

ДИНАМИЧНОСТЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ СУБЪЕДИНИЦ ХОЛОФЕРМЕНТА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III КЛЕТОК ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА A431, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

© Н. А. Меркулова, В. М. Седова

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

В составе субфракций IIIa и IIIb холофермента РНК-полимеразы III, выделенного из клеток A431, культивированных в условиях голодания по эмбриональной сыворотке, что приводит к удлинению клеточного цикла, и после индукции низкими концентрациями эпидермального фактора роста (ЭФР), в результате чего активируется пролиферация клеток, показана определенная динамичность фосфорилирования по остаткам серин/треонина и тирозина индивидуальных субъединиц *in vivo*. В субфракциях РНК-полимеразы III, выделенной из голодающих клеток, субъединица 45 кДа фосфорилирована достаточно выражено по остаткам серин/треонина только в составе субфракции IIIa. В субфракции IIIb эта субъединица практически не фосфорилирована. При индукции низкой концентрацией (0.1 нг/мл) ЭФР происходит не только восстановление фосфорилирования этой субъединицы по остаткам серин/треонина, но фосфорилирование носит более выраженный характер. В субфракциях РНК-полимеразы III, выделенной из клеток A431, культивированных в условиях голода, уровень фосфорилирования индивидуальных субъединиц по остаткам тирозина не только не снижен, но более интенсивное фосфорилирование субъединицы с мол. массой 60 кДа по сравнению с субъединицами 45 и 38 кДа можно отметить и в составе субфракции IIIa, и в составе субфракции IIIb. В субфракциях IIIa и IIIb холофермента, выделенного из клеток после индукции низкой концентрацией ЭФР, можно наблюдать более выраженное фосфорилирование субъединиц 60 и 38 кДа по сравнению с субъединицей 45 кДа.

ДНК-зависимая РНК-полимераза III синтезирует структурные и каталитические РНК, которые являются компонентами таких важных для жизнедеятельности клетки процессов, как созревание РНК и синтез белка (Sentenac, 1985; Geiduschek, Tocchini-Valentini, 1988; Geiduschek, Kassavetis, 2001). Поскольку эти процессы строго зависят от метаболического состояния клетки, то и транскрипция РНК-полимеразы III регулируется в течение клеточного цикла и клеточной пролиферации, а также в ответ на действие ростовых факторов, при вирусной инфекции и трансформации клеток (Brown et al., 2000; Paule, White, 2000; Felton-Edkins et al., 2003; Mauger, Scott, 2004). Уровень транскрипции РНК-полимеразы III наиболее высок в фазах S и G₂ клеточного цикла и ингибирован во время митоза (Leresche et al., 1996; Gottesfeld, Forbes, 1997).

Клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 экспрессируют избыточно большое количество рецепторов эпидермального фактора роста (ЭФР) на поверхностной мембране (Connolly, Rose, 1987; Masuda, Ui, 1991). ЭФР после связывания с ЭФР-рецептором запускает ряд сигнальных каскадов, сопровождающихся обратимым фосфорилированием различных компонентов этих каскадов, что приводит к активации эффекторных белков и модуляции экспрессии специфических генов (Hackel et al., 1999; Hunter, 2000; Chen et al., 2004; Breitling, Hoeler, 2005). Показано, что фосфорилирование и дефосфорилирование транскрипционных факторов являются той модификацией, которая участвует в регу-

ляции транскрипции в ответ на внеклеточные сигналы (Whitmarsh, Davis, 2000; Bollen, Veullens, 2002). Большинство протеинкиназ и протеинфосфатаз, участвующих в регуляции транскрипции, относятся к серин-треониновым ферментам. Однако показано, что у многоклеточных организмов в ядре присутствуют также и тирозиновые киназы и фосфатазы, которые участвуют в регуляции белок-белковых взаимодействий между некоторыми транскрипционными факторами (NF- κ B, STAT-белки, c-Jun) и РНК-полимеразой II (Cans et al., 2000). Модулирующая роль фосфорилирования РНК-полимеразы III в регуляции экспрессии генов класса III до настоящего времени не изучалась.

Ранее нами было показано, что в клетках A431, культивируемых при низких и высоких концентрациях ЭФР, наблюдаются изменения уровня экспрессии генов 5S рРНК и тРНК_{iMet} (Nikitina et al., 2004). Присутствие в культуральной среде ЭФР в концентрации 0.1 нг/мл приводит к активации пролиферации и усилению в 1.5—2.0 раза экспрессии гена тРНК_{iMet} по сравнению с уровнем экспрессии этого гена в клетках, культивируемых в бессывороточной среде. В составе субфракций холофермента РНК-полимеразы III из клеток человека нами были идентифицированы две субъединицы с мол. массой 60 и 45 кДа, фосфорилированные и по остаткам серин/треонина, и по остаткам тирозина, и одна субъединица с мол. массой 38 кДа, фосфорилированная только по остаткам тирозина.

Целью настоящего исследования было выяснение корреляции между уровнем экспрессии генов класса III в клетках A431, культивируемых в бессывороточной среде и в присутствии ЭФР в концентрации 0.1 нг/мл, и фосфорилированием индивидуальных субъединиц холофермента РНК-полимеразы III.

Материал и методика

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток A431. Клетки культивировали на среде ДМЕМ в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина при 37° С в атмосфере 5 % CO₂ до состояния монослоя. Далее клетки переводили на бессывороточную среду и культивировали в течение 24 ч. Такой режим культивирования в условиях голода приводит к удлинению клеточного цикла до 36 ч. Помимо условий голода клетки A431 культивировали в присутствии низкой концентрации ЭФР, для чего после 1-суточного выращивания в бессывороточной среде добавляли в среду ЭФР в концентрации 0.1 нг/мл и продолжали культивирование в течение 24 ч.

Выделение ядер. Клетки собирали с помощью скрепки (фирма Sarsted), промывали дважды раствором Хенкса и суспендировали в 5 объемах буфера 4. Далее клетки разрушали с помощью ручного гомогенизатора, полноту разрушения контролировали микроскопически. Ядра осаждали центрифугированием при 25 000 г 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 г 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 суммарной активности РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы III осуществляли по методу, описанному ранее (Huet, Manaud, 1996; Hannan et al., 1998). Далее выделение и очистку субфракций РНК-полимеразы III—IIIa и IIIb проводили по методу Солодовниковой и соавторов (2005). Удельная активность препаратов субфракций РНК-полимеразы III колебалась в пределах 0.3—0.5 Е в 5 мкл раствора.

Определение активности РНК-полимеразы III проводили в системе, содержащей 50 М Трис-НСl, рН 7.9, 80 мМ сульфат аммония, 2.5 мМ ДТТ, 1 мМ MgCl₂, 15 % глицерина, 1 мкг денатурированной ДНК плаценты человека, АТР, GTP, CTP и UTP в концентрации 0.5 мМ каждый, 0.06 МБк [³H]-UTP с удельной активностью 12 ГБк/мМ и 5 мкл фракции, содержащей РНК-полимеразу III. Конечный объем пробы составлял 25 мкл. Кислотонерастворимый материал осаждали 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 сцинтил-

ляторе на счетчике фирмы Beckman (США). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для включения 1 нмоль UTP за 15 мин при 37° С.

Для идентификации фосфорилированных индивидуальных субъединиц РНК-полимеразы III фермент подвергали диск-электрофорезу в 4.5—9.0%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия при токе 7 мА в течение ночи (Laemmly, 1977).

Разделенные полипептиды электрофоретически переносили на бумагу Hybond C Extra в аппарате BioRad в 0.118 М 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-Сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция); HEPARIN HyperD M (Biosera, Франция); нуклеозидтрифосфаты — АТР, GTP, CTP и UTP («Вектор», Бердск); радиоактивные изотопы [³H]-UTP (ГНЦ РФ ФЗИ, Обнинск); антитела против фосфорин-треонина и фосфотирозина (BD Biosciences, Pharmingen, США). Антитела, конъюгированные с пероксидазой, и систему Super Signal для идентификации пероксидазы приобретали в фирме Pierce (США). Среда ДМЕМ и эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота произведены в фирме «БиоЛот» (Россия). Препарат ЭФР был любезно предоставлен сотрудницей лаборатории акад. Н. И. Никольского Е. Б. Буровой.

Все растворы готовили на деионизованной воде. Все процедуры выполняли на холоде.

Результаты и обсуждение

Холофермент РНК-полимеразы III была выделена из клеток A431 в виде двух субфракций, различающихся по порядку элюции с колонки Сефадекс А-25 и плавучей плотности при ультрацентрифугировании в градиенте плотности глицерина. В составе этих субфракций три субъединицы фермента с мол. массами 60, 45 и 38 кДа фосфорилированы по остаткам тирозина и две субъединицы (60 и 45 кДа) фосфорилированы по остаткам серин/треонина *in vivo* (Солодовникова и др., 2005).

В настоящей работе мы исследовали уровень фосфорилирования *in vivo* индивидуальных субъединиц субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из клеток, культивируемых в различных условиях: на полной среде, в условиях голода, т. е. в отсутствие в культуральной среде эмбриональной сыворотки, и при индукции пролиферации клеток низкой (0.1 нг/мл) концентрацией ЭФР. Результаты исследования уровней фосфорилирования *in vivo* по остаткам серин/треонина индивидуальных субъединиц субфракций РНК-полимеразы III в указанных условиях приведены соответственно на рис. 1—3.

Как видно на рис. 1, в составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из клеток A431, культивируемых на полной среде, *in vivo* по остаткам серин/треонина фосфорилированы три полипептида с мол. массами 60, 52 и 45 кДа. Только две субъединицы с мол. массами

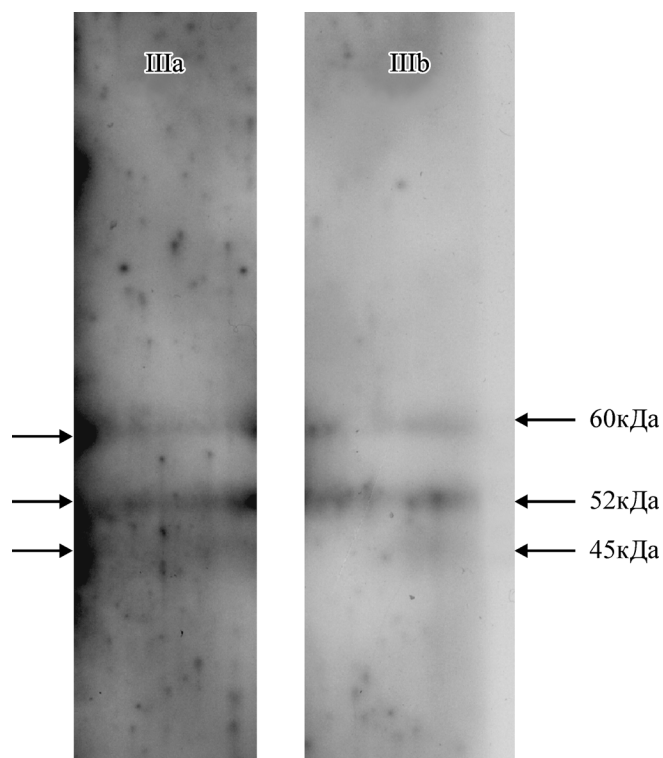


Рис. 1. Иммуноблоттинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам серин/треонина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека А431, культивированных на полной среде.

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

60 и 45 кДа мы относим к собственно РНК-полимеразе III. Можно видеть, что фосфорилирование субъединицы 45 кДа и в составе субфракции IIIa, и в составе субфракции IIIb слабее, чем фосфорилирование субъединицы 60 кДа. Как видно на рис. 2, в составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из голодающих клеток А431, фосфорилирование по остаткам серин/треонина субъединицы 45 кДа в субфракции IIIa остается достаточно выраженным, тогда как в субфракции IIIb эта субъединица практически дефосфорилирована. В составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из клеток А431 после индукции низкими концентрациями ЭФР, фосфорилирование субъединицы 45 кДа в субфракции IIIb восстанавливается. Следует отметить, что уровень фосфорилирования этой субъединицы после индукции ЭФР гораздо более выражен, чем в составе субфракций фермента, выделенных из клеток А431, выращенных на полной среде.

Результаты изучения уровня фосфорилирования *in vivo* субъединиц в субфракциях РНК-полимеразы III, выделенных из клеток А431, выращенных в описанных выше условиях, по остаткам тирозина приведены на рис. 4—6 соответственно. Можно видеть, что уровень фосфорилирования по остаткам тирозина во всех трех субъединицах достаточно выражен. В субфракциях РНК-полимеразы III, выделенной из клеток А431, культивированных в условиях голода, уровень фосфорилирования индивидуальных субъединиц не только не снижен,

но более интенсивное фосфорилирование субъединицы с мол. массой 60 кДа по сравнению с субъединицами 45 и 38 кДа можно отметить в составе и субфракции IIIa, и в составе субфракции IIIb. В субфракциях IIIa и IIIb холофермента, выделенного из клеток после индукции низкой концентрацией ЭФР, можно наблюдать такое же выраженное фосфорилирование субъединиц 60, 45 и 38 кДа по остаткам тирозина. Здесь можно отметить более выраженное фосфорилирование субъединиц 60 и 38 кДа по сравнению с субъединицей 45 кДа.

На основании приведенных данных можно говорить о том, что в характере фосфорилирования индивидуальных субъединиц субфракций РНК-полимеразы III прослеживается определенная динамика. Культивирование клеток А431 в условиях голода, при удлинённом клеточном цикле приводит к снижению фосфорилирования по остаткам серин/треонина в субъединице 45 кДа лишь в составе субфракции IIIb. В этой же субфракции холофермента, выделенной из клеток, индуцированных к пролиферации низкими концентрациями ЭФР, происходит восстановление фосфорилирования даже до несколько более высокого уровня, чем в клетках, культивированных на полной среде. Как нами показано ранее, индукция низкими концентрациями ЭФР вызывает повышение уровня $tRNK_{iMet}$ в клетках А431 в 1.5—2.0 раза по сравнению с таковыми в голодающих клетках. Однако прямо увязывать изменение степени фосфорилирования

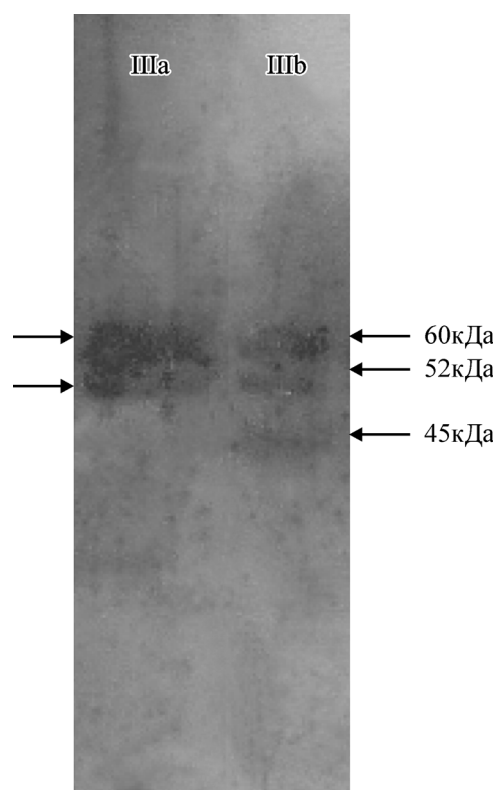


Рис. 2. Иммуноблоттинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам серин/треонина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека А431, культивированных в отсутствие эмбриональной сыворотки.

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

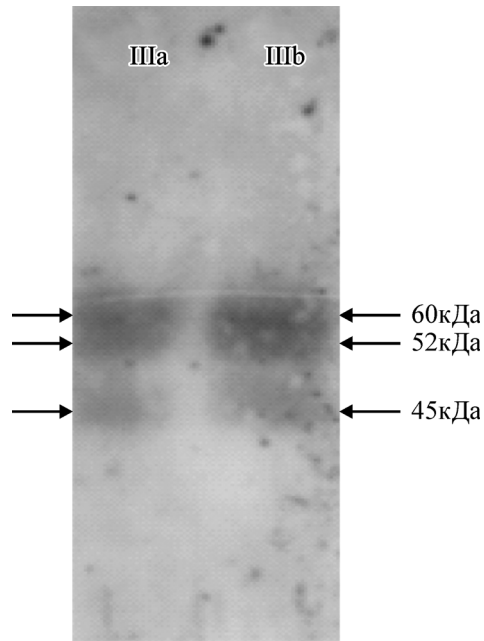


Рис. 3. Иммуноблотинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам серин/треонина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека A431 после индукции низкой (0.1 нг/мл) концентрацией ЭФР.

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

индивидуальных субъединиц субфракции IIIb РНК-полимеразы III с изменением уровня экспрессии тРНК_{i Met} было бы опрочетливо, так как выделенные нами субфракции холофермента РНК-полимеразы III представляют собой тотальные препараты, которые с равной интенсивностью транскрибируют *in vitro* матрицы, несущие любой тип промоторов генов класса III. В этом наборе холоферментов трудно выделить модификацию, которая отвечала бы за изменение уровня экспрессии только одного индивидуального гена, каким является ген тРНК_{i Met}; либо, если учесть, что это ген инициаторной тРНК_{i Met}, можно предположить, что такое повышение уровня экспрессии претерпевают при индукции низкими концентрациями ЭФР гены всех транспортных РНК. Однако и полностью исключить вклад динамики фосфорилирования субъединиц РНК-полимеразы III в регуляцию экспрессии генов тРНК нельзя. К сожалению, в литературе отсутствуют данные о роли субъединиц, идентифицированных нами как носители модификаций (в данном случае фосфорилирования) в осуществлении каталитических функций или структурной организации РНК-полимеразы III. В структуре молекулы РНК-полимеразы III принято выделять коровый домен, в состав которого относят пять субъединиц — C160, C128, C40, C23 и C19 (Geiduschek, Kassavetis, 2001). Но идентифицированные нами субъединицы РНК-полимеразы III не относятся к этому набору субъединиц. В этой связи нельзя не упомянуть о достаточно интенсивном изучении роли модификаций С-терминального домена самой крупной субъединицы РНК-полимеразы II и тех возможностях, которые сообщают С-терминальному домену модификации вхо-

дящих в его состав аминокислотных остатков. По представлениям исследователей группы Т. Руссо, С-терминальный домен действует как платформа для связывания с белками, влияющими на функцию РНК-полимеразы II, а модификации сообщают структуре С-терминального домена огромное молекулярное разнообразие (Sudol et al., 2001). Возможно, субъединицы 60, 45 и 38 кДа также образуют в составе молекулы РНК-полимеразы III определенный интерфейс, а модификации аминокислотных остатков в составе этих субъединиц сообщают ферменту дополнительные возможности для взаимодействия с ядерными компонентами, модулирующими экспрессию генов класса III. Поскольку тот факт, что экспрессия генов класса III подвержена жесткой регуляции в зависимости от фазы клеточного цикла и пролиферации клеток, является общепризнанным, логично предположить, что активность РНК-полимеразы III — ключевого компонента транскрипционной машины, ответственной за транскрипцию генов класса III, также подвержена регуляции. Поэтому изучение модификаций РНК-полимеразы III является весьма существенным для понимания тонких механизмов регуляции экспрессии такого разнообразного класса генов. До настоящего времени РНК-полимеразе III в транскрипции отводилась весьма пассивная роль, а регуляцию экспрессии генов 5S и тРНК осуществляют исключительно транскрипционные факторы (Geidu-

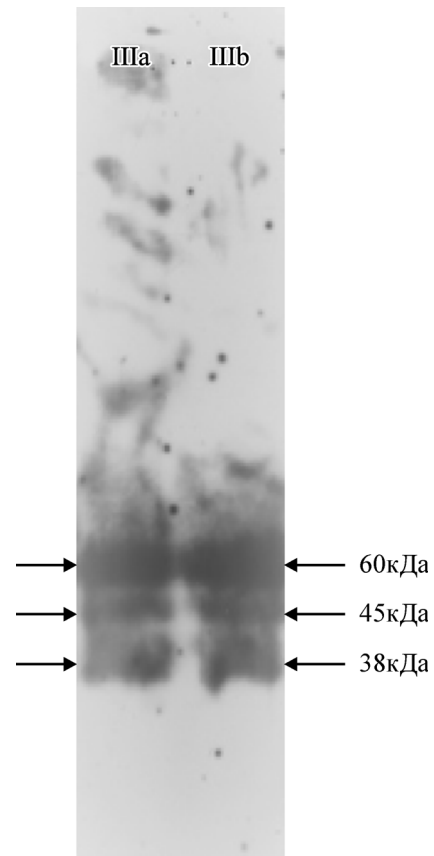


Рис. 4. Иммуноблотинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам тирозина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека A431, культивированных на полной среде.

IIIa и IIIb — субфракции РНК-полимеразы III, отличающиеся соответственно низкой и высокой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

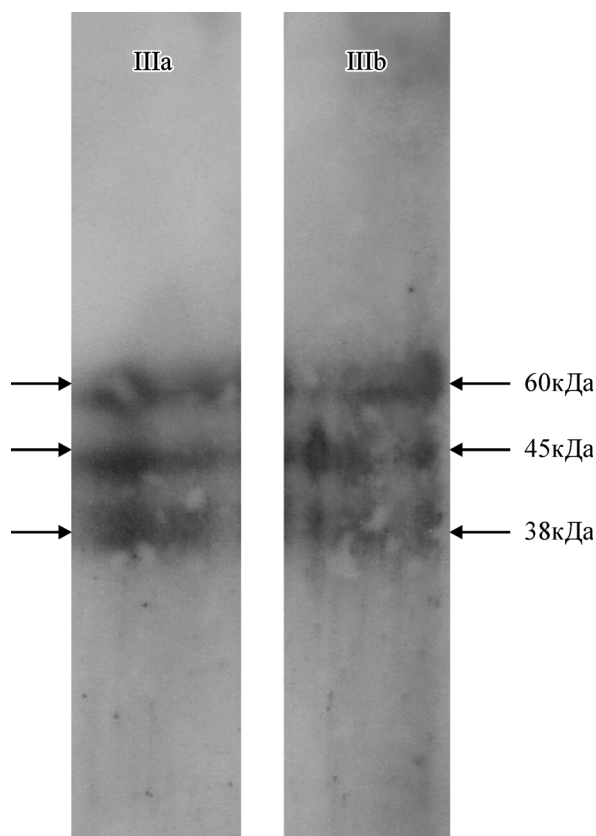


Рис. 5. Иммуноблоттинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам тирозина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека А431, культивированных на среде, лишенной эмбриональной сыворотки.

IIIa и IIIб — субфракции РНК-полимеразы III, отличающиеся соответственно низкой и высокой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

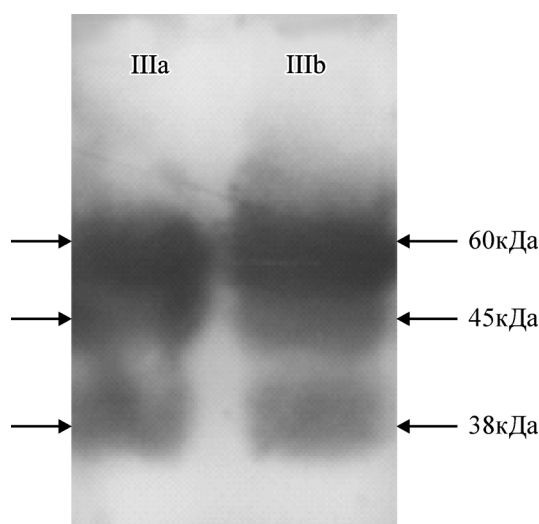


Рис. 6. Иммуноблоттинг фосфорилированных *in vivo* по остаткам тирозина субъединиц РНК-полимеразы III, выделенной из клеток эпидермоидной карциномы человека А431, после индукции низкой (0.1 нг/мл) концентрацией ЭФР.

IIIa и IIIб — субфракции РНК-полимеразы III, отличающиеся соответственно низкой и высокой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

schek, Kassavetis, 2001; Hu et al., 2003). Однако выявление динамичности фосфорилирования субъединиц РНК-полимеразы III, интенсивность которого меняется в зависимости от условий культивирования клеток А431, позволяет говорить о том, что активность РНК-полимеразы III также может быть подвержена опосредованной модификациями регуляции. До настоящего времени этот вопрос совершенно не изучен; более того, неизвестно, какие еще модификации индивидуальных субъединиц присутствуют в РНК-полимеразе III.

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

Список литературы

- Солодовникова А. С., Меркулова Н. А., Перова А. А., Седова В. М. 2005. Фосфорилированные *in vivo* субъединицы холофермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы III человека. Цитология. 47 (12): 1082—1087.
- Bollen M., Beullens M. 2002. Signaling by protein phosphatases in the nucleus. Trends Cell Biol. 12: 138—145.
- Breitling R., Hoeller D. 2005. Current challenges in quantitative modeling of epidermal growth factor signaling. FEBS Lett. 579: 6289—6294.
- Brown T. R., Scott P. H., Stein T., Winter A. G. 2000. RNA polymerase III transcription: its control by tumor suppressors and its deregulation by transforming agents. Gene Exp. 9: 15—28.
- Cans C., Mangano R., Barila D., Neubauer G. 2000. Nuclear tyrosine phosphorylation: the beginning of the map. Biochem. Pharmacol. 60: 1203—1215.
- Chen L.-C. H., Chen B.-K., Chang J.-M., Chang Ch. 2004. Essential role of c-Jun induction and coactivator p300 in epidermal growth factor-induced gene expression of cyclooxygenase-2 in human epidermoid carcinoma A431 cells. Biochim. biophys. acta. 1683: 38—43.
- Connolly J. M., Rose D. P. 1987. Quantitative differences in the effects of mouse and human epidermal growth factor on A431 human tumor cells. Cancer Lett. 37: 241—249.
- Dignam J. D., Leibovitz R. M., Roeder R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA Polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucl. Acids Res. 11: 1475—1477.
- Felton-Edkins Z. A., Fairley J. A., Graham E. L., Johnston I. M., White R. J., Scott P. H. 2003. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. EMBO J. 22: 2422—2432.
- 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.
- Hackel P. O., Zwick E., Prenzel N., Ulrich A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediator of multiple receptor pathways. Curr. Opin. Cell Biol. 11: 184—199.
- Hannan R. D., Hempel W. M., Cavanaygh A., Arino T., Dimitrov S. I., Moss T., Hu P., Wu S., Hernandez N. 2003. A minimal RNA Polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK 2. 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—267.
- Hunter T. Signaling-2000 and beyond. Cell. 100: 113—127.
- Gottesfeld J. M., Forbes D. J. 1997. Mitotic repression of the transcription machinery. Trends in Biochem. Sci. 22: 197—202.
- 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.

Masuda N., Ui M. 1991. Possible involvement of GTP-binding proteins in growth regulation of human epidermoid carcinoma cell line A431. *FEBS Lett.* 291 : 9—12.

Mauger E., Scott P. H. 2004. Mitogenic stimulation of transcription by RNA Polymerase III. *Biochem. Soc. of Actions.* 32 : 976—977.

Nikitina T. V., Nazarova N. Y., Aksenov N. D., Tishchenko L. I., Tuohimaa P., Sedova V. M. 2004. Small stable RNA level depends on the physiological state of the cell. *Tsytylogiya.* 46 : 437—441.

Paule M. R., White P. J. 2000. Transcription by RNA polymerase I and III. *NAR.* 28 : 1283—1298.

Sentenac A. 1985. Eukaryotic RNA Polymerases. *CRC Critical Rev. Biochem.* 18 : 31—89.

Sudol M. et al. 2001. Function of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* 490 : 190—195.

Whitmarsh A. J., Davis R. J. 2000. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 : 1172—1183.

Поступила 20 III 2006

DYNAMIC PHOSPHORYLATION OF RNA POLYMERASE III HOLOENZYME SUBUNITS
FROM HUMAN EPIDERMOID CARCINOMA CELLS A431 CULTIVATED
UNDER DIFFERENT CONDITIONS

N. A. Merkulova, V. M. Sedova

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

Dynamic phosphorylation *in vivo* of individual subunits of holoenzyme RNA polymerase III subfractions IIIa and IIIb on serine/threonine and tyrosine aminoacid residues has been shown in human epidermoid carcinoma cells A431. Cells cultivation under starvation on embryonic serum caused a prolongation of the cell cycle, while cultivation at low concentration of epidermal growth factor (EGF) activated cell proliferation. Subunit 45 kDa is phosphorylated on serine/threonine residues in subfraction IIIa only in starving cells. This subunit of subfraction IIIb is unphosphorylated. Phosphorylation of this particular subunit is restored under induction by EGF at low concentration (0.1 ng/ml). The level of phosphorylation on tyrosine aminoacid residues of subunits of holoenzyme subfractions IIIa and IIIb is high in cells cultivated under starvation. Subunit 60 kDa has a higher level of phosphorylation as compared with subunits 45 and 38 kDa. Induction by EGF at low concentrations increases the level of phosphorylation of subunits 60 and 38 kDa in both subfractions of holoenzyme.