

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ IN VIVO СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© Н. А. Меркулова,¹ В. М. Седова^{1, 2, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

и ²Кафедра медицинской физики С.-Петербургского государственного
политехнического университета

* электронный адрес: vandasedova@rambler.ru

В составе субфракций ДНК-зависимой РНК-полимеразы III, выделенной из ядер культуры фибробластов мыши 3Т3, клеток эпидермоидной карциномы А431 и зрелой плаценты человека, идентифицированы три субъединицы, одновременно и фосфорилированные, и гликозилированные. В составе фермента, выделенного из клеток человека, модифицированными оказались субъединицы с мол. массой 60 и 45 кДа и субъединица с мол. массой 52 кДа, которая, вероятно, принадлежит одному из базальных факторов транскрипции РНК-полимеразы III. В составе субфракций фермента, выделенного из культуры фибробластов мыши, модификации идентифицированы в трех полипептидах с мол. массами 49, 45 и 42 кДа. Субъединица 45 кДа, вероятно, является компонентом базального фактора транскрипции РНК-полимеразы III, так как она не идентифицирована в составе фермента мыши.

Ключевые слова: РНК-полимераза III, фосфорилирование, гликозилирование, плацента и клетки А431 человека, фибробласты мыши.

Принятые сокращения: СК2 — казеинкиназа 2, Brf2 и Vdp1 — ассоциированные компоненты TFIIIB, TBP — ТАТА-боксовывающий белок, TFIIIB — базальный фактор транскрипции РНК-полимеразы III.

РНК-полимераза III транскрибирует гены 5S рибосомных РНК, всех транспортных РНК, U6 малой ядерной РНК — компонента процессинга и сплайсинга информационных РНК, Th-РНК — компонента процессинга в митохондриях (Torper, Clayton, 1990), 7SL и 7SK регуляторных РНК (Sentenac, 1985; Geiduschek, Tocchini-Valentini, 1988), H1 РНК — компонента РНКазы Р (Baer et al., 1989), а также ряда вирусных РНК (Geiduschek, Kassavitis, 2001). Транскрипционный комплекс РНК-полимеразы III включает в себя ряд транскрипционных факторов, набор которых меняется в зависимости от типа транскрибируемых генов (Geiduschek, Tocchini-Valentini, 1988; Schramm, Hernandez, 2002). Интенсивность транскрипции этих генов существенно колеблется в зависимости от фазы клеточного цикла и клеточной пролиферации (Brown et al., 2000; Paule, White, 2000; Felton-Edkins et al., 2003; Mauger, Scott, 2004). Тотальный уровень транскрипции РНК-полимеразы III наиболее высок в фазах S и G₂ клеточного цикла и снижен во время митоза (Leresche et al., 1996; Gottesfeld, Forbes, 1997). Показано, что процессы фосфорилирования и дефосфорилирования транскрипционных факторов РНК-полимеразы III участвуют в регуляции транскрипции в ответ на внеклеточные сигналы (Whitmarsh, Davis, 2000; Bollen et al., 2002). В составе транскрипционного комплекса РНК-полимеразы III высших эукариот идентифицированы следовые примеси казеинкиназы 2 (СК2), она же связана с промотором U6 малой ядерной РНК. СК2 позитивно и негативно регулирует транскрипцию РНК-полимеразы III (Hu et al., 2003). Негативная регуляция осуществляется через фосфорилирова-

ние компонентов TFIIIB — TBP, Brf2 и Vdp1, с другой стороны, присутствие СК2 является совершенно необходимым для активации транскрипции РНК-полимеразы III (Hu et al., 2004). Большинство протеинкиназ и протеинфосфатаз, участвующих в регуляции транскрипции, относятся к серин-треониновым ферментам. Логично предположить, что и активность собственно фермента РНК-полимеразы III может регулироваться, однако механизм регуляции активности собственно РНК-полимеразы III в составе очень сложного транскрипционного комплекса остается невыясненным. Ранее нами было показано, что в составе РНК-полимеразы III человека три субъединицы фосфорилированы по остаткам серина, треонина и тирозина (Солодовникова и др., 2005). Уровень фосфорилирования этих субъединиц носит динамичный характер и зависит от пролиферативного статуса клеток (Меркулова, Седова, 2006).

Согласно современным представлениям, помимо фосфорилирования другой широко распространенной посттрансляционной модификацией цитоплазматических и ядерных белков является гликозилирование остатками O-N-ацетилглюкозамина (Torres, Hart, 1984), при этом темпы обмена данной модификации существенно превышают темпы обмена ее белков-носителей (Wells et al., 2002). Это позволяет предположить, что роль этой модификации в регуляции активности белков аналогична скорее фосфорилированию, нежели «классическому» гликозилированию (Haltiwangeler et al., 1997; Vosseler et al., 2001; Wells, Hart, 2003). Гликозилирование остатками O-N-ацетилглюкозамина осуществляется по остаткам се-

рина и треонина (Haltiwanger et al., 1997; Kamemura, Hart, 2003). Согласно представлениям Харта с соавторами, модификация белков O-N-ацетилглюкозамином может находиться в реципрокных отношениях с фосфорилированием, как в случае протоонкобелка с-Мус, гликозилированного по остатку треонина в положении 58, которое известно не только как сайт фосфорилирования, но и как «горячий» сайт мутаций в лимфомах (Chou et al., 1995). Такие конкурентные отношения между O-N-гликозилированием и фосфорилированием указывают на возможность существования ряда белков во множестве функционально различных изоформ, детерминированных посттрансляционными модификациями (Torres, Hart, 1984; Comer, Hart, 1999). При этом гликозилирование собственно РНК-полимеразы III до настоящего времени не исследовалось.

Нами показано, что в составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенной из ткани плаценты и культуры эпидермоидной карциномы А431 человека, а также из культуры фибробластов мыши 3Т3, три субъединицы гликозилированы остатками O-N-ацетилглюкозамина *in vivo*. В РНК-полимеразе III человека это полипептиды с мол. массами 60, 52 и 45 кДа, в составе фермента из клеток 3Т3 — полипептиды с мол. массами 49, 45 и 42 кДа. Таким образом, в составе субфракций РНК-полимеразы III человека фосфорилированию и гликозилированию оказались подверженными только две субъединицы с мол. массами 60 и 45 кДа, так как субъединица 52 кДа не принадлежит ферменту. В составе субфракций РНК-полимеразы III из культуры фибробластов мыши 3Т3 мы наблюдаем аналогичную картину — фосфорилированы и гликозилированы только две субъединицы 49 и 42 кДа, так как субъединица с мол. массами 45 кДа в составе РНК-полимеразы III мыши не идентифицирована (Sklar, Roeder, 1976).

Материал и методика

Зрелую плаценту человека получали в родильном отделении Института акушерства и гинекологии им. Д. М. Отта (Санкт-Петербург). Ткань немедленно препарировали на фрагменты весом не более 50 г, замораживали и хранили в жидком азоте. При использовании ткань размораживали до температуры, не превышающей 0 °С. Клетки эпидермоидной карциномы человека А431 и клетки 3Т3 фибробластов мыши получали из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток 3Т3 и А431. Клетки культивировали до состояния монослоя на среде ДМЕМ в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Выделение ядер. Клетки собирали с помощью скребка (Sarsted, Германия), дважды промывали раствором Хенкса и суспендировали в 5 объемах буфера А (20 mM Трис-НСl, pH 7.9, 0.5 mM ЭДТА, 0.2 mM ДТТ и 10 % глицерина). Далее клетки разрушали с помощью ручного гомогенизатора, степень разрушения контролировали микроскопически. Ядра осаждали центрифугированием при 25 000g в течение 30 мин. Осадок ядер суспендировали в буфере А и хранили в жидком азоте или немедленно использовали для получения ядерного экстракта (Dignam et al., 1983). Ядра из ткани плаценты выделяли по методу, описанному ранее (Солодовникова и др., 2005).

Получение ядерного экстракта. Ядра, суспендированные в буфере А, смешивали с равным объемом буфера Б (20 mM Трис-НСl, pH 7.9, 0.42 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM ЭДТА, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM ДТТ и 40 % глицерина). Суспензию ядер гомогенизировали в плотно притертом гомогенизаторе в течение 40 мин и центрифугировали при 25 000g в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, супернатант диализовали в течение ночи против буфера А, содержащего 0.250 M сульфата аммония. Полученный ядерный экстракт использовали для выделения и очистки субфракций 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 et al., 1996; Nannan et al., 1998). Дальнейшее выделение и очистку субфракций РНК-полимеразы III — IIIа и IIIб — проводили в соответствии с описанной ранее методикой (Солодовникова и др., 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 с конечным объемом 25 мкл, содержащей 50 M Трис-НСl (pH 7.9), 80 mM сульфата аммония, 2.5 mM ДТТ, 1 mM MgCl₂, 15 % глицерина, 1 мкг денатурированной ДНК плаценты человека (либо ДНК из клеток 3Т3), АТР, GTP, CTP и UTP в концентрации 0.5 mM каждый, 0.06 МБк [³H]-UTP с удельной активностью 12 ГБк/мМ и 5 мкл фракции, содержащей РНК-полимеразу III.

Осаждение материала, нерастворимого в кислоте, производили 5%-ной ТХУ в присутствии сывороточного альбумина в качестве носителя, осадки собирали на фильтры GF/C (Whatman, Англия) и промывали 5%-ной ТХУ и 96%-ным этиловым спиртом. Радиоактивность подсчитывали в толуольном сцинтилляторе на счетчике фирмы Beckman (США). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для включения 1 нмоля UTP за 15 мин при 37 °С.

Для идентификации фосфорилированных и гликозилированных *in vivo* индивидуальных субъединиц РНК-полимеразы III фермент подвергали диск-электрофорезу в 4.5—9%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия при силе тока 7 мА в течение ночи (Laemmly, 1970).

Разделенные полипептиды переносили на бумагу Hybond C Extra в аппарате BioRad (США) в 0.118 M Трис-глициновом буфере (pH 8.3), содержащем 15 % этилового спирта, при силе тока 90 мА в течение 18 ч. Гликозилирование отдельных субъединиц РНК-полимеразы III исследовали с помощью антител против остатка O-N-ацетилглюкозамина. Фосфорилирование индивидуальных субъединиц субфракций РНК-полимеразы III изучали с помощью антител к фосфосерин/треонину. В качестве вторых антител использовали моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Pierce, США). Визуализацию конъюгата осуществляли с помощью хемиллюминесцентной реакции 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-5 (Pharmacia, Швеция); HEPARIN HyperD M (Biosepra, Франция), нуклеозидтрифосфаты — АТР, GTP, CTP и UTP (Вектор, Россия); радиоактивные изотопы [³H]-UTP (ГНЦ РФ ФЗИ, Россия); антитела против O-N-ацетилглю-

козамина (Affinity Bioreagents, США); антитела к фосфосерин/треонину (BD Transduction Laboratories, Германия); антитела, конъюгированные с пероксидазой, и система Super Signal для идентификации пероксидазы (Pierce, США); среда ДМЕМ и эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (Биолот, Россия). Все растворы готовили на деионизированной воде. Все процедуры выполняли на холоде.

Результаты и обсуждение

ДНК-зависимую РНК-полимеразу III выделяли из ткани плаценты человека, клеток эпидермоидной карциномы человека A431 и культуры фибробластов мыши 3Т3. Фермент был выделен в виде двух субфракций, различающихся по порядку элюции с колонки ДЕАЕ-Сефадекс А-25 и плавучей плотности при ультрацентрифугировании в градиенте плотности глицерина (Солодовникова и др., 2005). Ранее нами было показано, что в составе субфракций РНК-полимеразы III человека по остаткам серин/треонина *in vivo* фосфорилированы три субъединицы с мол. массами 60, 52 и 45 кДа. Две из этих субъединиц с мол. массами 60 и 45 кДа фосфорилированы также и по остаткам тирозина (Солодовникова и др., 2005).

В настоящей работе мы исследовали гликозилирование индивидуальных субъединиц субфракций холофермента РНК-полимеразы III остатками N-О-ацетилглюкозамина, так как, по представлениям Харта с соавторами (Chou et al., 1995; Vosseler et al., 2001), эти модификации являются реципрокными относительно друг друга и соответственно могут участвовать в регуляции активности модифицированных белков. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о модификациях субъединиц РНК-полимеразы III.

Препараты субфракций РНК-полимеразы III, выделенные из различных источников, исследовали методом иммуноблотинга с антителами против N-О-ацетилглюкозамина. Для определения молекулярной массы модифицированных *in vivo* субъединиц фермента мы использовали наборы белков-стандартов с мол. массами 66, 45, 36, 29, 24, 20 и 14.2 кДа. Кривая подвижности стандартных белков после электрофоретического разделения в 4.5—9%-ном ПААГ приведена на рис. 1.

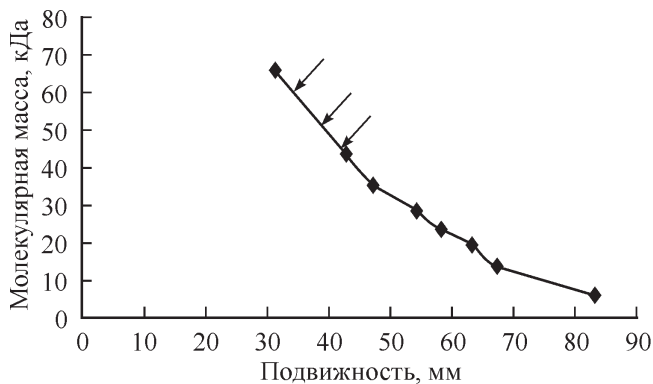


Рис. 1. Кривая подвижности белков-стандартов с мол. массами 66, 45, 36, 29, 24, 20 и 14.2 кДа.

Стрелками указана подвижность субъединиц РНК-полимеразы III из клеток человека, гликозилированных *in vivo* остатками O-N-ацетилглюкозамина.

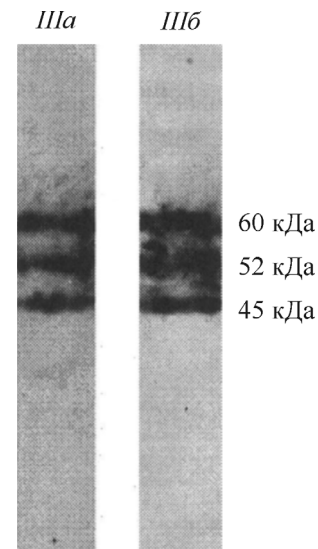


Рис. 2. Гликозилированные *in vivo* остатками O-N-ацетилглюкозамина субъединицы субфракций РНК-полимеразы III, выделенной из плаценты человека.

IIIa — субфракция РНК-полимеразы III, отличающаяся низкой плавучестью при ультрацентрифугировании в градиенте концентраций глицерина; IIIb — субфракция РНК-полимеразы III, отличающаяся высокой плавучестью при ультрацентрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

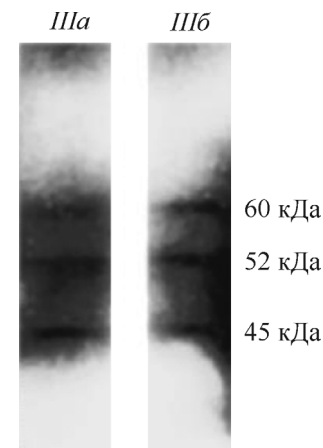


Рис. 3. Гликозилированные *in vivo* остатками O-N-ацетилглюкозамина субъединицы в субфракциях РНК-полимеразы III, выделенных из клеток A431.

IIIa — субфракция РНК-полимеразы III, отличающаяся низкой плавучестью при ультрацентрифугировании в градиенте концентраций глицерина; IIIb — субфракция РНК-полимеразы III, отличающаяся высокой плавучестью при ультрацентрифугировании в градиенте концентраций глицерина.

Результаты иммуноблот-анализа с антителами против N-О-ацетилглюкозамина субфракций РНК-полимеразы III, выделенной из плаценты человека и клеток эпидермоидной карциномы человека линии A431, приведены на рис. 2 и 3 соответственно. Как видно из этих рисунков, модифицированными *in vivo* остатками O-N-ацетилглюкозамина в составе субфракций РНК-полимеразы III плаценты человека и клеток эпидермоидной карциномы человека линии A431 являются субъединицы с мол. массами 60, 52 и 45 кДа, которые, как нами было

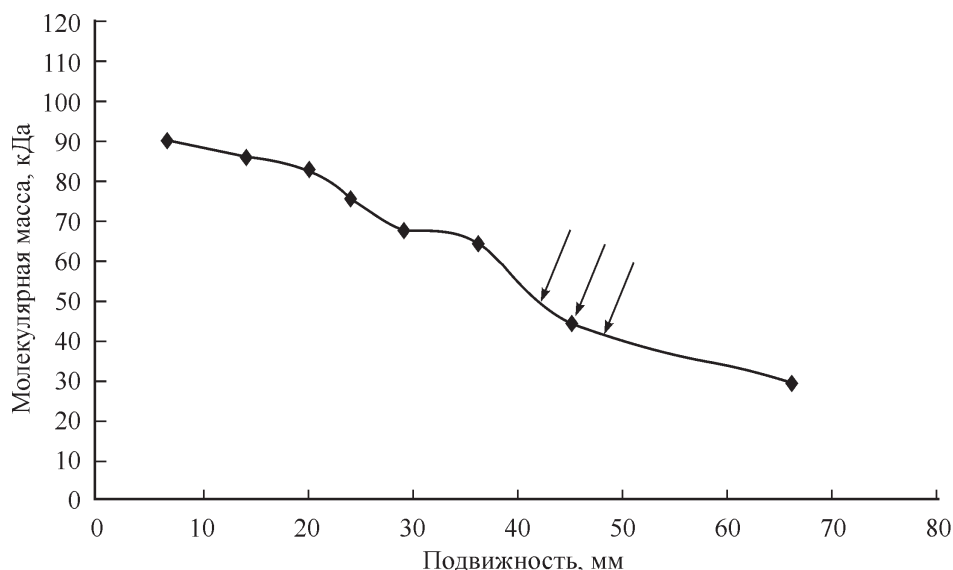


Рис. 4. Кривая подвижности белков-стандартов с мол. массами 66, 45, 36, 29, 24, 20 и 14.2 кДа. Стрелками указана подвижность фосфорилированных и гликозилированных *in vivo* полипептидов из клеток 3Т3.

показано ранее, фосфорилированы по остаткам серин/треонина. Интересно отметить, что в составе субфракций РНК-полимеразы III субъединица с мол. массой 38 кДа, фосфорилированная только по остаткам тирозина (Солодовникова и др., 2005), не модифицирована остатком N-О-ацетилглюкозамина.

Тот факт, что в составе такого сложного по субъединичной структуре фермента, как РНК-полимераза III человека, одни и те же субъединицы одновременно и фосфорилированы, и гликозилированы, побудил нас исследовать эти модификации в составе РНК-полимеразы III другого представителя млекопитающих. Для этой цели нами была выбрана культура фибробластов мыши линии 3Т3.

Модификации отдельных субъединиц субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из фибробластов мыши линии 3Т3, исследовали с помощью антител против фос-

фосерин/треонина и O-N-ацетилглюкозамина. Для точного определения молекулярных масс модифицированных субъединиц использовали набор белков-стандартов (Sigma, США). Кривая подвижности этих белков приведена на рис. 4.

Как показал иммуноблот-анализ, в составе субфракций РНК-полимеразы III, выделенных из фибробластов мыши, фосфорилированными по остаткам серин/треонина и гликозилированными остатками O-N-ацетилглюкозамина оказались одни и те же субъединицы с мол. массами 49.45 и 42 кДа (рис. 5, 6).

Следует отметить существенно более высокий уровень фосфорилирования субъединицы 49 кДа субфракции IIIб в сравнении с субъединицами 45 и 42 кДа. В то же время уровень N-О-гликозилирования этой субъединицы существенно снижен, что может косвенно указывать на реципрокный характер этих модификаций в субъединице 49 кДа субфракции IIIб.

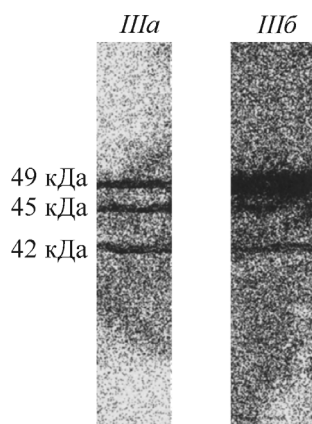


Рис. 5. Фосфорилированные *in vivo* по остаткам серина и треонина субъединицы в субфракциях РНК-полимеразы III из фибробластов мыши линии 3Т3.

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

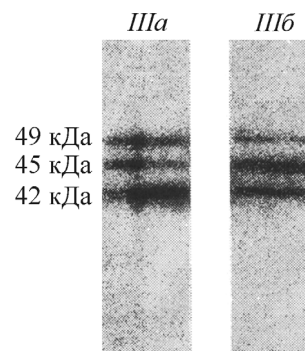


Рис. 6. Гликозилированные *in vivo* остатками O-N-ацетилглюкозамина субъединицы субфракций РНК-полимеразы III, выделенной из культуры фибробластов мыши линии 3Т3.

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

Согласно данным о молекулярных массах субъединиц РНК-полимеразы III, выделенных из клеток мышечной плазмцитомы MOPC 315, приведенным в статье Скляра и Родера (Sklar, Roeder, 1976), два полипептида с мол. массами 49 и 42 кДа могут быть отнесены к субъединицам собственно РНК-полимеразы III. Интересным представляется сам факт присутствия среди модифицированных полипептидов РНК-полимеразы III помимо двух субъединиц, относящихся к собственно ферменту, еще одного полипептида, который с большой вероятностью имеет отношение к одному из базальных транскрипционных факторов (Geiduschek, Tocchini-Valentini, 1988; Geiduschek, Kassavetis, 2001). Согласно современным представлениям об эволюции индивидуальных субъединиц РНК-полимераз I и III, происхождение таких субъединиц может восходить к общим предковым базальным факторам ферментов транскрипции, не исключая РНК-полимеразу архей (Carter, Drouin, 2010).

Полученные нами результаты указывают на то, что в составе РНК-полимеразы III млекопитающих (как человека, так и мыши) модифицированы определенные индивидуальные субъединицы. Известно, что РНК-полимераза III высших эукариот отвечает за транскрипцию достаточно разнообразной по функциональной роли класса стабильных нетранслируемых РНК. Поскольку уровень транскрипции этих РНК строго зависит от метаболического состояния клетки, то и активность РНК-полимеразы III, транскрибирующей те или иные стабильные РНК, изменяется в зависимости от стадии клеточного цикла и процессов клеточной пролиферации, а также в ответ на действие ростовых факторов, при вирусной инфекции и трансформации клеток. Снижение транскрипционной активности РНК-полимеразы III во время митоза связывают с СК2 либо с ассоциированной с рибосомами циклинзависимой киназой p34cdk2, которая ингибирует транскрипцию генов 5S рРНК и тРНК у *Xenopus laevis*, фосфорилируя предположительно РНК-полимеразу III или транскрипционный фактор ТFIIB (Westmark et al., 1998; Hu et al., 2004). Модификации индивидуальных субъединиц РНК-полимеразы III и их роль в регуляции активности фермента практически не изучены. Показано лишь, что в составе фермента, выделенного из дрожжей, фосфорилированы две субъединицы с мол. массами 19 и 23 кДа (Bell et al., 1977). Роль этих модификаций не определена, однако сам факт присутствия модификаций в этих субъединицах, безусловно, указывает на их возможное участие в регуляции активности РНК-полимеразы III.

Ранее мы показали, что фосфорилирование индивидуальных субъединиц субфракций фермента носит динамический характер и зависит от физиологического состояния клетки (Меркулова, Седова, 2006). Реципрокная динамичность фосфорилирования — O-N-гликозилирования, возможно, характерна и для субъединицы 49 кДа субфракции фермента IIIб (рис. 5, 6). Однако отсутствие данных о функциональной или структурной роли этих субъединиц РНК-полимеразы III делает любые предположения несколько спекулятивными.

Интересным представляется тот факт, что в составе РНК-полимеразы III выявляются субкомплексы, состоящие из двух или трех субъединиц, которые играют определенную роль в процессе прохождения ферментом тех или иных этапов транскрипции и проявляют аффинность к транскрипционным факторам (Wang, Roeder, 1997; Dumay et al., 1999; Devos et al., 2010; Kassavetis et al., 2010; Wu et al., 2012; Arimbasseri, Maraia, 2013). Модифициро-

ванные *in vivo* субъединицы РНК-полимеразы III не относятся к этим субкомплексам, но, возможно, сами представляют собой субкомплекс, в составе которого помимо модифицированных субъединиц собственно фермента присутствует модифицированный компонент базального фактора транскрипции.

Список литературы

- Меркулова Н. А., Седова В. М. 2006. Динамичность фосфорилирования субъединиц холофермента РНК-полимеразы III клеток эпидермоидной карциномы человека A431, культивированных в различных условиях. Цитология. 48 (9) : 711—716. (Merkulova N. A., Sedova V. M. 2006. Dynamic phosphorylation of RNA Polymerase III subunits from epidermoid carcinoma cells A431 cultivated under different conditions. Tsitologiya. 48 (9) : 711—716.)
- 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. (Solodovnikova A. S., Merkulova N. A., Perova A. A., Sedova V. M. 2005. The subunits of human holoenzyme DNA dependent RNA polymerase III phosphorylated *in vivo*. Tsitologiya. 47 (12) : 1082—1087.)
- Arimbasseri A. G., Maraia R. J. 2013. Distinguishing core and holoenzyme mechanisms of transcription termination by RNA polymerase III. Mol. Cell. Biol. 33 : 1571—1581.
- Baer M., Nilsen T. W., Costigan C., Altman S. 1989. Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. Nucleic Acids Res. 18 : 97—103.
- 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.
- Bollen M., Peti W., Ragusa M. J., Beullens M. 2002. Signaling by protein phosphatases in the nucleus. Trends Cell Biol. 12 : 138—145.
- 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.
- Carter R., Drouin G. 2010. The increase in the number of subunits in eukaryotic RNA Polymerase III relative to RNA Polymerase II is due to the permanent recruitment of general transcription factors. Mol. Biol. Evolution. 27 : 1035—1043.
- Chou T. Y., Hart G. W., Dang C. V. 1995. C-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. J. Biol. Chem. 270 : 18 961—18 965.
- Comer F. I., Hart G. W. 1999. O-GlcNAc and the control of gene expression. Biochim. biophys. Acta. 1473 : 161—171.
- Devos D. P., Lindner D., Christoph W., Muller C. W. 2010. Conformational flexibility of RNA polymerase III during transcriptional elongation. EMBO J. 29 : 3762—3772.
- 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.
- Dumay H., Rubbi L., Sentenac A., Marck Ch. 1999. Interaction between yeast RNA Polymerase III and transcription factor TFIIC via ABC10a and t131 subunits. J. Biol. Chem. 274 : 33 462—33 468.
- 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.
- Gottesfeld J. M., Forbes D. J. 1997. Mitotic repression of the transcriptional machinery. Trends Biochem. Sci. 22 : 197—202.

- Haltiwanger R. S., Busby S., Grove K., Li S., Mason D., Medina L., Moloney D., Philipsberg G., Scartozzi R. 1997. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231 : 237—242.
- Hannan R. D., Hempel W. M., Cavanagh 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.
- 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 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.
- Kamemura K., Hart G. W. 2003. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 73 : 107—136.
- Kassavetis G. A., Prakash P., Shim E. 2010. The C53/C37 subcomplex of RNA Polymerase III lies near the active site and participates in promoter opening. *J. Biol. Chem.* 285 : 2695—2706.
- Laemmly O. 1970. 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. Actions.* 32 : 976—977.
- Paule M. R., White R. J. 2000. Transcription by RNA polymerase I and III. *NAR.* 28 : 1283—1298.
- Schramm L., Hernandez N. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Gen. Develop.* 16 : 2593—2620.
- Sentenac A. 1985. Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Critical Rev. Biochem.* 18 : 31—90.
- 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 : 1064—1073.
- Torres C. R., Hart G. W. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 259 : 3308—3317.
- Topper J. N., Clayton D. A. 1990. Characterization of Human MRP/Th RNA and its nuclear gene: full length MRP/Th RNA is an active endoribonuclease when assembled as an RNP. *NAR.* 18 : 793—799.
- Vosseler K., Wells L., Hart G. W. 2001. Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochimie* 83 : 575—581.
- Wang Z., Roeder R. G. 1977. Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription. *Gen. Develop.* 11 : 1315—1326.
- Wells L., Hart G. W. 2003. O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* 546 : 154—158.
- Wells L., Vosseller K., Cole R. N., Cronshaw J. M., Matunis M. J., Hart G. W. 2002. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell Proteomics.* 1 : 791—804.
- Westmark C. J., Ghose R., Huber P. W. 1998. Inhibition of RNA polymerase III transcription by a ribosome-associated kinase activity. *Nucleic Acids Res.* 26 : 4758—4764.
- Whitmarsh A. J., Davis R. J. 2000. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol. Life Sci.* 57 : 1172—1183.
- Wu Ch.-Ch., Herzog F., Jennebach S., Lina Y.-Ch., Paia Ch.-Y., Aebersold R., Cramer P., Chena H.-T. 2012. RNA polymerase III subunit architecture and implications for open promoter complex formation. *PNAS USA.* 109 : 19 232—19 237.

Поступила 29 XII 2014

SUBUNITS OF MAMMAL DNA DEPENDENT RNA POLYMERASE III MODIFIED *IN VIVO*N. A. Merkulova,¹ V. M. Sedova^{1, 2, *}¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² Department of Medical Physics, St. Petersburg State Polytechnical University

* e-mail: vandasedova@rambler.ru

In subfractions of DNA-dependent RNA polymerase isolated from nuclei of 3T3 mouse fibroblasts, A431 epidermoid carcinoma cells and mature human placenta, we have identified three subunits modified by both phosphorylation and O-N-acetylglucosamine glucosylation. The subfractions of the human enzyme contained modified subunits with molecular weight of 60 and 45 kDa and a subunit of 52 kDa probably belonging to one of the basal factors of RNA Polymerase III transcription. The subfractions of 3T3 mouse cells RNA Polymerase III consisted of modified subunits with molecular weight 49, 45 and 42 kDa, however, the 45 kDa subunit might be a component of the basal transcription factor of RNA Polymerase III, since it was not identified in mouse enzyme composition.

Key words: RNA Polymerase III, phosphorylation, glycosylation, human placenta and A431 cells, mouse fibroblasts.