



МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

© С. Е. Москаленко^{1,2},
О. А. Мурина¹, О. Л. Аскинази¹,
Г. А. Журавлева¹

УДК 575.2:582.282.23

¹ Кафедра генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета;

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

✿ Для поиска белков, взаимодействующих с фактором терминации трансляции eRF1, кодируемых у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* геном *SUP45*, проводили скрининг библиотеки дрожжевых генов на мультикопийной плазмиде. Этот подход позволил выявить ген *ECM23*, увеличение экспрессии которого приводило к понижению жизнеспособности нонсенс-мутантов *sup45*. Сверхэкспрессия этого гена приводила также к антисупрессорному эффекту, не влияя при этом на количество белка eRF1 в клетке. Обсуждаются возможные механизмы влияния гена *ECM23* на жизнеспособность нонсенс-мутантов по гену *SUP45*.

✿ **Ключевые слова:** терминация трансляции; дрожжи; нонсенс-супрессия; *SUP45*; eRF1; eRF3.

ПОИСК НОВЫХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ПРОЦЕСС ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

ВВЕДЕНИЕ

Изучение путей регуляции различных клеточных процессов является ключевым направлением современной молекулярной биологии. Для поиска белковых факторов-регуляторов, оказывающих прямое или опосредованное влияние на работу других белков, в настоящее время используются различные подходы.

Терминация трансляции является заключительным этапом биосинтеза белка. Ключевым моментом при терминации трансляции является попадание стоп-кодона мРНК в А-участок рибосомы, в результате чего происходит гидролиз связи между тРНК и полипептидом и освобождение белка. Белковыми компонентами данного процесса являются факторы терминации I и II класса. Факторы терминации трансляции I класса узнают стоп-кодон в А-участке рибосомы. К ним относятся RF1 и RF2 у прокариот, а также eRF1 у эукариот. Факторы терминации II класса, к которым относятся RF3 у прокариот и eRF3 у эукариот, при участии ГТФ активизируют процесс терминации трансляции (см. обзоры: Inge-Vechtomov et al., 2003; Kisselev et al., 2003).

Фактор eRF1 распознает любой из трех стоп-кодонов (UAA, UAG или UGA) при его попадании в А-сайт рибосомы, что приводит к гидролизу связи пептидил-тРНК (Frolova et al., 1994). Фактор eRF3 является ГТФазой и стимулирует активность фактора eRF1, таким образом обеспечивая высвобождение новосинтезированной полипептидной цепи с рибосомы (Zhouravleva et al., 1995; Frolova et al., 1996). Для осуществления процесса терминации трансляции необходимо взаимодействие белков eRF1 и eRF3 (Stansfield et al., 1995; Zhouravleva et al., 1995). У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* фактор терминации трансляции eRF1 кодируется геном *SUP45* (Himmelfarb et al., 1985; Breining et al., 1986), а фактор eRF3 — геном *SUP35* (Kushnirov et al., 1988). Несмотря на то, что *SUP35* и *SUP45* являются жизненно важными для клетки, была показана возможность возникновения нонсенс-мутаций в этих генах (Stansfield et al., 1996; Moskalenko et al., 2003; Chabelskaya et al., 2004). Такие мутации, не являясь летальными, приводят к нарушению терминации трансляции.

За последние несколько лет значительный прогресс произошел в области изучения неканонических функций белков eRF1 и eRF3. Использование биохимических, генетических и молекулярно-биологических методов позволило идентифицировать ряд белков, взаимодействующих с факторами терминации трансляции. Посредством таких взаимодействий возможна координация терминации трансляции с другими клеточными процессами. Высокий уровень сходства аминокислотных последовательностей как eRF1, так и eRF3, в различных систематических группах эукариот предполагает сходство механизмов терминации трансляции. Целью данной работы является поиск новых факторов, влияющих на процесс терминации трансляции у дрожжей *S. cerevisiae*.

Поступила в редакцию 06.11.2012
Принята к публикации 10.01.2012

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. В работе использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* 31B-D1656 (*MATa ade1-14 trp1-289 ura3-52 leu2-3,112 sup45-105* [pRS316/SUP45]), штамм 1B-D1606 (*MATa ade1-14 his7-1 lys9-A21 A trp1-289 ura3-52 leu2-3,112*) и его производные, содержащие нонсенс-мутантные аллели *sup45-104*, *sup45-105* и *sup45-107*, а также штамм 1A-D1628 (*MATa ade1-14 his3 lys2 trp1-289 ura3-52 leu2-3, 112 SUP45:: HIS3* [pRS315/SUP45]) (Moskalenko et al., 2003). Аллели *ade1-14*, *his7-1*, *lys9-A21* и *trp1-289* несут нонсенс-мутации UGA, UAA, UAA и UAG соответственно. В работе использовали штаммы *Escherichia coli* DH5 α и C600 (Sambrook et al., 1989).

Плазмиды. Использовали центромерную плазмиду pRS316/SUP45, содержащую фрагмент дрожжевой ДНК с полноразмерным аллелем гена *SUP45* под контролем собственного промотора (Moskalenko et al., 2003), и мультикопийный вектор pRS425 (Sikorski et al., 1989). В работе был использован коммерческий банк генов дрожжей *S. cerevisiae* в мультикопийном векторе YEp13 (American Type Culture Collection, ATCC № 37323; <http://www.lgcstandards-atcc.org>). Банк состоял из набора плазмид, несущих фрагменты геномной ДНК дрожжей (5–20 т. п. н.), полученные при обработке генома рестриктазой *Sau3AI* и клонированные в вектор YEp13 по сайту рестрикции *BamHI*. Также были использованы плазмиды YGPM15111 из коммерческого банка дрожжевых генов Yeast Genomic Tiling Collection YSC № 4613, созданного на основе мультикопийного вектора pGP564.

Среды и условия культивирования. В работе использовали стандартные культуральные среды, применяемые при работе с дрожжами: полную среду (YAPD), минимальную среду (MD), синтетическую среду (SC) и селективные среды, не содержащие отдельных компонентов среды (Guthrie and Fink, 1991). Для отбора трансформантов, потерявших плазмиду pRS316 с маркером *URA3* использовали среду с 5-фтороротовой кислотой («Sigma», 5-FOA) в концентрации 1 г/л. Бактерии растили на полной среде (LB). Бактериальные трансформанты, содержащие плазмиду YEp13, несущую участок геномной ДНК, выявляли с использованием минимальной среды (M9) (Maniatis et al., 1982). Устойчивые к ампициллину трансформанты отбирали на средах LB и M9, содержащих ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Штаммы дрожжей выращивали при температуре 26 °C, штаммы бактерий — при 37 °C. Использованы стандартные генетические и молекулярные методы работы с дрожжами-сахаромицетами (Sherman et al., 1986; Rose et al., 1990). Высокоэффективную трансформацию дрожжей и выделение плазмидной ДНК из дрожжей проводили согласно ранее описанным методикам (Kaiser et al., 1994; Gietz et al., 1995).

Секвенирование концевых областей вставок в векторе YEp13 проводили в Центре методов молекулярной систематики животных ЗИН РАН «Таксон» на секвенаторе ABI PRISM с применением набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit.

Содержание белка. Получение клеточных лизатов, электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и вестерн-гибридизацию с поликлональными антителами к κ RF1 и моноклональными антителами T6074 к тубулину («Sigma») проводили согласно методике Moskalenko et al. (2003). Фотопленку сканировали и количественно оценивали интенсивность сигнала в программном пакете TotalLab.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация гена *ECM23*, как влияющего на жизнеспособность мутаций *sup45*

Для поиска факторов, изменяющих жизнеспособность нонсенс-мутантов по гену *SUP45*, штамм 31B-D1656, несущий нонсенс-мутацию *sup45-105* в хромосоме и центромерную плазмиду pRS316/SUP45, трансформировали банком генов дрожжей в мультикопийном векторе YEp13. В ходе скрининга банка, детально описанного ранее (Murina et al., 2010), было идентифицировано шесть трансформантов, у которых наблюдалось уменьшение частоты потери плазмиды pRS316/SUP45 по сравнению с контролем.

У части проанализированных трансформантов наблюдался нестабильный характер роста на среде с 5-FOA даже после нескольких проверок и повторной трансформации штамма 31B-D1656 [pRS316/SUP45] плазмидами, изолированными из дрожжевого банка генов. В связи с этим для дальнейшей работы были выбраны обладающие стабильным фенотипом трансформанты, содержащие плазмиду 14-Yep13.

В плазмиде 14-Yep13 идентифицирован ген *ECM23* и ген *RAD1*, у которого отсутствует 5'-концевая часть открытой рамки считывания. Продуктом гена *RAD1* является эндонуклеаза, специфичная к одноцепочечной ДНК, и участвующая в процессах репарации и рекомбинации в клетке (Schiestl et al., 1988). Точная функция продукта гена *ECM23* неизвестна. Предполагают, что белок *EcM23p* является негативным регулятором псевдогифального роста дрожжей (Canizarez et al., 2002). Также сообщается, что он может быть вовлечен в процесс биосинтеза клеточной стенки (Lussier et al., 1997). Данные о связи гена *ECM23* с процессом терминации трансляции отсутствуют. Поэтому было решено изучить влияние сверхэкспрессии этого гена на частоту потери плазмиды pRS316/SUP45 у штамма 31B-D1656 и жизнеспособность нонсенс-мутантов по гену *SUP45*.

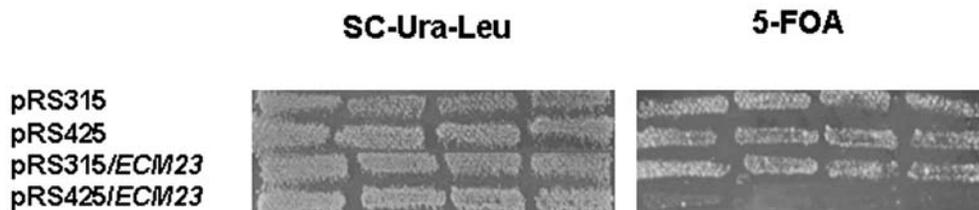


Рис. 1. Сверхэкспрессия гена *ECM23* снижает жизнеспособность мутанта *sup45-105*. Штамм 31B-D1656 (*sup45-105* [pRS316/*SUP45*]) трансформировали плазмидами pRS315/*ECM23*, pRS425/*ECM23*, pRS315 или pRS425, рост трансформантов оценивали на средах SC-Ura-Leu и на 5-FOA. В каждом случае было проанализировано по 12 независимых трансформантов, представлены типичные данные для четырех из них

Оценка влияния сверхэкспрессии гена *ECM23* на частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45* у штамма 31B-D1656

Для анализа влияния сверхэкспрессии гена *ECM23* на частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45* у штамма 31B-D1656 была использована мультикопийная плаزمида pRS425/*ECM23*. Для оценки влияния данного гена на характер роста трансформантов на среде с 5-FOA также была использована центромерная плазмида pRS315/*ECM23*. Штамм 31B-D1656 [pRS316/*SUP45*] трансформировали плазмидами pRS315/*ECM23* или pRS425/*ECM23*. Затем у трансформантов оценивали частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45* по характеру роста на среде с 5-FOA без лейцина (рис. 1). Контролем являлся штамм 31B-D1656 [pRS316/*SUP45*], трансформированный вектором pRS315 или pRS425.

У трансформантов штамма 31B-D1656, содержащих плазмиду pRS425/*ECM23*, наблюдалось снижение частоты потери плазмиды pRS316/*SUP45* по сравнению с контролем. Таким образом, сверхэкспрессия гена *ECM23* снижает частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45*, также как и в случае мультикопийной плазмиды 14-Yer13, несущей данный ген. Можно предполагать, что влияние плазмиды 14-Yer13 на характер роста трансформантов на среде с 5-FOA обусловлено присутствием в ней именно гена *ECM23*.

Также была проведена дополнительная проверка влияния участков геномной дрожжевой ДНК, содержащих исследуемые гены, на частоту потери плазмиды с геном *SUP45* дикого типа. Для этого был использован коммерческий банк дрожжевых генов Yeast Genomic Tiling Collection, созданный на основе мультикопийного вектора pGP564 (см. Материалы и методы). Бактериальные

трансформанты, содержащие плазмиды из коммерческого банка дрожжевых генов, были отсеяны из -70°C на среду LB с добавлением канамицина, а затем из них была выделена плазмидная ДНК, по два трансформанта для каждой из анализируемых плазмид. Далее штамм 31B-D1656 трансформировали выделенными плазмидами. Трансформантов отбирали на среде SC-Ura-Leu. Затем трансформантов перепечатывали на среду с 5-FOA и оценивали влияние плазмид, изолированных из банка, на частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45*. В качестве контроля были использованы трансформанты, несущие вектор pGP564. Были подтверждены данные о том, что сверхэкспрессия гена *ECM23* снижает частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45* (рис. 2)

Анализ влияния дизрупции гена *ECM23* на частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45* на фоне мутантной аллели *sup45-105*

Согласно нашему предположению, у трансформантов штамма 31B-D1656, содержащих плазмиду pRS425/*ECM23*, для которых наблюдается уменьшение частоты потери плазмиды pRS316/*SUP45*, происходит снижение жизнеспособности. В связи с этим, вероятно, что дизрупция генов *ECM23* будет приводить к повышению частоты потери плазмиды pRS316/*SUP45* на фоне мутантной аллели *sup45-105* и увеличению жизнеспособности штаммов.

Для проверки данного предположения были использованы штаммы 21A-D1670, содержащий дизрупцию генов *SUP45* и *ECM23*, и 17C-D1670, несущий дизрупцию гена *SUP45*. Все штаммы содержали плазмиду pRS316/*SUP45* для поддержания жизнеспособности. Эти штаммы трансформировали центромерной плазмидой pRS315/*sup45-105*. Затем у трансформантов оценивали частоту потери плазмиды

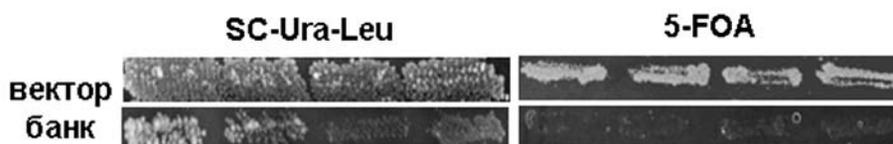


Рис. 2. Плазмиды, несущие вставку с генами *NCE4*, *MET12*, *RAD1*, *ECM23*, *ULP1*, *VTC3* («банк»), приводят к пониженной жизнеспособности штамма 31B-D1656 (*sup45-105* [pRS316/*SUP45*]) по сравнению с контролем («вектор»)

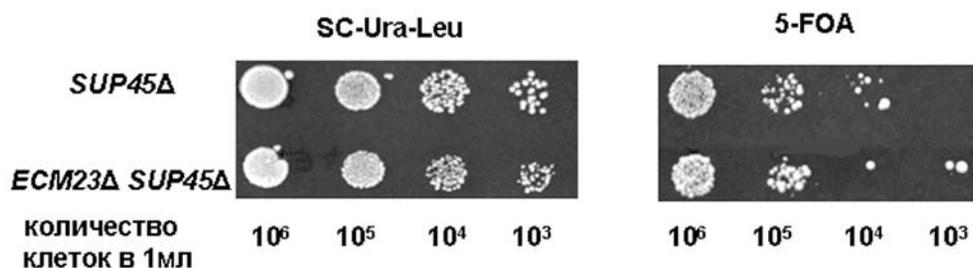


Рис. 3. Сверхэкспрессия гена *ECM23* приводит к антисупрессорному эффекту. Характер роста штаммов 102-1В-D1606 (*sup45-102*) и 107-1В-D1606 (*sup45-107*), трансформированных плазмидой рRS425/*ECM23* на серии селективных сред. В каждом случае было проанализировано по 12 независимых трансформантов, представлены типичные данные для одного из них в виде серии последовательных десятикратных разведений. Все штаммы, используемые в работе, несут нонсенс-мутантные аллели, содержащие стоп-кодоны трех типов (*ade1-14*, *his7-1*, *lys9-A21* и *trp1-289* несут нонсенс-мутации UGA, UAA, UAA и UAG соответственно)

рRS316/*SUP45* по характеру роста на среде с 5-FOA без лейцина (рис. 3). Отличий в характере роста трансформантов выявлено не было. Таким образом, частота потери плазмиды рRS316/*SUP45* на фоне дизрупции гена *ECM23* не изменяется по сравнению с контролем.

Влияние гена ECM23 на фенотипическое проявление мутаций sup45-n

Для анализа влияния гена *ECM23*, находящегося на плазмиде рRS425/*ECM23*, на уровень нонсенс-супрессии использовали штаммы 102-1В-D1606; 104-1В-D1606; 105-1В-D1606; 107-1В-D1606, несущие нонсенс мутации *sup45*. Также фенотипический анализ был проведен у штамма 1В-D1606, несущего ген *SUP45* дикого типа. Штаммы трансформировали плазмидой рRS425/*ECM23*. В качестве контроля использовались трансформанты, несущие вектор рRS425. Сегрегантов отбирали на селективной среде SC-Leu и далее перепечатавали на серию селективных сред для оценки уровня нонсенс-супрессии. Также проводили оценку характера роста трансформантов на средах YAPD, YAPD в 37 °С и СПГ.

При анализе характера роста трансформантов выяснилось, что трансформанты штамма, несущего ген *SUP45* дикого типа, и штаммов, несущих нонсенс-мутации *sup45-104* и *sup45-105* (штаммы 1В-D1606, 104-1В-D1606 и 105-1В-D1606 соответственно), демонстрируют сходный с контролем характер роста на всех средах независимо от присутствия плазмиды рRS425/*ECM23* (данные не представлены). Трансформанты, несущие нонсенс-мутации *sup45-102* и *sup45-107* и плазмиду рRS425/*ECM23* (штаммы 102-1В-D1606 и 107-1В-D1606 соответственно), характеризуются ослабленным по сравнению с контролем ростом на селективной среде SC-HisLeu (рис. 4). Также трансформанты демонстрируют термочувствительный фенотип и дыхательную некомпетентность, характерные для нонсенс-мутантов по гену *SUP45* (данные не представлены). Было отмечено снижение уровня супрессии мутации *his7-1* при сверхэкспрессии гена *ECM23* у штаммов, несущих нонсенс-мутации *sup45-102* и *sup45-107*.

Ген ECM23 не влияет на содержание белка eRF1 у штаммов, несущих ген SUP45 дикого типа или нонсенс-мутантные аллели sup45-104 и sup45-105.

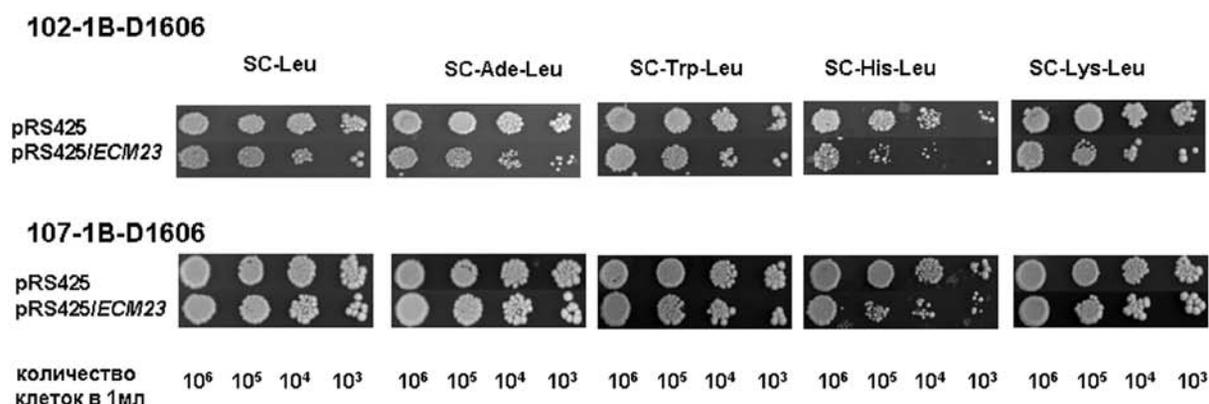


Рис. 4. Дизрупция гена *ECM23* не приводит к увеличению жизнеспособности мутантов *sup45*. Рост штаммов 17С-D1670 (*SUP45Δ*) и 21А-D1670 (*ECM23Δ SUP45Δ*), несущих плазмиду рRS315/*sup45-105*, на средах SC-Ura-Leu и с 5-FOA без лейцина. В каждом случае было проанализировано по 12 независимых трансформантов, представлены типичные данные для одного из них в виде серии последовательных десятикратных разведений

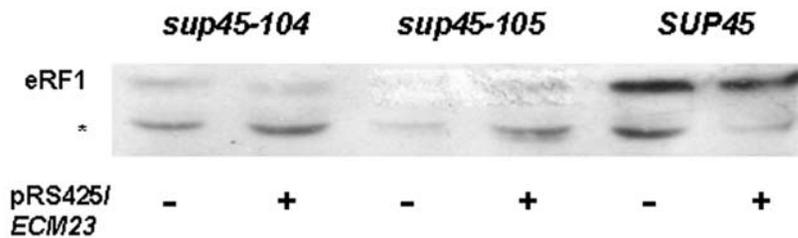


Рис. 5. Сверхэкспрессия гена *ECM23* не влияет на содержание белка eRF1. Анализ количества белка eRF1 у штаммов 1B-D1606, 1B-D1606-104 и 1B-D1606-105, трансформированных плазмидами pRS425 или pRS425/*ECM23*. Представлены результаты иммуноблотинга с использованием поликлональных антител к белку eRF1. (*) обозначена полоса, образованная в результате связывания антител с неизвестным белком, по которой контролировали количество нанесенных образцов

Согласно нашему предположению штаммы, несущие плазмиду pRS425/*ECM23*, характеризуются сниженной жизнеспособностью. Одним из возможных объяснений может быть снижение количество полноразмерного белка eRF1 в клетке.

Для анализа количества белка использовался штамм 1B-D1606, несущий ген *SUP45* дикого типа и штаммы 104–1B-D1606 и 105–1B-D1606, несущие нонсенс-мутантные аллели *sup45-104* и *sup45-105*. Штаммы трансформировали плазмидой pRS425/*ECM23*. В качестве контроля использовали трансформантов, несущих плазмиды pRS425 и pRS315. Сегрегантов отбирали на селективной среде SC–Leu. Для оценки количества белка eRF1 был применен стандартный метод иммуноблотинга с использованием поликлональных антител против белка eRF1 (рис. 5).

В результате проведенного анализа было отмечено снижение количества полноразмерной формы белка eRF1 у нонсенс-мутантов по отношению к штамму с геном *SUP45* дикого типа, что уже было показано ранее (Moskalenko et al., 2003) Различий в количестве белка между штаммами, трансформированными плазмидой pRS425/*ECM23* и контролем, обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы выявили, что сверхэкспрессия гена *ECM23* снижает частоту потери плазмиды с геном *SUP45* на фоне аллели *sup45-105*.

В настоящее время точная функция *EcM23p*, также известного как *Srd2p*, не определена. Первоначально, ген *ECM23* был идентифицирован при поиске генов, участвующих в процессе морфогенеза клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* (Lussier et al., 1997). Также было обнаружено, что белок *EcM23p* обладает достаточно высоким уровнем сходства с белком *Srd1p* в С-концевой области. Точная функция *Srd1p* не известна, однако показано, белок *Srd1p* *S. cerevisiae* участвует в процессинге пре-pPHK (Fabian et al., 1990). Мутации в гене *SRD1* супрессируют мутацию *gpr1-1*, которая приводит к чувствительности к повышенной температуре и нару-

шению в процессе созревания 27S пре-pPHK до 25S и 5.8S pPHK. В то же время мутации в *SRD1* не могут супрессировать делецию гена *rrp1*. Белок *Srd1p* содержит ДНК-связывающий мотив «цинковые пальцы», что позволяет отнести его к транскрипционным факторам. Однако было показано, что *Srd1p* не является транскрипционным регулятором гена *RRP1* (Hess et al., 1994). Авторы предполагают, что *Srd1p* может регулировать экспрессию генов, участвующих в процессинге pPHK, например генов, кодирующих белки, которые взаимодействуют с *Rrp1p*. Присутствие мотива «цинковые пальцы» характерно не только для белков, связывающихся с ДНК. Известно, что фактор инициации трансляции eIF2-β тоже содержит данный мотив, с помощью которого он, по-видимому, взаимодействует с мРНК (Donahue et al., 1988; Laurino et al., 1999). В связи с этим, существует гипотеза, что *Srd1p* регулирует экспрессию гена *RRP1* на уровне трансляции (Hess et al., 1994). Также, вероятно, что *Srd1p* может связываться с пре-pPHK и стимулировать ее процессинг.

Сходство *EcM23p* с *Srd1p* и другими белками, содержащими мотив «цинковые пальцы», позволяет предположить регуляторную функцию белка *EcM23p* в клетке. Показано, что *EcM23p* является негативным регулятором псевдогифального роста дрожжей, однако неизвестно каким образом осуществляется данная регуляция (Canizarez et al., 2002). В нашей работе выявлено, что сверхэкспрессия гена *ECM23* снижает частоту потери плазмиды pRS316/*SUP45* на фоне аллели *sup45-105*, и, по-видимому, жизнеспособность мутантного штамма. Мы предполагаем, что снижение частоты потери плазмиды pRS316/*SUP45* связано с увеличением эффективности терминации трансляции в клетке. В частности, наши данные об антисупрессорном эффекте сверхэкспрессии гена *ECM23*, по крайней мере в отношении стоп-кодона UGA, согласуются с этой гипотезой. Отсутствие антисупрессорного эффекта в случае стоп-кодонов UAG и UAA может быть связано с нуклеотидным окружением данных стоп-кодонов в аллелях *trp1-289*, *his7-1* и *lys9-A21*, которое, как известно, имеет большое значение в процессе узнавания терминирующего сигнала (см. обзор

Bertram et al., 2001). Возможно, что Ecm23p участвует в регуляции генов, кодирующих компоненты аппарата трансляции, и таким образом влияет на эффективность данного процесса.

Мы не обнаружили влияния дизрупции гена *ECM23* на частоту потери плазмиды *rRS316/SUP45* на фоне мутантной аллели *sup45-105*. Вероятно, что в клетке присутствуют белки со схожими функциями, которые компенсируют отсутствие продуктов данных генов. Дизрупция гена *ECM23*, возможно, компенсируется геном *SRD1*, который кодирует Srd1p, имеющий сходство с белком Ecm23p в С-концевой области (Lussier et al., 1997).

Согласно нашему предположению, трансформанты, несущие плазмиду *rRS425/ECM23*, характеризуются сниженной жизнеспособностью. В связи с этим мы предполагали, что у таких трансформантов может быть снижено количество полноразмерного белка eRF1 в клетке. Однако нам не удалось обнаружить влияния дополнительной экспрессии гена *ECM23* на количество белка eRF1.

Известно, что мутации в генах *SUP45* и *SUP35* *S. cerevisiae* обладают рядом плейотропных эффектов, таких как нарушения сегрегации хромосом в митозе, нарушения клеточного цикла, изменения цитоскелета (см. обзор von der Haar et al., 2007). Показано, что, например, eRF1 может взаимодействовать с белком легкой цепи миозина Mlc1p и участвовать в процессе цитокенеза (Valouev et al., 2004). В связи с этим считают, что у факторов терминации могут быть дополнительные функции в клетке помимо терминации трансляции. В настоящее время связь Ecm23p с фактором терминации eRF1 не изучена. Возможно, что eRF1 способен к взаимодействию с Ecm23p напрямую или опосредованно через другие белки для выполнения дополнительных функций вне процесса терминации трансляции. Однако данный вопрос нуждается в дальнейшем исследовании.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00237-а; 11-04-01905-а), программы Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы», ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (государственный контракт 16.740.11.0351).

ЛИТЕРАТУРА

- Bertram G., Innes S., Minella O. et al., 2001. Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition // *Microbiology*. Vol. 147. P. 255–269.
- Bradley M.E., Bagriantsev S., Vishveshwara N., Liebman S.W., 2003. Guanidine reduces stop codon read-through caused by missense mutations in SUP35 or SUP45 // *Yeast*. Vol. 20. P. 625–632.
- Breining P., Piepersberg W., 1986. Yeast omnipotent suppressor SUP1 (SUP45): nucleotide sequence of the wildtype and a mutant gene // *Nucleic Acids Res.* Vol. 14. P. 5187–5197.
- Canizares J.V., Pallotti C., Sainz-Pardo I. et al., 2002. The SRD2 gene is involved in *Saccharomyces cerevisiae* morphogenesis // *Arch. Microbiol.* Vol. 177. P. 352–357.
- Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., et al., 2004. Nonsense mutations in the essential gene SUP35 of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal // *Mol. Genet. Genomics*. Vol. 272. P. 297–307.
- Donahue T.F., Cigan A.M., Pabich E.K., Valavicius B.C., 1988. Mutations at a Zn (II) finger motif in the yeast eIF-2 beta gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process // *Cell*. Vol. 54. P. 621–632.
- Fabian G.R., Hess S.M., Hopper A.K., 1990. Srd1, a *Saccharomyces cerevisiae* suppressor of the temperature-sensitive pre-rRNA processing defect of *rrp1-1* // *Genetics*. Vol. 124. P. 497–504.
- Frolova L., Le Goff X., Rasmussen H. et al., 1994. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor // *Nature*. Vol. 372. P. 701–703.
- Frolova L., Le Goff X., Zhouravleva G. et al., 1996. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase // *RNA*. Vol. 2. P. 334–341.
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., Woods R.A., 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure // *Yeast*. Vol. 11. P. 355–360.
- Guthrie C., Fink G.R., 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. // San Diego: Academic Press.
- Himmelfarb H.J., Maicas E., Friesen J.D., 1985. Isolation of the SUP45 omnipotent suppressor gene of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of its gene product // *Mol. Cell Biol.* Vol. 5. P. 816–822.
- Hess S.M., Stanford D.R., Hopper A.K., 1994. SRD1, a *S. cerevisiae* gene affecting pre-rRNA processing contains a C2/C2 zinc finger motif // *Nucleic Acids Res.* Vol. 22. P. 1265–1271.
- Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M., 2003. Eukaryotic release factors (eRFs) history // *Biol. Cell*. Vol. 95. P. 195–209.
- Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A., 1994. Methods in yeast genetics. // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kikuchi Y., Shimatake H., Kikuchi A., 1988. A yeast gene required for the G1-to-S transition encodes a protein containing an A-kinase target site and GTPase domain // *EMBO J.* Vol. 7. P. 1175–1182.
- Kisselev L., Ehrenberg M., Frolova L., 2003. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? // *EMBO J.* Vol. 22. P. 175–182.

18. *Kushnirov V.V., Ter Avanesyan M.D., Telckov M.V.* et al., 1988. Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. Vol. 66. P. 45–54.
19. *Laurino J.P., Thompson G.M., Pacheco E., Castilho B.A.*, 1999. The beta Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Binds mRNA through the Lysine Repeats and a Region Comprising the C2-C2 Motif // Mol. and Cell. Biol. Vol. 19. P. 173–181.
20. *Lussier M., White A.M., Sheraton J.* et al., 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. Vol. 147. P. 435–450.
21. *Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.*, 1982. Molecular cloning a laboratory manual // Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
22. *Moskalenko S.E., Chabelskaya S.V., Inge-Vechtomov S.G.* et al., 2003. Viable nonsense mutants for the essential gene SUP45 of *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Mol. Biol. Vol. 4: 2.
23. *Murina O.A., Moskalenko S.E., Zhuravleva G.A.*, 2010. Overexpression of genes encoding tRNA (Tyr) AND tRNA (Gln) improves viability of nonsense mutants in SUP45 gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Biol. Vol. 44. P. 301–310.
24. *Rose M.D., Winston F.M., Hieter P., Sherman F.*, 1990. Methods in yeast genetics a laboratory course manual // Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
25. *Sherman F., Fink G.R., Hicks J.B.*, 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. // N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
26. *Schiestl R.H., Prakash S.*, 1988. RAD1, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in recombination // Mol. Cell Biol. Vol. 8. P. 3619–3626.
27. *Stansfield I., Jones K.M., Kushnirov V.V.* et al., 1995. The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae* // EMBO J. Vol. 14. P. 4365–4373.
28. *Stansfield I., Eurwilaichitr L., Akhmaloka, Tuite M.F.*, 1996. Depletion in the levels of the release factor eRF1 causes a reduction in the efficiency of translation termination in yeast // Mol. Microbiol. Vol. 20. P. 1135–1143.
29. *Valouev I.A., Urakov V.N., Kochneva-Perukhova N.V.*, et al., 2004. Translation termination factors function outside of translation: yeast eRF1 interacts with myosin light chain, Mlc1p, to effect cytokinesis // Mol. Microbiol. Vol. 53. P. 687–696.
30. *Von der Haar T, Tuite M.F.*, 2007. Regulated translational bypass of stop codons in yeast // Trends Microbiol. Vol. 15. P. 78–86.
31. *Wilson P.G., Culbertson M.R.*, 1988. SUF12 suppressor protein of yeast. A fusion protein related to the EF-1 family of elongation factors // J. Mol. Biol. Vol. 199. P. 559–573.
32. *Zhuravleva G., Frolova L., Le Goff X.* et al., 1995. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // EMBO J. Vol. 14. P. 4065–4072.

SEARCHING FOR NEW FACTORS WHICH INFLUENCE TRANSLATION TERMINATION IN YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE

*Moskalenko S. Ye., Murina O. A. ,
Askinazi O. L. , Zhuravleva G. A.*

✳ **SUMMARY:** In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* translation termination factor eRF1 is encoded by the essential gene *SUP45*. Here we applied multicopy yeast library to identify a new factor which interacts with the release factor eRF1 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We identified *ECM23* gene whose overexpression decreased viability of *sup45* nonsense mutants. We also showed that *ECM23* overexpression had antisuppressor effect but the level of eRF1 protein was the same as that in the wild-type cells. The mechanisms by which *ECM23* influence viability of *sup45* mutants are discussed.

✳ **KEY WORDS:** translation termination; yeast; nonsense suppression; *SUP45*, *eRF1*, *eRF3*.

✳ Информация об авторах

Москаленко Светлана Евгеньевна — к. б. н., с. н. с. Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова. Доцент кафедры генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: smoskalenko@mail.ru.

Мурина Ольга Анатольевна — студент. Кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: olga_murina@rambler.ru.

Аскинази Ольга Леонидовна — студент. Кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.

Журавлева Галина Анатольевна — д. б. н. Профессор кафедры генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: zhuravleva@rambler.ru.

Moskalenko Svetlana Yevgenyevna — Ph.D., Senior Researcher, St. Petersburg Branch Vavilov Institute of General Genetics (RAS), Assoc. Prof. Dept. of Genetics and Biotechnology. St.-Petersburg State University. 199034, St.-Petersburg, Universitetskaya nab, 7/9. Russia. E-mail: smoskalenko@mail.ru.

Murina Olga Anatolyevna — student. Dept. of Genetics and Biotechnology. St.-Petersburg State University. 199034, St.-Petersburg, Universitetskaya nab, 7/9. Russia. E-mail: olga_murina@rambler.ru.

Askinazi Olga Leonidovna — student. Dept. of Genetics and Biotechnology. St.-Petersburg State University. 199034, St.-Petersburg, Universitetskaya nab, 7/9. Russia.

Zhuravleva Galina Anatolyevna — Ph.D., Professor of the Dept. of Genetics and Biotechnology. St.-Petersburg State University. 199034, St.-Petersburg, Universitetskaya nab, 7/9. Russia. E-mail: zhuravleva@rambler.ru.