

УДК 577.21

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ФАКТОРА eRF1 ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. В. Шувалов^{a, b}, А. А. Клишин^{a, c}, Н. С. Бизяев^a,
Е. Ю. Шувалова^{a, b}, Е. З. Алкалаева^{a, b, c, *}^aИнститут молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^bЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, 119991 Россия^cМосковский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141700 Россия

*e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Фактор терминации трансляции эукариот eRF1 – важный клеточный белок, играющий ключевую роль в процессах терминации трансляции, нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD) и сквозного прочтения стоп-кодонов. Количество eRF1 в клетке влияет на все эти процессы. Механизм регуляции трансляции eRF1 через авторегуляторный NMD-зависимый контур экспрессии описан у растений и грибов, тогда как механизмы регуляции трансляции eRF1 человека до сих пор не изучены. С помощью репортерных конструкций нами изучено влияние элементов мРНК eRF1 на его трансляцию в бесклеточных системах трансляции и культуре клеток HEK293. Наши данные указывают на отсутствие NMD-зависимого авторегуляторного контура экспрессии eRF1 человека. Обнаружено, что на трансляцию основной рамки считывания eRF1 сильнее всего влияют 5'-нетранслируемая область мРНК этого фактора и старт-кодон короткой открытой рамки считывания. Согласно базе данных стартов транскрипции, для мРНК eRF1 характерна высокая гетерогенность начала транскрипции и варьирующая из-за этого длина 5'-нетранслируемой области. Кроме того, старт-кодон основной рамки считывания в мРНК eRF1 находится в пределах известного регулятора трансляции короткой 5'-нетранслируемой области (TISU), который также стимулирует транскрипцию мРНК генов с высокой гетерогенностью старта транскрипции. Мы предполагаем, что регуляция синтеза eRF1 человека осуществляется как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. На уровне транскрипции регулируется длина 5'-нетранслируемой области eRF1 и количество коротких открытых рамок считывания в ней, регулирующих, в свою очередь, продукцию eRF1 на уровне трансляции.

Ключевые слова: eRF1, трансляция, мРНК, 3'-нетранслируемая область мРНК, 5'-нетранслируемая область мРНК, короткая открытая рамка считывания

DOI: 10.31857/S0026898424040091, EDN: IMNJKL

ВВЕДЕНИЕ

Фактор терминации трансляции eRF1 – основной фактор, обеспечивающий терминацию трансляции в клетках эукариот. eRF1 состоит из трех функциональных доменов: N-домен вовлечен в распознавание стоп-кодона [1–6], M-домен обеспечивает гидролиз пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы [7], а С-домен связывается с дополнительным фактором терминации трансляции

eRF3 [8–13]. Кроме того, eRF1 вовлечен в регуляцию сквозного прочтения [14–16], в нонсенс-опосредованный распад (NMD) мРНК [17–20], преждевременную терминацию на некоторых редких смысловых кодонах [21, 22].

Терминация – это важный этап трансляции, на котором регулируется скорость и эффективность высвобождения новосинтезированных пептидов. Показано, что терминация трансляции на kOPC в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК ряда генов обеспечивает регуляцию трансляции основного продукта [23]. Изучение терминации трансляции имеет и прикладное значение. До 10% орфанных генетических заболеваний человека связаны с возникновением преждевременных стоп-кодонов (ПСК), а терапия таких заболеваний направлена на увеличение сквозного прочтения ПСК [24].

Сокращения: NMD – нонсенс-опосредованный распад; 5'- и 3'-НТО – нетранслируемые области мРНК; OPC – открытая рамка считывания; kOPC – короткая открытая рамка считывания; EJC – комплекс сращивания экзонов; Fluc (Fl) – люцифераза светлячка; Nluc (Nl) – нанолуцифераза; HbV – β-глобин; *ETF1* – символ гена, кодирующего eRF1; GAPDH – глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа; ПСК – преждевременный стоп-кодон; ССТ – сайты старта транскрипции; О.Е.Л. – относительные единицы люминесценции.

Сквозное прочтение стоп-кодонов и преждевременная терминация являются противоположными процессами, зависящими от концентрации eRF1 и конкурирующих tРНК [21, 25]. При сквозном прочтении происходит удлинение белкового продукта с С-конца за счет распознавания стоп-кодона конкурирующей близкородственной tРНК, что в некоторых случаях может быть частью нормальных физиологических процессов клетки [26–28]. Менее изученный процесс преждевременной терминации на смысловых кодонах описан у прокариот, грибов и дрожифил, обсуждается его более широкая представленность у эукариот [21, 22, 29]. Предполагается, что физиологический смысл преждевременной терминации на смысловых кодонах заключается в высвобождении “застывших” на мРНК рибосом, и этот механизм является альтернативой No-go-деградации мРНК (NGD).

NMD – процесс деградации мРНК, обусловленный наличием ПСК, может стимулировать комплекс сращивания экзонов (EJC – Exon Junction Complex) на определенном расстоянии после стоп-кодона. Основная функция NMD заключается в контроле качества и удалении ошибочно возникающих мРНК с ПСК в результате нарушений сплайсинга. Кроме того, имеется множество свидетельств участия NMD в регуляции нормальной экспрессии генов. мРНК могут подвергаться NMD и в отсутствие ошибочного соединения экзонов и появления ПСК. Такие события могут обуславливаться либо EJC-независимым NMD, либо неканоническим расположением EJC. Вероятность NMD при этом тем выше, чем длиннее 3'-НТО [19].

Таким образом, исследование продукции eRF1 имеет важное значение, так как уровень этого белка в клетке будет определять эффективность важных клеточных процессов, описанных выше. Экспрессия гена *ETF1*, кодирующего eRF1 человека, изучена на уровне транскрипции [30], однако отсутствуют работы о регуляции трансляции eRF1 у млекопитающих. Стоит отметить, что описан авторегуляторный контур экспрессии eRF1 у растений и грибов. При высоком содержании eRF1 запускается механизм распада собственной мРНК, обусловленный наличием EJC после первого стоп-кодона, компетентного для стимулирования NMD. Из-за этого снижается количество eRF1 в клетке, происходит сквозное прочтение стоп-кодона собственной мРНК, что ингибирует ее NMD [31, 32].

В представленной работе с помощью конструкций мРНК, включающих кодирующие последовательности репортеров люциферазы светлячка (Fluc – Firefly luciferase) или нанолуциферазы (Nluc – Nano luciferase), нами изучено влияние элементов мРНК eRF1 (5'-НТО, ОРС, 3'-НТО) на трансляцию. Показано, что основной вклад в регуляцию трансляции вносит 5'-НТО мРНК eRF1

и находящиеся в ней дополнительные старт-кодона. Наиболее вероятным механизмом контроля трансляции eRF1 является регуляция длины ее 5'-НТО за счет частоты использования сайтов инициации транскрипции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование 3'-НТО мРНК eRF1. Тотальную РНК HEK293 выделяли с помощью ExtractRNA (“Evrogen”, ВС032, Россия) по протоколу производителя. Эту РНК использовали для получения кДНК с помощью AMV Reverse Transcription System (“Promega”, А3500, США) с олиго(dT)₁₅ или случайными праймерами (табл. S1). С помощью праймеров CDS F и олиго(dT)₁₅ (табл. S1, дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI: 10.31857/S0026898424040091 статьи, а также размещены на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/4/supp_Shupalov_rus.pdf) был получен ПЦР-продукт, который клонировали в TA-вектор pGEM®-T Easy Vector (“Promega”, А1360). Клонированный продукт содержал часть ОРС eRF1 и последовательность 3'-НТО мРНК eRF1, включающую 861 нуклеотид после стоп-кодона UAG ОРС eRF1 и далее А(15).

Создание экспериментальных конструкций и синтез мРНК. Конструкции NI с ПСК и контроли с кодирующими кодонами. Плазмида pNI-gl описана ранее [33]. В конструкцию pNI-gl по NcoI-сайту рестрикции вставили частичную последовательность ОРС β-глобина с ПСК UGA и контекстом CUAGUA (слабый), усиливающим сквозное прочтение [34, 35]. Старт-кодон в последовательности гена β-глобина заменили на АТА, используя набор QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (“Agilent”, США), и получили плазмиду UGA_NI. С использованием этого же набора получены и все остальные плазмиды: UGU_NI, UAA_NI/AAA_NI, UAG_NI/UAU_NI.

Конструкции NI для изучения сквозного прочтения стоп-кодонов мРНК eRF1. На плазмиде pNI-gl с праймерами pNI F/R получен ПЦР-продукт NI. С помощью праймеров 5'1 F/R, 5'2 F/R, 5'2 F и 5'2sense R (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/4/supp_Shupalov_rus.pdf) получены соответствующие ПЦР-продукты. С помощью системы Gibson Assembly (“NEB”, E2611L, США) из ПЦР-продуктов NI, 5'1 и 5'2 получена плазмида 5'_NI (1), а из ПЦР-продуктов NI, 5'1 и 5'2sense плазмида 5'sense_NI (1), в которой стоп-кодон TAG кОРС мРНК eRF1 заменен на TCG, кодирующий серин (табл. S2). На плазмиде pNI-gl с праймерами pNI F и pNI-gl R (табл. S1) получен ПЦР-продукт NI-gl. С помощью системы Gibson Assembly (“NEB”, E2611L) из ПЦР-продуктов NI-gl и 5'2 получена плазмида 5'_NI (3), а из ПЦР-продуктов NI-gl и 5'2sense – плазмида 5'sense_NI (3) (табл. S2). На полученной нами ранее плазмиде petSUMO-eRF1

с помощью пар праймеров pNI_eRF1 F/R, pNI_eRF1 F и pNI_eRF1-Ser R (табл. S1) синтезировали ПЦР-продукты OPC и OPCsense. С помощью системы Gibson Assembly (“NEB”, E2611L) из ПЦР-продуктов NI-gl и OPC получена плаزمид OPC_NI, а из ПЦР-продуктов NI-gl и OPCsense – плазмид OPCsense_NI, в которой стоп-кодон TAG OPC eRF1 заменен на TCG, кодирующий серин (табл. S2). Конструкция с OPC eRF1 содержала дополнительно природную 3'-контекстную последовательность из 9 нуклеотидов после стоп-кодона UAG.

Конструкции Fluc для изучения влияния на трансляцию 5'- и 3'-НТО мРНК eRF1. На плазмиде pGEM-Fluc (“Promega”, кат. № E1541) с использованием праймеров F1 F/R получен ПЦР-продукт F1. С использованием праймеров 3'GAPDH F/R получен ПЦР-продукт 3'GAPDH. С помощью системы Gibson Assembly (“NEB”, E2611L) из ПЦР-продуктов F1 и 3'GAPDH получена плазмид F1_3'GAPDH (табл. S2). С использованием праймеров 3' F и 3' R на плазмиде pGEM-3'eRF1 получен ПЦР-продукт 3'eRF1. С помощью системы Gibson Assembly (“NEB”, E2611L) из ПЦР-продуктов F1 и 3'eRF1 получена плазмид F1_3'eRF1 (табл. S2). С использованием праймеров 5'_F1 F/R и плазмид 5'_NI (1) и 5'sense_NI (1) получены ПЦР-продукты 5'_F1 и 5'sense_F1. ПЦР-продукт 5'_F1 был вставлен в плазмиды F1_3'GAPDH и F1_3'eRF1 по сайтам рестрикции NheI и XbaI для получения конструкций 5'eRF1_F1_3'GAPDH и 5'eRF1_F1_3'eRF1, а ПЦР-продукт 5'sense_F1 вставлен в плазмиду F1_3'eRF1 для получения 5'eRF1sense_F1_3'eRF1 (табл. S2).

Использованные в работе мРНК получены из соответствующих ПЦР-продуктов, содержащих вносимые праймерами T7 промотор на 5'-конце и поли(A)₅₀-хвост на 3'-конце, с помощью набора T7 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (“Promega”) с добавлением аналога кеп-структуры мРНК (ARCA, “NEB”) согласно протоколу производителя. Список мРНК и названия праймеров, использованных для их синтеза, приведены в дополнительных материалах (табл. S2, см. Дополнительные материалы).

Выделение и очистка рекомбинантного eRF1. Рекомбинантный eRF1 получали из ранее созданной нами конструкции retSUMO-eRF1, как описано для NSP1 [33], проводили дополнительную очистку препарата eRF1 с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q HP (“Cytiva”).

In vivo и in vitro трансляция в бесклеточных системах трансляции и клетках HEK293. Трансляцию репортерных мРНК осуществляли в 10 мкл смеси, содержащей 50% лизата HEK293, 20 мМ HEPES-KOH pH 7.5, 2 мМ DTT, 0.25 мМ спермидина, 0.6 мМ MgAc₂, 16 мМ креатинфосфат, 0.06 ед/мкл креатинкиназы, 1 мМ АТР, 0.6 мМ GTP, 60 мМ

КАс, 0.05 мМ каждой аминокислоты, 0.2 ед/мкл RiboLock, 0.5 мМ D-люциферин (или 1% NanoGlo® (“Promega”). eRF1 добавляли до конечной концентрации 0.6 мкМ. Интенсивность люминесценции измеряли при 30°C в планшетном ридере Tecan Infinite 200 Pro в течение 100 мин. Эффективность трансляции рассчитывали как максимальную производную растущего линейного участка кривой люминесценции (v_0 , RLU/мин). Сквозное прочтение стоп-кодона рассчитывали как отношение эффективности трансляции матрицы с ПСК к эффективности трансляции контрольной матрицы со смысловым кодоном в данном положении.

In vivo трансляцию репортеров осуществляли в клетках HEK293 в соответствии с ранее описанным методом FLERT (Fleeting mRNA Transfection technique) [38]. Клетки HEK293 культивировали в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C и 5% CO₂. За день до трансфекции экспоненциально растущие клетки HEK293 рассаживали на 24-луночные планшеты с плотностью покрытия 50%. Через 12–16 ч роста, когда плотность клеток достигала 70–90%, проводили трансфекцию с использованием GenJector™-U (“Molnec”, Россия) для РНК. Для этого 0.5 пмоль репортерной мРНК и 0.05 пмоль контрольной мРНК инкубировали с 0.2 мкл ре-агента для трансфекции в 60 мкл Opti-MEM (“Gibco”, 11058–021) в течение 10 мин, а затем добавляли в питательную среду к клеткам HEK293T в соответствующую лунку. Через 2 ч клетки собирали, активность люциферазы анализировали с помощью системы люциферазы Dual Luciferase® (“Promega”). Трансфекцию повторяли несколько раз в разных клеточных пассажах.

Статистический анализ. Эксперименты проводили в трех и более повторах. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SE). Для сравнения средних значений между двумя группами использовали непарный двусторонний *t*-критерий. Множественные сравнения проводили с использованием поправки Холма на значение *p* [36]. Звездочками отмечены статистически значимые различия (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.0001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Организация мРНК eRF1

Референсная последовательность мРНК eRF1 человека в базе данных NCBI RefSeq имеет идентификационный номер NM_004730. Схема этой мРНК с аннотированными в базе данных GenBank элементами представлена на рис. 1а. мРНК eRF1 имеет длинную 3'-НТО, расположенную в пределах одного экзона, т.е. после стоп-кодона OPC отсутствуют места соединения экзонов (EJC).

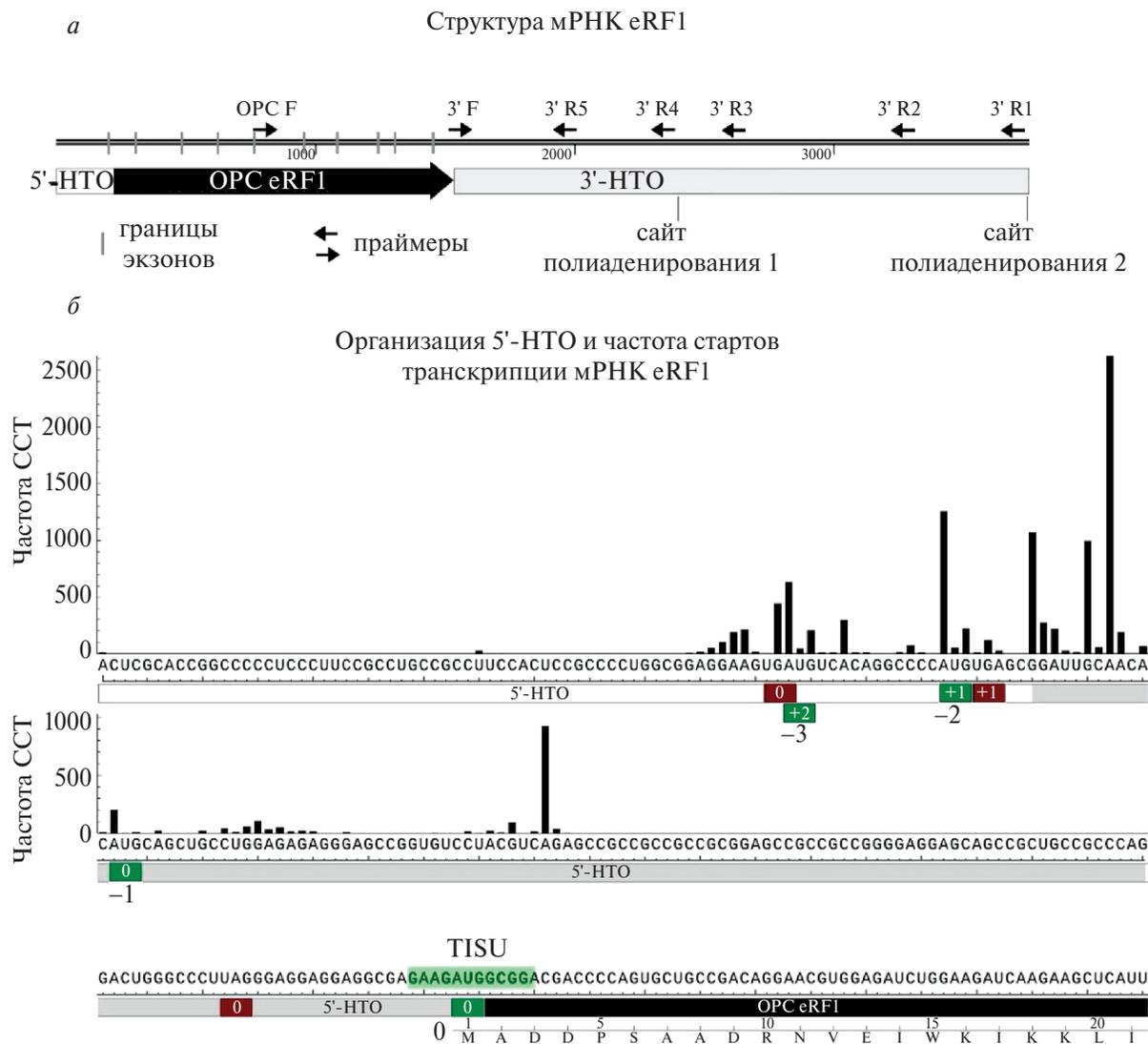


Рис. 1. Структура мРНК eRF1. *a* – Схема организации референсной мРНК eRF1 NM_004730. Стрелками отмечены праймеры, использованные для получения 3'-НТО мРНК eRF1. *б* – Схема организации 5'-НТО eRF1 и частота использования сайтов старта транскрипции согласно базе DBTSS. Зелеными и красными прямоугольниками отмечены старт- и стоп-кодона соответственно. Цифра внутри прямоугольников означает рамку считывания относительно основной OPC. Цифра рядом с зелеными квадратами означает порядковый номер AUG относительно старт-кодона основной OPC, принятый за 0. Светло-зеленым цветом выделена последовательность регуляторного элемента TISU. Серым обозначена укороченная последовательность 5'-НТО eRF1, изучаемая в работе, наряду с полноразмерной.

Таким образом, к eRF1 человека не применим механизм авторегуляции экспрессии за счет EJC-зависимого NMD.

3'-НТО мРНК eRF1 клонировали из клеточной линии HEK293 эмбриональной почки человека. Из клеток HEK293 была выделена тотальная мРНК (в трех биологических повторах), и на каждом из образцов синтезировали два вида кДНК с использованием олиго-dT или случайных праймеров. Из образцов кДНК, полученных с использованием олиго-dT и специфичного прямого праймера, синтезировались ПЦР-продукты длиной около 1600 п.н., которые клонировали в вектор. Секвенирование полученных последовательностей показало,

что они соответствуют области между прямым праймером и сайтом полиаденилирования 1, т.е. укороченному фрагменту 3'-НТО (рис. 1*a*). При этом ПЦР-продукты большего размера не детектировались. Затем из каждого полученного варианта кДНК мы попытались синтезировать ПЦР-продукты с прямым специфичным праймером и одним из обратных праймеров на 3'-НТО мРНК eRF1 (3'R1–5). При этом во всех случаях ПЦР-продукты получались только с обратными праймерами 3'R4–5 (рис. 1*a*). Секвенирование этих ПЦР-продуктов показало, что они соответствуют ранее клонированному укороченному 3'-НТО. Таким образом, в HEK293 преимущественно присутствует

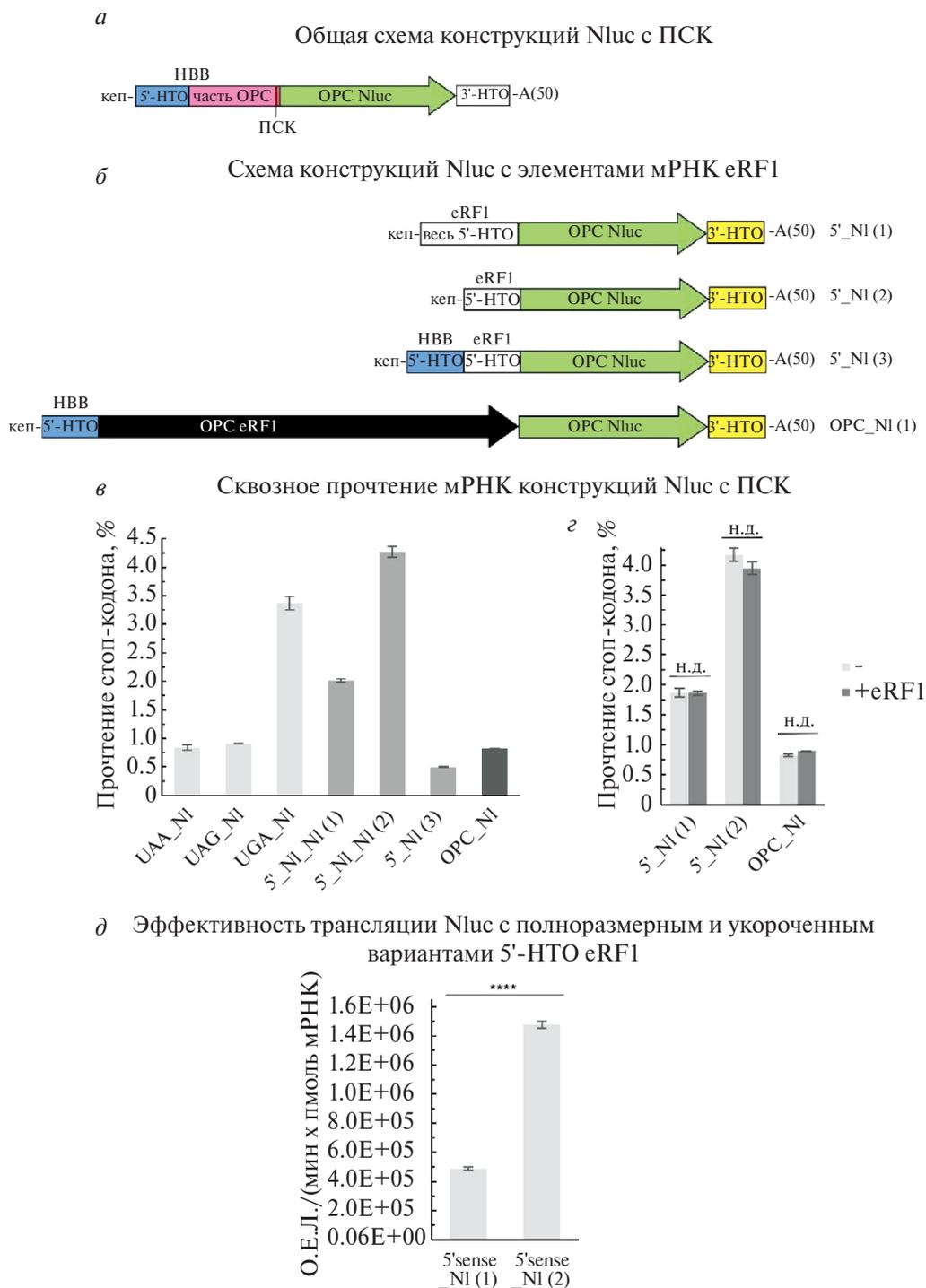


Рис. 2. Влияние на сквозное прочтение и трансляцию 5'-HTO и OPC eRF1, а также избытка eRF1. *а* – Общая схема конструкций с преждевременными стоп-кодонами перед OPC нанолуциферазы. Конструкция включает 5'-HTO и первые 13 кодонов OPC мРНК β-глобина с последующим стоп-/смысловым кодоном (UAA/AAA, UAG/UAU, UGA/UGU) и соответствующим 6-нуклеотидным 3'-контекстом (GGGCUG, GAUAAU, CUAGUA) для усиления сквозного прочтения, за которыми следует OPC Nluc без собственного старт-кодона в той же рамке считывания. 3'-HTO является искусственной и продуцируется из ~170 нуклеотидов после стоп-кодона в OPC Nluc в исходной плазмиде. *б* – Схема модельных конструкций для изучения сквозного прочтения стоп-кодонов мРНК eRF1. *в* – Измеренный в бесклеточных системах трансляции уровень сквозного прочтения модельных мРНК с репортером, содержащим нанолуциферазу. *г* – Влияние избытков eRF1 на сквозное прочтение стоп-кодонов в моделях с 5'-HTO и OPC собственной мРНК. *д* – Влияние длины 5'-HTO eRF1 на трансляцию. Сравнимые матрицы имеют идентичные последовательности после старта трансляции и отличаются только длиной 5'-HTO. О.Е.Л. – относительные единицы люминесценции, н.д. – различия не достоверны.

укороченный вариант 3'-НТО мРНК eRF1, который в дальнейшем использовали в экспериментах.

5'-НТО мРНК eRF1 содержит дополнительные старт- и стоп-кодона в различных рамках считывания (рис. 1б). Интересно, что вторые старт- (-2) и стоп-кодона организуют минимальную кОПС (AUGUGA), расположенную в другой рамке считывания относительно основной ОПС. При этом, третьи старт- и стоп-кодона образуют еще одну кОПС (далее также 5'ОПС) в одной рамке с основной ОПС. Подробные данные о стартах транскрипции NM_004730 (и размерах 5'-НТО) доступны в базе данных DBTSS (Data Base Transcriptional Start Sites, <https://dbtss.hgc.jp>) [37]. Согласно этим данным, полноразмерный 5'-НТО eRF1 в НЕК293 (и других доступных в базе образцах) синтезируется крайне редко, а старты транскрипции располагаются в широком диапазоне, преимущественно перед и после дополнительных старт-кодонов (рис. 1б). Нами получена полноразмерная 5'-НТО eRF1 (далее – “вся 5'-НТО” eRF1), а также укороченная, чаще транскрибируемая, версия 5'-НТО eRF1 (далее – “5'-НТО” eRF1), не включающая два первых дополнительных старт- и стоп-кодона (рис. 1б). Таким образом, мРНК eRF1 в клетках чаще всего укорочена с 5'- и 3'-концов относительно референсной последовательности, а размер ее 5'-НТО варьирует в широких пределах.

Длина 5'-НТО eRF1 влияет на эффективность трансляции и сквозного прочтения. eRF1 не влияет на собственную трансляцию

Для изучения влияния 5'-НТО eRF1 и белка eRF1 на трансляцию и сквозное прочтение стоп-кодонов мы создали ряд конструкций с репортером Nluc (рис. 2б). В данных конструкциях Nluc была лишена собственного старт-кодона. В конструкциях 5'_N1 (1–3) репортер Nluc детектировал трансляцию кОПС 5'-НТО eRF1 (5'-ОПС). Для изучения сквозного прочтения были созданы соответствующие контрольные конструкции, в которых стоп-кодон UAG был заменен кодоном UCG, кодирующим серин. 5'_N1 (1) содержала всю 5'-НТО eRF1 из референсной последовательности NM_004730, а 5'_N1 (2) – укороченный вариант (отмечен серым на рис. 1б). 5'_N1 (3) содержала гибридную 5'-НТО, в которой непосредственно перед 5'-ОПС расположена последовательность 5'-НТО β-глобина (НВВ), не содержащая дополнительных старт- и стоп-кодонов. ОПС_N1 перед репортером содержит 5'-НТО НВВ с последующими полной ОПС eRF1 и 9-нуклеотидным натуральным 3'-контекстом ее стоп-кодона.

Для оценки сквозного прочтения на разных стоп-кодонах созданы независимые конструкции, общая схема которых представлена на рис. 1а. В этих конструкциях перед ОПС Nluc расположены 5'-НТО и первые 13 кодонов ОПС НВВ с последующим стоп-/смысловым кодоном (UAA/AAA,

UAG/UAU, UGA/UGU) и соответствующим 6-нуклеотидным 3'-контекстом (GGGCUG, GAUAAU, CUAGUA) для усиления сквозного прочтения [35].

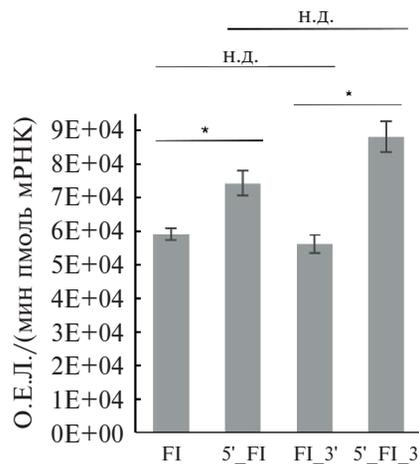
Изучение сквозного прочтения стоп-кодона UAG 5'-ОПС показывает, что на него влияет предшествующая последовательность: максимальная эффективность сквозного прочтения наблюдается на укороченной 5'-НТО eRF1 (более распространенной в клетке), чуть хуже прочитывается стоп-кодон с полноразмерной 5'-НТО eRF1 и хуже всего происходит сквозное прочтение стоп-кодона с 5'-НТО НВВ (рис. 2в). При этом сквозное прочтение UAG 5'-ОПС в присутствии 5'-НТО eRF1 выше, чем в модельной конструкции с преждевременным стоп-кодоном (ПСК) UAG_N1, однако 5'-НТО НВВ снижает эффективность сквозного прочтения. Сквозное прочтение UAG ОПС eRF1 не отличается от сквозного прочтения ПСК UAG_N1. Отсутствие повышенного сквозного прочтения основной ОПС eRF1 является дополнительным доводом против возможности описанной у растений и грибов авторегуляции трансляции eRF1 посредством NMD. Более того, добавление избытков eRF1 не влияет на сквозное прочтение стоп-кодонов в 5'-ОПС и основной ОПС eRF1 и на трансляцию соответствующих конструкций (рис. 2г, д). Эти данные противоречат возможности авторегуляции трансляции eRF1. Эффективность трансляции в присутствии полноразмерной 5'-НТО eRF1 ниже, чем в присутствии укороченной, что обусловлено, вероятнее всего, большим количеством дополнительных старт-кодонов (рис. 2д).

5'-НТО и 3'-НТО eRF1 обеспечивают эффективную трансляцию основной рамки считывания

Для изучения влияния 5'- и 3'-НТО eRF1 на трансляцию фактора терминации созданы модельные мРНК на основе репортера Fluc (рис. 3а). В отличие от небольшой ОПС Nluc, ОПС Fluc имеет схожие с ОПС eRF1 длину и GC-состав. В качестве контроля использовали 5'-НТО НВВ и 3'-НТО GAPDH. Соответствующие белки представлены в клетках в высоких концентрациях, и НТО их мРНК должны способствовать эффективной трансляции. *In vitro* в лизате клеток НЕК293 5'-НТО eRF1 увеличивает эффективность трансляции даже относительно 5'-НТО НВВ, в то время как 3'-НТО eRF1 не улучшает трансляцию репортера Fluc (рис. 3б). 5'- и 3'-НТО eRF1 совместно обеспечивают максимальный уровень трансляции репортера. Этот же эксперимент мы повторили *in vivo* в клетках НЕК293, трансфицировав их теми же мРНК в соответствии с методом FLERT (Fleeting mRNA Transfection technique) [38]. *In vivo* 5'- и 3'-НТО eRF1 совместно достоверно улучшают трансляцию репортера Fluc, в то время как одна 3'-НТО eRF1 не влияет заметно на трансляцию



б Влияние 5'- и 3'-НТО мРНК eRF1 на трансляцию Fluc *in vitro*



в Влияние 5'- и 3'-НТО мРНК eRF1 на трансляцию Fluc *in vivo*

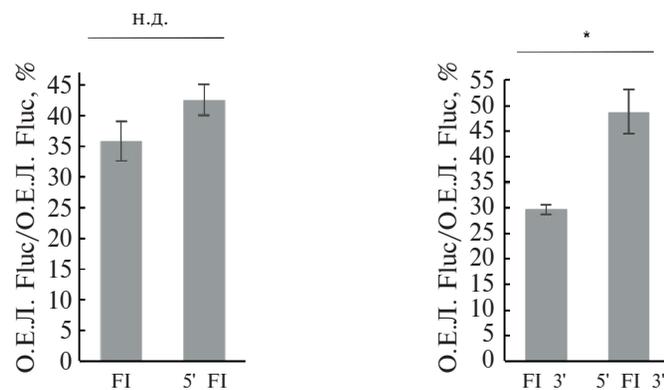


Рис. 3. Влияние 5'-НТО и 3'-НТО мРНК eRF1 на трансляцию. *а* – Схема конструкций, кодирующих люциферазу светлячка, использованных в экспериментах. *б* – Влияние 5'- и 3'-НТО мРНК eRF1 на трансляцию Fluc в лизате HEK293. *в* – Влияние 5'- и 3'-НТО мРНК eRF1 на трансляцию Fluc в культуре клеток HEK293.

(рис. 3*в*). Таким образом, 5'-НТО eRF1 сильнее всего влияет на трансляцию фактора терминации, тогда как эффект 3'-НТО eRF1 зависит от наличия 5'-НТО eRF1.

Старт-кодон 5'-НТО eRF1 ингибирует трансляцию

Влияние дополнительных старт- и стоп-кодонов, образующих kOPC в 5'-НТО eRF1, на трансляцию основной OPC мы изучали с использованием

созданных нами вариантов мРНК OPC Fluc с 5'- и 3'-НТО eRF1, в которых заменяли старт- и/или стоп-кодон на смысловой кодон (AAG и UCG соответственно). Эти конструкции использовали в экспериментах *in vivo* в культуре клеток HEK293 с помощью метода FLERT [38]. Удаление альтернативного старт-кодона из 5'-НТО eRF1 привело к более чем двукратному увеличению эффективности трансляции репортера, в то время как удаление стоп-кодона в 5'-НТО eRF1 практически не повлияло на

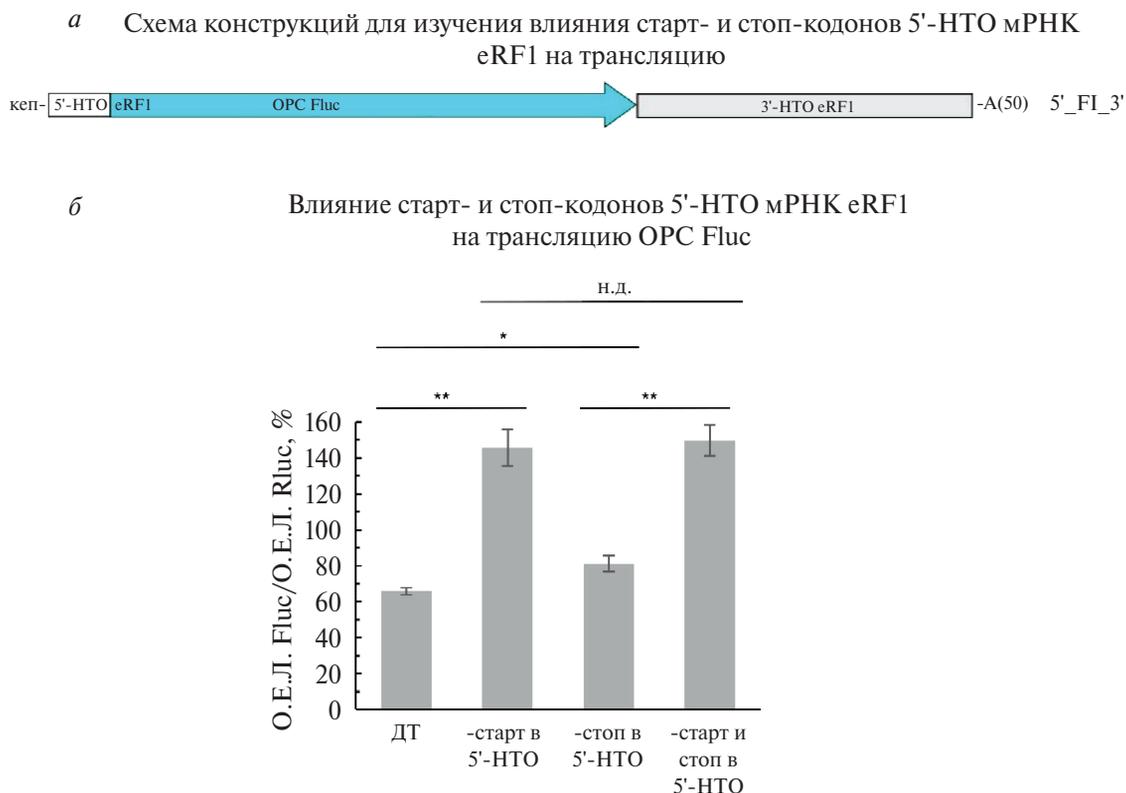


Рис. 4. Влияние старт- и стоп-кодонов в кОПС 5'-НТО мРНК eRF1. *а* – Общая схема конструкций, представляющая четыре варианта мРНК: “ДТ” – дикий тип 5'-НТО eRF1 не изменена и содержит старт- и стоп-кодон кОПС, “-старт в 5'-НТО” – старт-кодон кОПС заменен на кодон AAG, “-стоп в 5'-НТО” – стоп-кодон кОПС заменен на UCG, “-старт и стоп в 5'-НТО” – старт-кодон кОПС заменен на кодон AAG, а стоп-кодон – на UCG. *б* – Эффективность трансляции *in vivo* в клетках HEK293 репортерной мРНК с мутациями старт- и стоп-кодона кОПС 5'-НТО из мРНК eRF1.

трансляцию (рис. 4). Таким образом, наиболее заметным регулятором трансляции в мРНК eRF1 является старт-кодон кОПС в 5'-НТО eRF1.

Механизм регуляции трансляции мРНК eRF1 некодирующими областями

Полученные нами данные показывают, что наибольшее влияние на трансляцию оказывает 5'-НТО eRF1, а также ее сочетание с 3'-НТО eRF1, которые стимулируют трансляцию основной ОПС. При этом старт-кодон кОПС в 5'-НТО eRF1 ингибирует трансляцию, так как его удаление дополнительно увеличивает эффективность трансляции более чем в 2 раза, что в целом соответствует представлениям о регуляции трансляции кОПС [39–42]. Мы предполагаем, что трансляция eRF1 регулируется на двух уровнях: на уровне транскрипции и на уровне трансляции. Как видно из рис. 1б, мРНК eRF1 гетерогенна, имеет лидерные участки разной длины, при этом множественные сайты старта транскрипции концентрируются в области дополнительных старт-кодонов в 5'-НТО. Таким образом, за счет регуляции транскрипции может продуцироваться мРНК eRF1 с различным количеством дополнительных старт-кодонов и кОПС. В свою очередь,

дополнительные старт-кодоны и кОПС регулируют трансляцию по известным механизмам, ингибируя трансляцию основной ОПС за счет “захвата” факторов инициации трансляции. Таким образом, наибольшую эффективность трансляции eRF1 должны обеспечивать транскрипционные варианты мРНК с короткой 5'-НТО, не включающие дополнительные старт-кодоны. Следует отметить, что регуляция трансляции основной ОПС посредством кОПС активно изучается на других объектах, и полученные нами данные соответствуют общепринятому мнению о том, что кОПС подавляют трансляцию основной ОПС [39–42]. Кроме того, в ряде работ поднимается вопрос о регуляции трансляции за счет гетерогенности старта транскрипции некоторых мРНК, приводящей к возникновению в них набора 5'-НТО различной длины [43–45], что соответствует нашим выводам о транскрипции eRF1.

Также мы заметили, что старт-кодон основной ОПС eRF1 входит в состав трансляционно-транскрипционного регуляторного элемента TISU (Translation Initiator of Short 5'UTR). Ранее считалось, что трансляция первого старт-кодона мРНК, имеющей слишком короткую 5'-НТО, происходит неэффективно, с “утечкой” старта трансляции на

следующий AUG [46]. Однако позднее был описан регуляторный элемент TISU, способствующий эффективной трансляции с первого старт-кодона в матрицах мРНК, имеющих короткую 5'-НТО [47]. Локализация TISU частично перекрывается с последовательностью Козак. Кроме того, TISU описан как цис-регулятор транскрипции, способный связываться с транскрипционным фактором YY1 (Yin Yang 1 – Инь Ян 1) и эффективно стимулировать синтез мРНК с промоторов генов, имеющих высокую гетерогенность сайтов старта транскрипции [47]. Наличие TISU и его положение в мРНК eRF1 согласуются с нашей гипотезой о двухуровневой транскрипционно-трансляционной регуляции трансляции eRF1.

В целом, можно заключить, что регуляция трансляции основной ОРС eRF1 человека принципиально отличается от регуляции трансляции мРНК eRF1 растений и грибов, у которых описано существование NMD-зависимого авторегуляторного контура экспрессии [31, 32]. Продукция фактора терминации eRF1 человека не зависит от его концентрации в клетке и регулируется собственными 5'- и 3'-НТО.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-24-01019)

Настоящая работа выполнена без использования людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны на сайте: http://www.molecbio.ru/downloads/2024/4/supp_Shuvalov_rus.pdf.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bertram G., Bell H.A., Ritchie D.W., Fullerton G., Stansfield I. (2000) Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA*. **6**, 1236–1247.
- Frolova L., Seit-Nebi A., Kisselev L. (2002) Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. *RNA*. **8**, 129–136.
- Bulygin K.N., Khairulina Y.S., Kolosov P.M., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Vorobjev Y.N., Frolova L.Y., Kisselev L.L., Karpova G.G. (2010) Three distinct peptides from the N domain of translation termination factor eRF1 surround stop codon in the ribosome. *RNA*. **16**, 1902–1914.
- Bulygin K.N., Khairulina Y.S., Kolosov P.M., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Vorobjev Y.N., Frolova L.Y., Karpova G.G. (2011) Adenine and guanine recognition of stop codon is mediated by different N domain conformations of translation termination factor eRF1. *Nucl. Acids Res.* **39**, 7134–7146.
- Kryuchkova P., Grishin A., Eliseev B., Karyagina A., Frolova L., Alkalaeva E. (2013) Two-step model of stop codon recognition by eukaryotic release factor eRF1. *Nucl. Acids Res.* **41**, 4573–4586.
- Brown A., Shao S., Murray J., Hegde R.S., Ramakrishnan V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature*. **524**, 493–496.
- Frolova L.Y., Tsivkovskii R.Y., Sivolobova G.F., Oparina N.Y., Serpinsky O.I., Blinov V.M., Tatkov S.I., Kisselev L.L. (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA*. **5**, 1014–1020.
- Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M. (1995) Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**, 4065–4072.
- Frolova L., Le Goff X., Zhouravleva G., Davydova E., Philippe M., Kisselev L. (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA*. **2**, 334–341.
- Stansfield I., Jones K.M., Kushnirov V.V., Dagkesamanskayal A.R., Poznyakovski A., Paushkin S.V., Nierras C.R., Cox B.S., Ter-Avanesyan M.D., Tuite M.F. (1995) The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 4365–4373.
- Paushkin S.V., Kushnirov V.V., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. (1997) Interaction between yeast Sup45p (eRF1) and Sup35p (eRF3) polypeptide chain release factors: implications for prion-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2798–2805.
- 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**, S1355838298971874.
- Merkulova T.I., Frolova L.Y., Lazar M., Camonis J., Kisselev L.L. (1999) C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their *in vivo* interaction. *FEBS Lett.* **443**, 41–47.
- Namy O., Hatin I., Rousset J. (2001) Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep.* **2**, 787–793.
- Atkins J.F., Loughran G., Bhatt P.R., Firth A.E., Baranov P.V. (2016) Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: from genetic steganography and cryptography to adventitious use. *Nucl. Acids Res.* **44**, 7007–7078
- Rodnina M.V., Korniy N., Klimova M., Karki P., Peng B. Z., Senyushkina T., Belardinelli R., Maracci C., Wohlgemuth I., Samatova E., Peske F. (2020) Translational recoding: canonical translation mechanisms reinterpreted. *Nucl. Acids Res.* **48**, 1056–1067.
- Brogna S., Wen J. (2009) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 107–113.
- Шабельская С.В., Журавлева Г.А. (2010) Мутации в гене SUP35 нарушают процесс деградации мРНК, содержащих преждевременные стоп-кодоны. *Молекуляр. биология.* **44**, 51–59.
- Schweingruber C., Rufener S.C., Zünd D., Yamashita A., Mühlemann O. (2013) Nonsense-mediated mRNA decay – Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms.* **1829**, 612–623.

20. Karousis E.D., Gurzeler L.-A., Annibaldis G., Dreos R., Mühlemann O. (2020) Human NMD ensues independently of stable ribosome stalling. *Nat. Commun.* **11**, 4134.
21. Yang Q., Yu C.-H., Zhao F., Dang Y., Wu C., Xie P., Sachs M.S., Liu Y. (2019) eRF1 mediates codon usage effects on mRNA translation efficiency through premature termination at rare codons. *Nucl. Acids Res.* **47**, 9243–9258.
22. Wada M., Ito K. (2019) Misdecoding of rare CGA codon by translation termination factors, eRF1/eRF3, suggests novel class of ribosome rescue pathway in *S. cerevisiae*. *FEBS J.* **286**, 788–802.
23. Dever T.E., Ivanov I.P., Sachs M.S. (2020) Conserved upstream open reading frame nascent peptides that control translation. *Annu. Rev. Genet.* **54**, 237–264.
24. Bidou L., Allamand V., Rousset J.-P., Namy O. (2012) Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol. Med.* **18**, 679–688.
25. Janzen D.M. (2004) The effect of eukaryotic release factor depletion on translation termination in human cell lines. *Nucl. Acids Res.* **32**, 4491–4502.
26. Freitag J., Ast J., Böcker M. (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature.* **485**, 522–525.
27. Schueren F., Lingner T., George R., Hofhuis J., Dickel C., Gärtner J., Thoms S. (2014) Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *ELife.* **3**, e03640
28. Hofhuis J., Schueren F., Nötzel C., Lingner T., Gärtner J., Jahn O., Thoms S. (2016) The functional readthrough extension of malate dehydrogenase reveals a modification of the genetic code. *Open Biol.* **6**, 160246.
29. Svidritskiy E., Demo G., Korostelev A.A. (2018) Mechanism of premature translation termination on a sense codon. *J. Biol. Chem.* **293**, 12472–12479.
30. Dubourg C., Toutain B., Le Gall J.-Y., Le Treut A., Guenet L. (2003) Promoter analysis of the human translation termination factor 1 gene. *Gene.* **316**, 91–101.
31. Nyikó T., Auber A., Szabadkai L., Benkovics A., Auth M., Mérai Z., Kerényi Z., Dinnyés A., Nagy F., Silhavy D. (2017) Expression of the eRF1 translation termination factor is controlled by an autoregulatory circuit involving readthrough and nonsense-mediated decay in plants. *Nucl. Acids Res.* **45**, 4174–4188.
32. Kurilla A., Szőke A., Auber A., Káldi K., Silhavy D. (2020) Expression of the translation termination factor eRF1 is autoregulated by translational readthrough and 3'UTR intron-mediated NMD in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **594**, 3504–3517.
33. Shuvalov A., Shuvalova E., Biziaev N., Sokolova E., Evmenov K., Pustogarov N., Arnautova A., Matrosova V., Egorova T., Alkalaeva E. (2021) Nsp1 of SARS-CoV-2 stimulates host translation termination. *RNA Biol.* **18**, 804–817.
34. Соколова Е.Е., Власов П.К., Егорова Т.В., Шува-лов А.В., Алкалаева Е.З. (2020) Влияние A/G-состава 3'-контекстов стоп-кодонов на терминацию трансляции у эукариот. *Молекуляр. биология.* **54**, 837–848.
35. Biziaev N., Sokolova E., Yanvarev D.V., Toropygin I.Y., Shuvalov A., Egorova T., Alkalaeva E. (2022) Recognition of 3' nucleotide context and stop codon readthrough are determined during mRNA translation elongation. *J. Biol. Chem.* **298**, 102133.
36. Holm S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian J. Statistics.* **6**, 65–70.
37. Suzuki A., Kawano S., Mitsuyama T., Suyama M., Kanai Y., Shirahige K., Sasaki H., Tokunaga K., Tsuchihara K., Sugano S., Nakai K., Suzuki Y. (2018) DBTSS/DBKERO for integrated analysis of transcriptional regulation. *Nucl. Acids Res.* **46**, D229–D238.
38. Akulich K.A., Andreev D.E., Terenin I.M., Smirnova V.V., Anisimova A.S., Makeeva D.S., Arkhipova V.I., Stolboush-kina E.A., Garber M.B., Prokofjeva M.M., Spirin P.V., Prassolov V.S., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. (2016) Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes. *Sci. Rep.* **6**, 37905.
39. Lin Y., May G.E., Kready H., Nazzaro L., Mao M., Spealman P., Creeger Y., McManus C.J. (2019) Impacts of uORF codon identity and position on translation regulation. *Nucl. Acids Res.* **47**, 9358–9367.
40. Dever T.E., Ivanov I.P., Hinnebusch A.G. (2023) Translational regulation by uORFs and start codon selection stringency. *Genes Dev.* **37**, 474–489.
41. Starck S.R., Tsai J.C., Chen K., Shodiya M., Wang L., Yahiro K., Martins-Green M., Shastri N., Walter P. (2016) Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science.* **351**, aad3867
42. Akulich K.A., Sinitcyn P.G., Makeeva D.S., Andreev D.E., Terenin I.M., Anisimova A.S., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. (2019) A novel uORF-based regulatory mechanism controls translation of the human MDM2 and eIF2D mRNAs during stress. *Biochimie.* **157**, 92–101.
43. Dieudonné F.-X., O'Connor P.B.F., Gubler-Jaquier P., Yasrebi H., Conne B., Nikolaev S., Antonarakis S., Baranov P.V., Curran J. (2015) The effect of heterogeneous transcription start sites (TSS) on the transcriptome: implications for the mammalian cellular phenotype. *BMC Genomics.* **16**, 986.
44. Wang X., Hou J., Quedenau C., Chen W. (2016) Pervasive isoform-specific translational regulation via alternative transcription start sites in mammals. *Mol. Systems Biol.* **12**, 875
45. Li H., Bai L., Li H., Li X., Kang Y., Zhang N., Sun J., Shao Z. (2019) Selective translational usage of TSS and core promoters revealed by transcriptome sequencing. *BMC Genomics.* **20**, 282.
46. Kozak M. (1991) A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expression.* **1**, 111–115.
47. Elfakess R., Dikstein R. (2008) A translation initiation element specific to mRNAs with very short 5'UTR that also regulates transcription. *PLoS One.* **3**, e3094.

Human eRF1 Translation Regulation

A. V. Shuvalov^{1, 2}, A. A. Klishin^{1, 3}, N. S. Biziaev¹, E. Y. Shuvalova^{1, 2}, E. Z. Alkalaeva^{1, 2, 3, *}

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

²*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

³*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

*e-mail: alkalaeva@imb.ru

Translation termination factor eRF1 is an important cellular protein that plays a key role in translation termination, nonsense-mediated mRNA decay (NMD), and stop-codons readthrough. An amount of eRF1 in the cell influences all these processes. The mechanism of eRF1 translation regulation through an autoregulatory NMD-dependent expression circuit has been described for plants and fungi, but the mechanisms of human eRF1 translation regulation have not yet been studied. Using reporter constructs, we studied the effect of eRF1 mRNA elements on its translation in cell-free translation systems and HEK293 cells. Our data do not support the presence of the NMD-dependent autoregulatory circuit of human eRF1 expression. We found that the 5'-untranslated region (5'-UTR) of eRF1 mRNA and the start codon of the upstream open reading frame (uORF) have the greatest influence on the translation of CDS. According to the DataBase of Transcriptional Start Sites (DBTSS), eRF1 mRNA has a high heterogeneity of transcription start sites and variable length of 5'-UTRs as a consequence. Moreover, the start codon of the eRF1 CDS is located within the known Translation Initiator of Short 5'UTR (TISU), which also stimulates mRNA transcription of genes with high transcription start heterogeneity. We hypothesize that regulation of eRF1 mRNA translation occurs at both the transcriptional and translational levels. At the transcription level, the length of the 5'-UTRs of eRF1 and the number of short open reading frames in it are regulated, which in turn regulate eRF1 production at the translational level.

Keywords: eRF1, translation, mRNA, 3'-untranslated region of mRNA, 5'-untranslated region of mRNA, short open reading frame, uORF, 5'-UTR, 3'-UTR