacgaugc

Выберите файл | Файл не выбран

Min position for hairpin start:

12

Max position for hairpin start (<= 30):

18

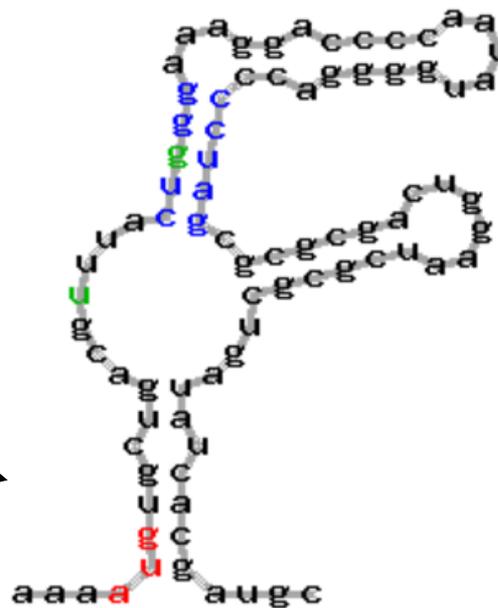
Detect only perfect helices:

Max bulge or interior loop size if imperfect helices are allowed:

1

ENTER | Clear

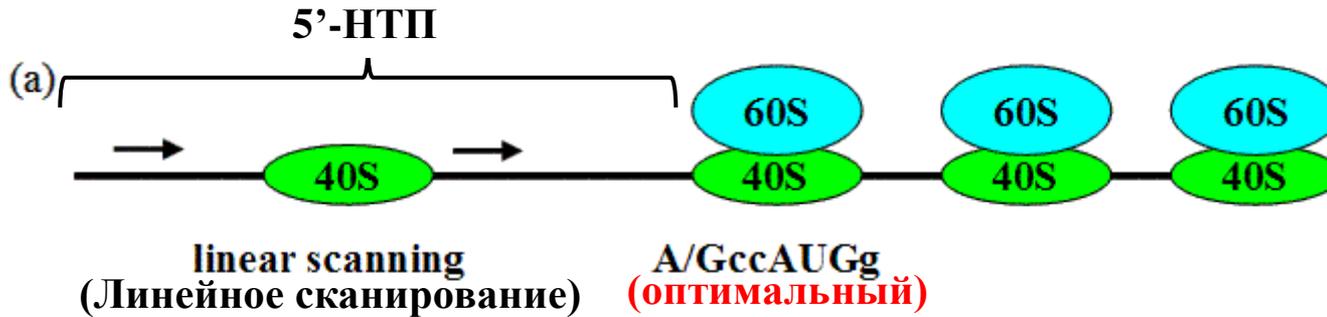
Energy of secondary structure = -26.8 kcal/mol
Position of Hairpin start: 16
Energy of double strands in Hairpin: -6.8 kcal/mol



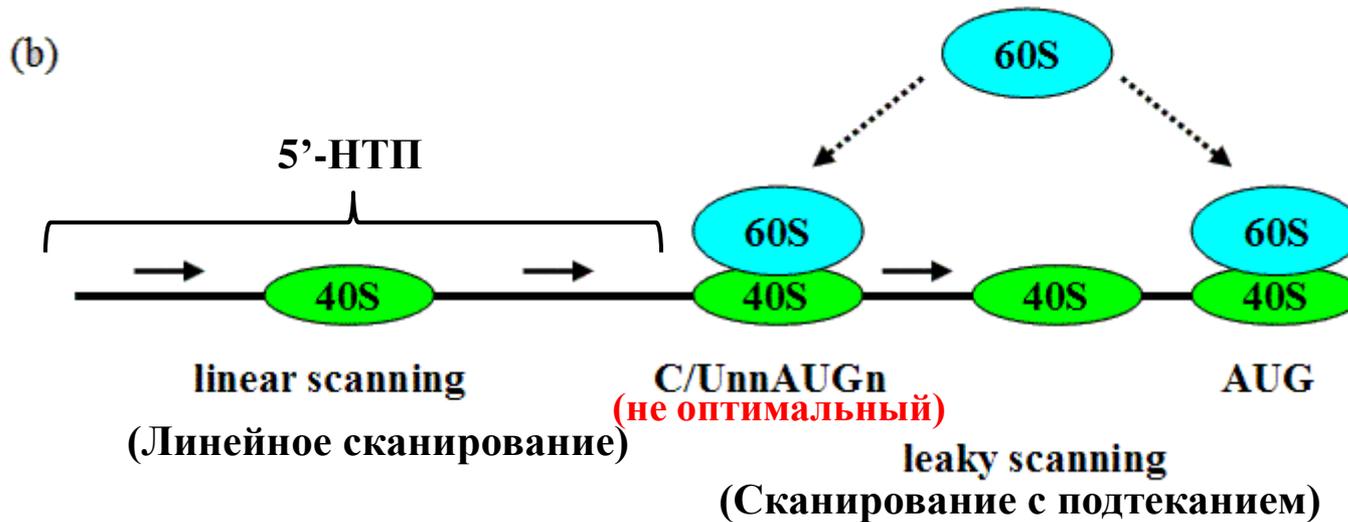
Разработка этой интернет-доступной программы осуществлялась при участии член-корр. РАН, д.б.н. А.В.Кочетова и д.ф.м.н. А.Ю.Пальянова

Линейное сканирование и линейное сканирование с подтеканием

Инициация трансляции осуществляется при наличии AUG кодона в окружении оптимального контекста (у млекопитающих - NNNPuNNAUGG (Pu = A либо G))



А также инициация трансляции возможна с добавочных AUG кодонов при наличии других контекстных характеристик, способствующих задержке инициаторного комплекса



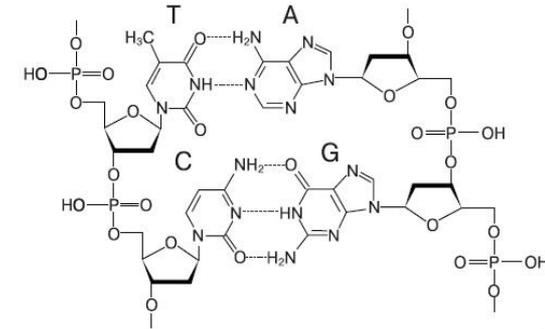
Если контекст первого кодона AUG не оптимален, часть 40S субъединиц рибосом его распознает и иницирует на нем трансляцию. Однако, некоторые рибосомы его пропускают (не распознают в качестве сайта инициации), продолжают сканирование мРНК далее в 3'-направлении могут и иницировать трансляцию на следующем кодоне AUG. Этот механизм получил название leaky scanning (что можно перевести как «сканирование с подтеканием») (Kozak, 2005; Кочетов, 2006)

Контекстные характеристики лидерной последовательности мРНК (5'-НТП), влияющие на эффективность трансляции

Дополнительные факторы, влияющие на эффективность трансляции:

- Длина 5'-НТП: Слишком короткое расстояние между кэпом и AUG кодоном (менее 10-15 нуклеотидов) снижает вероятность распознавания AUG кодона 40S субъединицей рибосомы. Увеличение длины (если это не приводит к возникновению стабильных шпилечных структур) повышает эффективность трансляции. Однако, чрезмерно длинные 5'-НТП, как правило принадлежат мРНК с низкой эффективностью трансляции

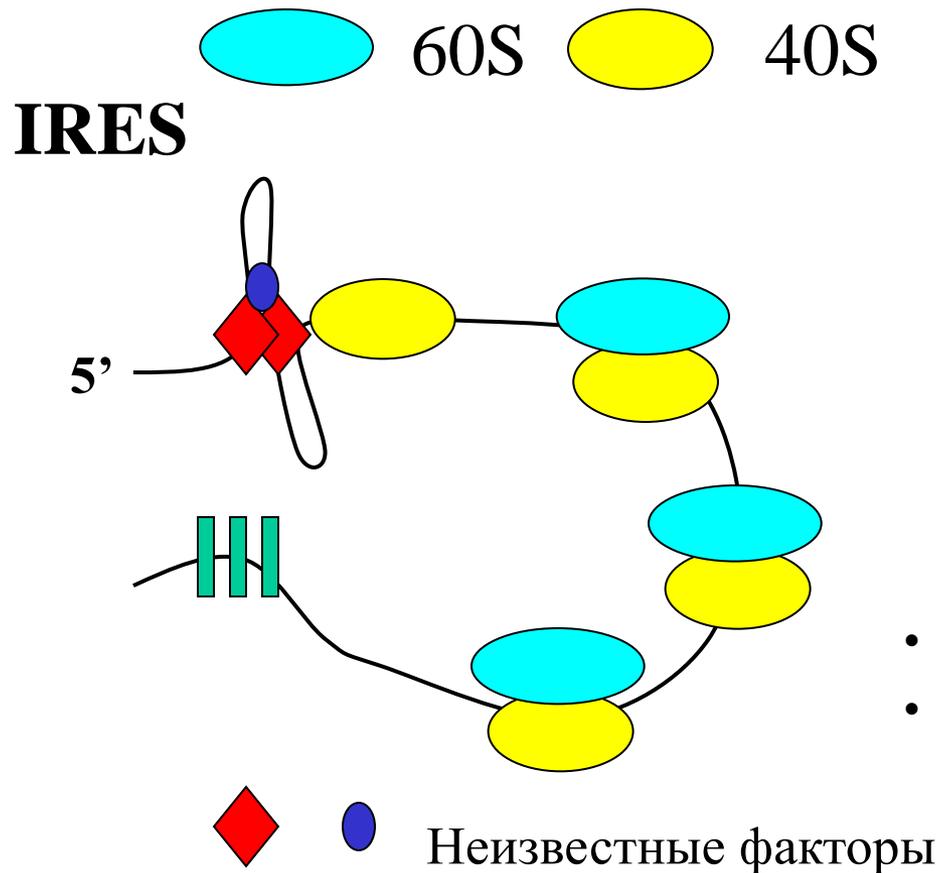
- Высокий уровень GC% в 5'-НТП при прочих равных условиях обеспечивает стабильность вторичных структур и таким образом коррелирует с низкой эффективностью трансляции [Kochetov A.V. et al., 1998]



- Наличие internal ribosome entry sites (IRES)

Kochetov A.V., Ischenko IV, Vorobiev DG, Kel AE, Babenko VN, Kisselev LL, Kolchanov NA. Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features. FEBS Lett. 1998 Dec 4;440(3):351-5.

IRES (internal ribosome entry site) = - участок внутренней посадки рибосомы.



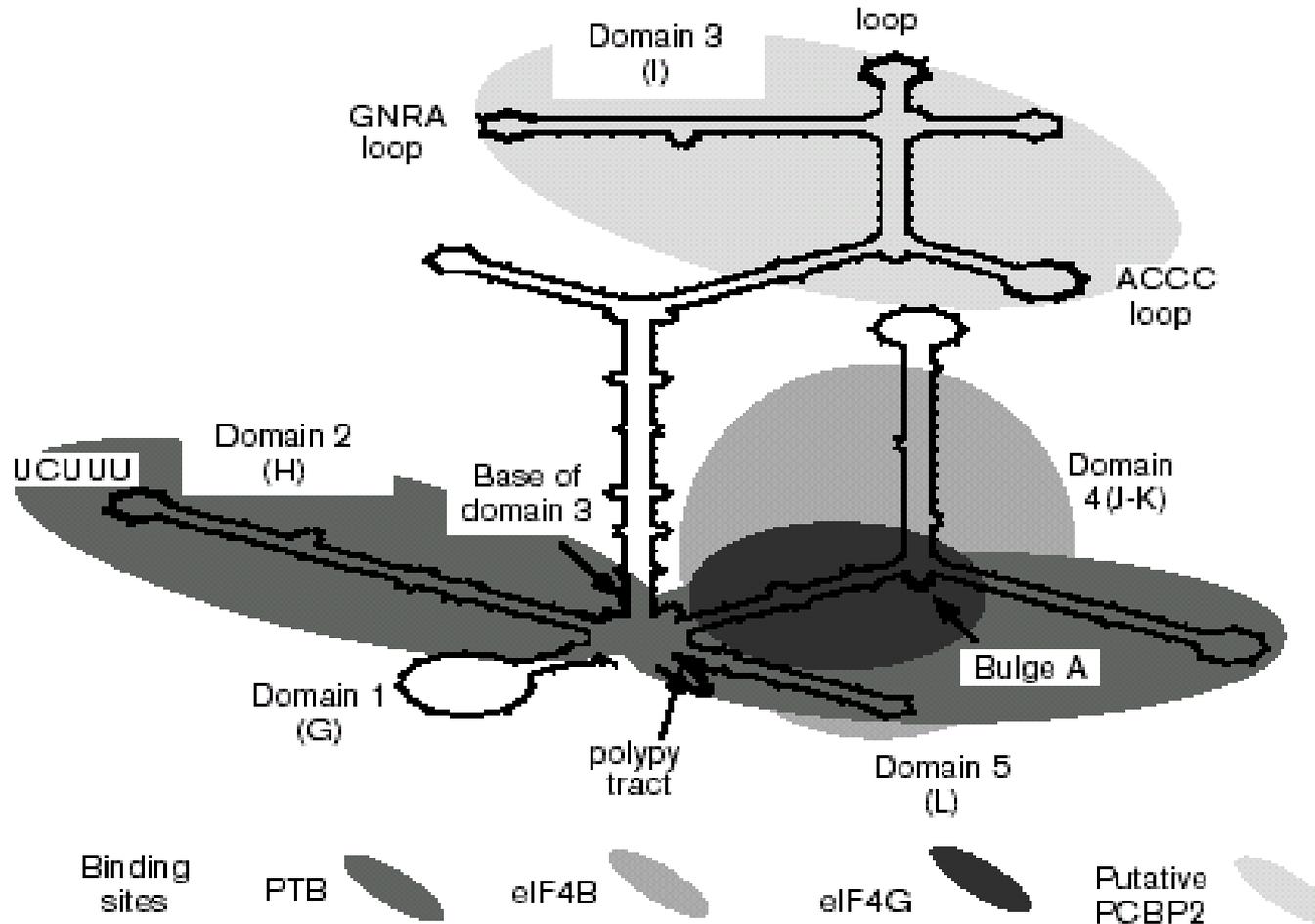
IRES - регуляторные мотивы мРНК, задействованные в кэп-независимом механизме инициации трансляции, при котором рибосома связывается с мРНК в области этих мотивов в 5'-нетранслируемой области недалеко от сайта инициации трансляции

Первая публикация в Pubmed про вирус энцефаломиокардита (encephalomyocarditis virus = EMCV) [Genes Dev. 1990 Sep;4(9):1560-72].

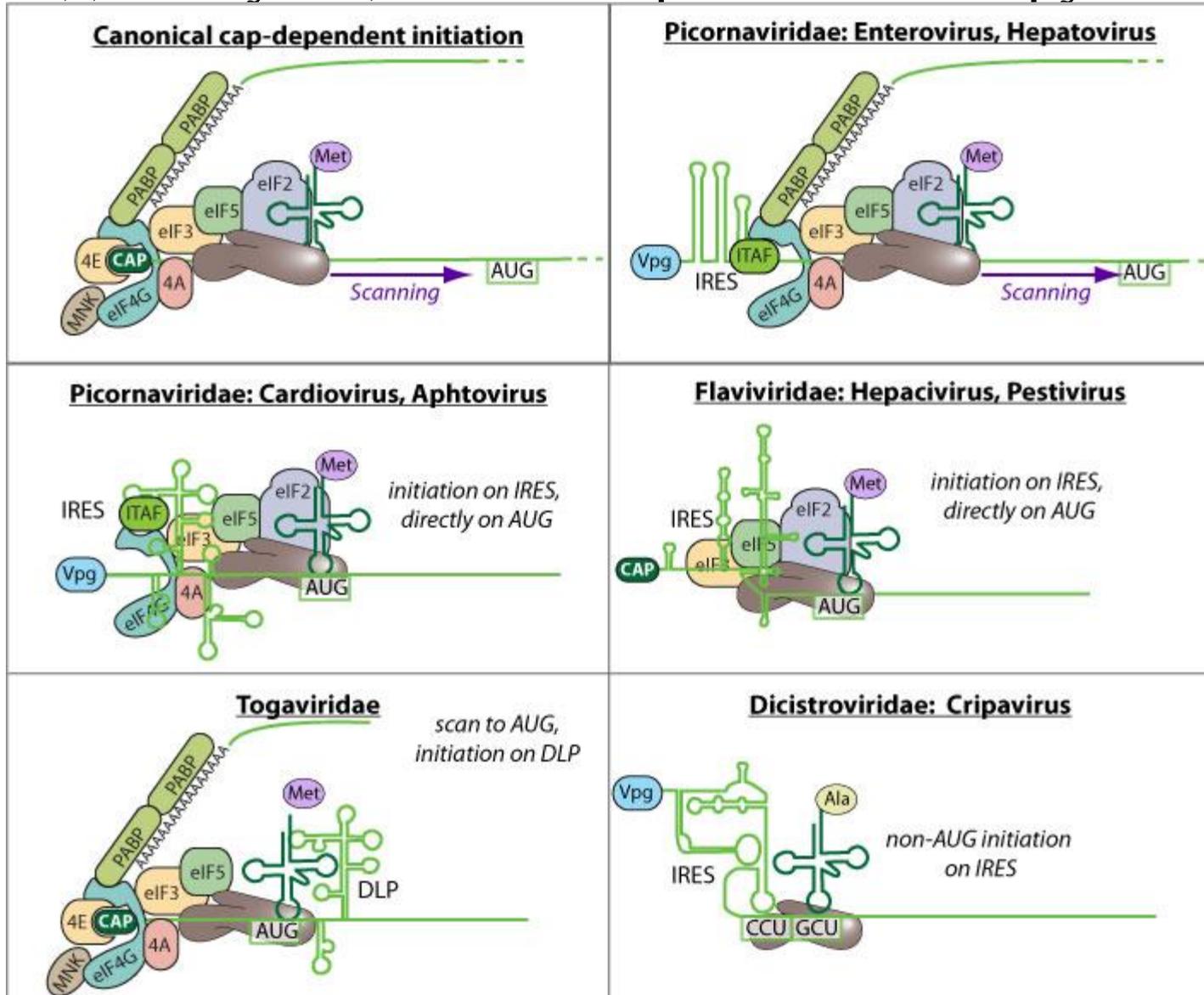
К сентябрю 2009 г. было известно 115 клеточных (у дрожжей, растений и других высших эукариот) и 68 вирусных IRES.

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

- Модель IRES EMCV (вирус энцефаломиокардита = encephalomyocarditis virus)



Состав и структура белковых комплексов, взаимодействующих с IRES различных вирусов

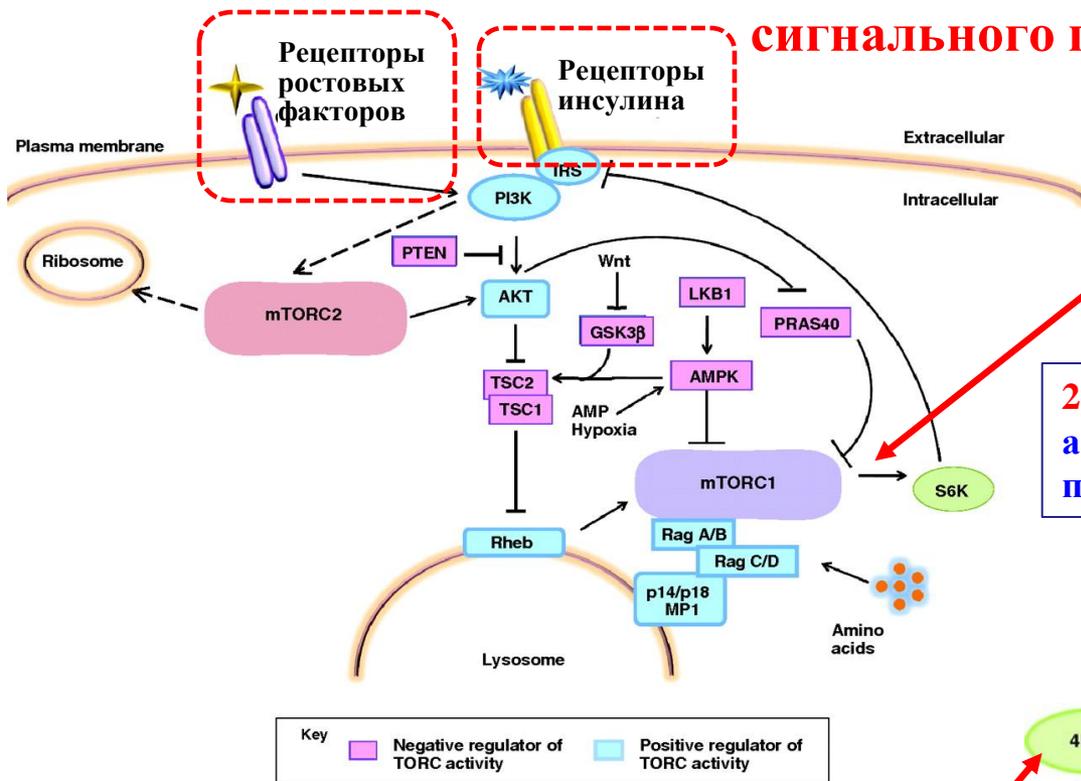


Каков биологический смысл существования альтернативного способа инициации трансляции с участием IRES ??

- Экспрессия белка с мРНК при участии IRES не подвержена общим регуляторным механизмам, управляющим трансляцией большинства мРНК

Общий контроль интенсивности трансляции при участии mTOR

сигнального пути

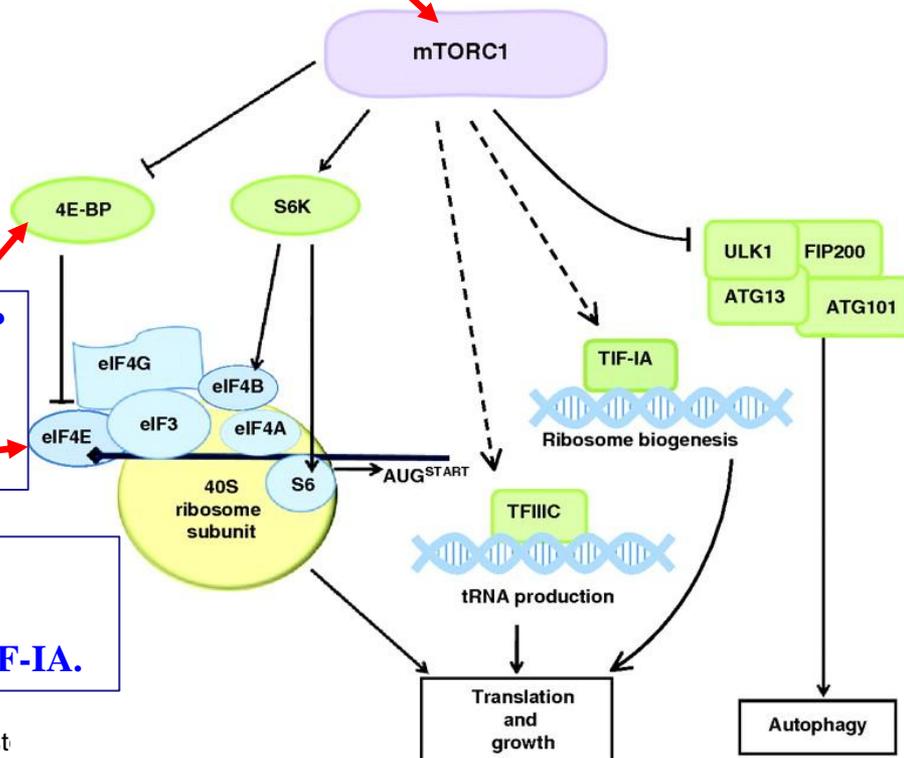


1. mTOR (=mechanistic target of rapamycin) – протеин киназа, которая активируется в ответ на воздействие ростовыми факторами и инсулином

2. Далее, mTOR посредством влияния на активность факторов инициации трансляции повышает интенсивность трансляции

3. mTORC1 фосфорилирует ингибиторный белок 4E-BP (eIF4E-binding protein). Фосфорилирование 4E-BP нарушает его связывание с фактором eIF4E. Таким образом eIF4E становится свободным и активным.

4. Представлены также и другие механизмы влияния mTORC1 на трансляционную машину (eIF4B, S6K = ribosomal S6 kinase), а также на активность TFIIIC и TIF-IA.

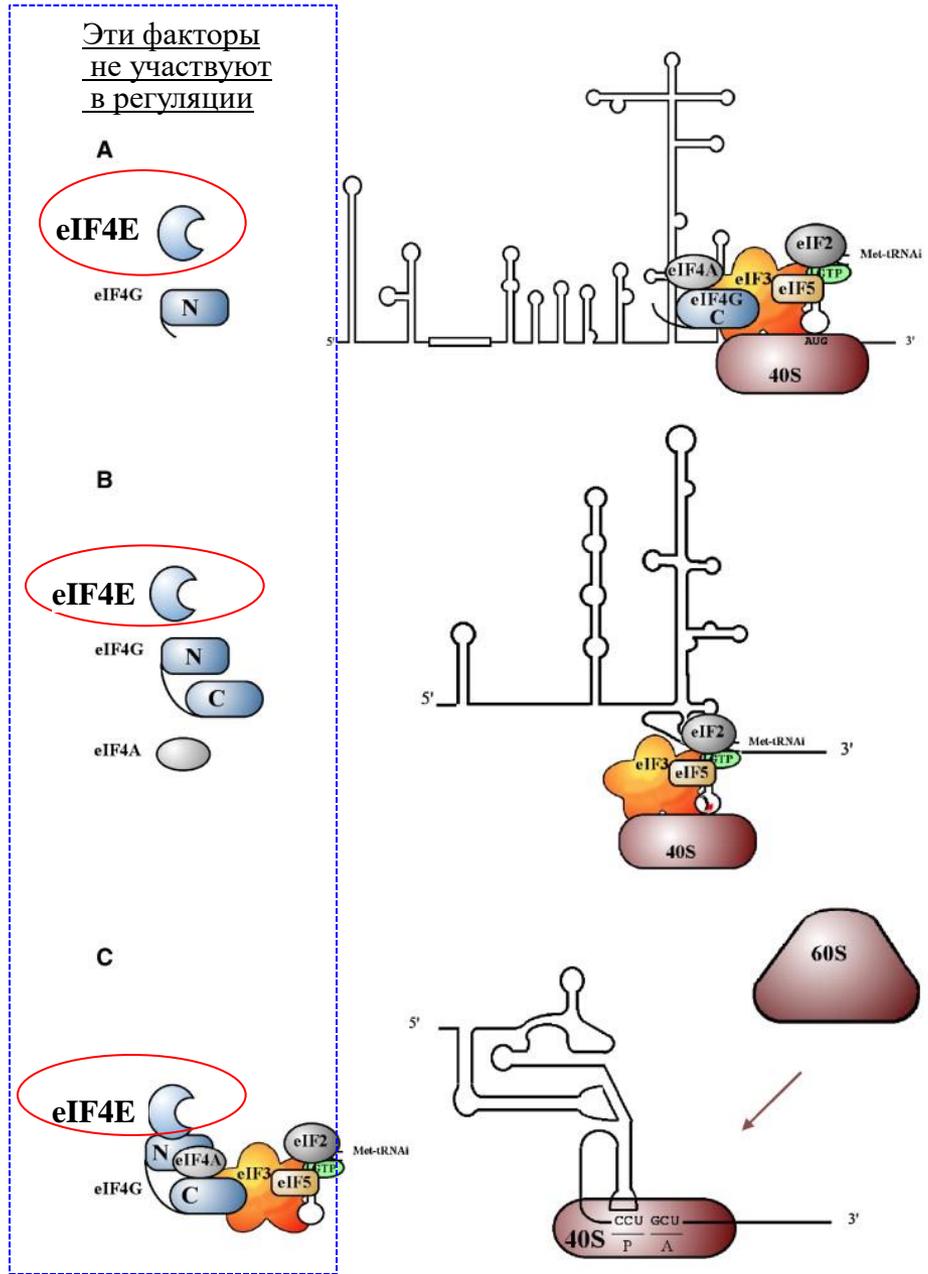


Состав и структура белковых комплексов, взаимодействующих с IRES различных вирусов

(A) Most viral IRESes including Picornaviruses and Lentiviruses. Участвуют почти все канонические факторы инициации (за исключением eIF4E и белка Nt из eIF4G).

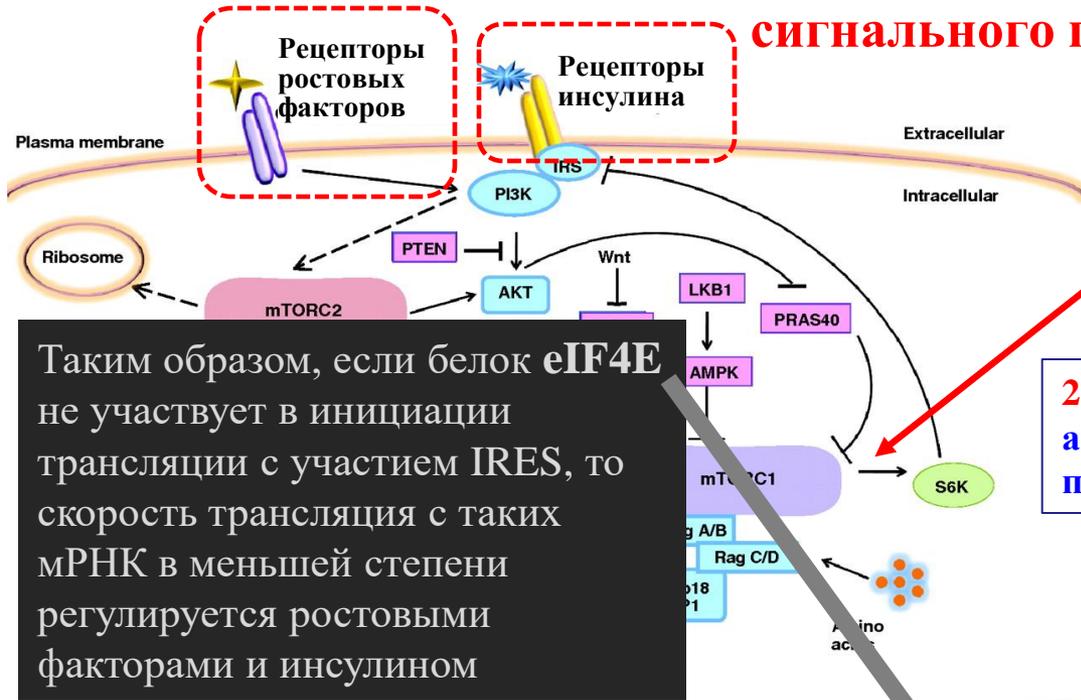
(B) Flaviviral/pestiviruses IRES. Участвуют eIF5, eIF2 and eIF3 Не участвуют eIFs 4F/4A/4B/1/1A

(C) Dicistrovirus IGR IRESes. IRES длиной 200 нуклеотидов способен контактировать с 40S субъединицей и присоединять 80S субъединицу без участия факторов инициации



Общий контроль интенсивности трансляции при участии mTOR

сигнального пути



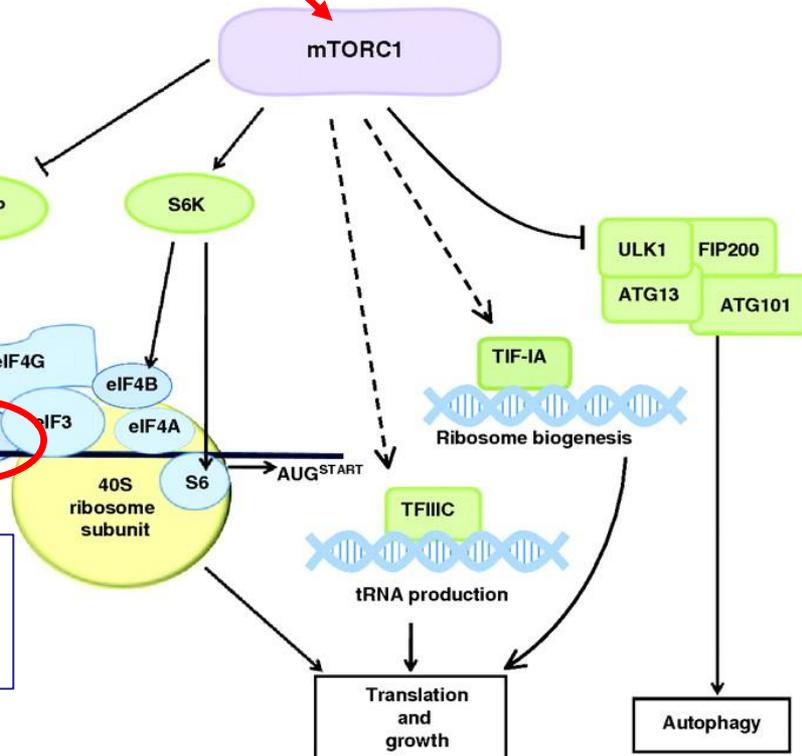
Таким образом, если белок eIF4E не участвует в инициации трансляции с участием IRES, то скорость трансляция с таких мРНК в меньшей степени регулируется ростовыми факторами и инсулином

1. mTOR (=mechanistic target of rapamycin) – протеин киназа, которая активируется в ответ на воздействие ростовыми факторами и инсулином

2. Далее, mTOR посредством влияния на активность факторов инициации трансляции повышает интенсивность трансляции

3. mTORC1 фосфорилирует ингибиторный белок 4E-ВР (eIF4E-binding protein). Фосфорилирование 4E-ВР нарушает его связывание с фактором eIF4E. Таким образом eIF4E становится свободным и активным.

4. Представлены также и другие механизмы влияния mTORC1 на трансляционную машину (eIF4B, S6K = ribosomal S6 kinase), а также на активность TFIIC и TIF-IA.



Трансляция при участии IRES и регуляция апоптоза.

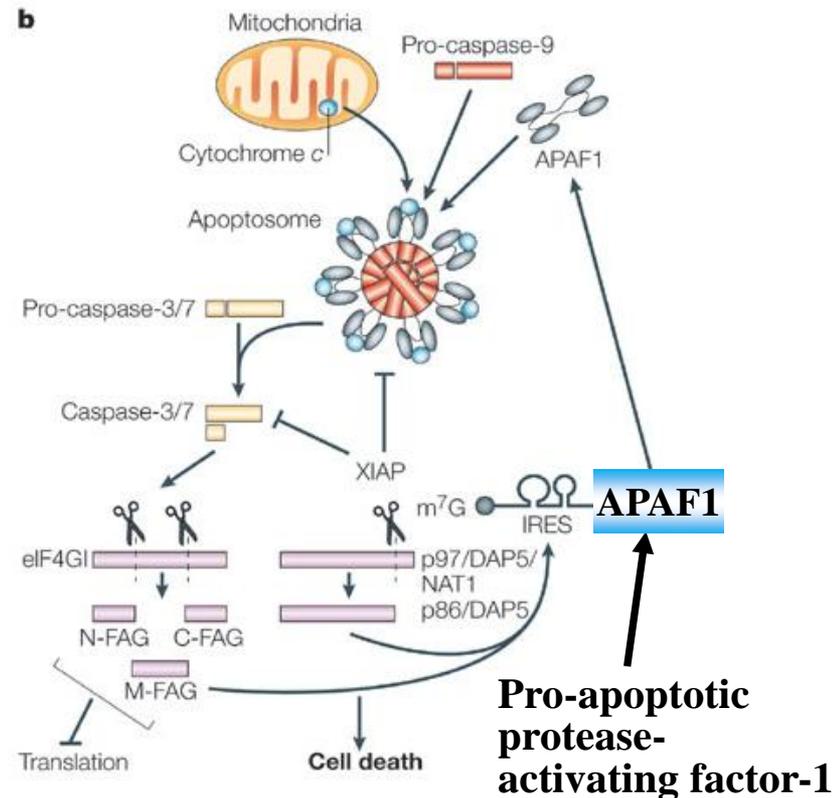
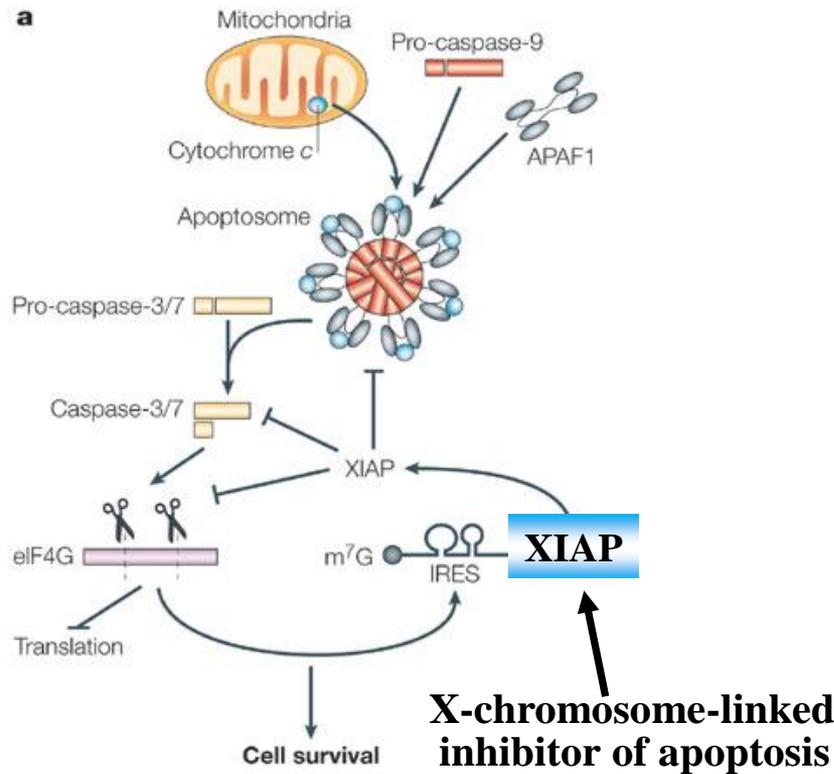
Во время апоптоза активируются каспазы, которые расщепляют многие белки, включая факторы инициации трансляции (семейство белков eIF4G). Таким образом кэп-зависимый механизм инициации трансляции подавляется. С участием IRES регулируется инициация трансляции регуляторов апоптоза XIAP и APAF1

XIAP – ингибитор апоптоза,

Активируется такими стрессовыми факторами как недостаток питательных веществ, низкие дозы радиации, обработка клеток интерлейкином 6

APAF1 – индуктор апоптоза,

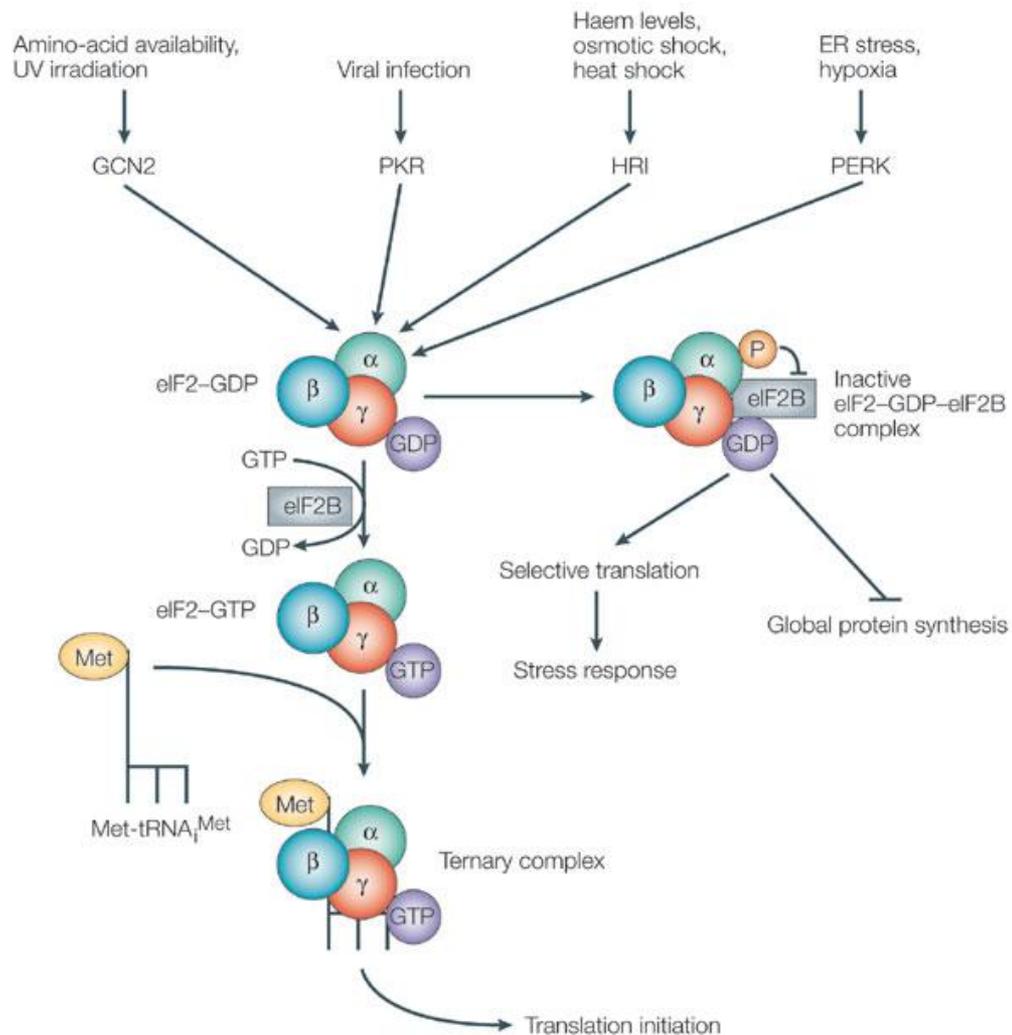
активируется этопозидом (цитостатик, ингибитор топоизомеразы II)



Активация трансляции XIAP и APAF1 приводит к противоположным эффектам на апоптоз

Роль IRES (internal ribosome entry site) в эукариотических клетках

- Инициация трансляции со слабых (нестандартных) AUG кодонов
- Экспрессия генов в условиях, когда кЭП-зависимая инициация трансляции подавляется стрессом, определённой стадией клеточного цикла или апоптоза. (Гены, чьи мРНК содержат IRES — с-Мус, ARAF1, Bcl-2)



База данных: IRESite (<http://www.iresite.org>)

The IRESite database presents information about the experimentally studied IRES (Internal Ribosome Entry Site) segments. IRES regions are known to attract eukaryotic ribosomal translation initiation complex and thus promote translation initiation independently of the presence of the commonly utilized 5'-terminal 7mG cap structure. It is not yet clear whether the activity could be attributed to a common sequence or to a common secondary structure present in them. Such IRES regions were found in a broad range of +RNA viruses and in some eukaryotic cellular mRNAs. Certain IRESs have been predicted based on the fact that closely related viruses should share its features and indeed, their sequences are in some regions conserved enough to allow identification of a new IRES. In contrast, cellular IRESs do not have almost anything in common in terms of their sequence or secondary structure. Therefore, cellular IRESs cannot be predicted. Either way, IRESite is focused only on IRESs which have been at least to some extent experimentally proven. To allow the cross-correlation of the experimental results the IRESite database was specifically designed to store not only the primary experimental results (sequence, structure, measured values) but also the most important methodological characteristics of the experiments.

For decent introduction to the problem please read the [NAR2010 article about IRESite first including the Supplementary material](#). More thorough explanation of the problems, our aims, a complete listing of IRESs reported so far and some analyses of the data accumulated in IRESite including features of viral and cellular IRESs we present in a book chapter named [A Bioinformatical Approach to the Analysis of Viral and Cellular Internal Ribosome Entry Sites](#). In: Columbus F editors. New Messenger RNA Research Communications. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers; pp. 133-166 (2007) ([abstract available](#)). Finally, in the above menu **Documentation** folder you might want to read the [Introduction](#) document.

To our knowledge, based on **some** experimental evidence [there are at least 68 viruses and at least 115 eukaryotic cellular mRNAs reported to contain IRES as of 2009](#). IRESite presents not all of them, unintentionally. IRESite is a work in a progress and hence is not complete unlike the published listing was in the NAR2010 Supplementary material. Finally, we do **NOT** think all the reported IRESs were sufficiently characterized (actually that is why we created IRESite!) and therefore, **appearance of a virus/gene in neither the Supplementary**

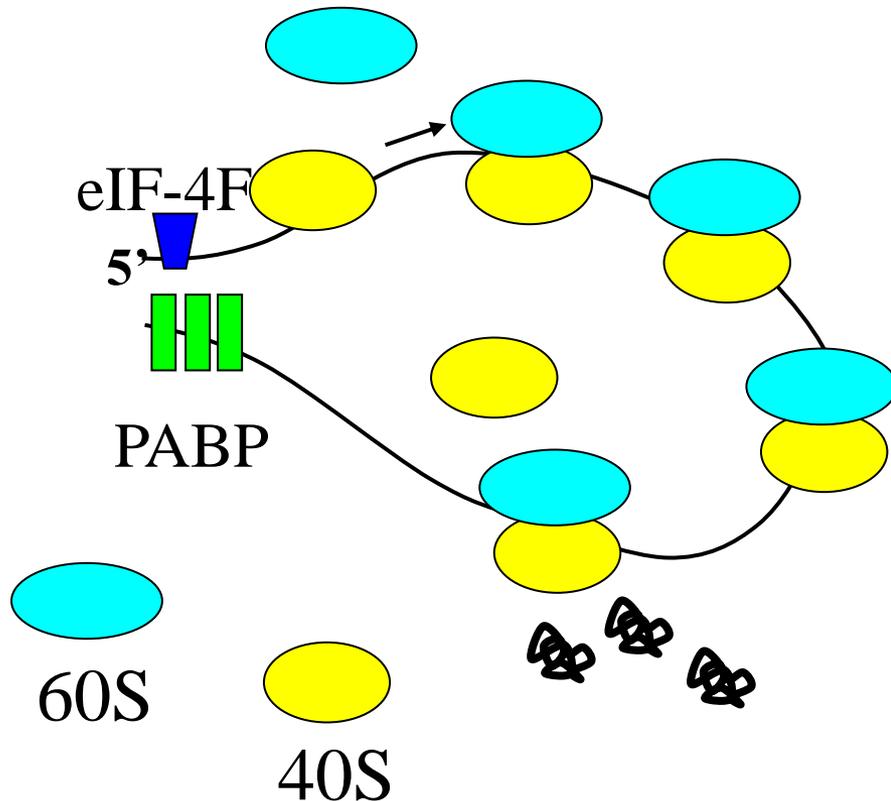
Hong JJ, Wu TY, Chang TY, Chen CY. Viral IRES prediction system - a web server for prediction of the IRES secondary structure in silico. PLoS One. 2013 Nov 5;8(11):e79288.
<http://140.135.61.250/vips/>

Wang, J., Gribskov, M. IRESpy: an XGBoost model for prediction of internal ribosome entry sites. BMC Bioinformatics 20, 409 (2019).

Итоговый слайд:

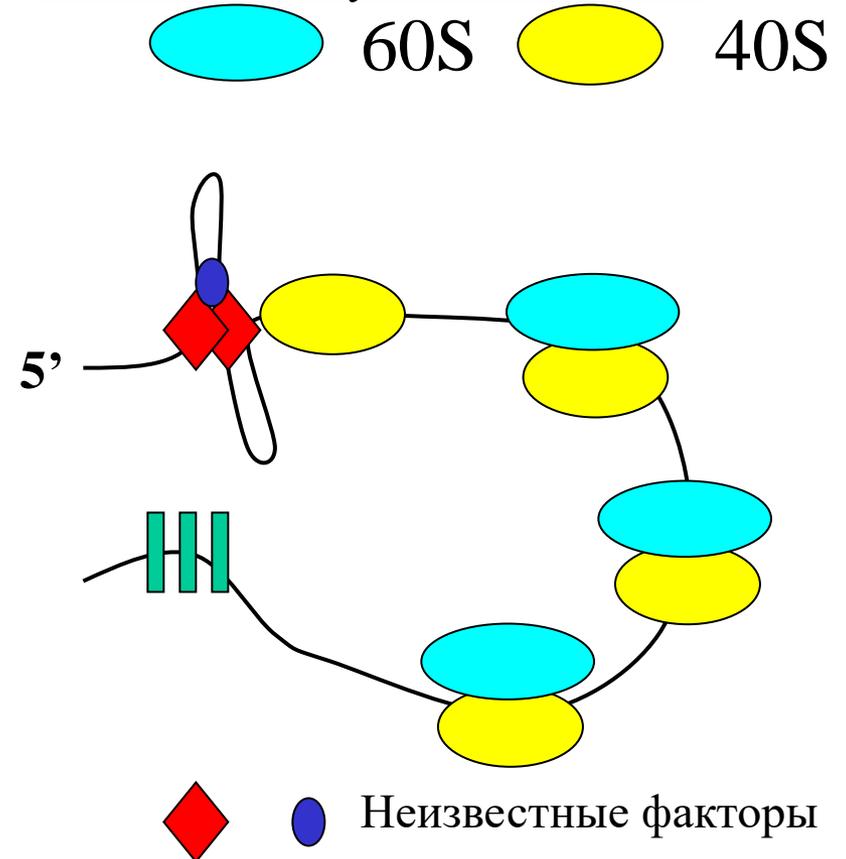
Основные механизмы инициации трансляции эукариотических мРНК

Модель “линейного сканирования”



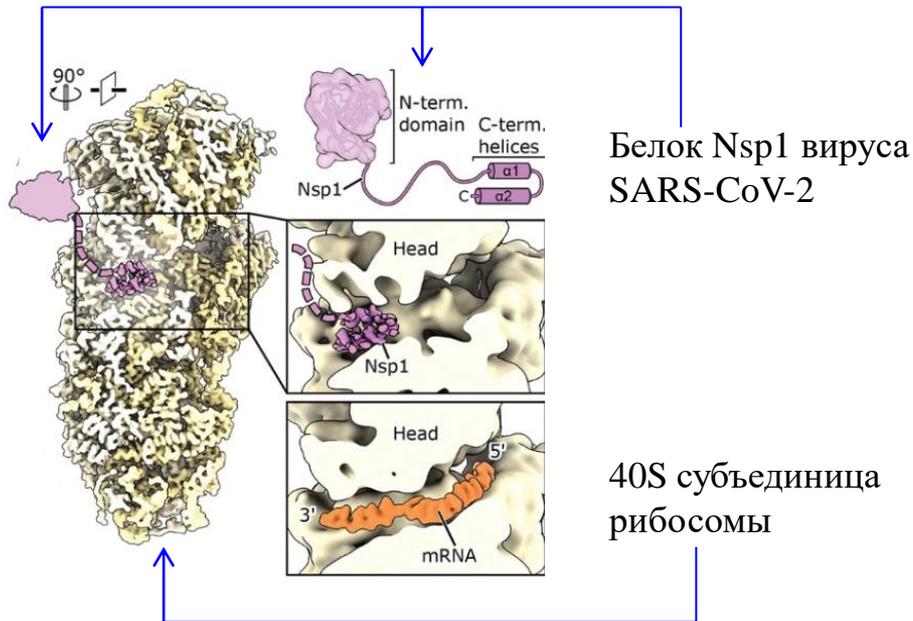
- Участие кепы и поли(А)-хвоста
- Расплетенный 5' UTR
- Роль контекста AUG кодона (-3,+4 позиции)

Инициация с участием IRES



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

Белок коронавируса SARS-CoV-2 взаимодействует с малой субъединицей рибосомы и подавляет трансляцию мРНК в клетке хозяина



Thoms M. et al., Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2 *Science* . 2020;369(6508):1249-1255.

Результат - блокируется синтез белков в клетке хозяина. В частности, блокируется образование белков противовирусного ответа.

Ингибирование зависит от структуры мРНК. Не подвержены ингибированию мРНК вирусных белков и белков клетки-хозяина, участвующих в базовых клеточных процессах (белки, обеспечивающие трансляцию, РНК-связывающие белки и ряд других белков, обеспечивающих жизненный цикл вируса). Показано, что избирательная трансляция мРНК этих белков происходит благодаря особой структуре их 5'- участков (олигопиримидиновые тракты)

Shilpa Rao S. et al., Genes with 5' terminal oligopyrimidine tracts preferentially escape global suppression of translation by the SARS-CoV-2 NSP1 protein *bioRxiv* . 2020;2020.09.13.295493.

Конец лекции №8(6)