

## ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ *UPF* НА ПРОЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *SUP45*

© 2012 г. Г. А. Журавлева\*, В. А. Грызина

Кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета,  
Санкт-Петербург, 199034

Поступила в редакцию 28.06.2011 г.

Принята к печати 28.07.2011 г.

Эукариотические клетки обладают специальным механизмом деградации мРНК, содержащей преждевременные стоп-кодоны, так называемым NMD (от nonsense-mediated mRNA decay). У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* эффективность работы этого механизма зависит от узнавания преждевременных стоп-кодонов аппаратом трансляции и от взаимодействия факторов терминирования трансляции eRF1 и eRF3 с белками Upf1, Upf2 и Upf3. Ранее мы обнаружили, что уменьшение содержания белка eRF1 у нонсенс-мутантов *sup45* приводит к нарушению NMD. В представленной работе показано, что делеции генов *UPF1* или *UPF2* увеличивают жизнеспособность мутантов *sup45*, в то время как эффект делеции гена *UPF3* является аллель-специфичным. При помощи двугибридной системы установлено, что во взаимодействии с eRF1 участвуют аминокислотные остатки 1-555 белка Upf1. Делеции любого из генов *UPF* не влияют на содержание белка eRF1, приводя к аллосупрессии мутации *ade1-14*. Отсутствие белка Upf1 не влияет на синтетическую летальность мутаций *sup45* и приона [*PSI*<sup>+</sup>]. Возможно, что отсутствие Upf1 (или его активатора Upf2) приводит к более эффективному образованию комплекса терминирования трансляции и, как следствие, к повышенной жизнеспособности клеток, содержащих мутантные факторы терминирования.

**Ключевые слова:** терминирование трансляции, деградация мРНК, eRF1, *SUP45*, *UPF1*, *UPF2*, *UPF3*, NMD.

THE INFLUENCE OF *UPF* GENES ON THE SEVERITY OF *SUP45* MUTATIONS, by G. A. Zhouravleva\*, V. A. Gryzina (Department of Genetics and Breeding, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia; \*e-mail: zhouravleva@rambler.ru). Eukaryotic cells possess special mechanism of the degradation of mRNAs containing premature termination codons (PTCs) – nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the activity of this pathway depends on the recognition of the PTC by the translational machinery and interaction of translation termination factors eRF1 and eRF3 with Upf1, Upf2 and Upf3 proteins. Previously we have shown that decreasing of eRF1 amount causes an impairment of NMD. Here we show that deletion of either *UPF1* or *UPF2* increased viability of *sup45* mutants, while effect of *UPF3* deletion is allele-specific. Two-hybrid data have shown that aa 1-555 of eRF1 participate in interaction with Upf1. Deletion of each *UPF* gene leads to allosuppression of *ade1-14* mutation without changing eRF1 amount. Depletion of Upf1 does not influence synthetic lethality of *sup45* and prion [*PSI*<sup>+</sup>]. It is possible that the absence of Upf1 (or its activator Upf2) leads to more effective formation of the translation termination complex and, consequently, increased viability of cells containing mutant termination factors.

**Keywords:** translation termination, mRNA degradation, eRF1, *SUP45*, *UPF1*, *UPF2*, *UPF3*, NMD.

Терминирование трансляции у эукариот осуществляется с помощью двух факторов – eRF1 и eRF3 (см. обзор [1]). У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* эти белки кодируются генами *SUP45* и *SUP35* соответственно (см. обзор [2]). За декодирование стоп-кодонов у эукариот отвечает единственный фактор, eRF1 (или Sup45 у дрожжей), в то время как ГТРаза eRF3 (Sup35) стимулирует терминирование трансляции, образуя комплекс с eRF1. Гены *SUP45* и *SUP35* жизненно необходимы, делеция С-концевого домена как у eRF1, так и у eRF3 при-

водит к гибели клетки (см. обзор [2]). Несмотря на это, ранее мы выделили нелетальные спонтанные нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35*, которые уменьшают количество eRF1 или eRF3 [3, 4]. Большинство из изученных мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к увеличению уровня эндогенных тРНК, что может объяснять жизнеспособность клеток с нонсенс-мутациями в генах *SUP45* и *SUP35* [5].

Количество функционального белка Sup35 в клетках дикого типа уменьшается при изменении конформации Sup35p и, как следствие, при возникновении приона [*PSI*<sup>+</sup>]. В результате подоб-

\* Эл. почта: zhouravleva@rambler.ru

**Таблица 1.** Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Генотип
1А-Д1628	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 (UGA) his3 leu2 lys2 trp1(UG) ura3 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45]</i>
Y06214	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 ura3<math>\Delta</math>0 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 upf1::kanMX4</i>
Y01905	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 ura3<math>\Delta</math>0 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 upf2::kanMX4</i>
Y04702	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 ura3<math>\Delta</math>0 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 upf3::kanMX4</i>
3Б-Д1658	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45]</i>
3В-Д1658	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45] upf1::kanMX4</i>
4А-Д1659	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45]</i>
4Б-Д1659	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 lys2 met15<math>\Delta</math> ura3 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45] upf2::kanMX4</i>
18А-Д1660	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 ura3 lys2 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45]</i>
3А-Д1660	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 ura3 lys2 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45] upf3::kanMX4</i>
1-1А-Д1628	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 sup45::HIS3 [pRS316/SUP45] upf1::kanMX4</i>
OT55	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 [PSI<sup>+</sup>]<sup>W</sup></i>
OT56	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-14 his3<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 [PSI<sup>+</sup>]<sup>S</sup></i>
HF7c	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101, 52 his3-200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-901 ura3-52 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 URA3::(GAL4 17-mers)<sub>3</sub>-CYC1-lacZ</i>

\**sup45::HIS3*, *upf1::kanMX4*, *upf2::kanMX4* и *upf3::kanMX4* – обозначения соответствуют замещению гена *SUP45* на ген *HIS3* и генов *UPF1*, *UPF2* и *UPF3* на ген *kanMX4*. Для удобства дальнейшего изложения замещения генов обозначены как “делеция гена *SUP45* (*sup45 $\Delta$* )” или “делеция гена *UPF* (*upf $\Delta$* )”.

ного превращения уменьшается количество функционально активного белка Sup35p и, таким образом, снижается эффективность терминации трансляции, что приводит к супрессии преждевременных стоп-кодонах (см. обзор [6]). В зависимости от эффективности супрессии нонсенс-мутаций, а также от размера агрегатов и количества растворимой формы Sup35p выделяют различные варианты, или штаммы [*PSI*<sup>+</sup>] (см. обзор, [7]), обозначаемые как [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> (от strong) и [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup> (от weak) [8].

Уменьшение содержания белка eRF1 у нонсенс-мутантов *sup45* (*sup45-n*) приводит к пониженной жизнеспособности клеток [*psi*<sup>-</sup>] [3] и гибели клеток [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> [9]. Такой же эффект наблюдается и при совмещении некоторых миссенс-мутаций *sup45* с прионом [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>. Подобная несовместимость, или синтетическая летальность, связана, возможно, с уменьшением до критического предела количества обоих функциональных факторов терминации трансляции [10].

Жизнеспособность клеток *sup45-n* [*psi*<sup>-</sup>] может значительно увеличиться в случае делеций генов *UPF* [11], основных участников процесса NMD у дрожжей. Клетки эукариот обладают специальным механизмом узнавания и разрушения мРНК, содержащих преждевременные стоп-кодонах (ПТС). Этот механизм получил название NMD (от nonsense-mediated mRNA decay (см. обзоры [12–14])). В процессе NMD участвуют белки Upf1, Upf2 и Upf3, способные взаимодействовать с eRF3, тогда как с eRF1 взаимодействует только Upf1 (см. обзор

[12]). Делеция любого из трех генов *UPF* приводит к стабилизации тех мРНК, которые обычно подвергаются деградации с помощью NMD, не влияя при этом на стабильность других мРНК [15–19]. Генетические эксперименты показали, что белки Upf1, Upf2 и Upf3 представляют собой необходимые компоненты NMD; мутации или делеции генов *UPF* хотя и не нарушают жизнеспособность, но в ряде случаев приводят к нонсенс-супрессии (см. обзоры [20, 21]). В свою очередь, мутация в GTP-связывающем участке eRF3 подавляет взаимодействие этого белка с eRF1 и не только нарушает терминацию трансляции, но также замедляет деградацию мРНК, в том числе и посредством NMD [22]. Мутации в генах *SUP45* и *SUP35* вызывают нарушение NMD [11, 23]. В представленной работе мы детально изучили эффекты генов *UPF1-3* на проявление миссенс-мутаций *sup45* (*sup45-m*) в клетках [*psi*<sup>-</sup>] и [*PSI*<sup>+</sup>].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы дрожжей *S. cerevisiae***, использованные в работе, указаны в табл. 1. Штамм 1А-Д1628 содержит делецию гена *SUP45*, компенсированную плазмидой с геном *SUP45* дикого типа, либо с мутантными аллелями *sup45*, описанными ранее [3, 24]. Штаммы OT56 и OT55 – изогенные производные штамма 74-D694 [25]. Штамм OT56 [*PSI*<sup>+</sup>] несет сильный супрессор [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>, прион [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup> штамма OT55 является слабым супрессором. Штамм OT56 [*psi*<sup>-</sup>] был получен на основе

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Номер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Локализация
154	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	R kanMX4
155	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	F kanMX4
201	CAGCCAACAACGTTGAAGATTC	F UPF1
202	GCGGAAACAATCCCAATAAAAAC	R UPF1 (внутренний)
203	CCGAAGTTCAGGATTTTGATGC	F UPF1 (внутренний)
204	GATAGATGCACCTCCGGAAG	R UPF1
205	TTCTTAGGGCATGAGGATGA	F UPF2
206	CCAAGGACGCCTCACTTAA	R UPF2 (внутренний)
207	TCCAAGCCAAAGAAGATTGC	F UPF2 (внутренний)
208	CTGCGAGAACAACGATGAG	R UPF2
209	TGTTTGCTGATCAAAAGTTGAAA	F UPF3
210	TGCCTTTGCTATTGTTGTTG	R UPF3 (внутренний)
211	CTCAGTCATCATCCGCTCAA	F UPF3 (внутренний)
212	GCTCATTGCGCAGCTTTT	R UPF3
213	AATATACTTTTATATTACATCAATCATTGTCAT TATCAACGGATCCCCGGGTAAATTA	F UPF1- <u>kanMX4</u>
214	AAGCCAAGTTTAAACATTTTATTTTAAACAGGGTTC ACCGAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R UPF1- <u>kanMX4</u>

OT56 [*PSI*<sup>+</sup>] путем элиминации фактора [*PSI*<sup>+</sup>]. Штаммы Д1658, Д1659 и Д1660 получены при скрещивании штаммов Y06214, Y01905 или Y04702 со штаммом 1А-Д1628 (*sup45Δ* [pRS316/SUP45]) соответственно. Замещение генов *UPF1*, *UPF2* и *UPF3* на кассету *kanMX4* контролировали по устойчивости к генетицину (200 мг/л) и по образованию специфического продукта при ПЦР. В качестве матрицы для ПЦР использовали хромосомную ДНК, выделенную из клеток дрожжей в соответствии со стандартной методикой [26]. Праймерами служили различные комбинации олигонуклеотидов, соответствующие нуклеотидным последовательностям генов *UPF1*, *UPF2*, *UPF3*, а также участкам кассеты *kanMX4* (табл. 2). Штамм 1-1А-Д1628 – производное 1А-Д1628, в котором ген *UPF1* замещен геном *kanMX4*. Линейный фрагмент для замещения хромосомного гена *UPF1* на кассету *kanMX4* синтезировали с помощью ПЦР следующим образом. Матрицей служила плазмида pFA6a-*kanMX4*, а праймерами – олигонуклеотиды 213 и 214, у которых 20 н. с 3'-конца комплементарны концам кассеты *kanMX4* (подчеркнуты в табл. 2), а 40 н. с 5'-конца комплементарны участкам, фланкирующим ген *UPF1* на хромосоме.

**Плазмиды.** Центромерные плазмиды, содержащие ген *SUP45* дикого типа либо один из мутантных аллелей (*sup45-n* или *sup45-m*), были сконструированы ранее [3, 24] на основе плазмид pRS315 и pRS316. Мутации *sup45*, использован-

ные в работе, представлены в табл. 3. Плазмиды pRS316/UPF1, pRS316/UPF2, pRS316/UPF3 содержат гены *UPF1-3* под контролем собственных промоторов [27]. Плазмиды для двугибридной системы, кодирующие eRF1, eRF3 и фрагменты Upf1, описаны ранее [28, 29]. Для индукции фактора [*PSI*<sup>+</sup>] использовали плазмиду pRS316/*P<sub>GAL1</sub>SUP35(NM)*, которая содержит участок дрожжевого гена *SUP35*, кодирующий NM-доме-

Таблица 3. Спонтанные мутации *sup45*, проанализированные в работе

Мутантный аллель	Замена нуклеотидного остатка:	Замена аминокислотного остатка:
<b>Нонсенс-мутации</b>		
<i>sup45-101</i>	796 G→T	266 Glu→(TAA)
<i>sup45-102</i>	159 T→A	53 Tyr→(TAA)
<i>sup45-104</i>	848 T→A	283 Leu→(TAA)
<i>sup45-105</i>	1153 G→T	385 Glu→(TAA)
<i>sup45-107</i>	950 T→G	317 Leu→(TGA)
<b>Миссенс-мутации</b>		
<i>sup45-103</i>	62 T→C	21 Leu→Ser
<i>sup45-113</i>	144 G→T	48 Met→Ile
<i>sup45-111</i>	193 C→T	65 Arg→Cys
<i>sup45-116</i>	185 G→C	62 Arg→Thr
<i>sup45-115</i>	209 C→T	70 Ser→Phe

ны соответствующего белка, под галактозным промотором [30]. Плазмида pFA6a-kanMX4 [31] использована в качестве матрицы при синтезе линейного фрагмента для получения делеции гена *UPF1*.

**Среды и условия культивирования.** В работе использовали стандартные среды для выращивания дрожжей: полную среду (YAPD), синтетическую среду (SC) и селективные среды, не содержащие отдельных компонентов среды SC [32]. Для получения твердых сред добавляли агар из расчета 30 г/л среды. Дрожжи выращивали при температуре 25°C. Для замещения плазмид использовали селективную среду, содержащую 1 мг/мл 5-фтороротовой кислоты (5-FOA, "Sigma"). Методика трансформации дрожжей описана ранее [33]. Экспрессию фрагмента гена *SUP35*, находящегося под контролем промотора *P<sub>GAL1</sub>*, индуцировали с использованием синтетической среды, селективной для поддержания плазмиды pRS316/*P<sub>GAL1</sub>SUP35(NM)* (SC-Ura), и содержащей галактозу (20 г/л) вместо глюкозы. Взаимодействие делеционных производных *Upf1* с белком eRF1 изучали с помощью двугибридной системы [34] с использованием дрожжевого штамма HF7c [35]. Взаимодействие оценивали по эффективности экспрессии репортерного гена *HIS3*, приводящей к росту клеток на среде без гистидина в присутствии 3-аминотриазола (3-AT, "Sigma").

**Замещение плазмид.** Гаплоидные штаммы, в которых делеция гена *SUP45* компенсируется центромерной плазмидой с селективным маркером *URA3* и аллелем дикого типа *SUP45*, использовали в опытах по замещению плазмид. Эти штаммы трансформировали плазмидами [*CEN LEU2 sup45*]. Трансформанты, отобранные на селективной среде – Ura-Leu, пересевали на среду с 5-FOA, что приводило к отбору клонов, потерявших плазмиду с *URA3* [26]. Рост трансформантов также оценивали с использованием 10-кратных разведений ночной культуры ( $OD_{600} = 1$ ). Суспензию клеток высевали на среду с 5-FOA, чтобы оценить способность мутаций *sup45* поддерживать жизнеспособность клеток дрожжей в зависимости от присутствия генов *UPF1*, *UPF2* или *UPF3*.

**Индукция [*PSI*<sup>+</sup>].** Штамм 1-1A-D1628 трансформировали плазмидой pRS316/*P<sub>GAL1</sub>SUP35(NM)*. Трансформированные клетки переносили на среду SC+Gal, селективную для плазмиды, и инкубировали в течение 3 сут. Далее трансформанты клонировали на среде YPD и отбирали клоны, прототрофные по аденину. В дальнейших опытах использовали субклоны, потерявшие плазмиду pRS316/*P<sub>GAL1</sub>SUP35(NM)* и хорошо росшие на среде без аденина на 4-й день инкубации, что говорит об индукции "сильного" фактора [*PSI*<sup>+</sup>]. Для подтверждения того, что наблюдаемая нон-

сенс-супрессия обусловлена именно присутствием фактора [*PSI*<sup>+</sup>], клетки подвергали трехкратному пассированию на среде, содержащей 5 мМ хлорид гуанидина. После этого клонировали выросшие клетки на среде YAPD и проверяли способность клонов расти на среде без аденина. В большинстве клонов отсутствовала супрессия нонсенс-мутации *ade1-14*, что свидетельствует об элиминации фактора [*PSI*<sup>+</sup>].

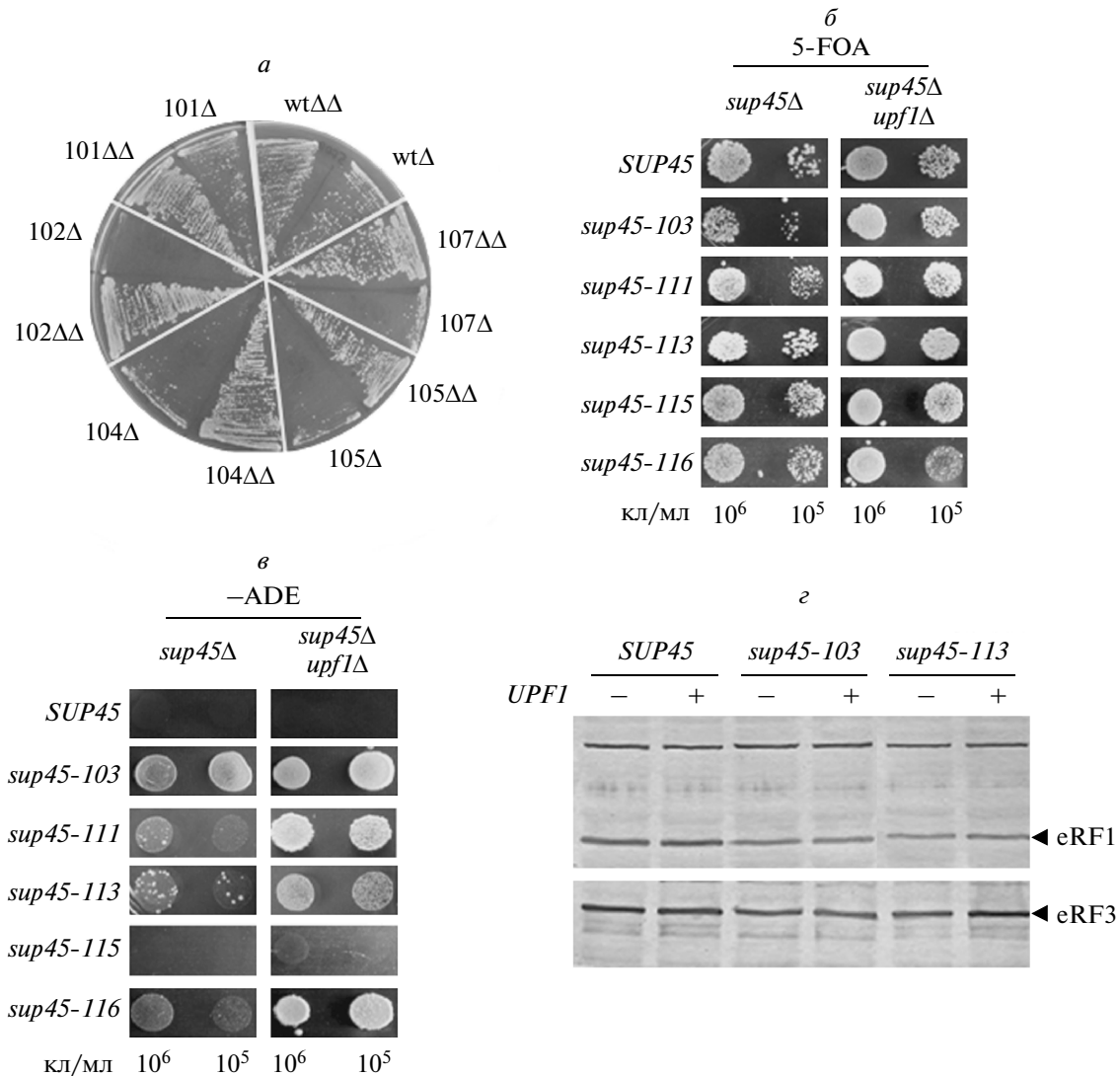
**Анализ белков.** Выделение суммарного белка из клеток дрожжей, проведение денатурирующего электрофореза и перенос белков описаны ранее [3]. Белки идентифицировали с использованием поликлональных антител к полноразмерному белку eRF1 [3], eRF3 [23] и моноклональных антител к тубулину [36].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Делеция гена UPF1 приводит к увеличению жизнеспособности мутантов sup45*

Ранее мы получили нонсенс- и миссенс-мутации в жизненно важном гене *SUP45* дрожжей *S. cerevisiae*. Эти мутации приводили к супрессии РТС [3, 24] и нарушению NMD. В представленной работе мы оценили влияние генов системы NMD на фенотипическое проявление мутаций *sup45*. Эффект делеции гена *UPF1* на жизнеспособность мутантов *sup45* мы оценили с использованием опытов по замещению плазмид в штаммах, содержащих одиночные мутации *sup45*, а также в штаммах с двойными мутациями *sup45 upf1Δ*. Проведено детальное изучение пяти нонсенс-мутаций, приводящих к появлению двух различных стоп-кодонов – UAA и UGA, и пяти миссенс-мутаций.

Два изогенных штамма дрожжей 3В-Д1658 (*sup45Δ* pRS316/*SUP45*) и 3В-Д1658 (*sup45Δ upf1Δ* pRS316/*SUP45*) трансформировали плазмидами pRS315, содержащими ген *SUP45* (контроль), или различные мутации *sup45*. Трансформированные клетки высевали на среду с 5-FOA. Рост штаммов на этой среде свидетельствовал о том, что они могут терять плазмиду с геном *SUP45* дикого типа. Все трансформанты штаммов, содержащих *sup45Δ*, могли расти на среде с 5-FOA, т.е. все изученные мутации способны замещать немутантный аллель *SUP45*. Тем не менее, эффективность замещения нонсенс-аллелей была достаточно низкой (рис. 1а) по сравнению с миссенс-аллелями (рис. 1б). Введение мутации *upf1Δ* значительно увеличивало жизнеспособность мутантов *sup45*, несущих мутации различного типа (рис. 1а, б). Делеция гена *UPF1* не приводила к супрессии мутации *ade1-14* в штамме дикого типа (рис. 1в), однако, она вызывала усиление супрессии у всех изученных мутантов (этот эффект наименее выражен у *sup45-115*, для которого характерно от-



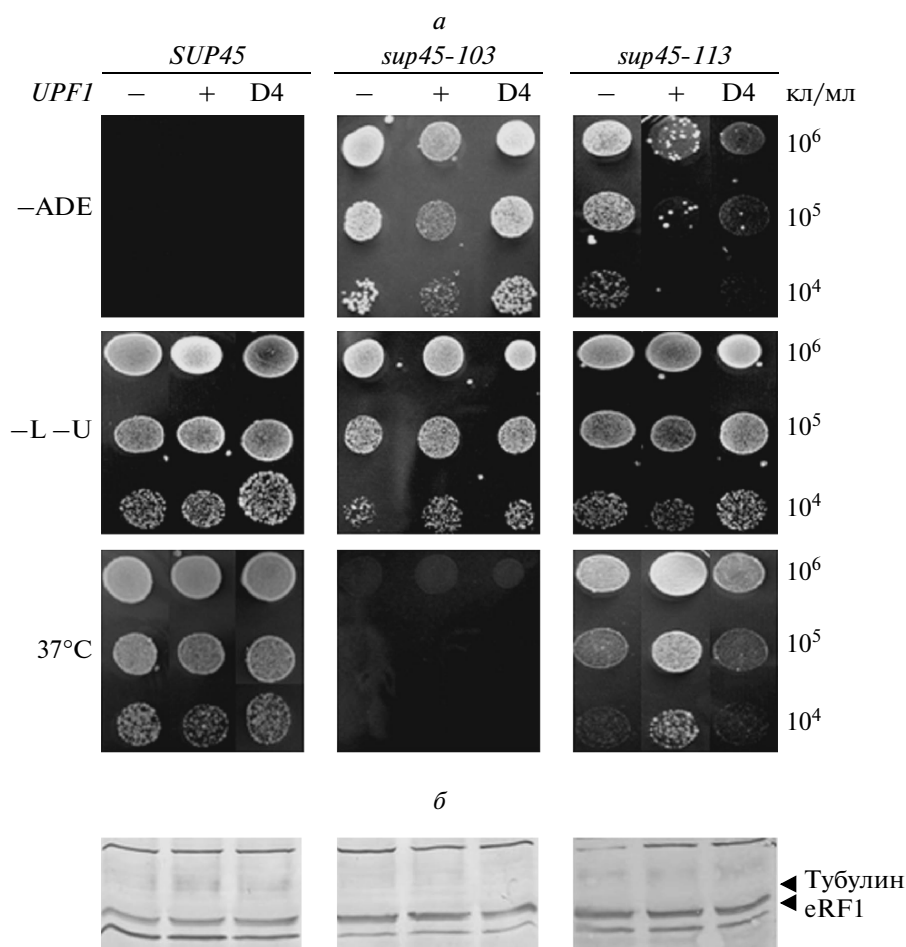
**Рис. 1.** Делеция гена *UPF1* приводит к увеличению жизнеспособности мутантов *sup45*. *а, б* – Изогенные штаммы 3В-Д1658 (*sup45Δ*) и 3В-Д1658 (*sup45Δ upf1Δ*), содержащие делецию гена *SUP45* и плазмиду pRS316/*SUP45*, трансформировали плазмидами pRS315, несущими различные аллели *sup45*. Рост трансформантов оценивали с помощью клоноирования (*а*) или 10-кратных разведений (*б*) на среде с 5-FOA. Представлены типичные данные для одного из пяти изученных трансформантов. *а* – Указаны нонсенс-аллели гена *SUP45*: wt – ген *SUP45* дикого типа; 101, 102, 104, 105, 107 – нонсенс-мутации в гене *SUP45*. Δ – штамм 3В-Д1658 (*sup45Δ*), ΔΔ – штамм 3В-Д1658 (*sup45Δ upf1Δ*). *б* – Указаны миссенс-аллели гена *SUP45*. *в* – Рост трансформантов, отобранных на среде с 5-FOA (панель *б*), на синтетической среде без аденина. *г* – Содержание белков eRF1 и eRF3 в клонах, отобранных на среде с 5-FOA, анализировали с помощью Вестерн-гибридизации. Тубулин использовали в качестве контроля нанесения.

сутствие супрессии мутации *ade1-14* [24]). Отсутствие связи между обнаруженным эффектом и изменением содержания белков eRF1 и/или eRF3 мы определяли, оценивая содержание этих белков в клетках дрожжей с мутациями *sup45-103* и *sup45-113* на фоне гена *UPF1* дикого типа и его делеции. Оказалось, что делеция гена *UPF1* не влияет на содержание белков eRF1 и eRF3 как в клетках дикого типа, так и у мутантов *sup45*. Следует отметить уменьшение содержания белка eRF1 в клетках дрожжей, содержащих мутации *sup45-103*

и *sup45-113*, по сравнению с клетками дикого типа (рис. 1г).

#### Делеция гена *UPF1* приводит к аллосупрессии мутации *ade1-14* у миссенс-мутантов *sup45*

Влияние одиночных мутаций *sup45* и двойных мутаций *sup45 upf1Δ* на эффективность супрессии на одном и том же генетическом фоне мы сравнивали с помощью трансформации штамма 3В-Д1658 (*sup45Δ upf1Δ* pRS315/*SUP45*) плазмидами pRS316, pRS316/*UPF1* и pRS316/*D4*. *D4* – это до-



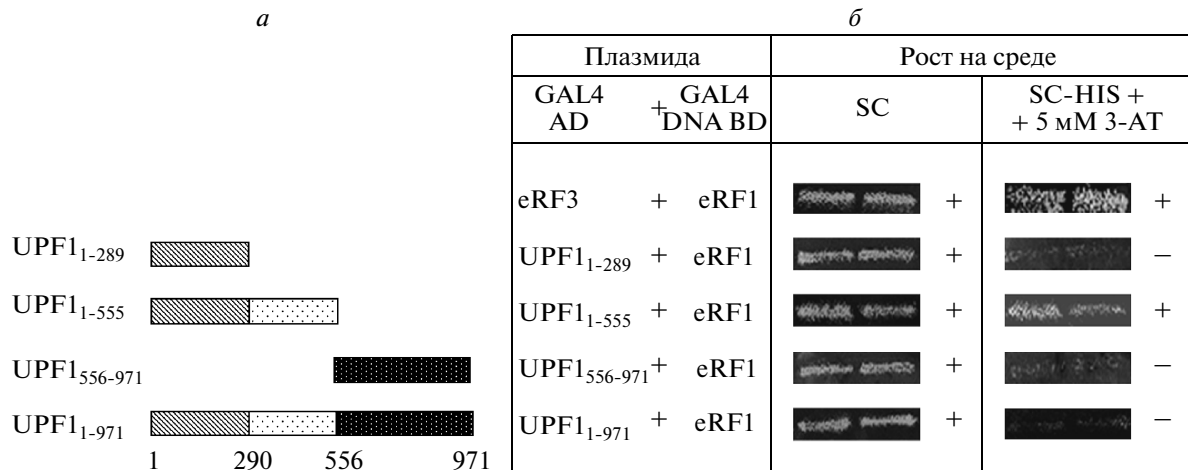
**Рис. 2.** Делеция гена *UPF1* приводит к аллосупрессии мутации *ade1-14* у миссенс-мутантов *sup45*. *a* – Штамм 3В-Д1658 (*sup45Δ upf1Δ* pRS315/SUP45) и его производные (*sup45Δ upf1Δ* pRS315/*sup45*) трансформировали плазмидами pRS316, pRS316/*UPF1* и pRS316/D4 (обозначены *UPF1*–, *UPF1*+ и *UPF1* D4 соответственно). Показан рост трансформантов на синтетической среде без аденина (–ADE), лейцина (–L –U) или на YPD при 37°C. Использовали серийные десятикратные разведения суспензий клеток одинаковой плотности. Представлены типичные данные для одного из пяти изученных трансформантов. *б* – Содержание белка eRF1 в тех же трансформантах, что и на панели *a*, анализировали с помощью Вестерн-гибридизации.

минантная мутация в геликазном домене Upf1, которая приводит к замене остатка аргинина в положении 779 на цистеин (R779C) [19]. Рост трансформантов оценивали на синтетической среде без аденина. Мутации *sup45* приводили к супрессии мутации *ade1-14*, которая усиливалась в отсутствие Upf1 (рис. 2*a*, –ADE). Следует отметить, что этот эффект не зависит от содержания белка eRF1 в клетке, которое во всех проверенных вариантах остается неизменным (рис. 2*б*). Интересно, что делеция *UPF1* вызывала усиление термочувствительности мутанта *sup45-113*, и этот эффект не компенсировался присутствием мутантного Upf1-D4 (рис. 2*a*, 37°C). У мутанта *sup45-103* этот эффект невозможно было оценить из-за его полной неспособности к росту при непермиссивной температуре. Мутантный Upf1-D4 по-разному влиял на супрессию: в случае мутации

*sup45-113* антисупрессорный эффект был сопоставим с эффектом белка Upf1 дикого типа и не наблюдался у мутанта *sup45-103*.

#### Выявление домена Upf1, участвующего во взаимодействии с eRF1

Участок Upf1, взаимодействующий с eRF1, выявляли с использованием двугибридной системы. Штамм HF7C, содержащий плазмиду pGBT9, которая кодирует полноразмерный eRF1, слитый с ДНК-связывающим доменом Gal4, трансформировали плазмидами, кодирующими делеционные варианты Upf1 (рис. 3*a*), слитые с активирующим доменом Gal4. Котрансформантов проверяли по способности к росту на среде с 3-АТ (рис. 3*б*). Положительным контролем служила плазида, кодирующая eRF3. Большинство



**Рис. 3.** Взаимодействие eRF1 с делеционными вариантами Upf1 в двугибридной системе. *а* – Схема расположения фрагментов Upf1, проанализированных в двугибридной системе. *б* – Плазмиды, кодирующие eRF1, слитый с ДНК-связывающим (GAL4 DNA BD) доменом белка Gal4p, использовали для трансформации штамма HF7C совместно с плазмидами, кодирующими белки eRF3 (позитивный контроль) или Upf1, слитые с активирующим доменом (GAL4 AD) Gal4p. Взаимодействие оценивали по способности трансформантов расти в присутствии 5 мМ 3-АТ.

фрагментов Upf1 не могли связываться с eRF1 за исключением фрагмента 1-555, способного взаимодействовать с eRF1. Ранее показали, что мутация K436A значительно снижает способность Upf1 взаимодействовать с eRF1 [37], поэтому можно предположить, что именно N-концевая область Upf1 (аминокислоты – 1555) участвует во взаимодействии с eRF1.

#### **Делеция гена *UPF1* не влияет на синтетическую летальность мутаций *sup45* и фактора [*PSI*<sup>+</sup>]**

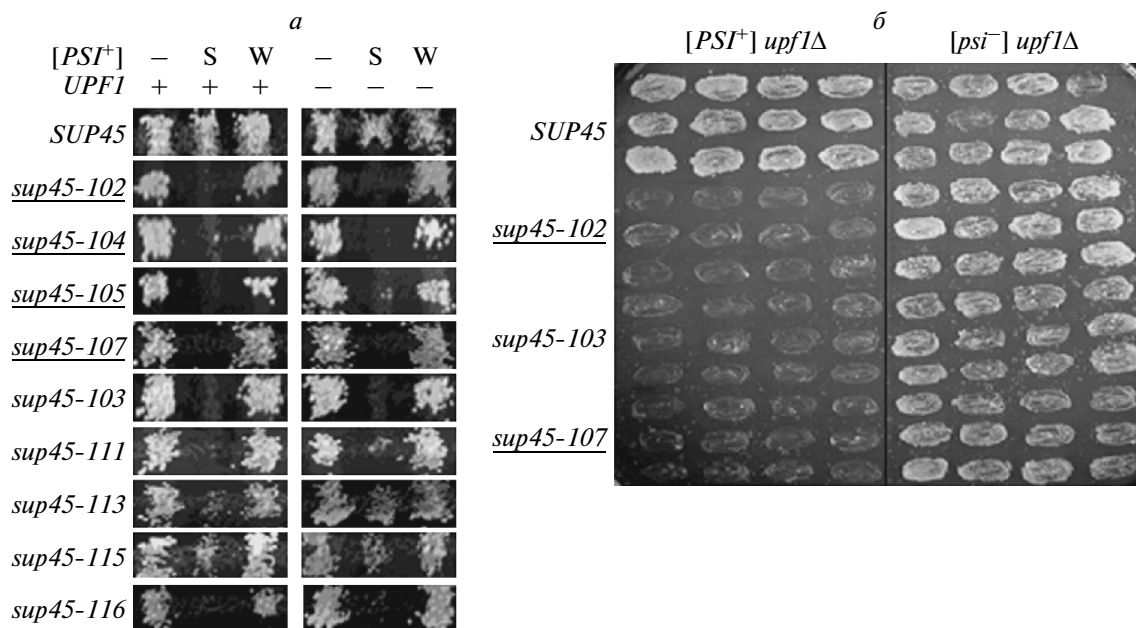
Мы проверили жизнеспособность клеток, несущих мутантные аллели гена *SUP45* и прион [*PSI*<sup>+</sup>] на фоне делеции гена *UPF1*. С этой целью производные штаммов 1A-D1628 (*sup45Δ* [pRS315/*SUP45*]) и 1-1A-D1628 (*sup45Δ upf1Δ* [pRS315/*SUP45*]), несущих плазмиды с мутантными аллелями гена *SUP45*, скрещивали со штаммами, содержащими различные варианты [*PSI*<sup>+</sup>]. В качестве таких тестерных штаммов использовали изогенные штаммы OT55 и OT56, различающиеся по “силе” [*PSI*<sup>+</sup>]: штамм OT56 содержит “сильный” [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>, OT55 – “слабый” [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup>. Как показано ранее [9], штаммы без делеции гена *UPF1* и несущие ген *SUP45* дикого типа или его мутантные аллели, образуют жизнеспособные гибриды со штаммом, несущим [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup> (рис. 4а). Со штаммом, содержащим “сильный” вариант [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>, жизнеспособные гибриды способны образовывать только штаммы, несущие ген *SUP45* дикого типа или слабые нонсенс-супрессорные мутации: *sup45-113* и *sup45-115*. Мы не обнаружили отличий в росте гибридов между тестерными

штаммами и штаммами с делецией гена *UPF1* от штаммов с геном *UPF1* дикого типа (рис. 4а). Таким образом, делеция гена *UPF1* не оказывает видимого влияния на жизнеспособность гибридов.

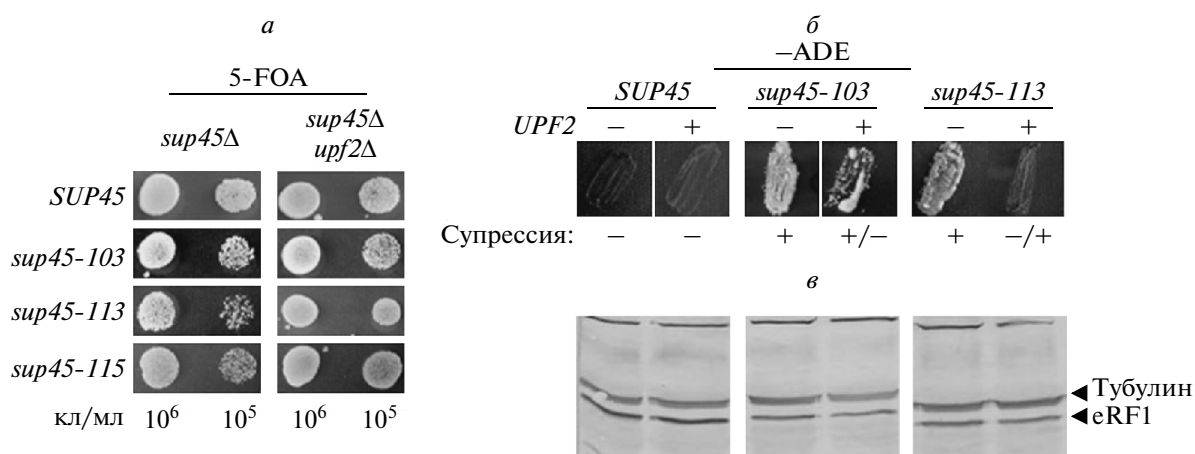
Мы провели аналогичные опыты на гаплоидном штамме с прионом [*PSI*<sup>+</sup>] и делецией гена *SUP45*. С этой целью мы индуцировали фактор [*PSI*<sup>+</sup>] в штамме 1-1A-D1628 (*sup45Δ upf1Δ* [pRS316/*SUP45*]), после чего трансформировали его производными pRS315, содержащими ген *SUP45* дикого типа или мутантные аллели *sup45*. На среде с 5-FOA в штамме [*psi*<sup>-</sup>] происходило эффективное замещение аллеля *SUP45* дикого типа на нонсенс-аллели *sup45*. В то же время, в штамме [*PSI*<sup>+</sup>] *upf1Δ* такое замещение невозможно (рис. 4б), как и в штамме [*PSI*<sup>+</sup>], содержащем ген *UPF1*, что показано ранее. Полученные данные свидетельствуют, что делеция гена *UPF1* не влияет на синтетическую летальность мутаций *sup45* и фактора [*PSI*<sup>+</sup>].

#### **Влияние делеции генов *UPF2* и *UPF3* на жизнеспособность мутантов *sup45***

Известно, что для работы системы NMD требуется не только белок Upf1, но также Upf2 и Upf3. Чтобы сравнить эффекты делеций *UPF2* или *UPF3* с эффектом делеции гена *UPF1* на жизнеспособность мутантов *sup45*, мы трансформировали штаммы 4A-D1659 (*sup45Δ*), 4Б-D1659 (*sup45Δ upf2Δ*), 18A-D1660 (*sup45Δ*) и 3A-D1660 (*sup45Δ upf3Δ*), содержащие плазмиду pRS316/*SUP45*, плазмидами pRS315, несущими мутантные аллели *sup45*. Трансформанты Leu<sup>+</sup> Ura<sup>+</sup> вы-



**Рис. 4.** Делеция гена *UPF1* не влияет на синтетическую летальность фактора  $[PSI^+]$  и мутаций *sup45*. *a* – Скрещивания штаммов 1A-D1628 (*sup45Δ* pRS315/*SUP45*), 1-1A-D1628 (*sup45Δ upf1Δ* pRS315/*SUP45*) (обозначены (*UPF1+*) и (*UPF1-*) соответственно) и их производных, несущих плазмиды pRS315/*sup45*, с  $[PSI^+]$  и  $[psi^-]$ -вариантами штаммов OT55  $[PSI^+]^W$  и OT56  $[PSI^+]^S$  (S – strong, W – weak  $[PSI^+]$ ). *б* – Замещение аллеля гена *SUP45* дикого типа на мутантные аллели *sup45* в  $[PSI^+]$ - и  $[psi^-]$ -производных штамма 1-1A-D1628 (*upf1Δ*). Представлен рост 12 трансформантов по каждому сочетанию плазмид на среде, содержащей 5-FOA. Номера мутаций указаны слева, нонсенс-мутации подчеркнуты.

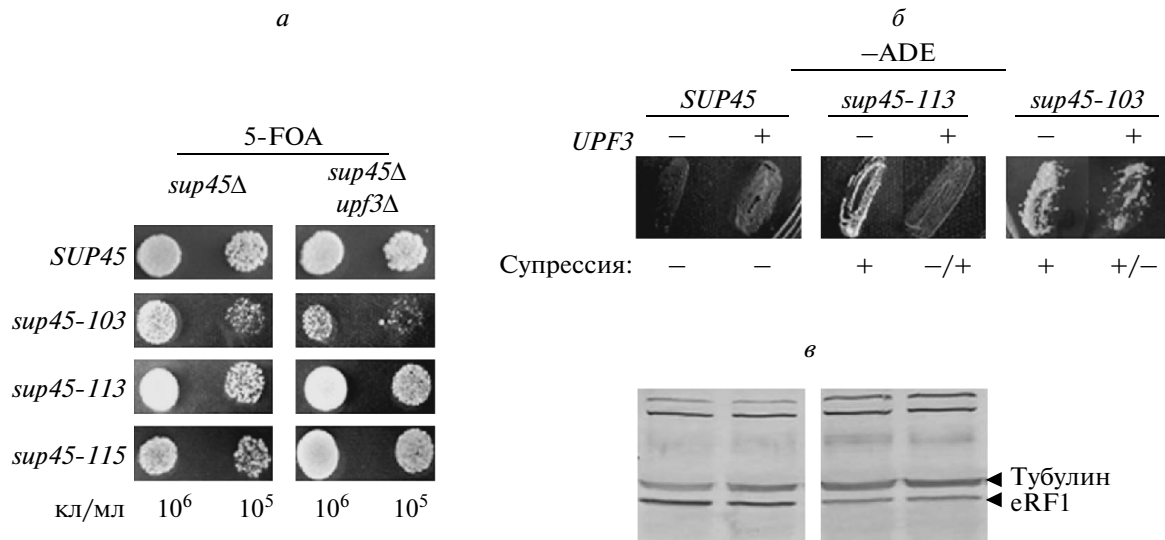


**Рис. 5.** Делеция гена *UPF2* увеличивает жизнеспособность миссенс-мутантов *sup45*. *a* – Штаммы 4A-D1659 (*sup45Δ* pRS316/*SUP45*) и 4Б-D1659 (*sup45Δ upf2Δ* pRS316/*SUP45*) трансформировали плазмидами pRS315/*SUP45* с различными аллелями *sup45*. Рост трансформантов оценивали с помощью десятикратных разведений на среде с 5-FOA. Представлены типичные данные для одного из пяти изученных трансформантов. *б* – Производные штамма 4Б-D1659 (*sup45Δ upf2Δ* pRS315/*SUP45* и pRS315/*sup45*), отобранные, как показано на панели *a*, трансформировали плазмидами pRS316 или pRS316/*UPF2*. Показан рост трансформантов на синтетической среде без аденина (-ADE). *в* – Содержимое белка eRF1 в тех же трансформантах, что и на панели *б*, анализировали с помощью Вестерн-гибридизации.

севали на среду с 5-FOA для селекции против плазмиды pRS316. Комбинирование делеции *UPF2* с мутациями *sup45* приводило к увеличению жизнеспособности клеток, содержащих мутации *sup45-103*, *sup45-113* и *sup45-115* (рис. 5а), что

проявлялось в ускорении роста на среде с 5-FOA по сравнению с клетками, содержащими ген *UPF2*. Влияние одиночных мутаций *sup45* и двойных мутаций *sup45 upf2Δ* на эффективность супрессии на одном и том же генетическом фоне мы





**Рис. 6.** Делеция гена *UPF3* уменьшает жизнеспособность миссенс-мутантов *sup45*. *a* – Штаммы 18А-Д1660 (*sup45* $\Delta$  рRS316/*SUP45*) и 3А-Д1660 (*sup45* $\Delta$  *upf3* $\Delta$  рRS316/*SUP45*) трансформировали плазмидами рRS315/*SUP45* с различными аллелями *sup45*. Рост трансформантов оценивали с помощью десятикратных разведений на среде с 5-FOA. Представлены типичные данные для одного из пяти изученных трансформантов. *б* – Производные штамма 3А-Д1660 (*sup45* $\Delta$  *upf3* $\Delta$  рRS315/*SUP45* и рRS315/*sup45*), отобранные, как показано на панели *a*, трансформировали плазмидами рRS316 или рRS316/*UPF3*. Показан рост трансформантов на синтетической среде без аденина (-ADE). *в* – Содержание белка eRF1 в тех же трансформантах, что и на панели *б*, анализировали с помощью Вестерн-гибридизации.

сравнивали с использованием трансформации штамма 4Б-Д1659 (*sup45* $\Delta$  *upf2* $\Delta$  рRS315/*SUP45*) плазмидами рRS316 или рRS316/*UPF2*. Рост трансформантов оценивали на синтетической среде без аденина. Делеция гена *UPF2* в клетках дикого типа не приводила к супрессии мутации *ade1-14* (рис. 5б). В отсутствие *Upf2* мутации *sup45* приводили к супрессии мутации *ade1-14*, однако появление *Upf2* вызывало антисупрессорный эффект (рис. 5б). Чтобы убедиться, что обнаруженный эффект не связан с изменением содержания белка eRF1, мы оценили содержание этого белка в клетках дрожжей с мутациями *sup45-103* и *sup45-113* на фоне гена *UPF2* дикого типа и его делеции и не обнаружили значительных отличий от клеток дикого типа (рис. 5в).

При делеции гена *UPF3* замещение плазмид происходило крайне неэффективно в случае мутации *sup45-103*, и трансформанты обладали низкой скоростью роста (рис. 6а). В случае мутаций *sup45-113* и *sup45-115* эффективность замещения возрастала в отсутствие белка *Upf3*. Чтобы сравнить влияние одиночных мутаций *sup45* и двойных мутаций *sup45 upf3* $\Delta$  на эффективность супрессии на одном и том же генетическом фоне, мы трансформировали штамм 3А-Д1660 (*sup45* $\Delta$  *upf3* $\Delta$  рRS315/*SUP45*) плазмидами рRS316 или рRS316/*UPF3*. Рост трансформантов оценивали на синтетической среде без аденина. Делеция гена *UPF3* в клетках дикого типа не приводила к супрессии мутации *ade1-14* (рис. 6б). В отсутствие *Upf3* мутации *sup45-103* и *sup45-113* приводили к

супрессии мутации *ade1-14*, однако появление *Upf3* вызывало антисупрессорный эффект (рис. 6б). Мы оценили содержание белка eRF1 в клетках дрожжей с мутацией *sup45-113* на фоне гена *UPF3* дикого типа и его делеции, и не обнаружили значительных отличий от клеток дикого типа (рис. 6в). В клетках с мутацией *sup45-103* такую оценку провести не удалось из-за крайне низкой скорости их роста. Таким образом, делеция гена *UPF3* по-разному влияет на жизнеспособность различных миссенс-мутантов *sup45*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее мы показали, что нонсенс-мутации в жизненно важных генах *SUP45* и *SUP35* не приводят к гибели клеток в отсутствие супрессорных тРНК [3, 4]. При этом жизнеспособность мутантов *sup35* и некоторых мутантов *sup45* увеличивалась в случае делеции гена *UPF1* [11, 23]. Результаты, полученные в нашей работе на более полной выборке мутантов *sup45*, свидетельствуют о том, что отсутствие продукта гена *UPF1* повышает эффективность замещения плазмид с аллелем гена *SUP45* дикого типа на его мутантные производные. Этот эффект не связан с изменением содержания белков eRF1 и eRF3, так как у миссенс-мутантов *sup45-103* и *sup45-113*, как и у ранее охарактеризованных нонсенс-мутантов *sup45-102* и *sup45-107* [11], содержание белков eRF1 и eRF3 не зависит от присутствия гена *UPF1*. Кроме того, эффект делеции гена *UPF1* не является, по-види-

тому, аллель-специфичным, поскольку он обнаружен как у всех изученных миссенс-мутантов, так и у всех нонсенс-мутантов. Все изученные миссенс-мутации локализованы в N-концевом домене eRF1. Мутация *sup45-103* (L21S), приводящая к замене остатка лейцина, консервативно у 20 видов эукариот [38], на серин, находится в центре участка  $\alpha 1$  [39]. Предполагается, что этот район (аминокислоты 9–38 eRF1 человека) участвует во взаимодействии eRF1 с рибосомой [40]. Четыре остальных мутации (*sup45-113*, M48I; *sup45-116*, R62T; *sup45-111*, R65C; *sup45-115*, S70P) локализованы в кармане, обеспечивающем взаимодействие с АТФ и стоп-кодоном [39, 41]. Используемые нонсенс-мутации приводят к появлению в клетке укороченных фрагментов eRF1 наряду с остаточными количествами полноразмерного eRF1 [3].

Известно, что eRF1 взаимодействует только с Upf1, но не с Upf2 и Upf3 [37, 42]. В наших опытах делеция *UPF1* вызывала супрессию некоторых нонсенс-мутаций [15, 18, 43–45], но не супрессию мутации *ade1-14* (рис. 1) [11, 23]. В то же время, мы наблюдали аллосупрессорный эффект комбинации миссенс-мутаций *sup45* и *upf1Δ*, свидетельствующий о большем нарушении терминации трансляции мутантным eRF1 в отсутствие белка Upf1. Этот эффект невозможно объяснить изменением содержания мРНК *ade1-14*, так как ранее мы показали, что делеция гена *UPF1* не влияет на количество этой мРНК в клетках дрожжей [11]. В случае мутантного аллеля *sup45-103* (но не *sup45-113*) аллосупрессорный эффект делеции *UPF1* был сопоставим с эффектом, который наблюдался в присутствии мутантного Upf1-D4 (рис. 2). Мутация *D4* приводит к замене остатка аргинина в положении 779 на цистеин (R779C) в геликазном домене Upf1 [19], что нарушает NMD, но не влияет на связь Upf1 с полисомами [27]. В клетках человека аналогичная мутация (R844C) в гомологе Upf1 оказывает сходный эффект, блокируя NMD [46]. Известно, что другая аминокислотная замена в том же сайте (R844L) влияет на NMD, но не на взаимодействие с eRF3, так как в этом взаимодействии участвует домен СН (Cys–His-богатый регион, аминокислоты 123–213 Upf1) [47]. Таким образом, можно предполагать, что увеличение эффективности супрессии мутации *sup45-103* в отсутствие белка Upf1 связано с нарушением NMD. В то же время, в случае мутации *sup45-113* мутантный белок Upf1-D4 снижал эффективность супрессии подобно Upf1 дикого типа (рис. 2), не компенсируя при этом термочувствительность. Аллосупрессорный эффект комбинации мутации *sup45* с делецией *UPF1* здесь нельзя объяснить нарушением NMD. Многие мутации в гене *SUP45* вызывают термочувствительность [2], причины которой остаются неизвестными. Наши данные позволяют предпо-

ложить, что причины этого явления могут быть различными. Так, термочувствительность мутанта *sup45-103* не зависела от количества белка Upf1 в клетке, в отличие от мутанта *sup45-113*, рост которого в непермиссивных условиях зависел от присутствия функционального Upf1. Можно предполагать, что в этом случае термочувствительность связана с NMD, поскольку дефектный по этому процессу Upf1-D4 не мог компенсировать нарушение роста при 37°C.

Анализ влияния делеций генов *UPF2* и *UPF3* позволил выявить дополнительные отличия между мутантами *sup45*. Следует отметить, что отсутствие белков Upf2 и Upf3 не влияло на содержание белка eRF1 в клетках миссенс-мутантов. Наиболее существенно отличался мутант *sup45-103*, жизнеспособность которого увеличивалась в отсутствие Upf2 и снижалась в отсутствие Upf3, при этом эффективность супрессии мутации *ade1-14* возрастала (рис. 5, рис. 6). В то же время, жизнеспособность мутантов *sup45-113* и *sup45-115* повышалась в отсутствие как Upf2, так и Upf3, при этом обе мутации обнаруживали аллосупрессорный фенотип в случае делеции как гена *UPF2*, так и *UPF3*.

Различия в плейотропных эффектах миссенс-мутаций *sup45* можно объяснить как их различной локализацией и, вследствие этого, различным влиянием на терминацию трансляции, так и участием eRF1 в процессах, не связанных непосредственно с синтезом белка [2]. Выполненное недавно детальное изучение большой коллекции мутантов *sup45* подтверждает последнюю точку зрения [48].

Ранее мы разработали чувствительный тест, позволяющий оценивать свойства мутантных аллелей *sup45* по их несовместимости (или синтетической летальности) с прионом [*PSI<sup>+</sup>*] [9, 49]. В настоящей работе показано, что этот феномен не зависит от делеции гена *UPF1*. Это вполне согласуется с данными, согласно которым синтетическая летальность мутаций *sup45* в присутствии [*PSI<sup>+</sup>*] определяется содержанием функциональных белков eRF1 и eRF3 [10], не зависящим от количества Upf1 в клетке.

Upf1 – сложный полифункциональный белок, состоящий из нескольких доменов [44, 45, 50]. Делеции Upf1, хоть и не влияют на жизнеспособность клеток дрожжей, однако приводят к гибели других, более сложных, организмов [51]. Образование комплекса NMD обеспечивается белок-белковыми взаимодействиями его компонентов. Домены, участвующие в некоторых из этих взаимодействий, идентифицированы в белках человека и дрожжей. Белок Upf1 взаимодействует с факторами терминации eRF3 и eRF1, что обуславливает непосредственную связь процессов синтеза белка и контроля стабильности мРНК [37, 42].

Показано, что домен СН белка Upf1 важен для взаимодействия Upf1 как с eRF3 [47], так и с Upf2 [52, 53], а также для регуляции терминации трансляции и прочтения преждевременных стоп-кодонов в клетках дрожжей [45]. Известно, что во взаимодействии eRF1 с Upf1 участвует С-концевой домен eRF1 (аминокислоты 271–437 eRF1 человека) [47]. Многочисленные данные делеционного анализа показывают, что у разных организмов во взаимодействии eRF1 с eRF3 также участвует С-концевой домен eRF1 [54–58]. Анализ трехмерной структуры комплекса eRF1–eRF3 показал, что во взаимодействии с eRF3 основную роль играют аминокислотные остатки в положениях 288, 291, 298, 300 и 405. Интересно, что в присутствии GTP М-домен eRF1 обеспечивает дополнительные участки связывания с eRF3 [39, 59]. Не известно, может ли eRF1 связываться одновременно с Upf1 и eRF3, либо взаимодействие eRF1–Upf1 определяется eRF3. Во взаимодействии с Upf1 (которое не зависит от присутствия РНК) участвует GTP-разный домен eRF3 [47]. В настоящей работе мы показали, что во взаимодействии с eRF1 вовлечен участок 1–555 Upf1. Эти данные согласуются с ингибирующим эффектом, который оказывает мутация K436A на связывание с eRF1 [37]. Отсутствие взаимодействия eRF1 с полноразмерным белком Upf1 можно объяснить особенностями самой двугибридной системы, например, маскировкой сайта связывания в результате присоединения участка белка Gal4, а также различиями в трехмерной структуре полноразмерного белка и его фрагмента.

Суммируя результаты настоящей, а также предыдущих работ [11, 23], можно сделать следующее заключение: жизнеспособность мутантов *SUP45* и *SUP35* повышается в отсутствие как Upf1, так и Upf2. Известно, что белки eRF1 и eRF3 ингибируют АТ-разную активность Upf1 [37], в то время как комплекс Upf2–Upf3 эту активность стимулирует [60]. Возможно, что снижение содержания факторов терминации в клетке (в случае нонсенс-мутантов *sup45* или *sup35*) или присутствие их неактивных форм (в случае миссенс-мутаций) приводит к стимуляции АТ-разной активности Upf1 и препятствует терминации трансляции. В отсутствие Upf1 (или его активатора Upf2) наблюдается более эффективное образование комплекса терминации трансляции и, как следствие, повышение жизнеспособности клеток с мутациями факторов терминации. Это предположение подтверждается данными о повышении устойчивости нонсенс-мутантов *sup45* к паромомицину в отсутствие гена *UPF1* [11].

Авторы благодарят М. Карлбертсона и А. Джакобсона за предоставление плазмид, Д. Киктева и С. Шабельскую за помощь в проведении некоторых экспериментов.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00237) и программы Президиума Российской академии наук “Происхождение и эволюция биосферы”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisselev L., Ehrenberg M., Frolova L. 2003. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.* **22**, 175–182.
2. Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M. 2003. Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol Cell.* **95**, 195–209.
3. 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.* **4**, 2.
4. 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.* **272**, 297–307.
5. Журавлева Г.А., Москаленко С.Е., Шабельская С.В., и др. 2006. Увеличение уровня тРНК у мутантов по факторам терминации трансляции eRF1 и eRF3. *Молекуляр. биология.* **40**, 724–730.
6. Kushnirov V.V., Vishnevskaya A.B., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan M.D. 2007. Prion and nonprion amyloids: a comparison inspired by the yeast Sup35 protein. *Prion.* **1**, 179–184.
7. Wickner R.B., Edskes H.K., Shewmaker F., et al. 2009. Prion variants, species barriers, generation and propagation. *J. Biol.* **47**.
8. Derkatch I.L., Chernoff Y.O., Kushnirov V.V., et al. 1996. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **144**, 1375–1386.
9. Kiktev D., Vechtomov S., Zhouravleva G. 2007. Prion-dependent lethality of *sup45* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prion.* **1**, 136–143.
10. Kiktev D., Moskalenko S., Murina O., et al. 2009. The paradox of viable *sup45* STOP mutations: a necessary equilibrium between translational readthrough, activity and stability of the protein. *Mol. Genet. Genomics.* **282**, 83–96.
11. Chabelskaya S., Gryzina V., Moskalenko S., et al. 2007. Inactivation of NMD increases viability of *sup45* nonsense mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol. Biol.* **8**, 71.
12. Amrani N., Dong S., He F., et al. 2006. Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 39–42.
13. Wilkinson M.F. 2005. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet.* **21**, 143–148.
14. Baker K.E., Parker R. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 293–299.
15. Cui Y., Hagan K.W., Zhang S., Peltz S.W. 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs con-

- taining a premature translational termination codon. *Genes Dev.* **9**, 423–436.
16. He F., Jacobson A. 1995. Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway by use of an interacting protein screen. *Genes Dev.* **9**, 437–454.
  17. Lee B.S., Culbertson M.R. 1995. Identification of an additional gene required for eukaryotic nonsense mRNA turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 10354–10358.
  18. Leeds P., Peltz S.W., Jacobson A., Culbertson M.R. 1991. The product of the yeast *UPF1* gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* **5**, 2303–2314.
  19. Leeds P., Wood J.M., Lee B.S., Culbertson M.R. 1992. Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2165–2177.
  20. Culbertson M.R. 1999. RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* **15**, 74–80.
  21. Gonzalez C.I., Bhattacharya A., Wang W., Peltz S.W. 2001. Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **274**, 15–25.
  22. Kobayashi T., Funakoshi Y., Hoshino S., Katada T. 2004. The GTP-binding release factor eRF3 as a key mediator coupling translation termination to mRNA decay. *J. Biol. Chem.* **279**, 45693–45700.
  23. Шабельская С.В., Журавлева Г.А. 2010. Мутации в гене *SUP35* нарушают процесс деградации мРНК, содержащих преждевременные стоп-кодоны. *Молекуляр. биология.* **44**, 51–59.
  24. Москаленко С.Е., Журавлева Г.А., Соом М.И., и др. 2004. Характеристика миссенс-мутаций в гене *SUP45* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующем фактор терминации трансляции eRF1. *Генетика*, **40**, 599–606.
  25. Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., et al. 1995. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*<sup>+</sup>]. *Science.* **268**, 880–884.
  26. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. 1994. *Methods in yeast genetics a Cold Spring Harbor laboratory course manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
  27. Atkin A.L., Schenkman L.R., Eastham M., et al. 1997. Relationship between yeast polyribosomes and Upf proteins required for nonsense mRNA decay. *J. Biol. Chem.* **272**, 22163–22172.
  28. He F., Brown A.H., Jacobson A. 1997. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1580–1594.
  29. Cosson B., Couturier A., Chabelskaya S., et al. 2002. Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [*PSI*<sup>+</sup>] propagation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3301–3315.
  30. Liu H., Krizek J., Bretscher A. 1992. Construction of a *GAL1*-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics.* **132**, 665–673.
  31. Wach A., Brachat A., Pohlmann R., Philippsen P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **10**, 1793–1808.
  32. Guthrie C., Fink G.R. 1991. *Guide to yeast genetics and molecular biology*. San Diego: Acad. Press.
  33. 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.* **11**, 355–360.
  34. Fields S., Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* **340**, 245–246.
  35. Feilolter H.E., Hannon G.J., Ruddell C.J., Beach D. 1994. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucl. Acids Res.* **22**, 1502–1503.
  36. Woods A., Sherwin T., Sasse R., et al. 1989. Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **93**, 491–500.
  37. Czaplinski K., Ruiz-Echevarria M.J., Paushkin S.V., et al. 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* **12**, 1665–1677.
  38. Liu Q. 2005. Comparative analysis of base biases around the stop codons in six eukaryotes. *Biosystems.* **81**, 281–289.
  39. Cheng Z., Saito K., Pisarev A.V., et al. 2009. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.* **23**, 1106–1118.
  40. 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.
  41. Bertram G., Bell H.A., Ritchie D.W., et al. 2000. Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA.* **6**, 1236–1247.
  42. Wang W., Czaplinski K., Rao Y., Peltz S.W. 2001. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO J.* **20**, 880–890.
  43. Czaplinski K., Weng Y., Hagan K.W., Peltz S.W. 1995. Purification and characterization of the Upf1 protein, a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA.* **1**, 610–623.
  44. Weng Y., Czaplinski K., Peltz S.W. 1996. Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5477–5490.
  45. Weng Y., Czaplinski K., Peltz S.W. 1996. Identification and characterization of mutations in the *UPF1* gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5491–5506.
  46. Sun X., Perlick H.A., Dietz H.C., Maquat L.E. 1998. A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 10009–10014.
  47. Ivanov P.V., Gehring N.H., Kunz J.B., et al. 2008. Interactions between *UPF1*, eRFs, PABP and the exon

- junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* **27**, 736–747.
48. Merritt G.H., Naemi W.R., Mugnier P., et al. 2010. Decoding accuracy in eRF1 mutants and its correlation with pleiotropic quantitative traits in yeast. *Nucl. Acids Res.* **38**, 54795492.
  49. Киктев Д.А., Чернов Ю.О., Архипенко А.В., Журавлева Г.А. 2011. Идентификация генов, влияющих на синтетическую летальность генетического и эпигенетического изменений в факторах термации трансляции у дрожжей. *Докл. Акад. Наук.* **438**, 416–418.
  50. Nazareus T., Cedarberg R., Bell R., et al. 2005. Upf1p, a highly conserved protein required for nonsense-mediated mRNA decay, interacts with the nuclear pore proteins Nup100p and Nup116p. *Gene.* **345**, 199–212.
  51. Nicholson P., Yepiskoposyan H., Metze S., et al. 2010. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells, mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 677–700.
  52. Applequist S.E., Selg M., Raman C., Jack H.M. 1997. Cloning and characterization of *HUPF1*, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing *UPF1* protein. *Nucl. Acids Res.* **25**, 814–821.
  53. Kadlec J., Guilligay D., Ravelli R.B., Cusack S. 2006. Crystal structure of the UPF2-interacting domain of nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1. *RNA.* **12**, 1817–1824.
  54. Ito K., Ebihara K., Nakamura Y. 1998. The stretch of C-terminal acidic amino acids of translational release factor eRF1 is a primary binding site for eRF3 of fission yeast. *RNA.* **4**, 958–972.
  55. Ebihara K., Nakamura Y. 1999. C-terminal interaction of translational release factors eRF1 and eRF3 of fission yeast: G-domain uncoupled binding and the role of conserved amino acids. *RNA.* **5**, 739–750.
  56. Eurwilaichitr L., Graves F.M., Stansfield I., Tuite M.F. 1999. The C-terminus of eRF1 defines a functionally important domain for translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **32**, 485–496.
  57. Merkulova T.I., Frolova L.Y., Lazar M., et al. 1999. C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their *in vivo* interaction. *FEBS Lett.* **443**, 41–47.
  58. Cosson B., Couturier A., Le Guellec R., et al. 2002. Characterization of the poly(A) binding proteins expressed during oogenesis and early development of *Xenopus laevis*. *Biol. Cell.* **94**, 217–231.
  59. Kononenko A.V., Mitkevich V.A., Dubovaya V.I., et al. 2008. Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3. *Proteins.* **70**, 388–393.
  60. Chamieh H., Ballut L., Bonneau F., Le Hir H. 2008. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 85–93.