

УДК 577.214.337

Н.А.Меркулова (5 курс, каф. ФХБК), В.М.Седова, к.б.н., с.н.с. (ИнЦ РАН)

#### ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ *IN VIVO* ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ХОЛОФЕРМЕНТА ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III ЧЕЛОВЕКА

ДНК-зависимая РНК-полимераза III осуществляет транскрипцию стабильных ядерных РНК: 5S рРНК, все тРНК, U6 мяРНК, 7SK, 7SL и ряд 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 [1]. Промоторы генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, отличаются разнообразием и по структуре, и по генной локализации [2,3]. Для узнавания этих промоторов и корректной и продуктивной транскрипции РНК-полимераза III использует различные наборы базальных транскрипционных факторов [3], 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 киназа [4].

Что касается собственно РНК-полимеразы III, то в составе фермента из дрожжей идентифицированы две фосфорилированные *in vivo* субъединицы с молекулярными массами 23 и 19 кДа, которые являются общими для всех трех РНК-полимераз [5], 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 высших 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. РНК-полимеразу III получали методом, который включает получение ядер из клеток плаценты человека и клеток эпидермоидной карциномы человека, получение ядерного экстракта [6], аффинную хроматографию на колонке Нерагип Нурег DM, ионообменную хроматографию на колонке ДЭАЭ-сефадекс-А-25 и ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина.

Мы исследовали фосфорилирование *in vivo* индивидуальных субъединиц в выделенных субфракциях РНК-полимеразы IIIа и IIIб после разделения в 4.5% – 9 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и переноса на бумагу Hybond C Extra методом иммуноблоттинга. Для наиболее точного определения молекулярных масс фосфорилированных *in vivo* субъединиц мы использовали стандартные наборы полипептидов (Sigma, США). После разделения в ПААГ и окрашивания серебром [7] подвижность белков-стандартов измеряли, строили кривую зависимости подвижности белка от его молекулярной массы и по этой кривой определяли молекулярную массу субъединиц РНК-полимеразы IIIа и IIIб, фосфорилированных *in vivo*.

Холофермент ДНК-зависимая РНК-полимераза III выделен как из ядер клеток эпидермоидной карциномы человека А431, так и из ядер плаценты человека в виде двух субфракций, различающихся по порядку элюции с колонки ДЭАЭ-сефадекс А-25 и плавучей плотности в градиенте плотности глицерина. Гетерогенность препаратов РНК-полимеразы

III высших эукариот была показана впервые на клетках плазмоцитомы мышей MOPC15. РНК-полимераза III из этих клеток была идентифицирована в виде двух субформ, отличающихся 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 развития не получила [8]. Согласно современным представлениям гетерогенность холофермента РНК-полимеразы III может определяться различными наборами транскрипционных факторов, ответственных за считывание генов класса III [2,9], но нельзя исключить и определенную роль модификаций субъединиц собственно РНК-полимеразы III в формировании и функционировании холофермента на промоторах генов класса III, которые отличаются существенным разнообразием [9].

В составе субфракций холофермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы III клеток как эпидермоидной карциномы человека, так и плаценты присутствуют четыре фосфорилированные *in vivo* субъединицы с молекулярными массами 60, 52, 45 и 38 кДа:

- с молекулярными массами 60, 45 и 38 кДа, фосфорилированные *in vivo* по остаткам тирозина;
- с молекулярными массами 60, 52, и 45 кДа, фосфорилированные *in vivo* по остаткам серин/треонина;
- с молекулярными массами 60 и 45 кДа, фосфорилированные *in vivo* и по остаткам тирозина и по остаткам серин/треонина;
- фосфорилированная *in vivo* субъединица 52 кДа, принадлежащая к одному из базальных транскрипционных факторов.

В клетках эпидермоидной карциномы человека A431 уровень фосфорилирования *in vivo* субъединицы 45 кДа по остаткам серин/треонина при разных физиологических состояниях носит динамический характер: в условиях пролонгирования клеточного цикла наблюдается дефосфорилирование субъединицы 45 кДа, индукция низкими концентрациями ЭФР приводит к восстановлению уровня фосфорилирования этой субъединицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 04-04-48497.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Hu P., Wu S., Hernandez N. 2003. *Molecular Cell*. 12: 699-709.
2. Sentenac A. 1985. *CRC Critical Rev. Biochem*. 18: 31-89.
3. Geiduschek E.P., Kassavetis G.A. 2001. *J. Mol. Biology*. 310: 1-26.
4. Hockman D.J., Schultz M.C. 1996. *Mol. Cell. Biol*. 16: 892-898.
5. Bell G.L., Valenzuela P., Rutter W.J. 1977. *J. Biol. Chem*. 252: 3082-3091.
6. Dignam J.D., Leibovitz R.M., Roeder R.G. 1983. *Nucleic Acids Res*. 11:1475-1477.
7. Wray W., Wu P. 1981 *Analyt. Biochem*. 118: 197-203.
8. Sklar V.E.F., Roeder R.G. 1976. *J. Biol. Chem*. 251 : 1064-1073.
9. Geiduschek E.P., Tocchini-Valentini G.P. 1988. *Annu. Rev. Biochem*. 57 : 873-914.