

ФОСФОРИЛИРОВАННЫЕ *IN VIVO* СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛОФЕРМЕНТА ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III ЧЕЛОВЕКА

© А. С. Солодовникова, Н. А. Меркулова, А. А. Перова, В. М. Седова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: sedova@mail.cytspb.rssi.ru

Исследовали фосфорилирование *in vivo* субъединиц холофермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы III человека. РНК-полимераза III из ядер зрелой плаценты и клеток эпидермоидной карциномы (линия А431) человека выделена в виде двух субфракций (IIIa и IIIb), различающихся по порядку элюции с колонки ДЭАЭ Сефадекс А-25 и плавучей плотности при центрифугировании в градиенте плотности глицерина. В составе субфракций обнаружены четыре фосфорилированные *in vivo* субъединицы с мол. массами 60, 52, 45 и 38 кДа. Субъединицы с мол. массами 60 и 45 кДа фосфорилированы по остаткам серин/треонина и тирозина. Субъединица с мол. массой 38 кДа фосфорилирована только по остаткам тирозина. Эти субъединицы могут быть отнесены к субъединицам собственно РНК-полимеразы III. Субъединица с мол. массой 38 кДа является общей для РНК-полимеразы III и РНК-полимеразы I. Идентифицированная нами субъединица с мол. массой 52 кДа фосфорилирована по остаткам серин/треонина и, вероятно, принадлежит к одному из базальных транскрипционных факторов РНК-полимеразы III.

Ключевые слова: РНК-полимераза III, субъединицы, фосфорилирование, клетки человека.

ДНК-зависимая РНК-полимераза III осуществляет транскрипцию стабильных ядерных РНК — 5S рРНК, всех тРНК, U6 мяРНК, 7SK, 7SL и ряда вирусных РНК. Эти РНК не транслируются, но принимают участие в очень важных для жизнедеятельности клетки процессах, таких как процессинг и сплайсинг матричных РНК, трансляция белков (Hu et al., 2003). В пролиферирующих клетках млекопитающих максимальный уровень активности РНК-полимеразы III достигается непосредственно перед переходом из фазы G₁ в фазу S клеточного цикла (Mauger, Scott, 2004). У большинства трансформированных клеток уровень экспрессии продуктов РНК-полимеразы III почти в 5 раз превышает таковой нормальных клеток (White et al., 1996).

Промоторы генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, отличаются разнообразием и по структуре, и по локализации (Sentenac, 1985; Geiduschek, Kassavetis, 2001). Для узнавания этих промоторов и корректной и продуктивной транскрипции РНК-полимеразы III используют различные наборы базальных транскрипционных факторов (Geiduschek, Kassavetis, 2001), т. е. РНК-полимераза III является составной частью сложного транскрипционного комплекса — холофермента.

Регуляторная роль фосфорилирования компонентов холофермента РНК-полимеразы III в последнее время изучается достаточно интенсивно. Впервые на роль фосфорилирования в регуляции транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III, обратили внимание Хокман и Шульц, которые показали, что для достижения высокого уровня базальной транскрипции генов 5S рРНК и тРНК дрожжам необходима казеинкиназа (Hockman, Schultz, 1996).

С белком, связывающим ТАТА-бокс (ТВР), который является компонентом базального транскрипционного фактора TFIIIB, ассоциирована казеинкиназа 2 (Ghavidel, Schultz, 2001). Активность ассоциированной казеинкиназы 2 угнетается при возникновении повреждений на матрице ДНК, что приводит к подавлению транскрипции РНК-полимеразы III. Считают, что казеинкиназа 2 представляет собой звено сигнального пути, который участвует в регуляции транскрипции генов класса III при нарушении целостности генома (Ghavidel, Schultz, 2001). Субъединица TFIIIB с мол. массой 70 кДа — Vdp1 — также модифицируется казеинкиназой 2, что приводит к угнетению транскрипции на промоторе гена U6 мяРНК (Hu et al., 2004). Ассоциированная с ТВР субъединица TFIIIB с мол. массой 92 кДа является мишенью для фосфорилирования циклинзависимой киназной активностью фактора, активирующего созревание (митоз). Модификация этой субъединицы TFIIIB может ингибировать активность транскрипционного комплекса РНК-полимеразы III в процессе митоза (Leresche et al., 1996).

TFIIIB является мишенью для протеинкиназы С. Эта модификация приводит к подавлению транскрипции РНК-полимеразой III гена *c-myc* человека. Промотор этого гена уникален тем, что может быть транскрибирован и РНК-полимеразой II, и РНК-полимеразой III. Фосфорилирование фактора TFIIIB является определяющим в выборе между промоторами РНК-полимеразы II и РНК-полимеразы III (Xu et al., 1998).

Фосфорилирование компонентов холофермента РНК-полимеразы III играет существенную роль не только на уровне формирования транскрипционного комплекса и инициации транскрипции, но регулирует сфор-

мированный, активно работающий комплекс (Fan et al., 1997). La-аутоантиген, высококонсервативный РНК-связывающий белок (Rappone et al., 1998), участвует в термации и реинициации транскрипции РНК-полимеразы III. Нативный La-белок существует в фосфорилированной (неактивной) и нефосфорилированной (активной) формах. Казеинкиназа 2, фосфорилируя La-антиген, ингибирует активность стабильного транскрипционного комплекса. Позитивную роль в регуляции биогенеза рибосом и синтеза тРНК играет TOR-киназа, принадлежащая семейству PI3-киназ (Schmelzle, Holl, 2000).

Что касается собственно РНК-полимеразы III, то в составе фермента из дрожжей идентифицированы две фосфорилированные *in vivo* субъединицы с мол. массами 23 и 19 кДа, которые являются общими для всех трех РНК-полимераз (Bell et al., 1977), что делает весьма привлекательной идею о возможности координации транскрипции, осуществляемой всеми тремя полимеразами, через модификации их общих субъединиц. Однако экспериментального подтверждения эта гипотеза пока не получила. В литературе отсутствуют данные о модификациях субъединиц собственно РНК-полимеразы III выших эукариот *in vivo*.

Целью нашего исследования явилось изучение фосфорилирования *in vivo* индивидуальных субъединиц собственно РНК-полимеразы III человека. В качестве объектов нами были выбраны клетки эпидермоидной карциномы человека А431, а также ткань зрелой плаценты человека, доступная в значительных количествах, что необходимо для выделения и очистки ДНК-зависимых РНК-полимераз. В составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из ядер эпидермоидной карциномы и плаценты человека, выявлены фосфорилированные *in vivo* по остаткам серин/треонина и остатку тирозина четыре полипептида, три из которых с мол. массами 60, 45 и 38 кДа с большой долей вероятности могут быть отнесены к субъединицам собственно РНК-полимеразы III. Что касается субъединицы с мол. массой 52 кДа, фосфорилированной по остаткам серин/треонина, то она не может быть отнесена к собственно РНК-полимеразе III, так как среди субъединиц, входящих в состав РНК-полимеразы III человека, полипептида с такой молекулярной массой не выявлено (Sentenac, 1985).

Материал и методика

Зрелую плаценту человека брали в родильном отделении Института акушерства и гинекологии им. Д. М. Отта РАМН. Ткань немедленно препарировали на фрагменты массой не более 50 г, замораживали и хранили в жидком азоте. Перед употреблением ткань размораживали до температуры, не превышающей 0 °С. Клетки эпидермоидной карциномы человека А431 получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Выделение ядер. Для выделения ядер плаценту гомогенизировали в 5 объемах раствора 2.2 М сахарозы, содержащего 15 мМ MgCl₂, 0.25 мМ спермина, 0.5 мМ спермидина, 0.2 мМ ЭГТА, 0.2 мМ ЭДТА и 0.5 мМ фенолметилсульфонилфторида. Гомогенат наслаивали на подслоюку 2.2 М сахарозы и центрифугировали при 90 000 g в течение 1 ч. Осадок ядер суспендировали в буфере 1 и хранили в жидком азоте или немедленно использовали для получения ядерного экстракта. Клетки куль-

тивировали на среде ДМЕМ в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ до состояния монослоя. Клетки собирали с помощью скребка (фирма Sarsted), промывали дважды раствором Хенкса и суспендировали в 5 объемах буфера 4. Далее клетки разрушали с помощью ручного гомогенизатора, полную разрушения контролировали под микроскопом. Ядра осаждали центрифугированием при 250 000 g в течение 30 мин. Осадок ядер суспендировали в буфере 1 и хранили в жидком азоте или немедленно использовали для получения ядерного экстракта (Dignam, Leibovitz, 1983).

Получение ядерного экстракта. Ядра, суспендированные в буфере 1, смешивали с равным объемом буфера 2. Суспензию ядер гомогенизировали в плотно притертом гомогенизаторе в течение 40 мин и центрифугировали при 25 000 g в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, супернатант диализовали в течение ночи против буфера 1, содержащего 0.250 М сульфата аммония. Полученный ядерный экстракт использовали для выделения и очистки РНК-полимеразы III.

Выделение и очистка РНК-полимеразы III. Выделение холофермента РНК-полимеразы III осуществляли на колонке Непарин Нурег DM. После нанесения ядерного экстракта колонку промывали 5 объемами буфера 1, содержащего 0.360 М сульфата аммония, что приводит к полному освобождению колонки от РНК-полимеразы II и ряда транскрипционных факторов (Huet, Manaud, 1996; Hannan et al., 1998). Фракционирование осуществляли в линейном градиенте концентраций сульфата аммония (0.365—0.800 М) на буфере 1. Собирали 35 фракций, в каждой из которых определяли активность РНК-полимеразы III.

Фракции, элюируемые в интервале концентраций сульфата аммония 0.40—0.55 М и содержащие суммарную активность РНК-полимераз I и III, объединяли, разводили буфером 3 до концентрации сульфата аммония 0.120 М и наносили на колонку ДЭАЭ-Сефадекс А-25, уравновешенную буфером 3, содержащим в этой же концентрации сульфат аммония. В этих условиях РНК-полимераза I не связывается с ионообменником. Для полного освобождения от РНК-полимеразы I колонку промывали 5 объемами буфера 3, содержащего 0.150 М сульфата аммония.

РНК-полимеразу III элюировали с колонки ДЭАЭ-Сефадекс А-25 градиентом концентраций сульфата аммония 0.150—0.700 М, приготовленным на буфере 3. Собирали 25 фракций, в каждой фракции определяли активность РНК-полимеразы III.

Субфракции IIIa и IIIb, элюируемые в интервале концентраций сульфата аммония 0.320—0.350 и 0.480—0.500 М соответственно, объединяли, добавляли бычий сывороточный альбумин в качестве носителя до конечной концентрации 50 мкг/мл и кристаллический сульфат аммония из расчета 42 г на 100 мл раствора. Осадок формировали в течение ночи. Препарат центрифугировали 1 ч при 105 000 g, осадок растворяли в минимальном объеме буфера 3. Чтобы освободиться от избытка сульфата аммония, фермент диализовали против буфера 3 в течение 2 ч и далее наносили на градиент плотности глицерина (22.5—35.0 %) в буфере 3, содержащем 0.110 М сульфата аммония. Разделение в градиенте осуществляли центрифугированием при 90 000 g в течение 18 ч. Градиент фракционировали на 10 проб, в каждой из которых определяли активность РНК-полимеразы III.

Фракции, соответствующие пикам активности, собирали и диализовали против буфера 3а, содержащего 0.110 М сульфата аммония, в течение ночи. Добавляли сывороточный альбумин до конечной концентрации 300 мкг/мл. Субфракции фермента хранили в виде аликвот в жидком азоте. Удельная активность препаратов РНК-полимеразы III колебалась в пределах 0.3—0.5 Е в 5 мкл раствора.

Определение активности РНК-полимеразы III на каждом этапе проводили в системе, содержащей 50 мМ Трис-НСl, рН 7.9, 80 мМ сульфата аммония, 2.5 мМ ДТТ, 1 мМ MgCl₂, 15 % глицерина, 1 мкг денатурированной ДНК плаценты человека, АТР, ГТР, СТР и УТР в концентрации 0.5 мМ каждый, 0.06 МБк [³H]-УТР с удельной активностью 12 ГБк/мМ и 5 мкл фракции, содержащей РНК-полимеразу III. Конечный объем пробы составлял 25 мкл. Осаждение кислотонерастворимого материала производили 5%-ной ТХУ в присутствии сывороточного альбумина в качестве носителя, осадки собирали на фильтры GF/C (Whatman) и промывали 5%-ной ТХУ и 96%-ным этиловым спиртом. Радиоактивность подсчитывали в толуольном сцинтиллаторе на счетчике фирмы Beckman (США). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для включения 1 нмоль УТР за 15 мин при 37 °С.

Для идентификации фосфорилированных индивидуальных субъединиц РНК-полимеразы III фермент разгоняли методом диск-электрофореза в 4.5—9.0%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия при токе 7 мА в течение ночи (Laemmly, 1970). Гель, содержащий пробы белков-стандартов, окрашивали серебром по методу Рэй и Ву (Wray, Wu, 1981).

Разделенные полипептиды электрофоретически переносили на бумагу Hybond C Extra в аппарате BioRad в 0.118 мМ Трис-глицериновом буфере, рН 8.3, содержащем 20 % метилового спирта, при силе тока 70 мА в течение 18 ч. Фосфорилирование отдельных субъединиц РНК-полимеразы III исследовали с антителами против фосфорилированных серин/треонина и тирозина. В качестве вторых антител использовали моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой. Визуализацию конъюгата осуществляли хемилюминесцентной реакцией в системе Super Signal (Pierce, США), блоты совмещали с R-пленкой и выдерживали в течение времени, достаточного для получения выраженной картины.

Использованные реактивы: ДЕАЕ-Сефадек А-25 (Pharmacia, Швеция), HEPARIN HyperD M (Bioserga, Франция), нуклеозидтрифосфаты — АТР, ГТР, СТР, УТР («Вектор», Бердск), радиоактивные изотопы [³H]-УТР (ГНЦ РФ ФЗИ, Обнинск), антитела против фосфосерин-треонина и фосфотирозина (BD Biosciences, Pharmingen, США), в качестве стандартов молекулярных масс использовали набор Low molecular weight Sigma Marker (США). Для идентификации антител, конъюгированных с пероксидазой, использовали систему Super Signal фирмы Pierce (США). Среду ДМЕ (ДМЕМ) и эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота приобретали в фирме «БиоЛот» (Россия).

Для выделения РНК-полимеразы III использовали следующие буферные растворы.

Буфер 1: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.9, 0.5 мМ ЭДТА, 0.2 мМ ДТТ и 10%-ный глицерин; буфер 2: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.9, 0.84 М NaCl, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ ЭДТА, 0.5 мМ PMSF, 0.5 мМ ДТТ и 40%-ный глицерин; буферы 3 и 3а: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.9, 5 мМ ЭДТА,

0.2 мМ ДТТ и 20%-ный и 50%-ный глицерин соответственно; буфер 4: 10 мМ Трис-НСl, рН 7.9, 1.5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl и 0.5 мМ ДТТ.

Насыщенный при 25 °С раствор сульфата аммония титровали концентрированным раствором аммиака до рН 7.0. Бычий сывороточный альбумин прогревали при 37 °С в течение 10 мин для удаления примесей протеаз. Все растворы готовили на деионизованной воде. Все процедуры выполняли на холоде.

Результаты и обсуждение

Выделенная нами РНК-полимераза III из ядер эпидермоидной карциномы и плаценты человека представляет собой две фракции, которые в глицериновом градиенте обладают различной плавучей плотностью. Более легкая фракция, обозначенная как РНК-полимераза IIIа, практически не мигрирует с поверхности глицеринового градиента, а более тяжелая, РНК-полимераза IIIб, мигрирует при центрифугировании в область более высоких концентраций глицерина (Никитина и др., 2002). Обе фракции РНК-полимеразы III достаточно эффективно транскрибируют *in vitro* денатурированную тотальную ДНК плаценты человека и плазмиды, несущие гены 5S рРНК и тРНК.

Мы исследовали фосфорилирование полипептидов, входящих в состав обеих фракций РНК-полимеразы III, после разделения в 4.5—9.0%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и переноса на бумагу Hybond C Extra методом иммуноблотинга. Результаты идентификации субъединиц субфракций холофермента РНК-полимеразы III из клеток А431 и плаценты человека, фосфорилированных по серин/треонину, приведены на рис. 1.

Для наиболее точного определения молекулярных масс фосфорилированных *in vivo* субъединиц мы использовали стандартные наборы полипептидов (Sigma, США). После разделения в ПААГ и окрашивания серебром подвижность белков-стандартов измеряли, строили кривую зависимости подвижности от молекулярной массы и по этой кривой определяли молекулярную массу субъединиц РНК-полимераз IIIа и IIIб, фосфорилированных *in vivo* (рис. 2). По остаткам серин/треонина в составе субфракций холофермента РНК-полимеразы III из клеток А431 и из ядер плаценты человека фосфорилированными оказались три полипептида с мол. массами 60, 52 и 45 кДа. Фосфорилирование индивидуальных субъединиц по остаткам серин/треонина в составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенной из клеток А431, различается по интенсивности (рис. 1, А). Субъединицы с мол. массами 60 и 52 кДа фосфорилированы несколько интенсивнее, чем субъединица 45 кДа. Следует отметить, что в составе субфракции РНК-полимеразы IIIб субъединица с мол. массой 45 кДа фосфорилирована по остаткам серин/треонина слабее, чем в субфракции IIIа.

Результаты изучения фосфорилирования *in vivo* индивидуальных субъединиц субфракций РНК-полимеразы III по остаткам тирозина, выделенных из клеток А431 и ядер плаценты человека, приведены на рис. 3. Как и в случае определения молекулярных масс субъединиц РНК-полимеразы III, фосфорилированных по остаткам серин/треонина, молекулярные массы субъединиц, фосфорилированных по остаткам тирозина, определяли по кривой распределения белков-стандартов после электро-

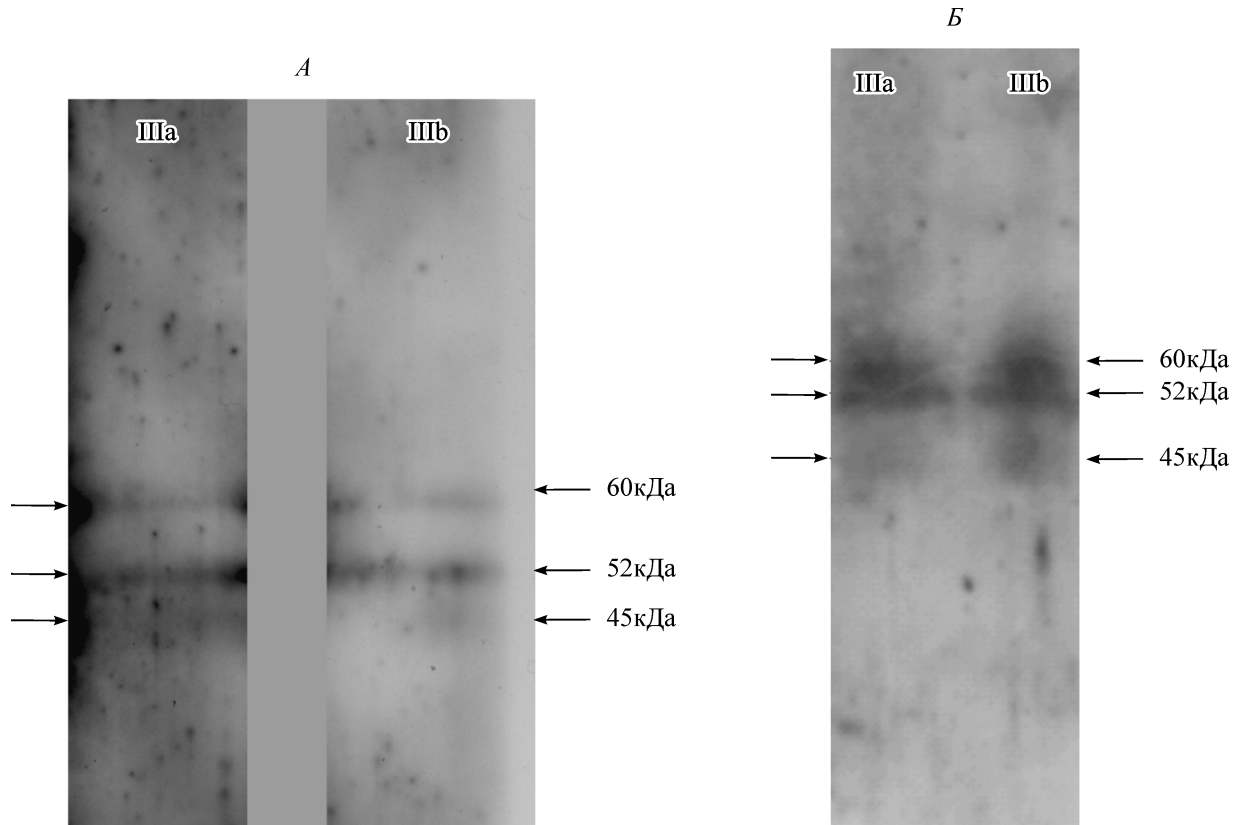


Рис. 1. Иммуноблоттинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам серин/треонина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека А431 (А) и плаценты человека (Б).

IIIa — субфракция РНК-полимеразы, отличающаяся низкой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина; IIIб — субфракция РНК-полимеразы, отличающаяся высокой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

фореза в ПААГ (рис. 2). В результате этого определения в составе субфракций холофермента РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы и ядер плаценты человека, фосфорилированными *in vivo* по остаткам тирозина оказались субъединицы с мол. массами 60, 45 и 38 кДа. В составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенной из ядер плаценты, высокой интенсивностью отличается фосфорилирование по остаткам тирозина субъединицы с мол. массами 60 и 38 кДа (рис. 3, Б). Субъединица 45 кДа фосфорилирована менее интенсивно в субфракции IIIa, в составе субфракции IIIб эта субъединица фосфорилирована исчезающе слабо. Такое различие в степени фосфорилирования индивидуальных субъединиц в составе субфракций РНК-полимеразы III, возможно, вносит определенный вклад в плавучую плотность этих субфракций, так как степень фосфорилирования субъединицы 45 кДа и по остаткам серин/треонина, и по остаткам тирозина может влиять на общий заряд молекулы фермента и соответственно на ее укладку.

Гетерогенность препаратов РНК-полимеразы III высших эукариот была показана впервые на клетках плазмоцитомы мышей МОРС 15 (Sklar, Roeder, 1976). РНК-полимераза III из этих клеток была идентифицирована в виде двух субформ, различающихся по молекулярной массе одной из субъединиц. Авторы предположили, что данные различия могут быть результатом какой-то модификации фермента, но сама модификация охарактеризована не была, и гипотеза не получила развития (Sklar, Roeder, 1976).

Согласно современным представлениям, гетерогенность холофермента РНК-полимеразы III может определяться различными наборами транскрипционных факторов, ответственных за считывание генов класса III (Sentenac, 1985; Geiduschek, Tochinni—Valentini, 1988), но нельзя исключить и определенную роль модификаций субъединиц собственно РНК-полимеразы III в формировании и функционировании холофермента на промото-

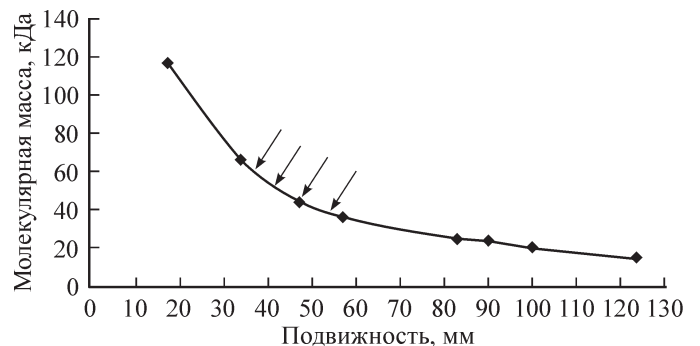


Рис. 2. Кривая подвижности белков-стандартов с мол. массами 116, 66, 45, 36, 25, 24, 20 и 14.3 кДа при электрофорезе в 4.5—9%-ном ПААГ по Лэммли (Laemmly, 1977), которая была использована для определения молекулярных масс субъединиц РНК-полимеразы III, фосфорилированных *in vivo*.

Стрелками указаны подвижности фосфорилированных *in vivo* полипептидов субфракций РНК-полимеразы III.

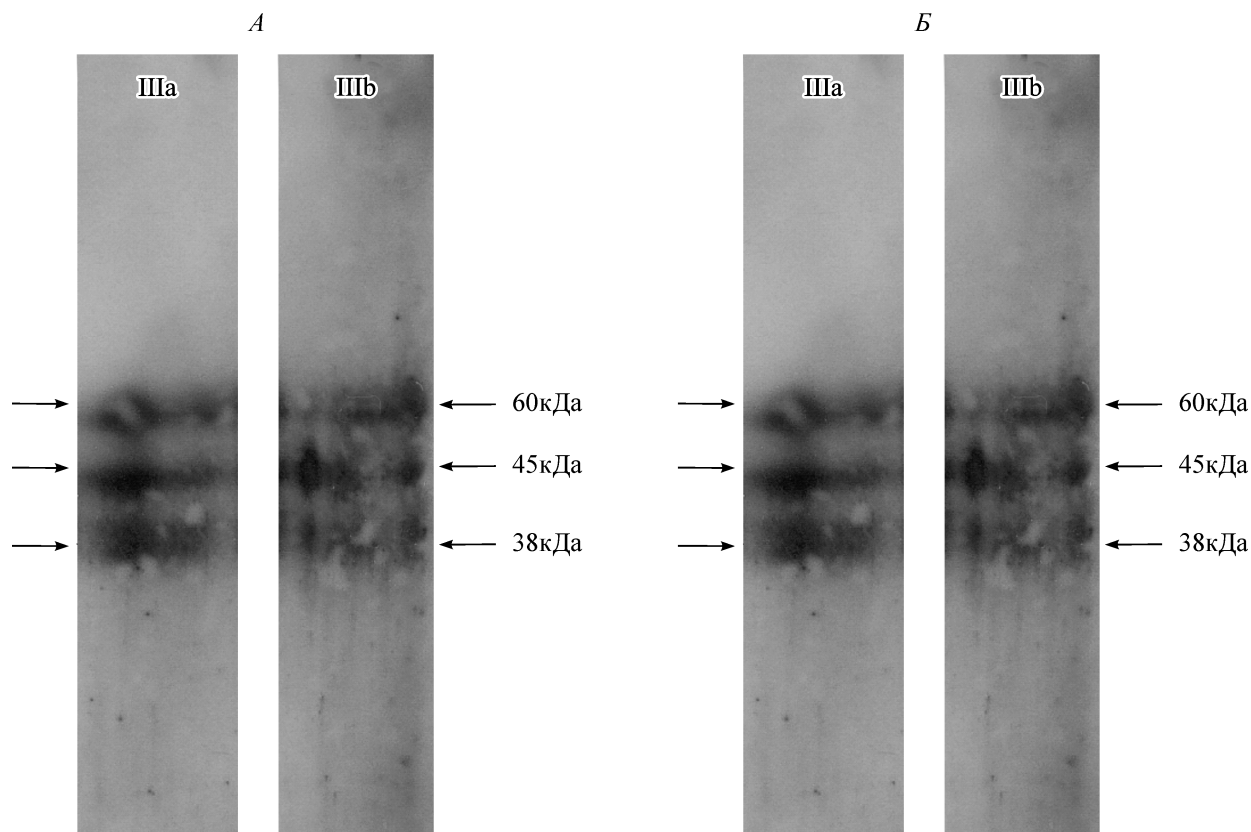


Рис. 3. Иммуноблотинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам тирозина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (А) и плаценты человека (Б).

IIIa — субфракция РНК-полимеразы, отличающаяся низкой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина; IIIб — субфракция РНК-полимеразы, отличающаяся высокой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

рах генов класса III, которые отличаются существенным разнообразием.

В результате проведенного нами исследования в составе холофермента РНК-полимеразы III, выделенного из клеток эпидермоидной карциномы A431 и ядер плаценты человека, идентифицированы две субъединицы с мол. массами 60 и 45 кДа, фосфорилированные и по остаткам серин/треонина, и по остаткам тирозина.

Согласно данным, приведенным в обзоре (Sentenac, 1985), в составе РНК-полимеразы III человека определены субъединицы с мол. массами 60,5, 44,4 и 38,6 кДа. Таким образом, идентифицированные нами фосфорилированные и по остаткам серин/треонина, и по остаткам тирозина субъединицы с мол. массами 60 и 45 кДа и субъединица 38 кДа, фосфорилированная только по остаткам тирозина, с большой степенью вероятности могут быть отнесены к субъединицам собственно РНК-полимеразы III.

Как упоминалось выше, РНК-полимераза III, полученная из дрожжей, включает в себя две фосфорилированные *in vivo* субъединицы с мол. массами 19 и 23 кДа (Bell et al., 1977). Согласно нашим исследованиям в области субъединиц РНК-полимеразы III человека с мол. массой не менее 38 кДа, не обнаружено полипептидов, фосфорилированных по остаткам серин/треонина и тирозина. Интересно отметить, что субъединица с мол. массой 38 кДа является общей для РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы III (Sentenac, 1985). Что касается полипептида с мол. массой 52 кДа, то в составе РНК-полимеразы III человека субъединицы с такой массой нет (Sen-

tenac, 1985). Возможно, этот полипептид принадлежит одному из базальных транскрипционных факторов, входящих в состав выделенного нами холофермента. Возможным претендентом на роль полипептида, фосфорилированного по остаткам серин/треонина и присутствующего в составе холофермента РНК-полимеразы III, можно рассматривать субъединицу BrfU с мол. массой около 50 кДа транскрипционного фактора TFIIIB (Teichman et al., 2000). В составе транскрипционного комплекса РНК-полимеразы III—SNAPc, который обеспечивает транскрипцию U6 мРНК, также присутствует полипептид с мол. массой около 50 кДа (Hu et al., 2003). Однако полученные нами данные не позволяют с достоверностью говорить о возможной принадлежности фосфорилированной по остаткам серин/треонина субъединицы с мол. массой 52 кДа к тому или иному базальному транскрипционному фактору.

Таким образом, нами показано, что в составе холофермента РНК-полимеразы III человека четыре полипептида фосфорилированы *in vivo*. Два из них с мол. массами 60 и 45 кДа, фосфорилированные и по остаткам серин/треонина, и по остаткам тирозина, и полипептид с мол. массой 38 кДа, фосфорилированный по остаткам тирозина, могут быть отнесены к модифицированным субъединицам собственно фермента РНК-полимеразы III.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48497).

Список литературы

- Никитина Т. В., Тищенко Л. И., Седова В. М. 2002. Фосфорилирование—дефосфорилирование РНК-полимеразы III — модификации, регулирующие уровень транскрипции *in vitro*. Цитология. 44 (3) : 277—284.
- Bell G. L., Valenzuela P., Rutter W. J. 1977. Phosphorylation of yeast DNA-dependent RNA polymerases *in vivo* and *in vitro* (isolation enzymes and identification of phosphorylated subunits). J. Biol. Chem. 252 : 3082—3091.
- Dignam J. D., Leibovitz R. M., Roeder R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA Polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res. 11 : 1475—1477.
- Fan H., Sakulich A. L., Goodier J. L., Zhang X., Qun J., Marraia R. J. 1997. Phosphorylation of human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA Polymerase III transcription complexes. Cell. 88 : 707—715.
- Geiduschek E. P., Kassavetis G. A. 2001. The RNA Polymerase III transcription apparatus. J. Mol. Biol. 310 : 1—26.
- Geiduschek E. P., Tocchini-Valentini G. P. 1988. Transcription by RNA polymerase III. Annu. Rev. Biochem. 57 : 873—914.
- Ghavidel A., Schultz M. C. 2001. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA Polymerase III transcriptional machinery. Cell. 106 : 575—584.
- Hannan R. D., Hempel W. M., Cavanaygh A., Arino T., Dimitrov S. I., Moss T., Rothblum L. 1998. Affinity purification of mammalian RNA polymerase I. Identification of an associated kinase. J. Biol. Chem. 273 : 1257—1267.
- Hockman D. J., Schultz M. C. 1996. Casein kinase is required for efficient transcription by RNA polymerase III. Mol. Cell. Biol. 16 : 892—898.
- Hu P., Samudre K., Wu S., Sun Y., Hernandez N. 2004. CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA Polymerase III transcription repression. Mol. Cell. 16 : 81—92.
- Hu P., Wu S., Hernandez N. 2003. A minimal RNA Polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. Mol. Cell. 12 : 699—709.
- Huet J., Manaud N., Dieci G., Peyroche G., Conesa C., Lefebvre O., Ruet A., Riva M., Sentenac A. 1996. RNA polymerase III and class III transcription factors from *Saccharomyces cerevisiae*. Methods Enzymol. 273 : 249—67.
- Laemmly O. 1977. Maturation of head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Leresche A., Wolf V. J., Gottesfeld J. M. 1996. Repression of RNA Polymerase III transcription during M phase of the cell cycle. Exp. Cell Res. 229 : 282—288.
- Mauger E., Scott P. H. 2004. Mitogenic stimulation of transcription by RNA Polymerase III. Biochem. Soc. of Actions. 32 : 976—977.
- Pannone B. K., Xue D., Wolin S. L. 1998. A role of the yeast La protein in U6 on RNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA Polymerase III transcripts. EMBO J. 17 : 7442—7453.
- Schmelzle T., Hall M. N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. Cell. 103 : 253—262.
- Sentenac A. 1985. Eukaryotic RNA Polymerases. CRC Critical Rev. Biochem. 18 : 31—89.
- Sklar V. E. F., Roeder R. G. 1976. Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase III from the mouse plasmacytoma, MOPC 315. J. Biol. Chem. 251 : 1067—1073.
- Teichmann M., Wang Z., Roeder R. G. 2000. A stable complex of a novel transcription factor II-B-related factor, human TFIIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA Polymerase III of genes with upstream promoter elements. PNAS. 97 : 14 200—14 205.
- White R. J., Trouche D., Martin K., Jacson S., Kouzarides T. 1996. Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma proteins. Nature. (London). 382 : 88—90.
- Wray W., Wu P. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gele. Analyt. Biochem. 118 : 197—203.
- Xu G., Gai Q., James B. L. 1998. Protein kinase C inhibit transcription from the RNA Polymerase III promoter of the human *c-myc* gene. Cancer Lett. 123 : 199—205.

Поступила 31 V 2005

SUBUNITS OF HUMAN HOLOENZYME OF DNA DEPENDENT RNA POLYMERASE III PHOSPHORYLATED *IN VIVO*

© A. S. Solodovnikova, N. A. Merkulova, A. A. Perova, V. M. Sedova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: sedova@mail.cytspb.rssi.ru

Phosphorylation of human holoenzyme of DNA dependent RNA polymerase III subunits *in vivo* has been investigated. RNA polymerase III from human placenta nuclei and epidermoid carcinoma cells A431 was isolated as two subfractions (IIIa and IIIb) distinguished in the order of elution from DEAE Sephadex A-25 column chromatography and buoyant density at glycerol gradient centrifugation. The subfractions of RNA polymerase III holoenzyme consists of four subunits with molecular masses 60, 52, 45 and 38 kDa, respectively, phosphorylated *in vivo*. The subunits with molecular masses 60 and 45 kDa are phosphorylated both on tyrosine and serine/threonine residues. All these subunits belong to subunits of the molecules of RNA polymerase III proper. RNA polymerase III and RNA polymerase I have the 38 kDa subunit in common. The subunit with molecular mass 52 kDa is phosphorylated on serine/threonine residues and may be related to some basal transcription factors of RNA polymerase III.