

Памяти Льва Львовича Киселева посвящаем

## ФАКТОР ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eRF1 РЕСНИЧНЫХ ИНФУЗОРИЙ *Blepharisma japonicum* УЗНАЕТ ВСЕ ТРИ СТОП-КОДОНА

© 2011 г. Б. Д. Елисеев<sup>1</sup>, Е. З. Алкалаева<sup>1</sup>, П. Н. Крючкова<sup>1,2</sup>, С. А. Лекомцев<sup>1</sup>, Wei Wang<sup>3</sup>, Ai-hua Liang<sup>3</sup>, Л. Ю. Фролова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>2</sup>Химический факультет Московского государственного университета

им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, P.R. China

Поступила в редакцию 12.11.2010 г.

Принята к печати 12.01.2011 г.

У организмов с вариантным генетическим кодом один или два стоп-кодона используются для кодирования аминокислотных остатков и не узнаются собственным фактором терминации трансляции первого класса (eRF1). Особенно много видов с вариантными генетическими кодами обнаружено среди ресничных инфузорий (Ciliata). Нами определена специфичность узнавания стоп-кодонов белком eRF1 ресничной инфузории *Blepharisma japonicum in vitro* в реконструированной эукариотической системе трансляции и *in vivo* с использованием двойной репортерной системы. Показано, что eRF1 *B. japonicum* сохранил способность узнавать все три стоп-кодона, хотя эффективность гидролиза пептидил-тРНК в присутствии кодона UGA снижена в эксперименте *in vitro*. Поскольку группа Heterotrichea, к которой относится и *B. japonicum*, находится на самой ранней ветви филогенетического древа ресничных инфузорий, мы предполагаем, что *B. japonicum* обладает универсальным генетическим кодом, как и возможный общий предок всех представителей типа Ciliata.

**Ключевые слова:** варианты генетических коды, терминация трансляции, ресничные инфузории, эукариотический фактор терминации трансляции eRF1.

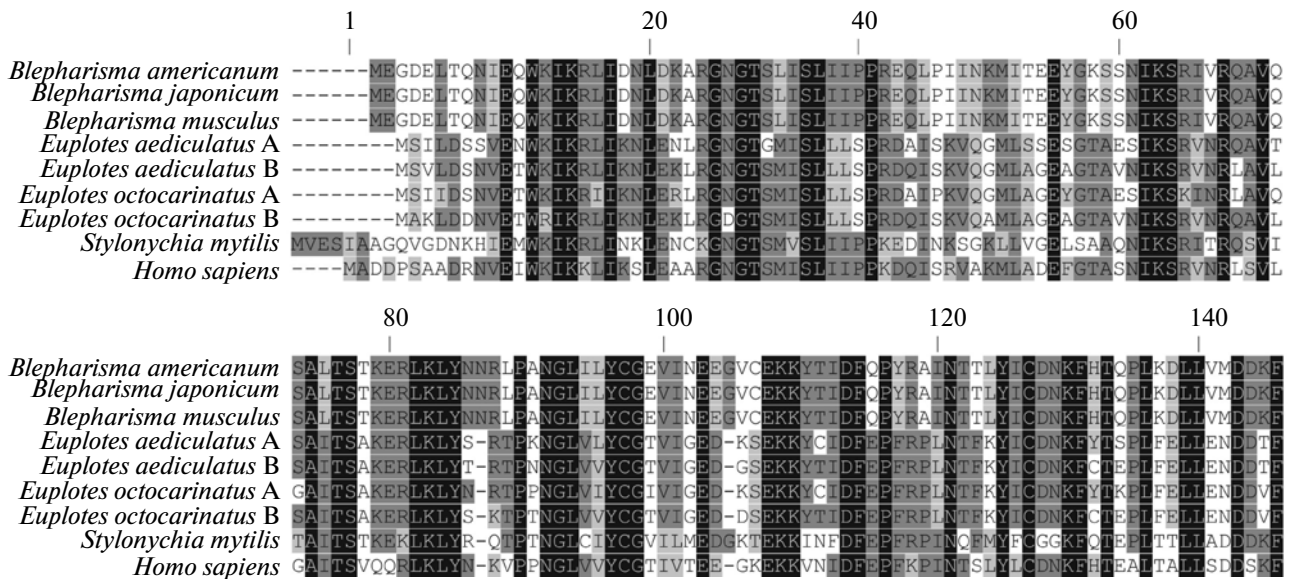
TRANSLATION TERMINATION FACTOR eRF1 OF THE CILIATE *Blepharisma japonicum* RECOGNIZES ALL THREE STOP CODONS, by B. D. Eliseev<sup>1</sup>, E. Z. Alkalaeva<sup>1</sup>, P. N. Kryuchkova<sup>1,2</sup>, S. A. Lekomtsev<sup>1</sup>, Wei Wang<sup>3</sup>, Ai-hua Liang<sup>3</sup>, L. Yu. Frolova<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: frolova@eimb.ru; <sup>2</sup>Chemical Department, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; <sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006 P.R. China). We have determined the type of stop codon specificity of *Blepharisma japonicum* translation termination factor eRF1 in an *in vitro* reconstituted eukaryotic translation system and in *in vivo* assay (the dual reporter system). We have shown that *B. japonicum* eRF1 retained specificity towards all three stop codons although efficiency of peptidyl-tRNA hydrolysis in the presence of UGA is reduced in an *in vitro* assay. We suggest that since the heterotrich *B. japonicum* represents the earliest diverged lineage on phylogenetic tree of ciliates, *B. japonicum* has the universal genetic code as ancestor group for all ciliates.

**Keywords:** variant genetic codes, translation termination, ciliated protozoa, eukaryotic translation termination factor eRF1.

У большинства организмов генетический код универсален — 61 кодон кодирует различные аминокислоты, а три кодона — UAA, UAG и UGA (стоп-кодона) — служат сигналами для остановки синтеза белка на рибосоме. Терминация трансляции проис-

ходит, когда в А-участок рибосомы поступает один из трех стоп-кодонов — UAA, UAG или UGA, который узнает фактор терминации первого класса — RF1. Факторы терминации первого класса индуцируют гидролиз сложноэфирной связи в пептидил-тРНК, находящейся в Р-участке рибосомы (см. обзоры [1–3]).

\* Эл. почта: frolova@eimb.ru



**Рис. 1.** Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей N-доменов факторов терминации трансляции eRF1 ресничных инфузорий (вариантный генетический код) и человека (универсальный генетический код). Нумерация согласно аминокислотной последовательности eRF1 человека. Идентичные, консервативные и полуконсервативные остатки обозначены черным, темно-серым и светло-серым соответственно.

У эукариот со стандартным генетическим кодом единственный фактор терминации первого класса (eRF1) узнает все три стоп-кодона. Однако существуют и организмы с вариантным генетическим кодом, у которых eRF1 способны декодировать один или два из трех стоп-кодонов, в то время как оставшийся стоп-кодон(ы) становится смысловым(и) и кодирует определенную аминокислоту(ы) (см. обзоры [4, 5]).

К организмам с вариантным генетическим кодом относятся некоторые одноклеточные водоросли и инфузории. Особенно много подобных видов оказалось среди ресничных инфузорий (тип Ciliata). Так, у *Paramecium*, *Tetrahymena* и *Stylonychia* UAA и UAG кодируют глутамин, у *Vorticella* и *Opisthionecta* UAA кодирует глутаминовую кислоту, а у *Euplotes* UGA кодирует цистеин или селеноцистеин [6, 7].

Показано, что eRF1 большинства видов эукариот с вариантным генетическим кодом узнают не все стоп-кодона. Например, eRF1 *Stylonychia mytilis* способен узнавать только стоп-кодон UGA (UGA-специфичность) [8], а eRF1 *E. aediculatus* — только UAA и UAG (UAR-специфичность) [9–12].

К ресничным относятся также представители рода *Blepharisma*, у которых кодон UAA используется как терминирующий [13]. Ген *eRF1 B. americanum* содержит в открытой рамке считывания два UGA-кодона, кодирующих триптофан [5]. На основании этих данных было высказано предположение о вариантности генетического кода у *Blepharisma*, подобной вариантности генетического кода у *Euplotes* (UAR-специфичность eRF1), но при этом UGA ко-

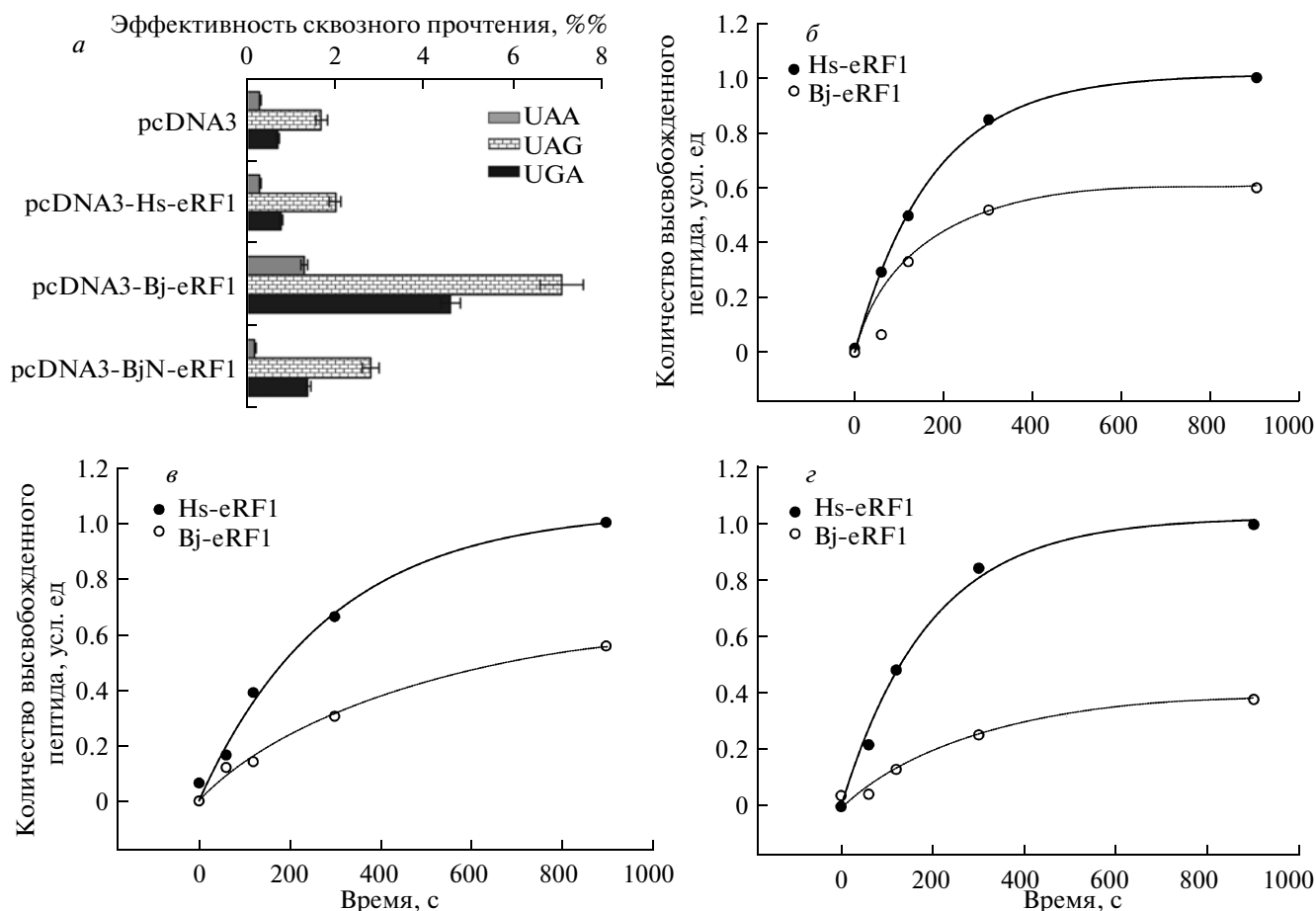
дирует триптофан, а не цистеин. Однако в открытой рамке считывания генов *eRF1 B. japonicum* и *B. musculus* стоп-кодона UGA не обнаружено, в этих положениях находится триптофановый кодон UGG [14, 15].

К настоящему моменту весьма мало известно об использовании кодонов UAA, UAG и UGA в геномах представителей рода *Blepharisma*. В геноме *B. americanum* секвенирован единственный ген — *eRF1*, а у всех видов рода *Blepharisma* определена нуклеотидная последовательность не более 50 белоккодирующих генов (из них 25 у *B. japonicum*), при этом все известные рамки считывания в геномах *Blepharisma* заканчиваются исключительно кодоном UAA (согласно данным базы NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Сравнение аминокислотных последовательностей N-доменов eRF1 *Euplotes* и *Blepharisma*, ответственных за узнавание стоп-кодонов, выявляет их очевидные различия (рис. 1).

Эффективность узнавания стоп-кодонов фактором терминации eRF1 *B. japonicum* (Bj-eRF1) определяли в двух тестах — *in vivo* и *in vitro*. Ген *eRF1 B. japonicum* амплифицировали, клонировали и экспрессировали в плазмиде pRSETC [14]. Функциональную активность факторов терминации определяли в двух тест-системах: *in vitro* — в реконструированной системе трансляции эукариот, описанной в работе [16], и *in vivo* — в двойной репортерной системе [8].

С целью определения функциональной активности Bj-eRF1 в системе *in vitro* белок, синтезированный в клетках *Escherichia coli*, выделяли и очи-



**Рис. 2.** Измерение функциональной активности eRF1 *Blepharisma japonicum in vivo* (а) и *in vitro* (б, в, з). а – Уровень сквозного прочтения каждого из трех стоп-кодонов, измеренный в клетках, трансфицированных исходной плазмидой pcDNA3 или плазмидами, несущими гены eRF1 *Homo sapiens* (pcDNA3-Hs-eRF1), *B. japonicum* (pcDNA3-Bj-eRF1) или химерного белка, состоящего из N-домена eRF1 *B. japonicum* и МС-доменов eRF1 человека (pcDNA3-BjN-eRF1). Процентное значение уровня сквозного прочтения рассчитывали относительно максимально возможного, принятого за 100%, в случае трансфекции клеток репортерным вектором pACTQ, в котором вместо стоп-кодона расположен смысловой кодон. б–з – Уровень гидролиза пептидил-тРНК в присутствии eRF1 *H. sapiens* и *B. japonicum*. Показано количество меченого тетрапептида ( $^{35}\text{S}$ Met-Val-His-Leu), высвободившегося из терминационных комплексов со стоп-кодонами UAA (б), UAG (в), UGA (з) в присутствии eRF1 человека (черные кружки) и eRF1 *B. japonicum* (белые кружки). Значение 1 соответствует максимальному количеству высвободившегося меченого пептида в присутствии eRF1 *H. sapiens*. Фоновое значение количества высвободившегося тетрапептида в отсутствие факторов терминации составляло 3–5% от максимального значения для eRF1 человека.

щали с помощью аффинной (Ni-NTA агароза) и ионообменной (monoQ) хроматографий, как описано для eRF1 человека [17]. Реконструированная эукариотическая система трансляции состояла из MVHL-stop мРНК, кодирующей тетрапептид метионил-валил-гистидил-лейцин и один из трех стоп-кодонов, суммарной тРНК, ацилированной Val, His, Leu и  $^{35}\text{S}$ Met, очищенных 40S и 60S рибосомных субъединиц кролика и факторов инициации и элонгации трансляции [16]. К очищенному претерминационному комплексу добавляли Bj-eRF1, смесь инкубировали, рибосомы осаждали, по количеству высвободившегося  $^{35}\text{S}$ Met-тетрапептида судили об эффективности гидролиза пептидил-тРНК и активности eRF1 (рис. 2). В качестве кон-

троля использовали eRF1 человека. Показано, что Bj-eRF1 индуцирует гидролиз пептидил-тРНК в системе *in vitro* в присутствии всех трех стоп-кодонов, хотя его активность заметно ниже, чем у eRF1 человека. В присутствии стоп-кодонов UAA и UAG активность Bj-eRF1 составила 50–60%, а в присутствии UGA – 35% от активности eRF1 человека (рис. 2). Кроме того, нами создана генетическая конструкция для синтеза *in vitro* химерного белка BjN-eRF1, состоящего из N-домена eRF1 *B. japonicum* и МС-доменов eRF1 человека. Фрагмент гена, кодирующий N-домен Bj-eRF1, ответственный за узнавание стоп-кодонов, клонировали в векторе pERF4b-Sal, описанном в [8], по сайтам NdeI и SalI. Активность химерного белка BjN-eRF1, выделен-

ного и очищенного, как и B<sub>j</sub>-eRF1, в системе *in vitro* составила 110, 100 и 65% относительно активности eRF1 человека в присутствии стоп-кодонов UAA, UAG и UGA соответственно. Мы предполагаем, что снижение активности полноразмерного B<sub>j</sub>-eRF1 по сравнению с активностью eRF1 человека и B<sub>j</sub>N-eRF1 в отношении всех трех стоп-кодонов связано с более низким сродством eRF1 инфузории *Blepharisma* к рибосомам млекопитающего (кролика), использованным в реконструированной эукариотической системе трансляции.

В системе *in vivo* измеряли влияние экспрессии чужеродного гена *Bj-eRF1* на уровень сквозного прочтения в культуре клеток человека. Для этого ген *Bj-eRF1* переклонировали в плазмиду pсDNA3 по сайтам HindIII и XhoI. Клетки эмбриональной почки человека HEK293 трансфицировали одновременно плазмидой pсDNA3, содержащей ген *Bj-eRF1*, и репортерным вектором pACstop. В векторе pACstop один из трех стоп-кодонов располагался между генами β-галактозидазы (*lacZ*) и люциферазы (*luc*) [18]. Активность β-галактозидазы и люциферазы измеряли согласно [19, 20]. Процентное значение уровня сквозного прочтения рассчитывали относительно максимально возможного уровня, принятого за 100%, в случае трансфекции клеток репортерным вектором pACTQ, в котором между генами *lacZ* и *luc* вместо стоп-кодона расположен смысловой кодон CAG. В контрольных опытах для оценки влияния экзогенного eRF1 человека на эффективность сквозного прочтения клетки HEK293 трансфицировали одновременно репортерным вектором и плазмидами pсDNA3 или pсDNA3-Hs-eRF1 (pсDNA3 со встроенным геном *eRF1* человека). Уровень сквозного прочтения в контрольных опытах составил 0.3, 1.7 и 0.7% для pсDNA3 и 0.3, 2.0 и 0.8% для pсDNA3-Hs-eRF1 в присутствии UAA, UAG и UGA соответственно (рис. 2). При экспрессии *Bj-eRF1* в клетках человека обнаружено примерно одинаковое увеличение уровня сквозного прочтения на всех трех стоп-кодонах: 1.3% (увеличение в 4 раза) на UAA, 7.1% (увеличение в 3.5 раза) на UAG и 4.6% (увеличение в 4.6 раза) на UGA (рис. 2). Вероятно, наблюдаемое в опытах *in vivo* увеличение уровня сквозного прочтения всех стоп-кодонов можно объяснить тем, что eRF1 *B. japonicum*, с одной стороны, конкурирует за узнавание стоп-кодонов с эндогенным eRF1, а с другой, не способен эффективно связываться с eRF3 человека. Действительно, в первичных структурах C-концевых доменов eRF1 *Blepharisma* и человека, ответственных за связывание с eRF3, имеются значительные различия. Таким образом, экспрессия *eRF1 B. japonicum* в клетках человека снижает эффективность работы эндогенных факторов терминации и увеличивает вероятность узнавания стоп-кодонов супрессорными тРНК. В случае химерного белка B<sub>j</sub>N-eRF1, содержащего C-домен eRF1 человека и поэтому способного связываться с eRF3 че-

ловека, уровень сквозного прочтения составил 0.2% (уменьшение в 1.5 раза) на UAA, 2.8% (увеличение в 1.4 раза) на UAG и 1.4% (увеличение в 1.7 раза) на UGA (рис. 2). Таким образом, при использовании B<sub>j</sub>N-eRF1 не происходит увеличения эффективности сквозного прочтения на всех трех стоп-кодонах. Это подтверждает наше предположение о том, что одинаковое увеличение уровня сквозного прочтения на всех трех стоп-кодонах в клетках человека может быть обусловлено сниженной эффективностью связывания B<sub>j</sub>-eRF1 с eRF3 человека.

Таким образом, фактор терминации трансляции B<sub>j</sub>-eRF1 способен узнавать все три стоп-кодона как в системе *in vivo*, так и *in vitro*, но при этом узнавание UGA *in vitro* несколько снижено по сравнению с UAA и UAG, т.е. B<sub>j</sub>-eRF1 отличается от eRF1 ресничных инфузорий *S. mytilis* и *E. aediculatus* с вариантным генетическим кодом, которые узнают только UGA или только UAA/UAG соответственно [8–12]. Поскольку группа Heterotrichea, к которой относится *B. japonicum*, находится на самой ранней ветви филогенетического древа ресничных инфузорий [21], можно предположить, что *B. japonicum* обладает универсальным генетическим кодом, как и возможный общий предок всех представителей типа Ciliata. Сравнение N-доменов eRF1 трех видов *Blepharisma* показывает их полную идентичность на уровне аминокислотной последовательности (рис. 1). Вероятно, все три фактора терминации трансляции обладают сходной специфичностью в узнавании стоп-кодонов, так как за это отвечает именно N-домен белка eRF1. Ранее в гене *eRF1 B. americanum* обнаружили два кодона UGA [5], которые соответствуют триптофановым кодонам UGG в генах двух других видов рода *Blepharisma* (*B. japonicum* и *B. musculus*). К сожалению, данные об использовании стоп-кодонов в других генах *B. americanum* отсутствуют, так как *eRF1* – единственный секвенированный ген у ресничных этого вида. По-видимому, необходимо повторно секвенировать участки гена *eRF1 B. americanum*, содержащие кодоны UGA, чтобы понять, действительно ли у этого вида ресничных инфузорий кодон UGA может кодировать триптофан.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (08-04-01091-а, 08-04-00375а), программой Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и грантом Президента Российской Федерации (МК-4705.2009.4).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisselev L., Ehrenberg M., Frolova L. 2003. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs release factors. *EMBO J.* 22, 175–182.
2. Nakamura Y., Ito K. 2003. Making sense of mimic in translation termination. *Trends Biochem. Sci.* 28, 99–105.

3. Poole E.S., Askarian-Amiri M.E., Major L.L., McCaughan K.K., Scarlet D.J., Wilson D.N., Tate W.P. 2003. Molecular mimicry in the decoding of translational stop signals. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* **74**, 83–121.
4. Inagaki Y., Doolittle W.F. 2001. Class 1 release factors in ciliates with variant genetic codes. *Nucl. Acids Res.* **29**, 921–927.
5. Lozupone C.A., Knight R.D., Landweber L.F. 2001. The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr. Biol.* **11**, 65–74.
6. Ohama T., Inagaki Y., Bessho Y., Osawa S. 2008. Evolving genetic code. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **84**, 58–74.
7. Turanov A.A., Lobanov A.V., Fomenko D.E., Morrison H.G., Sogin M.L., Klobutcher L.A., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2009. Genetic code supports targeted insertion of two amino acids by one codon. *Science*. **323**, 259–261.
8. Lekomtsev S., Kolosov P., Bidou L., Frolova L., Rousset J.P., Kisselev L. 2007. Different modes of stop codon restriction by the *Stylonychia* and *Paramecium* eRF1 translation termination factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 10824–10829.
9. Kervestin S., Frolova L., Kisselev L., Jean-Jean O. 2001. Stop codon recognition in ciliates: Euplotes release factor does not respond to reassigned UGA codon. *EMBO Rep.* **2**, 680–684.
10. Salas-Marco J., Fan-Minogue H., Kallmeyer A.K., Klobutcher L.A., Farabaugh P.J., Bedwell D.M. 2006. Distinct paths to stop codon reassignment by the variant-code organisms *Tetrahymena* and *Euplotes*. *Mol. Cell Biol.* **26**, 438–447.
11. Лекомцев С.А., Колосов П.М., Фролова Л.Ю., Биду Л., Руссе Ж.-П., Киселев Л.Л. 2007. Как фактор терминации трансляции eRF1 ресничных рода *Euplotes* не узнает стоп-кодон UGA. *Молекуляр. биология*. **41**, 1014–1022.
12. Eliseev B., Kryuchkova P., Alkalaeva E., Frolova L. 2011. A single amino acid change of translation termination factor eRF1 switches between bipotent and omnipotent stop-codon specificity. *Nucl. Acids Res.* **39**, 599–608.
13. Liang A., Heckmann K. 1993. *Blepharisma* uses UAA as a termination codon. *Naturwissenschaften*. **80**, 225–226.
14. Wang W., Chai B., Heckmann K., Liang A. 2004. Cloning, characterization and expression of the polypeptide release factor gene, *eRF1*, of *Blepharisma japonicum*. *Biotechnol. Lett.* **26**, 959–963.
15. Kim O.T., Yura K., Go N., Harumoto T. 2005. Newly sequenced eRF1s from ciliates: the diversity of stop codon usage and the molecular surfaces that are important for stop codon interactions. *Gene*. **346**, 277–286.
16. Alkalaeva E.Z., Pisarev A.V., Frolova L.Y., Kisselev L.L., Pestova T.V. 2006. *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell*. **125**, 1125–1136.
17. Frolova L.Y., Merkulova T.I., Kisselev L.L. 2000. Translation termination in eukaryotes: polypeptide release factor eRF1 is composed of functionally and structurally distinct domains. *RNA*. **6**, 381–390.
18. Cassan M., Delaunay N., Vaquero C., Rousset J.P. 1994. Translational frameshifting at the gag-pol junction of human immunodeficiency virus type 1 is not increased in infected T-lymphoid cells. *J. Virol.* **68**, 1501–1508.
19. Nguyen V.T., Morange M., Bensaude O. 1988. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.* **171**, 404–408.
20. Bidou L., Stahl G., Hatin I., Namy O., Rousset J.P., Farabaugh P.J. 2000. Nonsense-mediated decay mutants do not affect programmed-1 frameshifting. *RNA*. **6**, 952–961.
21. Tourancheau F.D., Tsao N., Klobutcher L.A., Pearlman R.E., Adoutte A. 1995. Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *EMBO J.* **14**, 3262–3267.