

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Никитина Татьяна Вячеславовна

**Зависимость интенсивности транскрипции
генов класса III от дополнительного
фосфорилирования РНК-полимеразы III
и физиологического состояния клетки**

Специальность 03.00.04 – «Биохимия»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель –
кандидат биологических наук,
доцент Людмила Ивановна Тищенко

Санкт-Петербург – 2004

Содержание

	Содержание	2
	Условные сокращения	6
1.	Введение	8
2.	Обзор литературы	12
	2.1. Эукариотические РНК-полимеразы	12
	2.2. Строение эукариотических РНК-полимераз	12
	2.3. Строение РНК-полимеразы III	14
	2.4. Промоторы генов класса III	17
	2.5. Базальные транскрипционные факторы РНК-полимеразы III	20
	2.5.1. Базальный транскрипционный фактор TFIIIA	20
	2.5.2. Базальный транскрипционный фактор TFIIIB	20
	2.5.3. Базальный транскрипционный фактор TFIIIC	23
	2.5.4. Базальный транскрипционный фактор SNAPc	25
	2.6. Сборка преинициального комплекса (ПНК) РНК-полимеразы III	25
	2.7. Холофермент РНК-полимеразы III	27
	2.8. Цикл транскрипции РНК-полимеразы III	28
	2.9. Регуляция транскрипции	29
	2.9.1. Влияние структуры хроматина и метилирования ДНК на транскрипцию	30
	2.9.2. Регуляция транскрипции в зависимости от фазы клеточного цикла	32
	2.9.3. Регуляция транскрипции при трансформации клеток	33
	2.9.4. Регуляция транскрипции в ответ на действие ростовых факторов	33
	2.9.5. Регуляция транскрипции в соответствии со скоростью роста клетки	36
	2.9.6. Регуляция транскрипции при апоптозе	38
	2.10. Регуляция транскрипции генов класса III	39
	2.10.1. Влияние структуры хроматина и метилирования ДНК на транскрипцию генов класса III	39
	2.10.2. Регуляция транскрипции генов класса III в зависимости от фазы клеточного цикла	40
	2.10.3. Регуляция транскрипции генов класса III при трансформации клеток	42
	2.10.3.1. Супрессор опухолей p53	43
	2.10.3.2. Онкобелок c-Myc	43
	2.10.3.3. Репрессор транскрипции Dg1	44
	2.10.3.4. Репрессор транскрипции Maf1p	44
	2.10.4. Регуляция транскрипции генов класса III в зависимости от действия ростовых факторов и скорости роста клетки	44
	2.10.4.1. Протеинкиназа СКII	45
	2.10.4.2. Митоген-активируемые протеинкиназы ERK1/2	46
	2.10.4.3. TOR-сигнальный путь	46
	2.10.5. Регуляция скоординированного синтеза рРНК и тРНК	48
	2.10.6. Регуляция транскрипции генов класса III при апоптозе	49
	2.10.7. Регуляция активности базальных транскрипционных факторов TFIIIA и TFIIIC и РНК-полимеразы III	49
3.	Материалы и методы	52
	3.1. Растворы и ионообменные смолы	52
	3.2. Работа с культурой клеток эпидермоидной карциномы человека A431	53
	3.3. Получение ядер из плаценты человека	54
	3.4. Получение ядер и цитоплазмы из клеток эпидермоидной карциномы человека A431	54

3.5. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина	55
3.5.1. Выделение тотальной РНК-полимеразной активности	55
3.5.2. Фракционирование субформ РНК-полимеразы III на колонке ДЕАЕ-сефадекс А-25	56
3.5.3. Фракционирование на колонке фосфоцеллюлозы Р11	56
3.5.4. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина	57
3.5.5. Определение РНК-полимеразной активности	57
3.5.6. Диск-электрофорез РНК-полимеразы III плаценты человека в присутствии SDS	57
3.6. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека и ядер клеток эпидермоидной карциномы человека А431 с использованием хроматографии на гепарине и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина	58
3.6.1. Получение ядерного экстракта	59
3.6.2. Разделение ядерного экстракта аффинной хроматографией на колонке Нерагін Нурер D M	59
3.6.3. Разделение РНК-полимераз I и III ионообменной хроматографией на колонке ДЕАЕ-сефадекс А-25	59
3.6.4. Ультрацентрифугирование субформ РНК-полимеразы III в градиенте плотности глицерина	60
3.6.5. Определение транскрипционной активности РНК-полимеразы III	60
3.7. Получение фракций ядерного экстракта S-100, содержащих базальные транскрипционные факторы РНК-полимеразы III - ТФIIВ и ТФIIС	61
3.8. Плазида рСRTM2.1 со вставкой АТ, содержащей последовательность Аlu-повтора	62
3.9. Трансформация клеток E. coli плазмидой рСRTM2.1 со вставкой АТ и выделение плазмиды	63
3.10. Проверка корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III плаценты человека in vitro	64
3.11. Фосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью	65
3.12. Фосфорилирование РНК-полимеразы III из клеток А431 с использованием цитоплазмы клеток А431	66
3.13. Дефосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека щелочной фосфатазой	66
3.14. Изучение влияния фосфорилирования и дефосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека на интенсивность транскрипции in vitro	67
3.14.1. Транскрипция in vitro с участием фосфорилированной и дефосфорилированной РНК-полимеразы III плаценты человека	67
3.14.2. Анализ РНК-транскриптов в 6% ПААГ с 7 М мочевиной	67
3.15. Поиск потенциальных сайтов фосфорилирования и гликозилирования в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека	67
3.16. Проточная цитофлуориметрия клеток А431 с использованием иодида пропидия ..	68
3.17. Изучение фрагментации ДНК в клетках А431 при апоптозе	69
3.18. Выделение тотальной РНК из клеток А431	69

3.19. Исследование содержания 5S рРНК и тРНК _i ^{Met1} в тотальной РНК клеток А431 двухэтапным методом RT-PCR в реальном времени	70
3.19.1. Обратная транскрипция	70
3.19.2. PCR в реальном времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I	71
4. Результаты	73
4.1. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина	73
4.1.1. Фракционирование РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11	73
4.1.2. Ультрацентрифугирование РНК-полимеразы III в градиенте плотности глицерина	75
4.1.3. Полипептидный состав препаратов РНК-полимеразы III плаценты человека	76
4.2. Фосфорилирование субформ РНК-полимеразы III плаценты человека – IIIа и IIIб, полученных с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина, ассоциированной протеинкиназной активностью	77
4.3. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на гепарине Нерагін Нурер D М и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина	78
4.3.1. Фракционирование РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека на гепарине Нерагін Нурер D М	78
4.3.2. Очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека фракционированием на ДЕАЕ-сефадексе А-25	79
4.3.3. Ультрацентрифугирование РНК-полимеразы III в градиенте плотности глицерина	81
4.4. Фосфорилирование субформ РНК-полимеразы III плаценты человека – IIIа и IIIб, полученных с использованием хроматографии на гепарине Нерагін Нурер D М и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина, ассоциированной протеинкиназной активностью	82
4.5. Изучение кинетики фосфорилирования РНК-полимеразы IIIа из ядер плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью	83
4.6. Изучение кинетики фосфорилирования РНК-полимеразы IIIб из ядер плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью	85
4.7. Изучение кинетики дефосфорилирования РНК-полимеразы IIIа из ядер плаценты человека щелочной фосфатазой	86
4.8. Изучение способности протеинкиназной активности, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека, использовать GTP в качестве источника фосфатной группы	87
4.9. Ингибиторный анализ протеинкиназной активности, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека	88
4.10. Проверка корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III плаценты человека in vitro	90
4.11. Влияние фосфорилирования РНК-полимеразы IIIа и IIIб плаценты человека на интенсивность транскрипции in vitro	91

4.12. Влияние дефосфорилирования РНК-полимеразы IIIa и IIIb плаценты человека на интенсивность транскрипции <i>in vitro</i>	95
4.13. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из клеток эпидермоидной карциномы человека A431 с использованием хроматографии на гепарине и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина	98
4.13.1. Выделение РНК-полимеразы III из клеток A431 фракционированием на гепарине Heparin Hyper D M	98
4.13.2. Очистка РНК-полимераз III из клеток A431 на ДЕАЕ-сефадексе А-25	98
4.13.3. Ультрацентрифугирование РНК-полимеразы III из клеток A431 в градиенте плотности глицерина	100
4.14. С субформами РНК-полимеразы III из клеток A431 – IIIa и IIIb, не соотношается протеинкиназная активность	101
4.15. В цитоплазме клеток A431 присутствует протеинкиназная активность, фосфорилирующая РНК-полимеразу IIIa из клеток A431 <i>in vitro</i>	102
4.16. Компьютерный поиск потенциальных сайтов фосфорилирования и гликозилирования в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека	103
4.17. Исследование физиологического состояния клеток эпидермоидной карциномы человека A431 при воздействии ЭФР в низких и высоких концентрациях	106
4.17.1. Проточная цитофлуориметрия с использованием иодида пропидия клеток A431, подвергнутых бессывороточному голоданию и воздействию ЭФР в низких и высоких концентрациях	107
4.17.2. Исследование характера фрагментации ДНК при воздействии на клетки A431 ЭФР в высокой концентрации	109
4.18. Оптимизация условий для эффективного анализа содержания 5S рРНК и тРНК в клетках A431 методом RT-PCR в реальном времени	110
4.19. Исследование содержания 5S рРНК в клетках A431, находящихся в различных физиологических состояниях	112
4.20. Исследование содержания тРНК ^{Met1} в клетках A431, находящихся в различных физиологических состояниях	115
5. Обсуждение	117
6. Выводы	134
7. Благодарности	136
8. Список литературы	137

Условные сокращения

- CAK – CDK-активирующая киназа, (CDK-activating kinase);
- CDK – циклин-зависимая киназа (cyclin-dependent kinase);
- CKI – ингибиторы CDK (CDK inhibitors);
- CKII – казеинкиназа II (casein kinase II);
- C_T – пороговый цикл (threshold cycle);
- DEPC – диэтиленпирокарбонат;
- DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко;
- DRB – 5,6-дихлоро-1-β-D-рибофуранозилбензимидазол;
- DSE – дистальный энхансерный элемент (distal sequence element);
- ERK – киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase);
- HAT – гистон-ацетил трансфераза (histone acetyltransferase);
- HMG-белки – белки группы высокой подвижности в геле (high mobility group proteins);
- ICR – внутренняя контрольная область (internal control region);
- MAP-киназы – митоген-активируемые протеинкиназы (mitogen-activated protein kinases);
- PI3-киназы – инозитол-3-фосфат-киназы (phosphoinositol-3 kinases);
- PMSF – фенилметилсульфонилфторид;
- PSE – проксимальный энхансерный элемент (proximal sequence element);
- P-TEFb – основной позитивный транскрипционный фактор элонгации (positive transcription elongation factor, basic);
- PCR – полимеразная цепная реакция (polymerase chain reaction);
- RPA – субъединица РНК-полимеразы I (A) (RNA polymerase I (A));
- RPB – субъединица РНК-полимеразы II (B) (RNA polymerase II (B));
- RPC – субъединица РНК-полимеразы III (C) (RNA polymerase III (C));
- RT – обратная транскрипция (reverse transcription);
- SDS – додецилсульфат натрия;
- SNAPc – белковый комплекс, активирующий гены малых ядерных РНК (small nuclear RNA-activating protein complex);
- STAT – передатчик сигнала и активатор транскрипции (signal transducer and activator of transcription);
- TAF – фактор, ассоциированный с ТВР (TBP-associated factor);
- ТВР – ТАТА-бокс-связывающий белок (TATA-box binding protein);
- TFIII – транскрипционный фактор РНК-полимеразы III (transcription factor III);

TGF- α – трансформирующий фактор роста α (transforming growth factor α);

TOR – мишень рапамицина (target of rapamycin);

X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -галактозид;

Бк – беккерель;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ДЕАЕ – диэтиламиноэтил;

ДТТ – дитиотреитол;

ИПТГ – изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид;

кДНК – комплементарная ДНК;

мяРНК – малая ядерная РНК;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПИК – преиниционный комплекс;

рРНК – рибосомная РНК;

СТД – С-терминальный домен РНК-полимеразы II;

тРНК – транспортная РНК;

тРНК^{Met} – инициаторная метиониловая тРНК;

ТХУ – трихлороуксусная кислота;

ЭГТА – (этиленгликоль)диэтилендинитрилотетрауксусная кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

ЭФР – эпидермальный фактор роста.

При описании локализации последовательностей на ДНК использовались обозначения: +1 - точка старта транскрипции, положительные номера позиций - от точки старта в сторону 3'-конца нетранскрибируемой цепи ДНК, отрицательные - от точки старта в сторону 5'-конца нетранскрибируемой цепи ДНК. Обозначение 3'- и 5'-фланкирующих концов относится к нетранскрибируемой цепи ДНК.

1. Введение

Актуальность проблемы

Изучение механизмов, лежащих в основе регуляции активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы III, транскрибирующей гены большинства малых стабильных нетранслируемых РНК (гены класса III), является актуальной проблемой, так как в последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о значительной роли подобных РНК в таких важных процессах в клетке, как рост, пролиферация и дифференцировка (White, 1998; Brown e.a., 2000; Felton-Edkins e.a., 2003a). Показано, что содержание РНК-продуктов генов класса III, – 5S рРНК, тРНК, Alu-РНК, мяРНК и других, изменяется в зависимости от скорости роста клетки (Powers, Walter, 1999; Schultz, 1999) и стадии клеточного цикла, при опухолевой трансформации, вирусной инфекции (Brown e.a., 2000; Felton-Edkins e.a., 2003a) и тепловом шоке (Chu e.a., 1995). Однако до сих пор не известны тонкие механизмы, лежащие в основе контроля содержания этих РНК в клетке в ответ на различные воздействия. Очевидно, одним из важнейших путей изменения количества продуктов генов класса III является регуляция транскрипционной активности РНК-полимеразы III. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что в этой регуляции могут участвовать протеинкиназы и протеинфосфатазы. Так, было выяснено, что на уровень транскрипции генов класса III влияют протеинкиназы p34^{cdc2} (Westmark e.a., 1998), СКП (Hockman, Schultz, 1996; Ghavidel, Schultz, 2001; Johnston e.a., 2002), MAP-киназы ERK1 и ERK2 (Felton-Edkins e.a., 2003b), TOR-киназа (Schultz, 1999) и протеинкиназа C (Li e.a., 2000). В то же время, механизм действия этих киназ на транскрипционную машину РНК-полимеразы III в большинстве случаев остаётся невыясненным. С другой стороны, известно, что фосфорилированию подвергаются некоторые субъединицы РНК-полимеразы III, в том числе субъединицы, общие для РНК-полимераз I и III и для всех трех РНК-полимераз (Bell e.a., 1977; Kayukawa e.a., 1999), а также базальные транскрипционные факторы TFIIIA, TFIIIB и TFIIIC (Hoeffler e.a., 1988; Shen e.a., 1996; White, 1998; Westmark e.a., 2002). Однако роль этих модификаций, а во многих случаях и протеинкиназы, их осуществляющие, не известны. Недостаточно изучено также изменение содержания индивидуальных видов малых стабильных РНК-продуктов генов класса III в тотальной РНК при изменении «программы» развития клетки, например, при переходе клетки от медленной к активной пролиферации или к запрограммированной клеточной гибели (апоптозу). Существуют лишь данные,

позволяющие предположить, что активация экспрессии генов класса III может вызывать опухолевую трансформацию клеток (Brown e.a., 2000). Мы полагаем, что изменение активности РНК-полимеразы III является важным механизмом, регулирующим не только переход клетки в трансформированное состояние, но и другие важнейшие процессы, такие как скорость роста и пролиферации клетки, а также ее переход к апоптозу. Для подтверждения этого предположения необходимо исследование корреляции содержания продуктов генов класса III и физиологического состояния клетки.

Цели и задачи исследования

Целью нашей работы явилось изучение влияния фосфорилирования и дефосфорилирования РНК-полимеразы III на интенсивность транскрипции *in vitro* с использованием в качестве матрицы Alu-повтора, содержащего промотор и терминатор генов класса III, а также исследование зависимости содержания продуктов разных генов класса III – 5S рРНК и тРНК^{Met}₁, от физиологического состояния клетки (медленная и активная пролиферация и апоптоз). Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. получение препаратов транскрипционно активной РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека и клеток эпидермоидной карциномы человека А431 и исследование наличия в составе этих препаратов протеинкиназной и протеинфосфатазной активностей;
2. определение принадлежности протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека, к одному из известных семейств протеинкиназ;
3. оценка интенсивности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III в фосфорилированной, нефосфорилированной и дефосфорилированной форме на специфичной Alu-матрице, содержащей промотор и терминаторы генов класса III;
4. выявление в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека потенциальных сайтов фосфорилирования и реципрокного фосфорилирования и гликозилирования (сайты «иньянь») с помощью компьютерного анализа;
5. исследование изменения доли различных продуктов генов класса III – 5S рРНК и тРНК^{Met}₁, в тотальной РНК клеток эпидермоидной карциномы человека А431, находящихся в различных физиологических состояниях: медленной и активной пролиферации и апоптоза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В ядрах клеток плаценты человека и клеток эпидермоидной карциномы человека A431 существуют две субформы РНК-полимеразы III – IIIa и IIIb, различающиеся по уровню транскрипционной активности *in vitro*.
2. РНК-полимераза IIIa из ядер клеток плаценты человека ассоциирована с протеинкиназной активностью, а РНК-полимераза IIIb – с протеинкиназной и протеинфосфатазной активностями.
3. Протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразой III из ядер клеток плаценты человека, принадлежит к семейству инозитол-3-фосфат-киназ (PI3-киназ).
4. Фосфорилирование и дефосфорилирование РНК-полимераз IIIa и IIIb из ядер клеток плаценты человека влияет на интенсивность транскрипции *in vitro*.
5. Содержание РНК-продуктов различных генов класса III – 5S рРНК и тРНК^{Met1}, в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 зависит от физиологического состояния клетки (медленная и активная пролиферация и апоптоз).

Научная новизна

Впервые показано, что в клетках плаценты человека и эпидермоидной карциномы человека A431 содержатся две субформы ДНК-зависимой РНК-полимеразы III, обозначенные IIIa и IIIb, различающиеся по уровню транскрипционной активности *in vitro*.

Впервые выявлено, что с обеими субформами РНК-полимеразы III плаценты человека ассоциирована протеинкиназная активность, фосфорилирующая 7 субъединиц в составе обеих субформ полимеразы и дополнительно 2 субъединицы в составе препарата РНК-полимеразы IIIa и 1 субъединицу в составе препарата РНК-полимеразы IIIb. Эта протеинкиназа, по-видимому, принадлежит к семейству инозитол-3-фосфат-киназ (PI3-киназ). Также показано, что фосфорилирование РНК-полимеразы III ассоциированной протеинкиназой и дефосфорилирование экзогенной щелочной фосфатазой влияет на интенсивность транскрипции *in vitro* на специфичной Alu-матрице. С субформой IIIb ассоциирована не только протеинкиназная, но и протеинфосфатазная активность.

Впервые проведен анализ содержания РНК-продуктов генов класса III (5S рРНК и тРНК^{Met1}) методом RT-PCR в реальном времени, позволяющим наиболее точно определить долю индивидуальной РНК в тотальной РНК клетки. Показано, что содержание 5S рРНК и тРНК^{Met1} в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 зависит от физиологического состояния клетки (медленная и активная пролиферация и апоптоз).

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты, полученные в данном исследовании, вносят вклад в понимание механизмов регуляции транскрипции генов класса III, роли в этом процессе посттрансляционных модификаций белков. Понимание механизмов регуляции активности РНК-полимеразы III необходимо для выяснения роли, которую играют в клетке гены класса III и их продукты, так как функция многих малых стабильных нетранслируемых РНК до сих пор не известна. Представленные в диссертации данные о корреляции содержания продуктов генов класса III и физиологического состояния клетки служат подтверждением предположения о том, что регуляция активности РНК-полимеразы III является важным механизмом, вызывающим изменение скорости роста и пролиферации клетки, а также переход клетки к апоптозу.

Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров биолого-почвенного факультета СПбГУ.

2. Обзор литературы

2.1. Эукариотические РНК-полимеразы

Транскрипцию ДНК, т.е. синтез РНК на ДНК-матрице, осуществляет фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза (ЕС 2.7.7.6). Этот фермент способен катализировать реакцию полимеризации рибонуклеотидов с образованием фосфодиэфирной связи, а также расщепление РНК-транскрипта с участием воды (гидролиз) или пирофосфата (пирофосфоролиз). В эукариотических клетках содержится три различные формы ДНК-зависимой РНК-полимеразы, получившие названия: РНК-полимераза I (А), РНК-полимераза II (В) и РНК-полимераза III (С), соответственно порядку их элюции с колонки ДЕАЕ-сефадекса А-25 (Roeder, Rutter, 1969; Schwartz e.a., 1974). Три формы РНК-полимеразы различаются по субъединичному составу, что, как полагают, отражает их специализацию в транскрипции различных генов, происшедшую в ходе эволюции этого фермента, а также необходимость в независимой регуляции каждого из ферментов. Гены, транскрибируемые той или иной формой РНК-полимеразы, относятся, соответственно, к классу I, II или III. Относящиеся к разным классам гены различаются строением промотора, что определяет, какие базальные (основные) транскрипционные факторы будут участвовать в образовании преиницирующего комплекса. Таким образом, от типа промотора зависит, какая форма РНК-полимеразы будет осуществлять транскрипцию данного гена. РНК-полимераза I транскрибирует гены предшественника рибосомальных РНК, из которого затем в результате процессинга образуются 5,8S рРНК, 18S рРНК и 28S рРНК. К генам класса II относятся все гены, кодирующие белки, а также гены мяРНК, кроме U6 мяРНК. РНК-полимераза III считывает гены 5S рРНК, всех тРНК, U6 мяРНК, 7SK РНК, 7SL РНК, Alu-повторы, а также ряд вирусных генов и генов небольших стабильных нетранслируемых клеточных РНК (Sentenac, 1985).

Три формы эукариотической РНК-полимеразы также различаются по чувствительности к токсину бледной поганки *Amanita phalloides* – α -аманитину: РНК-полимераза I не чувствительна к антибиотику, РНК-полимераза II наиболее чувствительна и ингибируется при концентрации α -аманитина 10^{-8} – 10^{-9} М, а РНК-полимераза III – при концентрации 10^{-4} – 10^{-5} М (Schwartz e.a., 1974).

2.2. Строение эукариотических РНК-полимераз

Эукариотические РНК-полимеразы, по сравнению с эубактериальным ферментом, имеют гораздо более сложный субъединичный состав (12 и более субъединиц), что, по-видимому, отражает разнообразие регуляторных механизмов, вовлеченных в процесс

транскрипции у эукариот (Sentenac, 1985). Однако данные рентгеноструктурного анализа эубактериальной РНК-полимеразы и РНК-полимеразы II дрожжей свидетельствуют, что пространственное строение всех мультисубъединичных ДНК-зависимых РНК-полимераз высоко консервативно. В настоящее время отсутствуют данные о пространственной структуре РНК-полимеразы III, но высокая гомология многих субъединиц всех трёх форм эукариотической РНК-полимеразы позволяет предположить, что структуры РНК-полимераз II и III являются схожими (Geiduschec, Kassavetis, 2001). Для строения всех мультисубъединичных ДНК-зависимых РНК-полимераз характерно наличие двух неодинаковых крупных полипептидов и набора меньших по размеру субъединиц (Sentenac, 1985). Две крупные субъединицы вместе образуют «кор» – структуру, по форме напоминающую клешню, при этом между субъединицами располагается каталитический «карман», на дне которого находится активный центр фермента. В активном центре содержится один или два (по разным данным) иона Mg^{2+} , которые участвуют в катализе всех трёх реакций: полимеризации, гидролиза и пирофосфоролиза. В составе РНК-полимераз также содержится несколько ионов цинка, которые, как показал рентгеноструктурный анализ фермента, выполняют структурную функцию, участвуя в поддержании конформации нескольких субъединиц, но не входят в состав активного центра (Zhang e.a., 1999). Помимо двух самых крупных субъединиц, мультисубъединичные РНК-полимеразы содержат, в зависимости от источника, от трех (эубактерии) до 15 (РНК-полимераза III человека) значительно меньших по массе субъединиц. Эти субъединицы располагаются по периферии от «кора» фермента, образованного двумя самыми крупными субъединицами, и не участвуют в образовании активного центра. Роль этих субъединиц не всегда ясна. Показано, что некоторые из них участвуют в конформационных переходах каталитического кармана при образовании так называемых открытой, способной связываться с ДНК-матрицей, и закрытой, компетентной к элонгации, форм полимеразы. Другие субъединицы участвуют в образовании желобка для выхода вновь синтезированного РНК-транскрипта из каталитического кармана. Роль ряда субъединиц, вероятно, связана с регуляцией транскрипционной активности РНК-полимеразы, например, они могут участвовать в передаче регуляторных сигналов от транскрипционных факторов к «кору» фермента (Asturias, Craighead, 2003).

Для обозначения субъединиц эукариотических РНК-полимераз латинскими буквами А, В и С указывают принадлежность субъединицы РНК-полимеразе I, II и/или III, соответственно, а затем указывают либо молекулярную массу субъединицы в кДа (например, С160, АВС23), либо порядковый номер субъединицы при расположении полипептидов от большего к меньшему по молекулярной масса (например, RPC1 – самая

крупная субъединица РНК-полимеразы III (C), где “RP” – RNA polymerase (РНК-полимераза); RPAVC1 – самая крупная общая субъединица всех трех форм РНК-полимеразы эукариот). В настоящее время не существует единой общепринятой системы наименования субъединиц, поэтому некоторые субъединицы, особенно общие для двух или трех РНК-полимераз, имеют несколько исторически сложившихся альтернативных названий. Например, общая для всех трех форм эукариотической РНК-полимеразы субъединица RPAVC2 в некоторых работах называется RPB6, RPB14.4 или ABC23 (см. табл. 1) (Sentenac, 1985).

2.3. Строение РНК-полимеразы III

РНК-полимераза III является самой сложно устроенной среди всех трех форм эукариотических РНК-полимераз, в её состав входит 17 субъединиц размером от ~160 до ~10 кДа, а суммарная молекулярная масса достигает 600-680 кДа (Geiduschec, Tocchini-Valentini, 1988). Наиболее подробно изучено строение РНК-полимеразы III дрожжей *S. cerevisiae* и человека, субъединичный состав которых представлен в табл. 1. Многие субъединицы РНК-полимеразы III имеют несколько альтернативных названий (см. табл. 1): например, субъединицы фермента из дрожжей обычно обозначают латинскими буквами «C», «AC» или «ABC» и значением молекулярной массы (в кДа), а субъединицы фермента из клеток человека – буквами «RPC», «RPAVC» или «RPAVC» и значением молекулярной массы (в кДа) или порядковым номером. Следует, однако, заметить, что строгих правил наименования субъединиц до сих пор не существует, и разные авторы придерживаются разных обозначений. Самые крупные субъединицы, у РНК-полимеразы III из дрожжей их молекулярные массы составляют 160 и 128 кДа, имеют области гомологии с β - и β' -субъединицами РНК-полимеразы *E. coli*, субъединицы с молекулярными массами 40 и 19 кДа содержат области гомологии с α -субъединицей, а субъединица с молекулярной массой 23 кДа – с ω -субъединицей бактериального фермента (Geiduschec, Tocchini-Valentini, 1988). Из 17 субъединиц, входящих в состав РНК-полимеразы III, 10 являются уникальными для этого фермента, 2 субъединицы – общие для РНК-полимераз I и III (AC40 и AC19 у дрожжей, см. табл. 1), а еще 5 субъединиц – общие для всех трех форм эукариотической РНК-полимеразы (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α и ABC10 β) (Schramm, Hernandez, 2002; Flores e.a., 1999). Субъединицы, гомологичные субъединицам РНК-полимеразы эубактерий (C160, C128, AC40, AC19 и ABC23), составляют «кор» фермента (Geiduschec, Kassavetis, 2001). Роль субъединиц, не входящих в «кор» РНК-полимеразы III, пока слабо изучена. Некоторые из этих субъединиц

Таблица 1.

Субъединичный состав РНК-полимеразы III дрожжей *S. cerevisiae* и человека (из работы Schramm and Hernandez, 2002, с изменениями).

Дрожжи <i>S. cerevisiae</i>		Соответствующие субъединицы РНК-полимеразы II	Человек	
Субъединицы РНК- полимеразы III	Молекулярная масса, кДа		Субъединицы РНК- полимеразы III	Молекулярная масса, кДа
C160	162,1	RPB1	HsRPC1/RPC155	155,6
C128	129,3	RPB2	HsRPC2	127,6
C82	73,6		<u>HsRPC3/RPC62</u>	60,5
C53	46,6		<u>HsRPC4/RPC53</u>	44,4
C37	32,1		<u>HsRPC5</u>	79,8
C34	36,1		<u>HsRPC6/RPC39</u>	35,6
C31	27,7		<u>HsRPC7/RPC32</u>	25,9
C25	24,3	RPB7	HsRPC8	22,9
C17	18,6	RPB4	HsRPC9/CGRP-RC	16,8
C11	12,5	RPB9	HsRPC10/RPC11	12,3
AC40	37,6	RPB3	HsRPAC1/RPA5, RPA39	38,6
AC19	16,1	RPB11	HsRPAC2/RPA9, RPA16	15,2
ABC27	25,1	RPB5	HsRPABC1/RPB5, RPB25	24,6
ABC23	17,9	RPB6	HsRPABC2/RPB6, RPB14.4	14,5
ABC14.5	16,5	RPB8	HsRPABC3/RPB8, RPB17	17,1
ABC10 α	7,7	RPB12	HsRPABC4/RPB7.0	7,0
ABC10 β	8,2	RPB10	HsRPABC5/RPB10, RPB7.6	7,6

Жирным шрифтом выделены уникальные субъединицы РНК-полимеразы III, не имеющие паралога в составе РНК-полимераз I и II. Подчеркнуты субъединицы РНК-полимеразы III, образующие субкомплекс, который может быть отделен от фермента при очистке в мягких условиях.

имеют гомологов в двух других формах РНК-полимеразы и, по-видимому, выполняют схожие функции. Так, субъединицы RPC8 (C25) и RPC/9 (C17) – гомологи субъединиц RPB7 и RPB4 РНК-полимеразы II, которые образуют субкомплекс в составе фермента и важны для инициации транскрипции и стабилизации открытого комплекса (Ferri e.a., 2000; Schramm, Hernandez, 2002). Субъединица RPC10 (C11) на С-конце содержит участок гомологии с фактором элонгации РНК-полимеразы II – TFIIIS, и необходима для переключения активности фермента с полимеразной на эндонуклеазную (Chedin e.a., 1998). Эта же субъединица содержит области гомологии с субъединицами РНК-полимеразы I (A12.2) и РНК-полимеразы II (B12.6) и, следовательно, может иметь дополнительные функции в ферменте (Chedin e.a., 1998). Субъединица RPABC2 (RPB6) является общей для всех трех форм эукариотической РНК-полимеразы и участвует в привлечении субкомплекса RPC8/9 РНК-полимеразы III (и гомологичных субкомплексов двух других форм РНК-полимеразы) к кору фермента (Tan e.a., 2003). Роль общих для нескольких РНК-полимераз субъединиц может заключаться и в координировании транскрипции генов разных классов. Так, сообщалось, что субъединица RPAC1 (AC40), общая для РНК-полимераз I и III, является мишенью для скоординированной регуляции синтеза 45S пре-рРНК и 5S рРНК (Matthews e.a., 1995).

Целый ряд субъединиц РНК-полимеразы III взаимодействуют с базальными транскрипционными факторами (Flores e.a., 1999; Werner e.a., 1993). Так, субъединица RPABC4 (ABC10 α) взаимодействует с субъединицей τ 131 базального фактора TFIIIC (Dumay e.a., 1999), субъединица RPC6 (C34) – с TFIIIB70 (BRF) в составе фактора TFIIIB (Andrau e.a., 1999). Очевидно, эти субъединицы участвуют в привлечении РНК-полимеразы III к базальному транскрипционному комплексу на промоторе.

Роль пяти уникальных субъединиц РНК-полимеразы III, которые не имеют гомологов у других двух форм эукариотической РНК-полимеразы (C82, C53, C37, C34 и C31 у дрожжей), по-видимому, связана с обеспечением каких-то уникальных для РНК-полимеразы III свойств. Например, с локализацией фермента в ядре, взаимодействием со специфическим транскрипционным аппаратом, терминацией, взаимодействием с ферментами процессинга РНК-продуктов генов класса III (Geiduschec, Kassavetis, 2001). Так, было показано, что субъединицы C82, C34 и C31 у дрожжей и их гомологи у человека образуют *in vivo* субкомплекс, который можно отделить от корового фермента РНК-полимеразы III. РНК-полимераза III, не содержащая данный субкомплекс, способна к элонгации и терминации транскрипции *in vitro*, но не способна к специфичной инициации транскрипции, что, по-видимому, связано с тем, что через субъединицу C34 происходит взаимодействие полимеразы с базальным фактором TFIIIB (Werner e.a., 1993; Wang Z.,

Roeder, 1997). Уникальная субъединица C53 также выполняет какую-то важную для выживания клетки функцию в составе РНК-полимеразы III, так как в температурочувствительных мутантах по гену этой субъединицы в условиях непермиссивной температуры резко снижается синтез тРНК и происходит блокировка клеточного цикла в G₁-фазе (Mann e.a., 1992).

Недавно была определена субъединичная структура РНК-полимеразы III человека и клонированы все гены, кодирующие ее субъединицы (табл. 1; Schramm, Hernandez, 2002). В составе РНК-полимеразы III человека идентифицированы гомологи всех семнадцати субъединиц РНК-полимеразы III дрожжей (Hu e.a., 2002). Интересно, что субъединица RPC9 РНК-полимеразы III человека представляет собой необычный пример белка, который имеет разные функции в ядре и цитоплазме. В ядре RPC9 является субъединицей РНК-полимеразы III (Hu e.a., 2002), а в цитоплазме – внутриклеточным периферическим мембранным белком, получившим название CGRP-RCP (calcitonin gene-related peptide – receptor component protein, «белковый компонент рецептора пептида, родственного кальцитонину»), который участвует в передаче сигнала от мембранного рецептора к G-белку (Siaut e.a., 2003). Субъединица RPC9 имеет гомологов в составе РНК-полимераз I и II, поэтому скорее всего функция передачи сигнала от мембраны в клетку была приобретена ею уже после расхождения в эволюции трех форм эукариотической РНК-полимеразы.

2.4. Промоторы генов класса III

Характерной чертой генов класса III является большое разнообразие в строении промоторов. Промоторы в основном имеют внутригенную локализацию и отличаются прерывистой структурой, включающей существенные для функционирования последовательности, разделенные участками, менее существенными для транскрипции. Различают несколько типов промоторов: внутригенные промоторы 1-го и 2-го типа, внешние промоторы и промоторы смешанного типа.

1. Внутригенный промотор генов 5S рРНК (промотор 1-го типа): локализован от +50 до +97, в нем различают: А-последовательность (от +50 до +64), вставочный элемент (от +67 до +72) и С-последовательность (от +80 до +97), составляющие все вместе внутреннюю контрольную область (ICR). Есть данные, что для активированной транскрипции важна и 5'-фланкирующая последовательность от -26 до -39 (Pieler e.a., 1987).

2. Внутригенный промотор генов тРНК, 7S L РНК и Alu-повторов (промотор 2-го типа) (Telford e.a., 1979; Chu e.a., 1995): содержит А- и В-последовательности, локализованные внутри гена. Структура А-последовательности в промоторах генов 5S

РНК и тРНК является высоко консервативной. У индивидуальных генов тРНК расстояние от А-последовательности до точки старта транскрипции постоянно, в то время как расстояние между последовательностями А и В может сильно варьировать: от 31 до 93 пар нуклеотидов у дрожжей; от 21 до 365 пар нуклеотидов у разных видов. Считается, что В-последовательность является количественной детерминантой силы промотора, то есть без В-последовательности транскрипция идет корректно, но менее эффективно, а А-последовательность играет роль качественной детерминанты. В отсутствие А-последовательности транскрипция происходит некорректно.

На различных объектах показано, что делеции в 5'-фланкирующей области генов тРНК и 5S рРНК могут вызывать как усиление, так и ослабление эффективности транскрипции, что указывает на наличие дополнительных цис-регуляторных элементов. Характерное свойство этих цис-элементов – их низкая консервативность как в разных генах класса III одного организма, так и в гомологичных генах у разных видов (Hall e.a., 1982).

3. Внешний промотор (промотор 3-го типа) содержат только гены многоклеточных организмов. Например, некоторые гены U6 мяРНК млекопитающих и гены 7S К РНК. Для внешнего промотора характерно наличие АТ-богатого, так называемого ТАТА-подобного элемента, расположенного выше точки старта, то есть вне пределов кодирующей последовательности, в положении -27. У генов U6 мяРНК имеется также проксимальный элемент (PSE) в области -60 и дистальный энхансерный элемент (DSE) в области -250. Внутри гена U6 мяРНК есть участок, который мог бы служить А-последовательностью (как у промоторов 2-го типа), но мутации в нём не влияют на транскрипцию (Carbon e.a., 1987). По наличию проксимального и дистального элементов этот промотор подобен промоторам гена U2 мяРНК и других генов мяРНК, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Так как у позвоночных промоторы генов мяРНК, транскрибируемых РНК-полимеразой II, не содержат ТАТА-последовательности, то считается, что именно локализация ТАТА-подобной последовательности в области -27 определяет специфичность промотора гена U6 мяРНК для РНК-полимеразы III (обсуждается далее, см. п. 2.6.) (Simmen, Mattaj, 1990). У растений промоторные элементы генов U6 и U2 мяРНК, транскрибируемых, соответственно, РНК-полимеразами III и II, идентичны, а решающую роль для транскрипции той или иной формой фермента играет расстояние между PSE и ТАТА-элементами промотора (Waibel, Filipowicz, 1990). В промоторах генов мяРНК насекомых специфичность к той или другой форме РНК-полимеразы определяется последовательностью PSE, с которой связываются разные транскрипционные факторы (Jensen e.a, 1998).

К внешним промоторам можно отнести и так называемый минимальный промотор, характерный для гена 7S К РНК (Murphy e.a., 1987). Весь промотор локализован во фрагменте длиной в 40 пар нуклеотидов выше от точки старта транскрипции, то есть от -1 до -40, ТАТА-подобная последовательность идентифицирована в положении -25. Последовательность выше -40 выполняет лишь энхансерную функцию. Никакие внутригенные элементы для такого минимального промотора не требуются.

4. Смешанные промоторы: в их составе есть как элементы, характерные для внешних промоторов (ТАТА-подобный мотив, проксимальный и, возможно, дистальный элементы), так и характерная для внутригенных промоторов В-последовательность. При этом В-последовательность работает синэргично с внешним промотором и сильно влияет на транскрипцию. А-последовательность в таких генах не обнаружена. Примерами генов со смешанным типом промоторов могут служить гены U6 мяРНК некоторых видов дрожжей. Локализация В-последовательности может быть различной. Так, в гене U6 мяРНК *Saccharomyces cerevisiae* В-последовательность локализована ниже области терминации транскрипции (120-130 пар нуклеотидов ниже 3'-конца гена), а у другого вида дрожжей В-последовательность расположена в интроне гена (Brow, Guthrie, 1990).

К смешанным промоторам относят также промотор гена тРНК селеноцистеина. Этот промотор содержит проксимальный элемент в положении -60, ТАТА-подобный мотив в положении -30, В-последовательность, локализованную от +65 до +75, а также измененную А-последовательность (локализована от +8 до +20), которая не влияет на уровень транскрипции. Удаление В-последовательности снижает уровень транскрипции в 5 раз, но не приводит к ее прекращению. Было показано, что делеция участка от -318 до -100 снижает уровень транскрипции в 10 раз, что говорит в пользу присутствия в этой области дистального регуляторного элемента (Carbon, Krol, 1991). В последние годы были получены данные, что у целого ряда генов тРНК *Drosophila*, *Schizosaccharomyces pombe* и других видов в положении от -25 до -30 располагается ТАТА-подобный элемент, необходимый для транскрипции этих генов *in vivo* и *in vitro*, а внутри гена находятся функционально значимые А- и В-последовательности, характерные для всех генов тРНК (Trivedi e.a., 1999). Таким образом, оказалось, что промоторы смешанного типа довольно часто встречаются у самых разных организмов. По-видимому, в процессе эволюции генов класса III происходил постепенный переход промоторных функций от внешних элементов к внутригенным. Интересно отметить, что, как было выяснено недавно, многие гены класса II также содержат внутренние элементы, которые связывают базальные транскрипционные факторы и играют важную роль в сборке ПИК на промоторах, не содержащих ТАТА-последовательность (Smale, Kadonaga, 2003).

2.5. Базальные транскрипционные факторы РНК-полимеразы III

К основным (базальным) транскрипционным факторам РНК-полимеразы III относят факторы TFIIIA, TFIIIB, TFIIIC и комплекс SNAPc (Schramm, Hernandez, 2002). Название транскрипционных факторов TFIIIC и TFIIIB соответствует названию фракций (B и C) ядерного экстракта клеток млекопитающих, полученных при разделении его на фосфоцеллюлозе P11, из которых были выделены эти факторы (Segall e.a., 1980). Изучение фракций B и C ядерного экстракта клеток разных организмов выявило, что у дрожжей они содержат по одному базальному фактору каждая – TFIIIB и TFIIIC, соответственно, а у многоклеточных их состав намного сложнее: из фракций B и C было выделено несколько субфракций, обладающих активностью базальных транскрипционных факторов РНК-полимеразы III, а в составе некоторых субфракций найдено несколько транскрипционных факторов (табл. 2; Geiduschek, Kassavetis, 2001). Таким образом, у многоклеточных произошло как усложнение состава транскрипционных факторов, так и появление новых факторов, гомологи и аналоги которых отсутствуют у дрожжей.

2.5.1. Базальный транскрипционный фактор TFIIIA

Базальный транскрипционный фактор TFIIIA необходим для сборки преинициального комплекса на внутригенном промоторе 1-го типа генов 5S рРНК. Фактор состоит из одной субъединицы, содержащей 9 (у человека и *S. cerevisiae*) или 10 (у *S. pombe*) мотивов «цинковых пальцев», которые образуют ДНК-связывающий домен TFIIIA (табл. 2, Miller e.a., 1985). TFIIIA связывается с помощью «цинковых пальцев» с внутренней контрольной областью (ICR) промотора длиной примерно 50 п.н. и служит для связывания двух других базальных факторов – TFIIIB и TFIIIC (Schramm, Hernandez, 2002; Nolte e.a., 1998). TFIIIA также способен связываться с продуктом транскрипции – 5S рРНК, что служит механизмом регуляции по типу отрицательной обратной связи: при избытке 5S рРНК, которая не вовлекается в состав рибосом и остается связанной с TFIIIA, недостаток свободного TFIIIA препятствует транскрипции гена 5S рРНК (Pelham, Brown, 1980).

2.5.2. Базальный транскрипционный фактор TFIIIB

Базальный транскрипционный фактор TFIIIB называют центральным фактором транскрипционной машины РНК-полимеразы III, так как он рекрутирует фермент в состав преинициального комплекса и необходим для транскрипции с промоторов генов класса III

Таблица 2.

Субъединичный состав транскрипционных факторов РНК-полимеразы III дрожжей *S. cerevisiae* и человека (из работы Geiduschek and Kassavetis, 2001, с изменениями).

Транскрипционный фактор	Дрожжи <i>S. cerevisiae</i>		Гомологи и паралоги в составе транскрипционных факторов человека	Примечание
	Компонент	Альтернативные названия		
TFIIIA	Tfc2	Pzf1	TFIIIA	содержит домен «цинковых пальцев»
TFIIB	TBP	-	TBP	
	Brf	TFIIB70/Pcf4/Tds4/Brf1 ^a	Brf/TFIIB90; ^a BrfU/TFIIB50;	
TFIIC	Tfc5	B''/TFIIB90/Bdp1	Brf2 Bdp1	
	Tfc3	τ_{138}	-	связывается с В-последовательностью промотора; содержит HMG-мотив
	-	-	TFIIC220	связывается с В-последовательностью промотора; обладает НАТ-активностью
	Tfc4	τ_{131} /Pcf1	TFIIC102	
	Tfc1	τ_{95}	TFIIC63	связывается с А-последовательностью промотора
	Tfc6	τ_{91}	TFIIC110	обладает НАТ-активностью (у человека)
	Tfc8	τ_{60}	TFIIC90 ^b	обладает НАТ-активностью (у человека)
	Tfc7	τ_{55}		

^aАльтернативные названия разделены наклонной чертой, паралоги – точкой с запятой.

^bГомология между этими субъединицами TFIIC у дрожжей и человека обнаружена только для короткого С-концевого сегмента.

всех типов. Более того, показано, что для транскрипции *in vitro* с участием РНК-полимеразы III в дрожжевой системе достаточно наличия ТАТА-содержащей матрицы, РНК-полимеразы III и ТFIIB (Mitchell e.a., 1992). Большинство регуляторных путей, для которых известно, что они регулируют транскрипцию генов класса III, воздействуют именно на ТFIIB, вызывая таким образом активацию или репрессию транскрипции (см. далее).

У дрожжей *S. cerevisiae* в состав ТFIIB входят три субъединицы: ТАТА-бок-связывающий белок (ТВР) с молекулярной массой 38 кДа, Vdp1 (другие названия – В'' или ТFIIB90) с молекулярной массой 90 кДа и ТFIIB-подобный фактор Brf1 (ТFIIB70) с молекулярной массой 70 кДа (табл. 2, Bartholomew e.a., 1991).

У человека ТFIIB хроматографически разделяют на две фракции, названные ТFIIB α и ТFIIB β (Mital e.a., 1996; Teichmann, Seifart, 1995; Schramm e.a., 2000). Фактор ТFIIB β содержит гомологи всех трех субъединиц ТFIIB дрожжей – ТВР, Brf1 и Vdp1, и необходим для транскрипции с внутригенных промоторов. Фактор ТFIIB α содержит ТВР, Vdp1, субъединицу BrfU (другие названия – hТFIIB50 или Brf2) и, возможно, другие, пока не идентифицированные, субъединицы. Этот фактор необходим для транскрипции с внешних промоторов 3-го типа. По-видимому, появление новой субъединицы BrfU у млекопитающих связано с появлением у генов класса III промоторов 3-го типа, то есть полностью внешних промоторов, которые отсутствуют у дрожжей (Teichmann e.a., 2000). Еще одной особенностью фактора ТFIIB человека является наличие у субъединицы Vdp1 на С-конце 9,5 повторяющихся мотивов из 55 аминокислотных остатков, содержащего много остатков серина и треонина. Возможно, этот домен служит сайтом для регуляторного фосфорилирования, однако, этот вопрос еще не изучен (Schramm e.a., 2000).

Фактор ТFIIB связывается с ДНК либо напрямую через ТАТА-последовательность промотора с помощью ТВР (на внешних промоторах), либо опосредованно – через взаимодействие с фактором ТFIIC (на внутригенных промоторах) (Kassavetis e.a., 1989; Lassar e.a., 1983). На генах с промоторами смешанного типа, содержащими как ТАТА-последовательность выше точки начала транскрипции, так и внутригенные элементы, вероятно, реализуются оба типа взаимодействия ТFIIB с промотором. Взаимодействие ТFIIB с субъединицей С34 РНК-полимеразы III происходит через субъединицу Brf1 (Wang Z., Roeder, 1997), а с фактором ТFIIC – через ТВР и Brf1 (Yoshinaga e.a., 1987).

Фактор ТFIIB выполняет в составе транскрипционной машины РНК-полимеразы III целый ряд функций. Помимо взаимодействия с РНК-полимеразой III и привлечения ее в состав преинициального комплекса, ТFIIB участвует в плавлении ДНК при образовании открытого транскрипционного комплекса (Kassavetis e.a., 1998). Так,

показано, что на внешних промоторах при связывании TFIIIB происходит изгибание ДНК между ТАТА-последовательностью и точкой начала транскрипции (Grove e.a., 1999). Возможно, подобное изгибание ДНК, способствующее плавлению последовательности вблизи точки начала транскрипции, происходит и при связывании TFIIIB через взаимодействие с TFIIIC. Взаимодействие TFIIIB с последовательностью ДНК выше точки +1 также играет важную роль в обеспечении быстрой реинициации транскрипции. Полагают, что при прохождении РНК-полимеразы III по матрице связь транскрипционных факторов с внутригенными элементами промотора временно разрывается, и целостность преинициального комплекса, необходимого для реинициации, сохраняется за счет белок-белковых взаимодействий факторов друг с другом и взаимодействия TFIIIB с последовательностью ДНК выше точки начала транскрипции (Paule, White, 2000).

В последнее время появляются данные, свидетельствующие о том, что у многоклеточных существует несколько вариантов субъединиц фактора TFIIIB – TBP, Brf и Bdp, а значит, роль этого фактора в транскрипции различных генов класса III сложнее, чем у дрожжей. Так, показано, что у *Drosophila* в состав TFIIIB, в отличие от транскрипционного фактора TFIIID, входит не TBP, а его гомолог TRF1 (TBP-related factor 1, «TBP-подобный фактор 1»), и роль такой замены пока не ясна (Takada e.a., 2000). В геноме человека найдено два гена, которые потенциально могут кодировать TBP-подобные белки, то есть, возможно, у человека транскрипционный фактор TFIIIB может содержать различные варианты TBP (Tupler e.a., 2001). У человека также показано образование в результате альтернативного сплайсинга нескольких вариантов мРНК, кодирующей субъединицы Brf1 и Bdp1. Роль различных вариантов этих субъединиц в транскрипции не ясна. Возможно, на разных промоторах используются TFIIIB, содержащие разные варианты этих субъединиц (McCulloch e.a., 2000; Schramm, Hernandez, 2002).

2.5.3. Базальный транскрипционный фактор TFIIIC

Базальный транскрипционный фактор TFIIIC дрожжей содержит шесть субъединиц, его суммарная молекулярная масса – 520 кДа. Фактор имеет гантелеобразную форму и состоит из двух глобулярных доменов – τ_A и τ_B , каждый диаметром около 10 нм, соединенных гибким линкерным участком. Домен τ_A связывается с А-последовательностью, а τ_B – с В-последовательностью промотора 2-го типа. Благодаря линкеру между τ_A - и τ_B -доменами TFIIIC расстояние между А- и В-последовательностями промотора может значительно варьировать (Baker e.a., 1987; Schultz e.a., 1989). У дрожжей фактор TFIIIC участвует в узнавании промотора, непосредственно связываясь с ДНК

(промоторы 2-го типа и смешанного типа) или через связь с TFIIIA (промотор 1-го типа), а затем привлекает TFIIIB и РНК-полимеразу III в состав преиниционного комплекса (Schramm, Hernandez, 2002).

У человека в составе фракции С ядерного экстракта выделили три субфракции, названные С1, С2 и С0 (Oettel e.a., 1997). Каждая субфракция имеет сложный состав и может быть в свою очередь разделена на ряд субфракций, состав и свойства которых до конца не изучены. Из субфракций С1 и С2 были выделены базальные транскрипционные факторы TFIIIC1 и TFIIIC2, соответственно. Эти факторы существенно различаются по составу. Гомологом TFIIIC дрожжей является только фактор TFIIIC2 (табл. 2). TFIIIC1 имеет молекулярную массу около 200 кДа и глобулярную форму. Он содержит как минимум четыре субъединицы с молекулярными массами ~70, 50, 45 и 40 кДа, не имеющие гомологов у дрожжей. TFIIIC1 не обладает ДНК-связывающей активностью и, как полагают, служит для усиления связи факторов TFIIIC2, TFIIIA и SNAPc с промотором. Этот фактор необходим для транскрипции генов класса III с промоторами всех трех типов. (Yoshinaga e.a., 1987; Wang, Roeder, 1996; Oettel e.a., 1997).

Фактор TFIIIC2 участвует в транскрипции генов только с внутригенными промоторами (1-го и 2-го типа) (Lagna e.a., 1994). Этот фактор содержит пять субъединиц с молекулярными массами 220, 110, 102, 90 и 63 кДа, его суммарная молекулярная масса составляет около 600 кДа. Гомологов в составе TFIIIC дрожжей имеют только две субъединицы – с молекулярными массами 102 и 63 кДа (Yoshinaga e.a., 1989). Самая крупная субъединица служит для связывания с В-последовательностью, а субъединица с молекулярной массой 63 кДа – с А-последовательностью промотора. Субъединицы с молекулярными массами 102 и 63 кДа взаимодействуют с ТВР в составе TFIIIB, а субъединицы с молекулярными массами 90 и 63 кДа – с РНК-полимеразой III (Yoshinaga e.a., 1987). Три субъединицы TFIIIC2 млекопитающих, с молекулярными массами 220, 110 и 90 кДа, обладают гистон-ацетилтрансферазной (НАТ) активностью. Интересно отметить, что НАТ-активностью обладают те субъединицы TFIIIC2, которые не имеют гомологов в TFIIIC дрожжей (Yoshinaga e.a., 1987; Kundu e.a., 1999). То есть, у млекопитающих TFIIIC2 выполняет дополнительные функции, помимо привлечения TFIIIB и РНК-полимеразы III к промотору. Полагают, что он участвует в разрушении нуклеосомной структуры ДНК-матрицы, ацетилируя гистоны по специфическим сайтам (Kundu e.a., 1999). Помимо формы TFIIIC2, содержащей пять субъединиц и названной TFIIIC2a, из ядерного экстракта млекопитающих также была выделена форма TFIIIC2b, которая не содержит субъединицу с молекулярной массой 110 кДа. Эта форма фактора TFIIIC2 способна связываться с ДНК, но не поддерживает транскрипцию генов класса III *in vitro* (Sinn e.a., 1995). Показано, что

при стимуляции пролиферации клеток и аденовирусной инфекции повышение уровня транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III, сопровождается увеличением содержания субъединицы TFIIIC2 с молекулярной массой 110 кДа, то есть, именно эта субъединица необходима для перевода неактивной формы фактора TFIIIC2b в транскрипционно активную форму TFIIIC2a (Sinn e.a., 1995).

В субфракции C0 ядерного экстракта клеток человека был идентифицирован белок TBA (termination site binding activity, «активность, связывающаяся с терминаторным сайтом»), который связывается с терминаторной последовательностью генов класса III, содержащих внутригенные промоторы (Oettel e.a., 1997; Oettel e.a., 1998). TBA стимулирует транскрипцию, но не является необходимым для базальной транскрипции, то есть, строго говоря, не может быть отнесен к базальным транскрипционным факторам. В составе субфракции C0 также была обнаружена активность TFIIIU, участвующая в транскрипции генов U6 мРНК, которая также не является базальным фактором (Oettel e.a., 1998).

2.5.4. Базальный транскрипционный фактор SNAPc

У высших эукариот появление генов класса III с внешними промоторами 3-го типа сопровождалось появлением специального транскрипционного фактора, названного SNAPc (small nuclear RNA-activating protein complex, «белковый комплекс, активирующий гены малых ядерных РНК»). Это белковый комплекс, состоящий из четырех субъединиц, SNAP190, SNAP50, SNAP45 и SNAP43, необходимый для транскрипции генов малых ядерных РНК (мРНК) с участием как РНК-полимеразы III, так и РНК-полимеразы II (Yoon e.a., 1995). Самая крупная субъединица, SNAP190, связывается с последовательностью PSE в составе внешнего промотора через ДНК-связывающий Mub-домен (Wong e.a., 1998). Взаимодействие с ДНК также осуществляется через субъединицу SNAP50 (Henry e.a., 1996). Через субъединицу SNAP190 комплекс взаимодействует с белком-активатором транскрипции Oct-1, который связывается с последовательностью DSE внешнего промотора (Wong e.a., 1998).

2.6. Сборка преинициального комплекса (ПИК) РНК-полимеразы III

Состав транскрипционных факторов, участвующих в сборке преинициального комплекса (ПИК) РНК-полимеразы III зависит от строения промотора гена (Schramm, Hernandez, 2002). С промотором 1-го типа (ген 5S рРНК) первым связывается фактор TFIIIA, затем с ним взаимодействует фактор TFIIIC, который, в свою очередь, привлекает в ПИК фактор TFIIIV и РНК-полимеразу III. В этом случае фактор TFIIIC связывается с

промотором опосредованно, через белок-белковые взаимодействия с ТФIIIA (Schramm, Hernandez, 2002).

С промотором 2-го типа фактор ТФIIIC взаимодействует напрямую, связываясь с его А- и В-последовательностями внутри гена. Далее, как и в случае промотора 1-го типа, происходит присоединение ТФIIIV и РНК-полимеразы III (Schramm, Hernandez, 2002). У млекопитающих с промотором связывается фактор ТФIIIC2, а затем происходит присоединение ТФIIIC1, ТФIIIV и РНК-полимеразы III (Dean, Berk, 1988).

До сих пор не выяснено, как определяется точка начала транскрипции. Фактор ТФIIIC определяет положение ТФIIIV на промоторе, но взаимодействие между этими факторами довольно гибкое. Полагают, что после связывания ТФIIIV с ТФIIIC ТВР в составе ТФIIIV «сканирует» область -30 матрицы в поисках оптимального сайта для связывания ТФIIIV с ДНК. Инициация транскрипции происходит ниже этого сайта на ~ 30 п.н., но в то же время, определенную роль играет и предпочтение РНК-полимеразы III к последовательности ДНК вокруг точки начала транскрипции (Joazeiro e.a., 1996).

Промоторы 3-го типа, содержащие промоторные элементы только выше по течению от точки +1, имеются только у многоклеточных организмов (например, некоторые гены U6 мРНК человека). С PSE-элементом промотора связывается фактор SNAPc, с DSE-элементом – белки-активаторы Oct-1 или Staf, а с TATA-последовательностью – фактор ТФIIIV α (через ТВР) (Schramm, Hernandez, 2002). Связывание Oct-1, SNAPc и ТФIIIV α кооперативно: Oct-1 связывается с С-концевым доменом субъединицы SNAP190, открывая таким образом ДНК-связывающий Myb-домен последней. В свою очередь, взаимодействие N-конца ТВР с SNAPc-комплексом открывает С-концевой домен ТВР для связывания фактора ТФIIIV с TATA-последовательностью (Mittal, Hernandez, 1997; Mittal e.a., 1997; Schramm, Hernandez, 2002). Промоторы генов мРНК, транскрибируемые РНК-полимеразой II, содержат элементы PSE и DSE, но не содержат TATA-последовательности, что предотвращает связывание ТФIIIV α с этими промоторами. Таким образом, специфичность промотора гена класса III 3-го типа к РНК-полимеразе III определяется наличием всех трех элементов – DSE, PSE и TATA-последовательности (Schramm, Hernandez, 2002). У млекопитающих в транскрипции генов с промоторами 3-го типа участвуют также факторы ТФIIIC1 (Yoon e.a., 1995) и ТФIIIU (Oettel e.a., 1998).

В промоторах смешанного типа, характерных для генов U6 мРНК *S. cerevisiae*, с А- и В-последовательностями промотора взаимодействует фактор ТФIIIC, который затем привлекает ТФIIIV, а последний устанавливает дополнительное взаимодействие с TATA-последовательностью (Gerlach e.a., 1995). В сборке ПИК также участвуют

вспомогательные «архитектурные» факторы – HMG-подобные белки Nhr6A и Nhr6B (Kruppa e.a., 2001; Lopez e.a., 2001).

У дрожжей связь фактора TFIIIB с промоторами генов тРНК и 5S рРНК остается достаточно прочной даже после инициации транскрипции и диссоциации факторов TFIIIA и TFIIIC. Для реинициации транскрипции с того же промотора достаточно такого связанного TFIIIB, то есть, факторы TFIIIA и TFIIIC важны для сборки ПИК, но не для инициации транскрипции (Kassavetis e.a., 1990). У позвоночных, по-видимому, связь TFIIIB с промотором не столь прочна. Так, при ультрацентрифугировании в градиенте плотности хлористого цезия от ПИК, собранного на промоторе гена 5S рРНК *X. laevis*, диссоциирует TFIIIB, но не TFIIIA и TFIIIC. В случае гена тРНК, в тех же условиях и TFIIIB, и TFIIIC остаются связанными с промотором (Jahn e.a., 1987). Таким образом, у позвоночных прочность взаимодействия транскрипционных факторов с ДНК может зависеть от типа промотора данного гена. Это, возможно, обусловлено присутствием дополнительных транскрипционных факторов, упрочняющих связь базальных факторов с промотором, или специфичных форм базальных факторов, которых нет у дрожжей (например, TFIIIC1 и TFIIIB α , см. ранее).

2.7. Холофермент РНК-полимеразы III

Так же как и в случае с РНК-полимеразой II, вопрос о существовании в клетке холоферментов РНК-полимеразы III, не связанных с ДНК, до конца не решен. Сообщалось о выделении холо-РНК-полимеразы III из клеток человека HeLa с помощью иммунопреципитации. Это стало возможно благодаря использованию модифицированных генно-инженерными методами клеток HeLa, стабильно экспрессирующих субъединицу РНК-полимеразы III RPC53 со вставкой – FLAG-эпитопом (октапептидным фрагментом с последовательностью: DYKDDDDK), и применению антител против FLAG-фрагмента для преципитации полимеразы. В составе комплекса идентифицировали, помимо самой полимеразы, факторы TFIIIC2, TFIIIC1, субъединицы фактора TFIIIB – Brf1 и TBP, а также дополнительные белки – NF1, PC4, La-белок и ДНК-топоизомеразу I (Wang e.a., 1997; Wang e.a., 2000). В состав холофермента также входил ранее не описанный фактор – TDF (translation dependent factor, «фактор, зависящий от трансляции»), количество которого падало при ингибировании белкового синтеза *in vivo* циклогексимидом и на поздней стадии аденовирусной инфекции. Авторы полагают, что TDF участвует в сборке холофермента РНК-полимеразы III, и поэтому его недостаток приводит к снижению уровня транскрипции генов тРНК и вирусной VAI РНК, наблюдаемому при этих условиях (Wang e.a., 1997). Есть также данные о том, что транскрипционные факторы TFIIIB и

TFIIIS из ядерного экстракта клеток HeLa могут взаимодействовать с РНК-полимеразой III в отсутствие ДНК и образовывать функциональный комплекс, сохраняющий стабильность даже при 1 М KCl (Wingender *e.a.*, 1986). Очевидно, что если в клетке действительно присутствуют предсобранные в отсутствие ДНК холоферменты РНК-полимеразы III, то для генов с промоторами разных типов должны существовать комплексы, различающиеся по составу транскрипционных факторов, ассоциированных с РНК-полимеразой III.

2.8. Цикл транскрипции РНК-полимеразы III

Цикл транскрипции РНК-полимеразы III, как и РНК-полимераз I и II, состоит из четырех основных этапов: сборка преинициального комплекса, инициация, элонгация и терминация транскрипции. Часто сразу вслед за терминацией происходит реинициация транскрипции на том же гене. В литературе отсутствуют данные о факторах элонгации РНК-полимеразы III. Считается, что подобные факторы не нужны для транскрипции таких коротких генов, как гены класса III. Однако РНК-полимераза III, подобно всем другим РНК-полимеразам, может делать остановки на определенных «критических» последовательностях матрицы. В этом случае для возобновления транскрипции необходима РНКазная активность РНК-полимеразы III, которую стимулирует субъединица RPC11 самой полимеразы, обладающая гомологией с фактором элонгации TFIIIS, который выполняет ту же функцию в отношении РНК-полимеразы II (Chedin *e.a.*, 1998).

Для корректной терминации транскрипции РНК-полимераза III не требует присутствия каких-либо дополнительных белковых факторов, а терминаторная последовательность на матрице представляет собой идущие подряд четыре или более остатков тимина. Было показано, что для терминации необходимо присутствие в составе РНК-полимеразы III субъединицы C11 (Chedin *e.a.*, 1998). Очевидно, в процессе терминации должна стимулироваться РНКазная активность РНК-полимеразы III, производящая расщепление транскрипта. Этот факт хорошо согласуется с гипотезой о том, что выход полимеразы из остановки транскрипции на критических последовательностях матрицы и терминация транскрипции осуществляются с помощью одного и того же механизма, включающего расщепление транскрипта (Landick, 1997). Способность РНК-полимеразы продолжить удлинение транскрипта после отщепления его 3'-конца или терминировать транскрипцию зависит, вероятно, от последовательности ДНК-матрицы, на которой произошла остановка транскрипции, и/или присутствия специфических белковых факторов.

Показано, что ряд белковых факторов: NF1 (nuclear factor 1, «ядерный фактор 1»), La-белок и, возможно, топоизомераза I и PC4 (positive cofactor 4, «позитивный

кофактор 4») хоть и не являются абсолютно необходимыми для терминации транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III, но значительно повышают эффективность этого процесса, а также взаимосвязанной с терминацией реинициации транскрипции на том же гене (Gottlieb, Steitz, 1989; Fan e.a., 1997; Wang, Roeder, 1998; Goodier, Maraia, 1998; Wang e.a., 2000). Некоторые из этих факторов – NF1, PC4 и топоизомераза I, взаимодействуют с теми субъединицами фактора TFIIIC2 человека, которые находятся вблизи терминатора (Wang, Roeder, 1998; Wang e.a., 2000), но механизм их действия не выяснен.

La-белок взаимодействует с 3'-олигоU-хвостом транскриптов РНК-полимеразы III (Stefano, 1984), и, по-видимому, помогает высвобождению РНК-транскрипта из комплекса с РНК-полимеразой III и ДНК и, таким образом, способствует эффективной терминации и реинициации транскрипции (Gottlieb, Steitz, 1989; Fan e.a., 1997; Goodier, Maraia, 1998). Было даже сделано предположение, что La-белок может участвовать и в инициации транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III (Maraia, 1996). Активность La-белка ингибируется фосфорилированием по остатку Ser366 протеинкиназой СКII, при этом снижается уровень транскрипции генов класса III *in vitro* (Fan e.a., 1997). Таким образом, La-белок может участвовать в регуляции транскрипции генов класса III. Однако данные о роли La-белка в транскрипции РНК-полимеразой III противоречивы. Так, было показано, что удаление из системы La-белка не влияет на транскрипцию *in vitro* в бесклеточной системе *X. laevis*. Наблюдаемое же укорочение 3'-концов тРНК могло быть связано с тем, что La-белок защищает транскрипты от деградации нуклеазами, но не влияет на их синтез (Lin-Marg, Clarkson, 1998).

После терминации транскрипции РНК-полимераза III способна реиницировать этот процесс на том же самом гене, что значительно повышает эффективность транскрипции. Реинициации способствует изгибание матрицы связанными с ней базальными транскрипционными факторами TFIIIV и (в случае гена 5S рРНК) TFIIIA, в результате которого происходит сближение терминатора и точки начала транскрипции (Jahn e.a., 1987; Braun e.a., 1992). Как уже упоминалось, возможно участие ряда дополнительных белковых факторов, таких как La-белок, топоизомераза I, PC4 и NF1, в повышении эффективности реинициации.

2.9. Регуляция транскрипции

Транскрипция, осуществляемая всеми тремя формами эукариотической РНК-полимеразы, находится под жестким контролем целого ряда клеточных регуляторных систем и модулируется в зависимости от физиологического состояния (пролиферация,

покой или апоптоз) и скорости роста клетки, стадии клеточного цикла, в ответ на действие ростовых факторов и факторов, вызывающих трансформацию клетки. Регуляция транскрипции происходит с использованием самых разнообразных механизмов, которые можно разделить на две группы. В первую группу входят механизмы, обеспечивающие изменение структуры хроматина, приводящее либо к репрессии, либо к активации транскрипции на данном участке ДНК-матрицы. Изменение структуры хроматина осуществляется путем ремоделирования нуклеосом АТР-зависимыми белковыми комплексами, а также с помощью разрушения или, наоборот, стабилизации нуклеосомной структуры путем различных модификаций гистонов и метилирования ДНК. В основе механизмов второй группы лежит изменение свойств специфичных белков-регуляторов транскрипции, транскрипционных факторов и РНК-полимераз. Эта регуляция может осуществляться путем синтеза *de novo* или деградации белков, участвующих в транскрипции, а также с использованием обратимых посттрансляционных модификаций белков (РНК-полимераз, базальных транскрипционных факторов и белков-регуляторов транскрипции). И если синтез белков *de novo* требует достаточно длительного времени, то с помощью посттрансляционных модификаций клетка способна быстро регулировать транскрипцию.

2.9.1. Влияние структуры хроматина и метилирования ДНК на транскрипцию

В настоящее время высказывается предположение, что формирование активной или неактивной формы хроматина есть результат сложного взаимодействия сразу нескольких процессов – ацетилирования и деацетилирования гистонов, метилирования-деметилирования гистонов H3 и H4, метилирования и деметилирования ДНК и ремоделирования нуклеосом АТР-зависимыми комплексами (Park, Pfeifer, 2003). Давно известно, что ацетилирование гистонов вызывает их диссоциацию от ДНК и является одним из механизмов освобождения ДНК от нуклеосом при образовании транскрипционно активного хроматина. Некоторые базальные транскрипционные факторы (TFIIВ, TFIIID и TFIIIC) обладают гистон-ацетилтрансферазной (НАТ) активностью и способны модифицировать гистоны *in vivo* и *in vitro*. (Martinez, 2002). Однако было показано, что гистоны могут подвергаться нескольким разным модификациям – не только обратимому ацетилированию, но и метилированию, убиквитилированию, ADP-рибозилированию и фосфорилированию (Bannister, Miska, 2000). То, как изменятся свойства гистонов, зависит от сочетания определенных модификаций по определенным сайтам, что позволяет говорить о так называемом «гистоновом коде», под которым подразумевается зависимость

структуры хроматина от определенного сочетания модификаций гистонов (Schreiber, Bernstein, 2002; Fischle e.a., 2003). Так, метилирование гистонов H3 и H4 по определенным остаткам лизина обычно опосредует образование гетерохроматина и подавление транскрипции. Полагают, что метилирование гистонов является центральной эпигенетической модификацией, обуславливающей организацию хроматина у эукариот (Lachner, Jenuwein, 2002). Метилирование гистонов происходит и в составе транскрипционно активного эухроматина, но уже по другим сайтам. Так, у дрожжей метилтрансфераза Set2, метилирующая гистон H3 по остатку Lys36, взаимодействует с гиперфосфорилированным С-терминальным доменом самой крупной субъединицы элонгирующей РНК-полимеразы II. Предполагают, что эта модификация как-то связана с эпигенетическим «мечением» транскрипционно активного хроматина (Hampsey, Reinberg, 2003). Довольно редкая модификация гистонов – метилирование по остаткам аргинина, как полагают, может играть роль в активации транскрипции некоторых генов (Davie, Dent, 2002). Роль убиквитилирования гистонов изучена плохо, но показано, что убиквитилирование гистона H2B необходимо для последующего метилирования гистона H3. Сочетание этих двух модификаций приводит к репрессии транскрипции (Sun, Allis, 2002). Кроме того, убиквитилтрансферазной активностью обладает субъединица TAF_{II}250 базального транскрипционного фактора РНК-полимеразы II – TFIID, которая способна модифицировать гистон H1 и таким образом активировать транскрипцию некоторых генов (Conaway e.a., 2002). Фосфорилирование гистонов также может влиять на структуру хроматина. Так, показано, что фосфорилирование гистона H2B у млекопитающих и амфибий коррелирует с конденсацией хроматина при апоптозе (Cheung e.a., 2003).

Данные о роли метилирования ДНК в репрессии транскрипции довольно противоречивы. Известно, что ДНК промоторных областей многих генов, транскрипция которых в клетке репрессирована, метилирована по многим остаткам цитозина. Однако на целом ряде генов класса II было показано, что метилирование ДНК происходит уже после подавления транскрипции этих генов и, как полагают, лишь закрепляет неактивную форму хроматина, но не устанавливает ее (Park, Pfeifer, 2003).

Участие в регуляции транскрипции АТФ-зависимых комплексов, удаляющих коровые частицы нуклеосом с ДНК-матрицы, исследовано только для генов класса II. Показано, что такие белковые комплексы, как SWI/SNF, NURF и FACT помогают элонгирующей РНК-полимеразе II транскрибировать матрицу, но механизм их действия пока не выяснен. Есть данные, что по крайней мере FACT (facilitates chromatin transcription, «облегчает транскрипцию хроматина») может способствовать удалению гистонового кора

перед транскрибирующей РНК-полимеразой II и сборке нуклеосомы сразу позади полимеразы, действуя как шаперон (Svejstrup, 2003).

2.9.2. Регуляция транскрипции в зависимости от фазы клеточного цикла

Считается, что транскрипция каждого пятого гена в клетке подвержена регуляции в соответствии со стадией клеточного цикла (Breedem, 2003). Известно, что ключевыми белками-регуляторами клеточного цикла являются циклин-зависимые киназы (CDK, cyclin-dependent kinases) (Vermeulen e.a., 2003a) – семейство Ser/Thr-протеинкиназ, специфично активируемых в особых точках клеточного цикла при связывании с другими белками – циклинами. Уровень CDK остается постоянным в течение всего цикла, и периодичность смены стадий обеспечивается регулируемым синтезом и быстрой деградацией циклинов, специфичных для данной стадии клеточного цикла. Согласно современным представлениям, из девяти известных CDK лишь пять играют роль при регуляции клеточного цикла: на стадии G₁ – CDK4, CDK6 и CDK2, на стадии S – CDK2 и на стадиях G₂ и M – CDK1, на всех стадиях – CDK7, являющаяся CDK-активирующей киназой (CAK, CDK-activating kinase). Активность CDK регулируется не только ассоциацией с циклинами, но и специфичным фосфорилированием и дефосфорилированием киназ, а также действием ингибиторных белков (CKI, CDK inhibitors) (Vermeulen e.a., 2003a). При активации CDK они регулируют активность различных белков-мишеней, фосфорилируя их по специфичным сайтам. Среди белков-мишеней CDK много транскрипционных факторов, а также белков-регуляторов активности транскрипционных факторов, наиболее изученный из которых – белок ретинобластомы pRb. Белок pRb и два родственных белка – p107 и p130, относят к семейству «покетных» белков (от англ. pocket, «карман»), названному так из-за присутствия в структуре данных белков «кармана», посредством которого они связываются с регулируемыми белками-мишенями (Dyson N., 1998). В фазе M клеточного цикла pRb находится в нефосфорилированном состоянии и связан с транскрипционными факторами E2F и DP-1, препятствуя их участию в активации транскрипции. В ранней фазе G₁ белок pRb фосфорилируется киназами CDK4/6 в комплексе с циклином D, что приводит к диссоциации pRb от факторов E2F и DP-1. После диссоциации эти транскрипционные факторы участвуют в активации транскрипции генов, чьи продукты необходимы для прохождения фазы S, включая гены циклинов A, E и фосфатазы Cdc25 (Dyson N., 1998; Vermeulen e.a., 2003a). Белок p130 участвует в репрессии синтеза рРНК в ооцитах свиньи при переходе к мейозу, связывая и ингибируя активность базального транскрипционного фактора РНК-полимеразы I UBF (upstream binding factor, «фактор, связывающийся выше по течению») (Bjerregaard e.a., 2003) Известно также, что ряд CDK – CDK 1, 2, 7, 8 и 9, фосфорилируют С-терминальный домен самой крупной субъединицы

РНК-полимеразы II, активируя или ингибируя транскрипцию генов класса II в зависимости от стадии клеточного цикла (Oelgeschlager T., 2002).

2.9.3. Регуляция транскрипции при трансформации клеток

Трансформация клеток в большинстве случаев вызвана мутациями в генах двух типов: протоонкогенах (кодирующих белки-активаторы пролиферации клетки) и генах белков-супрессоров опухолей (кодирующих белки-репрессоры пролиферации клетки). Так, показано, что у человека в большинстве случаев трансформированные клетки имеют мутантные белки-супрессоры опухолей pRb и/или p53 (Vermeulen e.a., 2003a). Многие продукты прото-онкогенов (например, белки c-Myc, c-Mycb, c-Jun, c-Fos) и белок p53 являются транскрипционными факторами, а белок pRb регулирует активность транскрипционных факторов. Следовательно, нарушение нормальной функции этих белков будет приводить к дерегуляции транскрипции целого ряда генов и, в некоторых случаях, к неконтролируемой пролиферации клеток (Sherr, McCormick, 2002). Так, в ряде опухолевых клеток нарушена деятельность онкобелка c-Myc, который в норме активирует транскрипцию генов, кодирующих белки, необходимые для контроля клеточного цикла: Cdc25, циклины A, D, E, CDK1, 2, 4, фактор E2F, а также репрессирует транскрипцию генов, кодирующих проапоптотические белки Gadd45, Gadd153 (growth arrest and the DNA damage inducible gene, «ген, индуцируемый остановкой роста и повреждением ДНК») и белки-ингибиторы CDK – CKI (Grandori e.a., 2000).

2.9.4. Регуляция транскрипции в ответ на действие ростовых факторов

В настоящее время наиболее изучено участие различных протеинкиназ и протеинфосфатаз в регуляции транскрипции в ответ на действие ростовых факторов и в зависимости от скорости роста клетки (Schenk, Snaar-Jagalska, 1999; Brivanlou, Darnell, 2002). Эти ферменты специфично фосфорилируют или дефосфорилируют определенные белковые субстраты при получении сигнала из внешней среды. Полагают, что фосфорилирование белков по остаткам серина, треонина и тирозина, осуществляемое различными протеинкиназами, является наиболее распространенной регуляторной модификацией у эукариот (Johnson, O'Reilly, 1996; Hunter, 2000). Модификация является обратимой – дефосфорилирование белков, которое происходит с участием протеинфосфатаз, также является регуляторным процессом (Hunter, 2000). Известно, что процессы фосфорилирования и дефосфорилирования белков играют важную роль в регуляции таких ключевых физиологических процессов, как рост, дифференциация и развитие клетки. Сигналы от рецепторов клеточной мембраны передаются по различным сигнальным каскадам, и во многих случаях эта передача включает обратимое

фосфорилирование различных компонентов этих каскадов (Hunter, 2000). В геноме человека идентифицировано 518 генов, кодирующих протеинкиназы, которые фосфорилируют десятки тысяч внутриклеточных белков (Manning e.a., 2002). Одним из процессов, в регуляции которого участвуют различные протеинкиназы и протеинфосфатазы, является транскрипция. Во многих случаях было показано, что активность транскрипционных факторов регулируется с помощью фосфорилирования или дефосфорилирования в ответ на внеклеточные сигналы. При этом может изменяться локализация транскрипционных факторов в клетке, стабильность факторов, белок-белковые взаимодействия между разными факторами, ДНК-связывающие свойства белков, структура хроматина (Whitmarsh, Davis, 2000; Bollen, Beullens, 2002). Многие транскрипционные факторы, например, TIF-IA, HSF1, p53 и NFAT, могут фосфорилироваться разными протеинкиназами по разным сайтам, что приводит к разным функциональным последствиям (Holmberg e.a., 2002). Большинство протеинкиназ и протеинфосфатаз, участвующих в регуляции транскрипции, относятся к серин-треониновым ферментам. Однако показано, что у многоклеточных в ядре присутствуют также и тирозиновые киназы и фосфатазы, которые участвуют в регуляции белок-белковых взаимодействий между некоторыми транскрипционными факторами (NFκB, STAT-белки, TFII-I, c-Jun), РНК-полимеразой II и белками гяРНП-частиц (Cans e.a., 2000). Недавно в ядре были обнаружены комплексы некоторых мембранных рецепторов с их лигандами. Цитоплазматические домены этих рецепторов обладают Туг-киназной активностью. Для ряда таких комплексов выявлено, что они связываются со специфичными последовательностями ДНК и выступают в качестве транскрипционных факторов (например, активированные рецепторы эпидермального фактора роста – EGFR) (Carpenter, 2003).

Регуляторному фосфорилированию и дефосфорилированию подвергаются не только транскрипционные факторы, но и РНК-полимеразы. Известно, что у дрожжей в составе всех трех РНК-полимераз присутствуют фосфорилированные субъединицы (Bell e.a., 1977). В клетках млекопитающих исследовалось только фосфорилирование *in vivo* и *in vitro* РНК-полимераз I и II (Hirsch e.a., 1976; Kranias e.a., 1977; Dahmus, 1981). В настоящее время роль фосфорилирования в регуляции транскрипции наиболее полно изучена для РНК-полимераз I и II. Показано, что СКII соочищается с РНК-полимеразой I и фосфорилирует ее самую крупную субъединицу, а дефосфорилирование РНК-полимеразы I снижает уровень корректной инициации транскрипции *in vitro* (Hannan et al., 1998; Grummt, 1999). Другими авторами было продемонстрировано, что фосфорилирование РНК-полимеразы I по определенным сайтам необходимо для

правильной инициации транскрипции генов пре-рРНК (Fath e.a., 2001). Основная мишень протеинкиназ, фосфорилирующих РНК-полимеразу II – это С-терминальный домен (CTD) ее самой крупной субъединицы. Эта модификация важна для перехода от инициации к элонгации транскрипции, для предотвращения abortивной транскрипции и для созревания пре-мРНК транскриптов (Riedl, Egly, 2000). Фосфорилирование CTD осуществляют ряд протеинкиназ, действующих на различных этапах транскрипции *in vivo*: CDK7 – компонент базального транскрипционного фактора TFIIH, и CDK8 – компонент холофермента РНК-полимеразы II, участвуют в сборке преиниционного комплекса и инициации транскрипции, а CDK9 – компонент позитивного фактора элонгации P-TEFb (positive transcription elongation factor), участвует в элонгации транскрипции (Ramanathan, 2001; Oelgeschlager, 2002). Идентифицированы также две CTD-фосфатазы, специфично дефосфорилирующие CTD-домен РНК-полимеразы II (Yeo e.a., 2003). Долгое время считалось, что гликозилированию подвержены только внеклеточные белки и внеклеточные домены мембранных белков. Однако оказалось, что у всех исследованных эукариот многие цитоплазматические и ядерные белки модифицированы по остаткам серина и треонина добавлением одного остатка N-ацетилглюкозамина (Haltiwanger e.a., 1997). Эта модификация является обратимой и служит для регуляции активности различных белков, в том числе транскрипционных факторов (Sp1, AP1, p53 и других) и РНК-полимеразы II (Haltiwanger e.a., 1997; Comer, Hart, 2000). Было замечено, что гликозилирование, может происходить по тем же остаткам серина и треонина, что и фосфорилирование, – это так называемые сайты «инь-янь». Оказалось, что и гликозилирование может влиять на транскрипцию не только регулируя белок-белковые взаимодействия между различными ядерными белками, но также конкурируя за одни и те же сайты модификации с фосфорилированием (Vosseller e.a., 2001). Таким образом, с помощью гликозилирования осуществляется дополнительный контроль над регуляцией активности белков: в некоторых случаях для фосфорилирования белка может быть недостаточно присутствия соответствующей протеинкиназы, а необходимо, чтобы сайт модификации был дегликозилирован. Причем активация протеинкиназы и дегликозилирование могут индуцироваться разными сигнальными путями, обеспечивая скоординированный ответ клетки на разные сигналы (Vosseller e.a., 2001). Мало изучена роль других модификаций белков при передаче сигнала от мембранных рецепторов факторов роста в клетку. Однако известно, что целый ряд факторов транскрипции могут подвергаться множественным регуляторным модификациям, влияющим на их активность. Так, для белка-супрессора опухолей p53 показаны множественные модификации (фосфорилирование, ацетилирование и убиквитилирование) по целому ряду сайтов,

которые влияют как на стабильность белка, так и на его активность как регулятора транскрипции (Brooks, Gu, 2003).

Среди протеинкиназ, участвующих в передаче сигнала от мембранных рецепторов ростовых факторов в ядро, наиболее изучены киназа СКП и MAP-киназы ERK1/2. Протеинкиназа СКП (ранее применялось название казеинкиназа II) – это Ser/Thr-киназа, присутствующая в цитоплазме и ядре клеток у всех эукариот и регулирующая рост и пролиферацию клеток. СКП состоит из двух каталитических субъединиц α и/или α' и двух регуляторных субъединиц β и/или β' (Pinna, 1997). СКП является абсолютно необходимой для выживания клетки. В раковых клетках ее активность повышена, и наоборот, сверхпродукция каталитической субъединицы СКП в клетках p53^{+/-} и p53^{-/-} мутантных мышей ведет к образованию опухолей (Ahmed e.a., 2002). СКП участвует в передаче сигналов от рецепторов ростовых факторов – активирует Ras-путь (Ahmed e.a., 2002). Известно множество внутриклеточных субстратов СКП, среди них транскрипционные факторы c-Myc, c-Myb, рецептор андрогенов, p53, РНК-полимеразы I и II, ДНК-топоизомеразы I и II, нуклеолин и другие (Pinna, 1997). СКП является также антиапоптотическим фактором: при апоптозе киназа фосфорилирует белок Bid, транскрипционные факторы Max и p53, снижая их проапоптотические свойства (Ahmed e.a., 2002).

Киназы ERK1 и 2 (extracellular signal-regulated kinase, «киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами») относятся к семейству MAP-киназ (MAPK, mitogen-activated protein kinases, «митоген-активируемые протеинкиназы»). Они участвуют в передаче сигнала от мембранного рецептора и G-белка Ras, по MAP-сигнальному каскаду: рецептор → Ras → киназа киназы MAP-киназы (Raf) → киназа MAP-киназы (MEK) → MAP-киназа (ERK) → транскрипционные факторы (Hazzalin, Mahadevan, 2002). Транскрипционные факторы, регулируемые ERK, далее связываются со специфичными сайтами в промоторах генов и влияют на транскрипцию последних через белок-белковые взаимодействия с компонентами транскрипционной машины и/или модифицируя другие белки (например, фосфорилируя гистон H3) (Hazzalin, Mahadevan, 2002).

2.9.5. Регуляция транскрипции в соответствии со скоростью роста клетки

Согласно современным представлениям, прохождение клетки по клеточному циклу и рост клетки регулируются двумя разными системами: соответственно, системой циклинов и циклин-зависимых киназ и системой TOR-сигнального пути (Schmelzle, Hall, 2000). TOR (target of rapamycin)-сигнальный путь, ключевым компонентом которого

является TOR-киназа, регулирует скорость роста в зависимости от наличия в среде питательных веществ и/или факторов роста (Warner, 1999). TOR-киназа относится к семейству PI3-киназ (инозитолфосфат-3-киназ) Название киназы и всего сигнального пути отражает тот факт, что TOR-киназа и, соответственно, весь сигнальный путь, ингибируется антибиотиком рапамицином в комплексе с белком FKBP (FK560 binding protein) (Schmelzle, Hall, 2000). У млекопитающих TOR-киназа была обнаружена как в цитоплазме, так и в ядре клетки. Было показано, что в одних клетках (клетки человека HEK293 и HeLa) ее локализация преимущественно цитоплазматическая, а в других (фибробласты человека IMR90, миобласты мыши и клетки человека HCT8) – ядерная (Zhang e.a., 2002). Причина такой различной локализации TOR-киназы не выяснена.

На основании данных, полученных для дрожжей, Тсанг с соавторами предложили модель действия ингибиторов TOR-киназы на синтез рибосомальных РНК: подавление TOR-сигнального пути вызывает ассоциацию гистоновой деацетилазы Rpd3-Sin3 с хроматином в области расположения генов пре-рРНК и специфичное деацетилирование гистона H4, что приводит к конденсации этой области хроматина и, как следствие, к репрессии транскрипции генов пре-рРНК, уходу РНК-полимеразы I из ядрышка и уменьшению размеров ядрышка (Tsang e.a., 2003). Для дрожжей также показано, что недостаток питательных веществ в среде или обработка рапамицином, приводящие к ингибированию TOR-сигнального пути, ведут к быстрому дефосфорилированию транскрипционного фактора РНК-полимеразы II – Gln3, и к активации транскрипции генов, кодирующих специфичные «белки голодания» (Bertram e.a., 2002). У млекопитающих влияние TOR-сигнального пути на транскрипцию генов всех трех классов не изучено. Сообщалось лишь, что рапамицин ингибирует транскрипцию, осуществляемую РНК-полимеразой I в клетках млекопитающих (Mahajan, 1994). Хорошо изучено влияние TOR-сигнального пути на трансляцию у многоклеточных. Существует по крайней мере два механизма регуляции белкового синтеза. Первый – фосфорилирование S6-киназы p70^{S6k} – служит для активации трансляции специфических мРНК, содержащих в 5'-нетранслируемой области TOP (terminal oligopyrimidine)-сигнал. Этот механизм отсутствует у дрожжей, у которых нет мРНК, содержащих TOP-сигнал. Второй механизм – активация общей трансляции через активацию фактора трансляции eIF4E (Powers, Walter, 1999). Различия в механизмах регуляции с участием TOR-сигнального пути у дрожжей и многоклеточных могут объясняться тем, что в многоклеточном организме TOR-сигнальный путь реагирует на наличие в среде не только питательных веществ, но и ростовых факторов.

2.9.6. Регуляция транскрипции при апоптозе

В настоящее время имеются данные о регуляции транскрипции белок-кодирующих генов класса II, считываемых РНК-полимеразой II. Так, известно, что при апоптозе (программируемой клеточной гибели) происходит индукция синтеза целого ряда проапоптотических белков, многие из которых являются белками-регуляторами транскрипции. И, по-видимому, эти белки-регуляторы способствуют экспрессии генов белков, участвующих в развитии апоптоза. Показано, что в регуляции процессов, приводящих к программируемой клеточной гибели, участвуют некоторые белки, регулирующие также прохождение клетки по клеточному циклу и пролиферацию: онкобелок c-Myc, белки-супрессоры опухолей pRb и p53, CDK, циклины, СК1 и другие. Будут ли эти белки вызывать пролиферацию или апоптоз, зависит, как полагают, от действия различных факторов, таких как генетическое окружение, повреждение ДНК и уровень самих белков-регуляторов в клетке (Vermeulen e.a., 2003b). Так, показано, что сверхэкспрессия, также как и низкая экспрессия c-Myc могут привести к апоптозу. Активация Ras-сигнального пути может приводить к программируемой клеточной смерти в результате активации JNK (c-Jun N-terminal protein kinase, «протеинкиназа N-конца c-Jun»): JNK фосфорилирует и активирует транскрипционный фактор c-Jun, необходимый для индукции апоптоза (Vermeulen e.a., 2003b). Большинство исследователей отводят одну из центральных ролей в регуляции перехода клетки к апоптозу белку p53. В нормальных условиях этот белок присутствует в клетке в небольшом количестве, но при различных стрессовых воздействиях его содержание резко возрастает (Oren, 2003). При этом p53, действуя как транс-регулятор генов, активирует транскрипцию одних генов и репрессирует транскрипцию других. В том случае, если p53 активирует экспрессию генов проапоптотических белков и ингибирует экспрессию генов антиапоптотических белков, клетка переходит к апоптозу. Набор генов, которые активируются и репрессируются с участием p53 в клетке в данный момент, зависит как от ковалентных модификаций белка p53, так и от его белок-белковых взаимодействий с другими факторами (Oren, 2003).

Регуляция транскрипции генов классов I и III при апоптозе не изучена, хотя представляется вероятным, что работа РНК-полимераз I и III, синтезирующих РНК-компоненты трансляционного аппарата, должна регулироваться при переходе клетки к запрограммированной гибели.

2.10. Регуляция транскрипции генов класса III

Долгое время считалось, что поскольку гены класса III относятся к так называемым генам «домашнего хозяйства», то их транскрипция происходит конститутивно и не подвержена регуляции. Однако в последние годы были получены данные, убедительно свидетельствующие в пользу того, что транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой III, находится в клетке под строгим контролем множества регуляторных путей. Показано, что транскрипция генов класса III регулируется в соответствии с фазой клеточного цикла, скоростью роста клетки, а также в ответ на действие ростовых факторов, при вирусной инфекции и при трансформации клеток (Brown e.a., 2000; Felton-Edkins e.a., 2003a).

Отдельный важнейший аспект регуляции транскрипции в клетке касается координации работы РНК-полимеразы III с работой РНК-полимераз I и II. Так, показано, что синтез основных компонентов трансляционной машины – 28S, 18S и 5.8S рРНК (продуктов генов класса I), 5S рРНК и тРНК (продуктов генов класса III) и рибосомных белков (продуктов генов класса II) взаимосвязан, и количество всех этих компонентов соответствует количеству рибосом, образующихся в клетке в данный момент (Warner, 1999). Можно предположить, что подобная координация должна существовать и для синтеза U6 мРНК (продукта гена класса III) и других мРНК (продуктов генов класса II), участвующих в сплайсинге мРНК, однако, эта проблема в данный момент не изучена.

2.10.1. Влияние структуры хроматина и метилирования ДНК на транскрипцию генов класса III

Показано, что, в отличие от РНК-полимеразы II, РНК-полимераза III после инициации может эффективно транскрибировать матрицу, имеющую нуклеосомную структуру, в отсутствие дополнительных факторов, ремоделирующих хроматин. Так, транскрипция генов тРНК и U6 мРНК осуществляется с практически одинаковой эффективностью как на матрице с нуклеосомной структурой, так и на «голой» ДНК-матрице (Studitsky e.a., 1997). Вероятно, это объясняется тем, что базальный транскрипционный фактор TFIIIC2 обладает НАТ-активностью и может способствовать эффективному удалению нуклеосом из области промотора (Burnol e.a., 1993). Как было показано на клетках зародышей *X. Laevis*, репрессия транскрипции генов класса III происходит только при компактизации хроматина на уровнях, выше нуклеосомного. Увеличение количества гистона H1A на стадии ранней гаструлы приводит к образованию компактного хроматина в области хромосом, где расположены гены 5S рРНК ооцитного типа и, соответственно, к репрессии транскрипции этих генов (Kandolf. 1994). Сообщалось

о том, что гены Alu-РНК очень чувствительны к нуклеосомной структуре. Так, 99% всех Alu-повторов в клетках HeLa репрессированы, и эта репрессия не снимается даже при удалении гистона H1 (Russanova e.a., 1995). Известно, что гены Alu-РНК имеют промоторы 2-го типа, как и гены тРНК, и в их транскрипции участвует фактор TFIIIC2 (Schramm, Hernandez, 2002). Однако в данном случае наличия у TFIIIC2 НАТ-активности недостаточно для преодоления репрессии транскрипции. Было высказано предположение, что репрессированное состояние большинства Alu-повторов объясняется не особенностями строения промотора, а тем, что ДНК в области промотора Alu-генов метилирована по многим остаткам цитозина (Englander e.a., 1993; Liu, Schmid, 1993). Показано, что метилирование ДНК подавляет транскрипцию и ряда других генов класса III – генов тРНК и вирусной VAI РНК и, но не генов 5S рРНК (Juttermann e.a., 1991; Besser e.a., 1990). Однако как уже упоминалось, в настоящее время считается, что метилирование ДНК лишь закрепляет репрессированную форму хроматина, поэтому и в случае Alu-последовательностей нельзя с уверенностью утверждать, что метилирование ДНК является непосредственной и единственной причиной репрессии этих генов.

Для одного из генов U6 мяРНК человека было показано позитивное влияние нуклеосомной структуры на транскрипцию. В этом случае нуклеосома позиционирована между PSE- и DSE-элементами внешнего промотора гена таким образом, что сближает связанные с этими элементами факторы SNAPc и Oct-1, что облегчает сборку преинициального комплекса и приводит к активации транскрипции (Zhao e.a., 2001).

2.10.2. Регуляция транскрипции генов класса III в зависимости от фазы клеточного цикла

Изучение транскрипции *in vitro* с использованием ядерных экстрактов, полученных из пролиферирующих клеток HeLa, показало, что уровень транскрипции матриц с генами VAI РНК, тРНК^{Leu}, U6 мяРНК и 5S рРНК зависит от того, на какой стадии клеточного цикла находились клетки, использованные для получения экстракта (White e.a., 1995). Уровень транскрипции на специфичных матрицах был минимальным при использовании экстракта из клеток, находящихся в М-фазе, средним – при использовании экстракта из клеток, находящихся в G₁-фазе и максимальным – при использовании экстракта из клеток, находящихся в S- и G₂-фазах клеточного цикла. При этом уровень транскрипции на неспецифичной матрице poly(dA-dT) не зависел от фазы клеточного цикла клеток, из которых получали ядерный экстракт. Показано, что репрессия транскрипции в М-фазе клеточного цикла связана с гиперфосфорилированием ТВР в составе фактора TFIIIV. В ранней G₁-фазе происходит дефосфорилирование ТВР, что ведет к повышению уровня

транскрипции генов класса III (White e.a., 1995). Какие протеинкиназы участвуют в фосфорилировании ТВР в М-фазе в клетках человека, не выяснено. В ооцитах *X. laevis* эту роль выполняет циклин-зависимая киназа $p34^{cdc2}$ в комплексе с циклином В (Westmark e.a., 1998). Ассоциированная с рибосомами киназа $p34^{cdc2}$ ингибирует транскрипцию генов 5S рРНК и тРНК. По-видимому, смысл колокализации киназы $p34^{cdc2}$ с рибосомами состоит в том, что таким образом обеспечивается инактивация транскрипции именно при переходе клетки в стадию митоза (М-фазу), когда разрушается ядерная оболочка и ядерные белки, в том числе и транскрипционные факторы, становятся доступными для цитоплазматических факторов (Westmark e.a., 1998).

Позже было показано, что для активации транскрипции генов класса III в G_1 - фазе клеточного цикла недостаточно только дефосфорилирования ТВР в составе ТФШВ. В G_0 - (фаза покоя) и G_1 -фазах с ТФШВ связан супрессор опухолей pRb (белок ретинобластомы), который препятствует взаимодействию ТФШВ с промотором (Larminie e.a., 1997; Scott e.a., 2001). В средней и поздней G_1 -фазе белок pRb фосфорилируется циклин-зависимыми киназами CDK4, CDK6 и CDK2, которые активируются на этой стадии циклинами D и E, и это приводит к высвобождению ТФШВ из комплекса с pRb (Scott e.a., 2001). В поздней G_1 - и в S-фазе клеточного цикла активность ТФШВ достигает максимального уровня, и если в ранней и средней G_1 -фазе ТФШВ является лимитирующим фактором для сборки преинициального комплекса, то в S- и G_2 -фазах лимитирующим фактором становится ТФШС (White e.a., 1995). Показано также, что другие покетные белки – p107 и p130 действуют на фактор ТФШВ так же как и белок pRb (Scott e.a., 2001).

Таким образом, при прохождении клетки по клеточному циклу активность ТФШВ как транскрипционного фактора контролируется как минимум двумя механизмами. При входе клетки в М-фазу происходит ингибирование ТФШВ фосфорилированием, которое снимается в начале G_1 -фазы с помощью дефосфорилирования. Но в то же время происходит дефосфорилирование покетных белков (pRb, p107 и p130), в результате которого эти белки приобретают способность связываться со своими мишенями, одной из которых является ТФШВ. То есть, для активации транскрипции генов класса III в G_1 -фазе недостаточно просто окончания митоза и дефосфорилирования ТФШВ, необходимо также поступление сигнала о том, что клетка будет входить в следующий цикл, а не в состояние покоя (G_0 -фазу). Таким сигналом является активация циклином D1 протеинкиназ CDK4 и CDK6, которые фосфорилируют pRb и таким образом высвобождают ТФШВ. Существование дополнительного механизма репрессии ТФШВ в М-фазе, в соответствии с последними данными, может быть объяснено тем, что, синтез циклина D1 активируется в клетке в ответ на действие митогенов во время G_2 -фазы клеточного цикла, а не G_1 -фазы,

как считали ранее (Stacey, 2003). Можно предположить, что pRb скорее всего фосфорилируется в G₂-фазе и не может репрессировать TFIIIB во время M-фазы, что и обуславливает необходимость в дополнительном механизме репрессии TFIIIB во время митоза путем фосфорилирования TBP.

Переход клетки от пролиферации к состоянию покоя (G₀-фаза), например, в результате окончательной дифференцировки клетки, также сопровождается изменением уровня транскрипции с участием РНК-полимеразы III. Показано, что дифференцировка клеток париетальной эндодермы мыши из клеток F9 эмбриональной карциномы сопровождается резким падением уровня транскрипции генов класса III. При этом в дифференцированных клетках было резко снижено содержание факторов TFIIIC1 и TFIIIB β , но практически не изменялось содержание TFIIIC2 (Meissner e.a., 2002).

2.10.3. Регуляция транскрипции генов класса III при трансформации клеток

Было показано, что в клетках опухолей яичников повышено содержание фактора TFIIIC2, а также тРНК, 5S рРНК и 7S L РНК (по сравнению с нормальными клетками) (Winter e.a., 2000). Кроме того, как было продемонстрировано методом задержки электрофоретической подвижности в геле, TFIIIC2 из опухолевых клеток обладает более высоким сродством к ДНК, несущей в своем составе ген вирусной VAI РНК с промотором генов класса III. Авторы предполагают, что существует регуляция ДНК-связывающей активности этого фактора с помощью посттрансляционных модификаций, например, фосфорилирования (Winter e.a., 2000). В пользу этого предположения свидетельствует то, что в клетках HeLa все пять субъединиц в составе TFIIIC2 фосфорилированы, хотя влияние этой модификации на сродство фактора с ДНК не изучено (Hoeffler e.a., 1988; Shen e.a., 1996). Другие авторы продемонстрировали, что в фибробластах мыши при трансформации вирусом SV40 повышается уровень TFIIIC2 и снимается репрессия TFIIIB белком pRb (Larminie e.a., 1999). В фибробластах, трансформированных полиомавирусом Р μ , наблюдается сверхэкспрессия субъединицы Vdp1 фактора TFIIIB и всех субъединиц фактора TFIIIC2 (Felton-Edkins, White, 2002). Исходя из имеющихся данных, Вайт предполагает, что повышение уровня транскрипции генов класса III является центральным механизмом, контролирующим опухолевую трансформацию (Larminie e.a., 1999).

Таким образом, в трансформированных клетках, как правило, нарушена регуляция активности базальных транскрипционных факторов TFIIIB и/или TFIIIC. Полагают, что в клетках разных типов транскрипция генов класса III может активироваться и репрессироваться через разные регуляторные пути (Brown e.a., 2000). Исследования, проведенные на трансформированных клетках, позволили выявить целый ряд механизмов,

которые нарушены в опухолевых клетках, но в нормальной клетке могут участвовать в репрессии транскрипции генов класса III. Среди этих механизмов – регуляторные пути, в которых участвуют белок-супрессор опухолей p53, онкобелок c-Myc, белки-репрессоры транскрипции Dr1 и Maf1p.

2.10.3.1. Супрессор опухолей p53

Активация транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III, во многих трансформированных клетках вызвана нарушением функции супрессора опухолей p53 (Cairns, White, 1998). Показано, что в норме p53 подавляет транскрипцию генов Alu, U6 мяРНК, тРНК, 5S рРНК, VAI РНК, B2 РНК и EBER РНК (Chesnokov e.a., 1996). Все эти гены не содержат участков связывания для p53, и супрессор действует, специфично связываясь с ТВР в составе ТФШВ, что препятствует взаимодействию этого базального транскрипционного фактора с промотором (Crighton e.a., 2003). Интересно, что белок p53 по-разному влияет на разные промоторы: чем слабее промотор, тем он чувствительнее к репрессии белком p53. Наиболее чувствительны промоторы генов Alu и U6 мяРНК (Cairns, White, 1998). Белок p53 также может вызывать арест клеточного цикла и апоптоз в ответ на стрессовые воздействия. Однако за арест клеточного цикла и репрессию транскрипции генов класса III отвечают разные участки молекулы p53 (Crighton e.a., 2003).

2.10.3.2. Онкобелок c-Myc

Участие онкобелка c-Myc в регуляции транскрипции генов класса III в трансформированных клетках было показано с помощью нового метода – интерференции РНК. Этот метод заключается в том, что в клетку вводится малая интерферирующая РНК (siРНК), которая комплементарно взаимодействует со специфичной мРНК и вызывает деградацию последней клеточными нуклеазами, образующими комплекс с siРНК. При деградации мРНК онкобелка c-Myc методом интерференции РНК в клетках HeLa резко снижалось содержание тРНК и 5S рРНК (Gomez-Roman e.a., 2003). Регуляторные области генов класса III не содержат E-последовательностей для связывания c-Myc, поэтому действие этого онкобелка должно осуществляться только через белок-белковые взаимодействия с компонентами транскрипционной машины РНК-полимеразы III. И действительно, показано, что в трансформированных клетках млекопитающих c-Myc присутствует в транскрипционных комплексах РНК-полимеразы III и взаимодействует с фактором ТФШВ, активируя его (Gomez-Roman e.a., 2003). Интересно, что c-Myc стимулирует рост клетки и биосинтез белка независимо от процесса деления клетки (Schuhmacher e.a., 1999). Таким образом, взаимодействие c-Myc с ТФШВ может являться

одним из механизмов, с помощью которого транскрипция генов класса III согласуется со скоростью роста клетки (см. далее).

2.10.3.3. Репрессор транскрипции Dr1

Dr1 – ядерный фосфобелок с молекулярной массой 19 кДа, способный связываться с ТВР. Первоначально был выделен из клеток HeLa как репрессор РНК-полимеразы II (Inostroza e.a., 1992). Позже было показано, что Dr1 репрессирует также и РНК-полимеразу III, препятствуя ассоциации ТВР с ТFIIB (White e.a., 1994). Активность Dr1 подавляется вирусным белком E1A при аденовирусной инфекции, что вызывает повышение уровня транскрипции генов класса III в инфицированных клетках (Kraus e.a., 1994).

2.10.3.4. Репрессор транскрипции Maf1p

Maf1p – ядерный белок, впервые описанный у *S. cerevisiae* (Boguta e.a., 1997). С использованием поиска в геномных базах данных возможные гомологи были обнаружены и у других организмов: *Plasmodium falciparum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, дрозофилы и человека (Pluta e.a., 2001). У дрожжей показано, что Maf1p физически взаимодействует с РНК-полимеразой III, скорее всего, с самой крупной ее субъединицей C160, и негативно регулирует транскрипцию генов класса III (Pluta e.a., 2001). Позже было выявлено, что Maf1p является у дрожжей общим компонентом сразу нескольких регуляторных путей, которые репрессируют транскрипцию генов класса III в ответ на подавление секреции, недостаток питательных веществ и повреждение ДНК (Upadhyya e.a., 2002). Полагают, что при недостатке питательных веществ Maf1p активируется благодаря ингибированию TOR-сигнального пути (см. далее), а при повреждении ДНК – с участием киназы СКII (Upadhyya e.a., 2002). Авторы этой статьи также показали, что Maf1p препятствует взаимодействию de novo ТFIIB с ДНК-матрицей (Upadhyya e.a., 2002). Таким образом, не до конца ясно, имеет ли функциональное значение взаимодействие Maf1p с РНК-полимеразой III, выявленное ранее (Pluta e.a., 2001).

2.10.4. Регуляция транскрипции генов класса III в зависимости от действия ростовых факторов и скорости роста клетки

Трансформированные клетки в присутствии ростовых факторов начинают активно расти и пролиферировать, что сопровождается активацией транскрипции генов класса III. Например, при стимуляции роста клеток HeLa добавлением в среду сыворотки, как и при аденовирусной инфекции, повышается количество транскрипционно активной формы

фактора TFIIIC2 – TFIIIC α , что приводит к активации транскрипции с участием РНК-полимеразы III (Sinn e.a., 1995).

При действии ростовых факторов транскрипция генов класса III активируется различными путями как опосредованно (снятием репрессии, например, инактивацией супрессора опухолей pRb), так и прямым действием на транскрипционную машину РНК-полимеразы III (например, модификация транскрипционных факторов протеинкиназами СКII и ERK1/2). Для регуляции уровня транскрипции в соответствии со скоростью роста клетки существуют дополнительные механизмы. Благодаря этому в активно пролиферирующих клетках уровень транскрипции генов класса III выше, чем в медленно пролиферирующих. Это необходимо для удовлетворения потребностей клетки в большом количестве новых рибосом и тРНК для быстрого роста и деления (Kief, Warner, 1981). Считается, что основным путем, который осуществляет такую координацию уровня транскрипции со скоростью роста клетки, является TOR-сигнальный путь.

2.10.4.1. Протеинкиназа СКII

Показано участие СКII в регуляции транскрипции генов класса III путем воздействия на TFIIIB. В дрожжах СКII необходима для активированной, но не базальной транскрипции генов тРНК и 5S рРНК *in vivo* и *in vitro* (Hockman, Schultz, 1996). СКII физически взаимодействует с TFIIIB (через регуляторные β -субъединицы киназы, которые определяют специфичность СКII к субстрату) и фосфорилирует TBP. После фосфорилирования TBP резко повышается способность TFIIIB ассоциировать в состав преинициального комплекса, собираемого на промоторе гена (Ghavidel e.a., 1999; Ghavidel, Schultz, 2001). И наоборот, при повреждении ДНК ультрафиолетовым облучением или метанметилсульфонатом (MMS) СКII диссоциирует от комплекса с TFIIIB, и нефосфорилированный TFIIIB менее эффективно включается в сборку ПИК, что ведет к снижению уровня транскрипции генов тРНК и 5S рРНК (Ghavidel, Schultz, 2001). В клетках человека HeLa СКII также стимулирует транскрипцию генов класса III, связываясь с TFIIIB и фосфорилируя одну из его субъединиц. Но в этом случае было показано фосфорилирование не TBP, а Brf1 (Johnston e.a., 2002). Однако *in vitro* СКII может фосфорилировать все три субъединицы TFIIIB (Johnston e.a., 2002). Ранее говорилось о том, что в M-фазе клеточного цикла TBP в составе TFIIIB фосфорилирован, и поэтому TFIIIB находится в неактивной форме (White e.a., 1995; Brown e.a., 2000). Очевидно, СКII фосфорилирует какие-то другие сайты TBP, что приводит не к репрессии, а к активации TFIIIB. Поскольку СКII способна фосфорилировать p53, то это может служить еще одним механизмом активации транскрипции генов класса III: фосфорилированный p53

диссоциирует от фактора TFIIIB, позволяя ему войти в состав ПИК (см. ранее, (Ahmed e.a., 2002). Важно также отметить, что СКII также регулирует транскрипцию с участием РНК-полимераз I и II, то есть можно предполагать ее участие в обеспечении скоординированной работы всех трех эукариотических РНК-полимераз (Johnston e.a., 2002). Так, СКII фосфорилирует общую для всех трех полимераз субъединицу RPAВC2 (RPB6), что может служить механизмом подобной регуляции (Kayukawa e.a., 1999).

Невыясненной остается роль СКII в регуляции активности базального транскрипционного фактора TFIIIA. СКII соочищается с 7S РНП-частицами из цитоплазмы ооцитов *X. laevis*. 7S РНП-частицы состоят из 5S рРНК и TFIIIA и являются запасной формой 5S рРНК (Westmark e.a., 2002). СКII может фосфорилировать TFIIIA, но роль этой модификации не ясна. Не ясно также, происходит ли фосфорилирование TFIIIA киназой СКII в ядре (Westmark e.a., 2002).

Сообщалось также, что СКII может ингибировать транскрипцию генов класса III *in vitro*, фосфорилируя La-белок (Fan e.a., 1997). Однако роль La-белка в работе РНК-полимеразы III *in vivo* не выяснена (см. ранее), поэтому невозможно сделать вывод о том, какое значение может иметь модификация этого белка в клетке.

2.10.4.2. Митоген-активируемые протеинкиназы ERK1/2

Недавно было показано, что в усилении транскрипции с участием РНК-полимеразы III в фибробластах при добавлении в среду сыворотки участвуют митоген-активируемые протеинкиназы (MAP) ERK1 и ERK2 (Felton-Edkins e.a., 2003b). ERK связывается с субъединицей Brf1 фактора TFIIIB и фосфорилирует ее, что усиливает взаимодействие TFIIIB с РНК-полимеразой III и фактором TFIIIC2 (Felton-Edkins e.a., 2003b).

2.10.4.3. TOR-сигнальный путь

У дрожжей TOR-сигнальный путь активирует транскрипцию генов рибосомных белков, рРНК и тРНК, а также влияет на процессинг 35S пре-рРНК и общую трансляцию (Powers, Walter, 1999; Schultz, 1999). Активация транскрипции генов 5S рРНК и тРНК происходит независимо от регуляции трансляции. Полагают, что эта активация может осуществляться через инактивацию репрессорного белка Maf1p (см. ранее; Upadhyya e.a., 2002) и через влияние на РНК-полимеразу III и/или фактор TFIIIB (Schultz, 1999). Показано, что в экстракте, полученном из клеток дрожжей, обработанных рапамицином, существенно подавлена транскрипция *in vitro*, осуществляемая РНК-полимеразами I и III на специфичных матрицах (Zaragoza e.a., 1998). Добавление к такому экстракту фактора

TFIIIB, очищенного из клеток, не обработанных рапамицином, лишь частично восстанавливало транскрипцию *in vitro* генов класса III. Авторы полагают, что помимо TFIIIB воздействию TOR-сигнального пути подвергается и РНК-полимераза III. Это подтверждается и тем фактом, что активность этой полимеразы, выделенной из обработанных рапамицином клеток, на специфичной ДНК-матрице ниже, чем у полимеразы из необработанных клеток (Schultz, 1999). Использование метода генных ДНК-чипов позволило показать, что в дрожжах при голодании снижается количество мРНК ряда субъединиц РНК-полимеразы III – С34, С82, С53, С19 и С40 (DeRisi e.a., 1997; Schultz, 1999). Исходя из этого, Шульц предполагает, что еще один возможный механизм регуляции транскрипции генов класса III TOR-сигнальным путем – это регуляция транскрипции генов субъединиц РНК-полимеразы III и трансляции соответствующих мРНК (Schultz, 1999). У дрожжей было показано участие в регуляции транскрипции генов класса III еще одного компонента TOR-сигнального пути – протеинфосфатазы РР2А. Мутации в гене структурной субъединицы А этой фосфатазы вызывают у дрожжей нарушения транскрипции генов тРНК *in vivo* и *in vitro*. Транскрипция *in vitro* генов тРНК восстанавливается при добавлении в систему либо очищенной РНК-полимеразы III, либо очищенного TFIIIB (van Zyl e.a., 1992). Однако известно, что РР2А – это целое семейство внутриклеточных Ser/Thr-протеинфосфатаз, имеющих общие каталитическую (С) и структурную (А) субъединицы, но разные регуляторные (В) субъединицы. Эти фосфатазы участвуют в широком спектре клеточных процессов, регулируя метаболизм, транскрипцию, сплайсинг РНК, трансляцию, репликацию ДНК, прохождение клетки по клеточному циклу, дифференцировку и онкогенез. Основные субстраты РР2А – различные протеинкиназы (СКИ, GSK-3, WEE1, различные циклин-зависимые киназы, СКII, JAK2, p70^{S6k}) и транскрипционные факторы (CREB, c-Jun, p107, Sp1, STAT3, NOX11) (Zolnierowicz, 2000). Таким образом, влияние РР2А на транскрипцию генов класса III может быть обусловлено не только TOR-сигнальным путем, но и другими регуляторными путями. Например, недавно было показано, что РР2А необходима для активации Ras-сигнального пути (одного из MAP-киназных каскадов), который приводит в итоге к активации киназ ERK (Ory e.a., 2003). А, как уже упоминалось, ERK непосредственно связываются с фактором TFIIIB и фосфорилируют его, активируя при этом транскрипцию генов класса III (Felton-Edkins e.a., 2003b).

Считается, что, благодаря влиянию TOR-сигнального пути на содержание компонентов трансляционной машины скорость роста клетки находится в соответствии с содержанием в среде питательных веществ и (у многоклеточных) ростовых факторов. Поскольку РНК-полимераза III синтезирует важнейшие компоненты трансляционной

машины, то представляется важным исследование путей передачи сигнала от TOR-киназы к транскрипционной машине РНК-полимеразы III.

2.10.5. Регуляция скоординированного синтеза рРНК и тРНК

Как уже отмечалось, разные компоненты трансляционной машины синтезируются у эукариот разными РНК-полимеразами, поэтому должен существовать механизм координации работы этих полимераз (Kief, Warner, 1981). И действительно, было показано, что у дрожжей у температуро-чувствительных мутантов по самой крупной субъединице РНК-полимеразы III при непермиссивной температуре снижен уровень не только всех транскриптов генов класса III, но и всех РНК-продуктов РНК-полимеразы I. И наоборот, у мутантов по субъединице РНК-полимеразы I снижен уровень тРНК (Briand e.a., 2001). Скоординированное снижение уровня тРНК и рРНК происходит очень быстро, еще до ареста клеточного цикла, то есть, имеет место не просто влияние замедления пролиферации клетки на обе полимеразы, а влияние одной полимеразы на другую. Авторы предположили, что это влияние осуществляется через регуляцию процессинга пре-рРНК и пре-тРНК (Briand e.a., 2001). Например, известно, что РНК-продукты РНК-полимеразы III участвуют в процессинге пре-рРНК, например, RPR1 – РНК-компонент РНКазы Р, необходимой для созревания 5.8S рРНК у дрожжей и млекопитающих (Briand e.a., 2001).

К скоординированному ингибированию синтеза 45S пре-рРНК и 5S рРНК приводит также недостаток питательных веществ в среде, в которой растут клетки (Clarke e.a., 1996). Кроме того, было продемонстрировано, что для нормального созревания 25S и 5.8S рРНК у дрожжей необходима ассоциация 5S рРНК с пре-60S субъединицей рибосомы. Таким образом может обеспечиваться синтез стехиометрического количества всех рРНК в субчастице 60S (Dechampesme e.a., 1999). В другой работе было показано, что ингибитор трансляции циклогексимид ингибирует также транскрипцию с участием РНК-полимераз I и III, но не РНК-полимеразы II, *in vivo* (в клетках мышей P1798) и *in vitro* (в клеточном экстракте) (Gokal e.a., 1986). Авторы статьи полагают, что наблюдаемое действие циклогексимида может быть связано с тем, что для транскрипции РНК-полимераз I и III нужны какие-то транскрипционные факторы с коротким временем жизни. Для РНК-полимеразы I таким фактором может являться TFIIC (современное название: TIF-IA), синтез которого регулируется глюкокортикоидами. Для РНК-полимеразы III такой фактор найден не был (Gokal e.a., 1986; Clarke e.a., 1996). Однако в случае 5S рРНК влияние циклогексимида может быть объяснено тем, что подавляется синтез рибосомных белков, а значит, 5S рРНК остается связанной с TFIIA, что препятствует сборке преиниционных комплексов на промоторах генов 5S рРНК и, соответственно, синтезу новых молекул этой РНК (Gokal e.a., 1986).

У дрожжей уровень транскрипции генов рРНК, рибосомных белков и тРНК быстро и скоординированно снижается в ответ на повреждение секреторного пути в клетке (Li e.a., 2000). С помощью делеции гена киназы ПК С показано, что в снижении уровня транскрипции генов класса III участвует протеинкиназа С (ПК С), но ее действие осуществляется по невыясненному пока пути, в обход MAP-киназного каскада (Li e.a., 2000). В случае регуляции работы РНК-полимеразы III ПК С может прямо или опосредованно активировать репрессорный белок Maf1p, который подавляет транскрипцию генов 5S рРНК и тРНК (Upadhyya e.a., 2002). Интересно, что негативное влияние ПК С на транскрипцию *in vitro* гена класса III (гена VAI РНК) было показано еще в 1992 году (James, Carter, 1992). Однако точный механизм действия ПК С до сих пор не ясен.

2.10.6. Регуляция транскрипции генов класса III при апоптозе

Как уже отмечалось, в настоящее время регуляция транскрипции генов класса III при программируемой клеточной гибели не изучена. В литературе отсутствуют и данные о содержании 5S рРНК, тРНК и других РНК-продуктов РНК-полимеразы III в клетках при апоптозе. Ранее было показано, что при индукции апоптоза в различных клетках на поздних стадиях апоптоза происходит дегградация 28S рРНК, вызванная пока не идентифицированной экзогенной РНКазной активностью (Houge et al., 1995). Была прослежена судьба всех четырех рРНК (28S, 18S, 5,8S и 5S) при апоптозе в Т-клетках лейкемии человека Jurkat и клетках монобластной лейкемии человека U937 (Nadano, Sato, 2000). С помощью метода электрофореза РНК в агарозно-полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием авторами было показано специфичное расщепление 28S рРНК по определенному сайту, детектированное по появлению дополнительной полосы в геле. Подобной специфичной дегградации других рРНК авторы не наблюдали (Nadano, Sato, 2000). Однако данный метод исследования недостаточно чувствителен для детекции различия в содержании РНК, меньшего, чем 10-кратное, и не может быть применен для сравнения содержания РНК в клетках, находящихся в различных физиологических состояниях.

2.10.7. Регуляция активности базальных транскрипционных факторов TFIIIA и TFIIIC и РНК-полимеразы III

В последние годы получено довольно много данных по регуляции транскрипции генов класса III. Однако практически все исследователи рассматривают TFIIIB как центральный фактор, свойства которого могут меняться в клетке под воздействием различных сигнальных путей (White, 1998). Традиционно мало внимания уделяется

изменению свойств двух других базальных транскрипционных факторов – TFIIIA и TFIIIC, а также регуляции активности РНК-полимеразы III. В то же время, есть данные, указывающие на то, что и эти компоненты транскрипционной машины могут подвергаться регуляции. Так, из клеток плазмоцитомы мыши MOPC15 были выделены две субформы РНК-полимеразы III, различающиеся по молекулярной массе одной из малых субъединиц. Авторы предположили, что данные различия являются результатом какой-то модификации фермента, но сама модификация охарактеризована не была (Sklar, Roeder, 1976). При разделении РНК-полимеразы III человека двумерным электрофорезом целый ряд субъединиц (с примерными молекулярными массами 155, 135, 82, 62, 53, 39, 38 и 36) выявляются на электрофореграмме в виде нескольких пятен, что свидетельствует о возможных модификациях этих субъединиц (Wang, Reoder, 1997). Кроме того, разными авторами было показано, что модификации (фосфорилированию) подвергаются и TFIIIA, и все субъединицы TFIIIC, и некоторые субъединицы РНК-полимеразы III дрожжей (Bell e.a., 1977; Hoeffler e.a., 1988; Shen e.a., 1996; Westmark e.a., 2002). При этом фосфорилированию подвергаются в том числе и те субъединицы РНК-полимеразы III, которые являются общими для РНК-полимераз I и III и для всех трех РНК-полимераз (Bell e.a., 1977), что может служить для координации работы разных полимераз. Однако в настоящее время роль этих модификаций, а во многих случаях и протеинкиназы, их осуществляющие, не известны.

В пользу того, что активности TFIIIA и TFIIIC должны быть подвержены регуляции говорит и то, что именно эти факторы *in vivo* первыми связываются с промоторами генов (Schramm, Hernandez, 2002), а у млекопитающих TFIIIC, обладая НАТ-активностью, способен удалять нуклеосомы с промоторной области матрицы, «подготавливая» нужные гены к транскрипции (Burnol e.a., 1993). Как известно, в клетке именно первые этапы многостадийного процесса, каковым является транскрипция, наиболее жестко регулируются. Кроме того, полученные недавно на дрожжах данные по иммунопреципитации хроматина противоречат широко распространенной гипотезе о том, что активация и репрессия транскрипции генов класса III обеспечивается в основном ассоциацией и диссоциацией от преинициального комплекса фактора TFIIIB, а фактор TFIIIC все время остается связанным с промотором. Было показано, что при репрессии транскрипции генов *tRNK* и *RPR1* (РНК-компонента РНКазы Р) в клетках дрожжей, культивируемых в условиях недостатка питательных веществ, фактор TFIIIB остается связанным с промотором, но резко увеличивается количество фактора TFIIIC, ассоциированного с этими генами (Roberts e.a., 2003). Исходя из этих данных, авторы предположили, что после инициации первого раунда транскрипции на гене фактор TFIIIC,

активность которого не нужна для реинициации, диссоциирует от комплекса TFIIIB–РНК-полимераза III, а при репрессии транскрипции этого гена от комплекса диссоциирует полимеразы, и фактор TFIIIC может вновь связаться с промотором. В этом случае для начала следующего раунда транскрипции необходима лишь ассоциация РНК-полимеразы III со связанными на промоторе факторами TFIIIB и TFIIIC (Roberts *et al.*, 2003). Предложенная Робертсом с соавторами модель требует еще тщательной проверки, но, несомненно, принятая ранее гипотеза о центральной роли TFIIIB в регуляции транскрипции генов класса III является слишком упрощенной. Очевидно, следует уделить более пристальное внимание исследованию регуляции не только TFIIIB, но и других компонентов транскрипционной машины, чтобы получить полное представление о механизмах, лежащих в основе контроля транскрипции генов класса III в клетке.

Таким образом, можно видеть, что РНК-полимераза III является самой сложно устроенной, но и самой плохо изученной из всех трех форм эукариотической ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Сложность строения самого фермента, многообразие промоторов генов класса III и белков, участвующих в транскрипции этих генов, разнообразие регуляторных модификаций этих белков, а также полученные в последние годы данные о регуляции транскрипции генов класса III в клетке указывают на то, что нужно более глубокое изучение механизмов, модулирующих активность РНК-полимеразы III. Именно это являлось целью данной работы. В частности, было важно исследовать существование в клетке нескольких комплексов фермента, которые могут представлять собой как холоферменты различного состава для транскрипции генов с разными промоторами, так и различающиеся по уровню транскрипционной активности изоферменты РНК-полимеразы III. Кроме того, необходимо было изучить возможность регуляции транскрипционной активности РНК-полимеразы III путем ее фосфорилирования, так как известно, что эта модификация играет ключевую роль в передаче сигналов внутри клетки и в регуляции энзиматических активностей большого числа ферментов, включая РНК-полимеразы I и II. Большой интерес представляло также исследование корреляции содержания различных продуктов генов класса III с изменением физиологического состояния клетки, особенно при переходе к апоптозу. Полученные данные помогут в будущем проверить гипотезу о том, что изменение активности РНК-полимеразы III является важным механизмом, регулирующим скорость роста и пролиферации клетки, а также ее переход к апоптозу или опухолевой трансформации.

3. Материалы и методы

3.1. Растворы и ионообменные смолы

Все растворы, используемые для выделения РНК и проведения обратной транскрипции и PCR, готовили на воде, обработанной диэтиленпирокарбонатом (DEPC), остальные растворы готовили на деионизированной воде Super Q.

Буфер MS: 0,05 М трис-НСl, рН 7,9; 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂. Буферы MS-5, MS-15, MS-30 и MS-50 содержали соответственно 5, 15, 30 и 50% глицерин.

Буфер ТЭД: 50 мМ трис-НСl, рН 7,9, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ, 0,5 мМ PMSF, 10% глицерин.

Буфер А: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 0,5 мМ ДТТ.

Буфер С: 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 25% (v/v) глицерин, 0,42 М NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ PMSF, 0,5 мМ ДТТ.

Буфер I: 20 мМ трис-НСl, рН 7,97, 10% (v/v) глицерин (если не указано иначе), 0,5 мМ ЭДТА, 0,2 мМ ДТТ.

Буфер II: 20 мМ трис-НСl, рН 7,97, 20% (v/v) глицерин, 0,5 мМ ЭДТА, 0,2 мМ ДТТ.

Насыщенный при 25°C раствор сульфата аммония титровали концентрированным раствором аммиака до рН 7,0.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) для удаления примесей протеаз прогревали при 37°C в течение 10 мин.

Ионообменную хроматографию проводили на ДЕАЕ-сефадексе А-25 (Pharmacia, Швеция) и фосфоцеллюлозе P11 (Whatman, Англия). Аффинную хроматографию проводили на гепарине Heparin Hyper D M (BIOSEPR, S.A., France).

Подготовка колонки ДЕАЕ-сефадекса А-25: смолу оставляли для набухания в деионизированной воде Super Q в течение 24 часов при комнатной температуре. Набухший ДЕАЕ-сефадекс А-25 промывали 0,5 н NaOH до полного вытеснения ионов хлора, а затем отмывали водой до постоянного рН. Смолу наносили на колонку и доводили до рН 7,9 с помощью 50 мМ триса, рН 11,0. Далее колонку обрабатывали двумя объемами 1 М сульфата аммония, отмывали 50 мМ трис-НСl, рН 7,97, до полного исчезновения сульфат-ионов и уравнивали буфером MS-30, содержащим 0,08 М сульфат аммония.

Подготовка колонки фосфоцеллюлозы P11: фосфоцеллюлозу оставляли для набухания в деионизированной воде Super Q в течение суток при комнатной температуре. Набухшую смолу дважды промывали водой методом декантации для освобождения от мелких частиц. Далее смолу обрабатывали равным объемом 0,5 н КОН в течение 30 мин,

отмывали водой до pH 9,0 и затем обрабатывали равным объемом 0,5 М HCl в течение 30 мин. Смолу отмывали до pH 5,0 и повторяли обработку 0,5 М HCl. Фосфоцеллюлозу P11 отмывали водой до pH 4,0 и наносили на колонку. Колонку доводили до pH 7,9 с помощью 50 мМ триса, pH 11,0. Далее колонку обрабатывали двумя объемами 1 М сульфата аммония и отмывали 50 мМ трис-HCl, pH 7,97, до полного исчезновения сульфат-ионов.

Подготовка колонки Heparin Hyper D M: перед первым использованием смолу помещали в колонку, промывали 10 объемами 3 М NaCl, и отмывали 15 объемами буфера I. Затем колонку уравнивали 0,3 М сульфатом аммония, приготовленном на буфере I.

3.2. Работа с культурой клеток эпидермоидной карциномы человека A431

Культуру клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (Giard *et al.*, 1973) получали из Банка клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург*. Среду DMEM (среда Игла в модификации Дульбекко), сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота (FCS), раствор Хэнкса, раствор трипсина и раствор Версена приобретали в фирме Биолот (Санкт-Петербург). Для культивирования клеток использовали пластиковую посуду фирмы Sarsted (Германия). Эпидермальный фактор роста (ЭФР) из слюнных желез мыши был любезно предоставлен к.б.н. Е.Б. Буровой и к.б.н. К.П. Василенко (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Для выделения РНК-полимеразы III клетки A431 выращивали в среде DMEM в присутствии 10% эмбриональной сыворотки (FCS) и антибиотика гентамицина в концентрации 40 мкг/мл при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до субконфлюэнтного состояния. Для определения содержания тРНК и 5S рРНК в клетках, находящихся в различных физиологических состояниях, клетки культивировали в среде DMEM в отсутствие сыворотки в течение 48 ч. При этом скорость прохождения клеток A431 по клеточному циклу значительно замедляется, и, соответственно, удлиняется их время генерации (Barnes, 1982). Далее клетки собирали до (контроль) или после обработки ЭФР в концентрации 0,1 или 100 нг/мл. Обработку ЭФР проводили в среде DMEM в присутствии 40 мкг/мл гентамицина при 37°С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. Клетки собирали, обрабатывая раствором трипсин–Версен (3:7), затем к суспензии клеток добавляли равный

* Автор сердечно благодарит к.б.н. Е.Г. Семенову (Институт цитологии РАН) за консультации по работе с культурой эукариотических клеток.

объем среды DMEM для нейтрализации действия трипсина. Количество клеток определяли с использованием камеры Горяева. Осадок клеток собирали центрифугированием при 1000 g, 4 °C в течение 10 мин, промывали раствором Хэнкса и вновь собирали центрифугированием при тех же условиях. К осадку клеток (примерно 3 млн клеток в каждой пробирке) добавляли 10 мкл раствора Хэнкса и 100 мкл RNAlater™ (Ambion, США) для ингибирования РНКаз. Клетки выдерживали при 4 °C в течение ночи и хранили при -20 °C.

3.3. Получение ядер из плаценты человека

Ядра получали центрифугированием в гипертоническом растворе сахарозы. Ткань плаценты гомогенизировали в 5 объемах 2,2 М сахарозы, содержащей 15 мМ MgCl₂, 0,25 мМ спермин, 0,2 мМ ЭГТА, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ спермидин и 0,1 мМ PMSF. Гомогенат центрифугировали при 12000×g в течение 1 ч. Осадок, содержащий ядра, собирали и суспендировали в буфере MS-5. Далее ядра использовали для получения ядерного экстракта S-100 и выделения РНК-полимеразы III (Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002а).

3.4. Получение ядер и цитоплазмы из клеток эпидермоидной карциномы человека A431

Клетки A431, собранные с использованием раствора трипсин–Версен (3:7), центрифугировали при 1000×g, 4°C в течение 10 мин, затем осадок промывали раствором Хэнкса и собирали клетки при тех же условиях. Надосадочную жидкость сливали и для лизиса клеток добавляли к осадку 2 объема (относительно объема осадка) буфера А и гомогенизировали во льду в течение 30 мин. За лизисом клеток следили под микроскопом. Далее ядра собирали центрифугированием при 25000×g, 4°C в течение 30 мин. Надосадочная жидкость содержала цитоплазму клеток (Dignam e.a., 1983). Полученный осадок ядер хранили при -70°C в течение ночи и далее использовали для выделения РНК-полимеразы III. Цитоплазму клеток хранили при -70°C и использовали для фосфорилирования РНК-полимеразы III клеток A431 *in vitro* и для контроля при проведении иммуноблоттинга.

3.5. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина

Схема выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием ДЕАЕ-сефадекса А-25 и фосфоцеллюлозы Р11 представлена на рис. 1. Метод разработан к.б.н. В.М. Седовой (Институт цитологии РАН) и опубликован в печати (Седова и др., 1997; Sedova e.a., 1998; Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002а).

3.5.1. Выделение тотальной РНК-полимеразной активности

Ядра в буфере MS-5 разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора при частоте 22 кГц. Затем прибавляли 4 М сульфат аммония, рН 7,0, до концентрации 0,5 М, при этом вязкость раствора сильно возрастала из-за освобождения ДНК. Обработку ультразвуком повторяли до полного исчезновения вязкости (3-4 обработки по 10 с) и

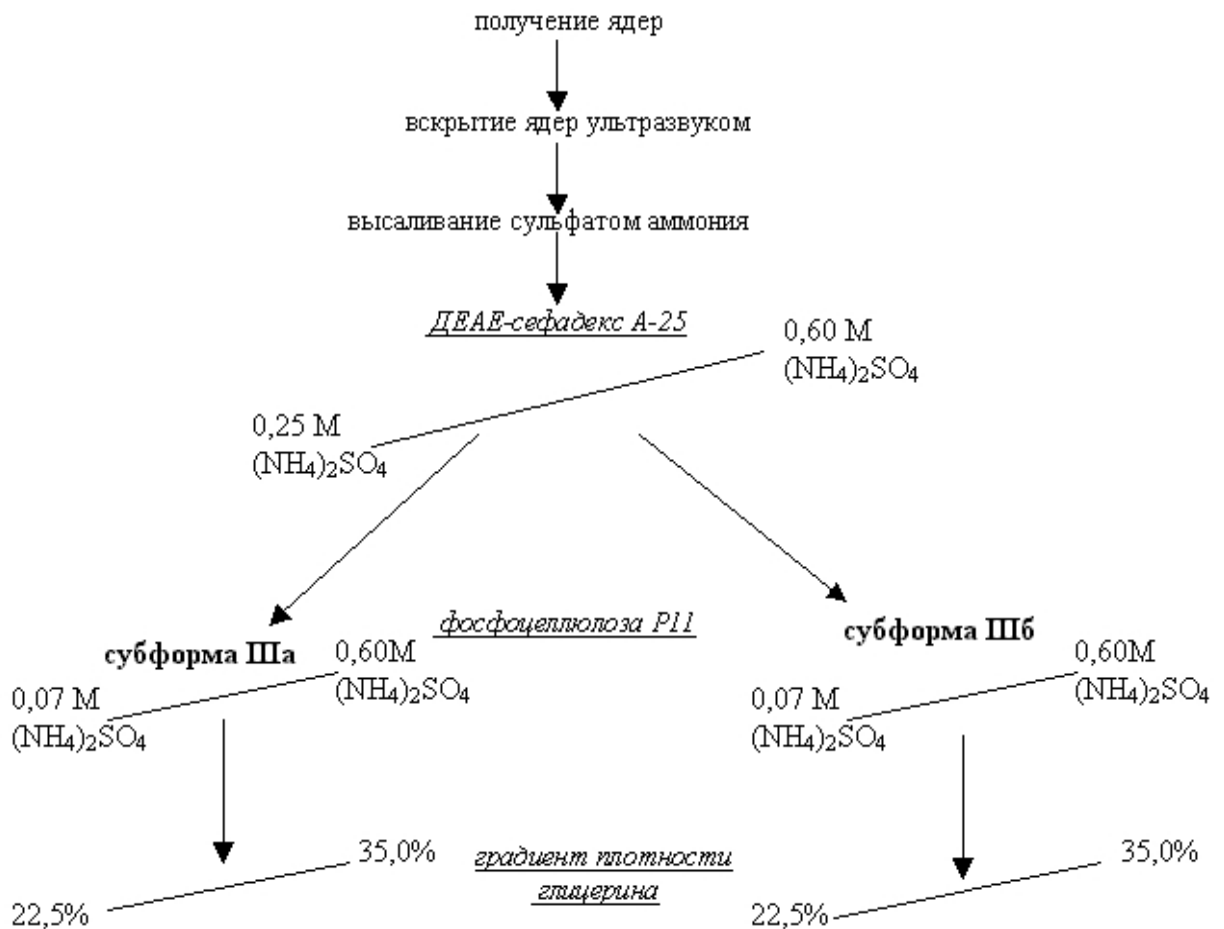


Рис. 1. Схема выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина.

следили за тем, чтобы в процессе разрушения ядер температура суспензии не превышала 6°C. Суспензию фильтровали через 4 слоя марли и добавляли кристаллический сульфат аммония из расчета 15 г на 100 мл (конечное насыщение – 40% при 0°C). В этих условиях осаждаются все три формы РНК-полимеразы. Через 45 мин. после полного растворения сульфата аммония суспензию центрифугировали при 105000×g в течение 1 ч. Осадок суспендировали в буфере MS-30 при постоянном перемешивании в течение ночи. Затем центрифугировали при 105000×g в течение 1 ч. Надосадочную жидкость, в которой содержатся все три формы РНК-полимеразы, собирали.

3.5.2. Фракционирование субформ РНК-полимеразы III на колонке ДЕАЕ-сефадекса А-25

Для разделения индивидуальных форм РНК-полимеразной активности надосадочную жидкость разбавляли буфером MS-30 до концентрации сульфата аммония не выше 0,08 М (концентрацию сульфата аммония определяли на рефрактометре) и наносили на колонку ДЕАЕ сефадекса А 25, уравновешенную буфером MS-30, содержащим 0,08 М сульфат аммония. При такой ионной силе с ДЕАЕ-сефадексом А-25 связываются РНК-полимеразы II и III, но не связывается РНК-полимераза I. Затем колонку промывали 3 объемами буфера MS-30 с 0,25 М сульфатом аммония (в этих условиях основная часть РНК-полимеразы II элюируется с колонки) и фракционировали в линейном градиенте концентрации сульфата аммония 0,25-0,60 М, приготовленном на буфере MS-30. Собирали не менее 25 фракций (объем каждой фракции составлял около 3 мл). В каждой фракции определяли активность РНК-полимеразы III (см. п. 3.5.5). Фракции, обладающие максимальной активностью, собирали. Далее очистку фермента производили на фосфоцеллюлозе P11.

3.5.3. Фракционирование на колонке фосфоцеллюлозы P11

Собранные после ДЕАЕ-сефадекса А-25 фракции разбавляли буфером MS-30 до конечной концентрации 0,06 М сульфата аммония и наносили весь объем на колонку фосфоцеллюлозы P11, уравновешенную буфером MS-30 с 0,07 М сульфатом аммония. Колонку промывали 3 объемами буфера MS-30 с 0,07 М сульфатом аммония. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации сульфата аммония 0,07-0,6 М на буфере MS-30. Собирали 20 фракций. В каждой фракции определяли активность РНК-полимеразы III. Фракции, проявляющие РНК-полимеразную активность, 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 (насыщение 75% при 0°C). Осадок формировался в течение ночи. Осадок собирали центрифугированием в течение 1 ч при 105000×g и растворяли в минимальном объеме

буфера MS-15. Чтобы освободиться от избытка сульфата аммония, раствор фермента диализовали против буфера MS-15 в течение 2 ч.

3.5.4. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина

Раствор фермента наносили на градиент плотности глицерина 22,5-35,0% в буфере MS, содержащем 0,11 М сульфат аммония. Разделение в градиенте осуществляли центрифугированием при 90000×g в течение 18 ч. Из градиента отбирали 20 проб по 0,5 мл (начиная с более тяжелых фракций), в каждой из которых определяли активность РНК-полимеразы III. Фракции, соответствующие пику активности, собирали и диализовали против буфера MS-50 с 0,1 М сульфатом аммония в течение ночи. Добавляли сывороточный альбумин до конечной концентрации 300 мкг/мл. Фермент хранили в виде аликвот в жидком азоте. Удельная активность препарата РНК-полимеразы III колебалась в пределах 1 Е на 30-35 мкл фермента. Из-за малого количества РНК-полимеразы III в полученных препаратах определять концентрацию белка в препарате фермента традиционными количественными методами не представлялось целесообразным. Степень очистки фермента: в ~2000 раз для РНК-полимеразы IIIб и в ~500 раз для РНК-полимеразы IIIа.

3.5.5. Определение РНК-полимеразной активности

Определение РНК-полимеразной активности на каждом этапе проводили в системе, содержащей: 40 мМ трис-НСl, рН 7,9; 80 мМ сульфат аммония, 2,5 мМ ДТТ, 1 мМ MgCl₂, 15% глицерин, 5 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/ммоль и 25 мкл фракции, содержащей РНК-полимеразу III. Конечный объем пробы - 125 мкл. Параллельно определяли активность РНК-полимеразы III в присутствии α-аманитина в конечной концентрации 1 мкг/мл. Пробы инкубировали 15 мин при 37°C. Осаждение кислотонерастворимого материала производили 5% ТХУ в присутствии сывороточного альбумина в качестве носителя, осадки собирали на фильтры GF/C («Whatman») и промывали 5% ТХУ и 96° этиловым спиртом. Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике фирмы «Beckman», США. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, необходимое для включения 1 нМ UTP за 15 мин при 37°C.

3.5.6. Диск-электрофорез РНК-полимеразы III плаценты человека в присутствии SDS

Полипептидный состав полученной РНК-полимеразы III плаценты человека анализировали диск-электрофорезом в 9% ПААГ с SDS по методу Лэммли (Laemmly, 1970). Далее гель окрашивали серебром по методу Рэя и Ву (Wray, Wu, 1981).

3.6. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека и ядер клеток эпидермоидной карциномы человека A431 с использованием хроматографии на гепарине и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина

Схема выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека и ядер клеток A431 с использованием гепарина и ДЕАЕ-сефадекса А-25 представлена на рис. 2 (Никитина и др., 2002б). Метод является модификацией метода, предложенного Хьюетом с соавторами для выделения РНК-полимеразы III из клеток дрожжей (Huet e.a., 1996).

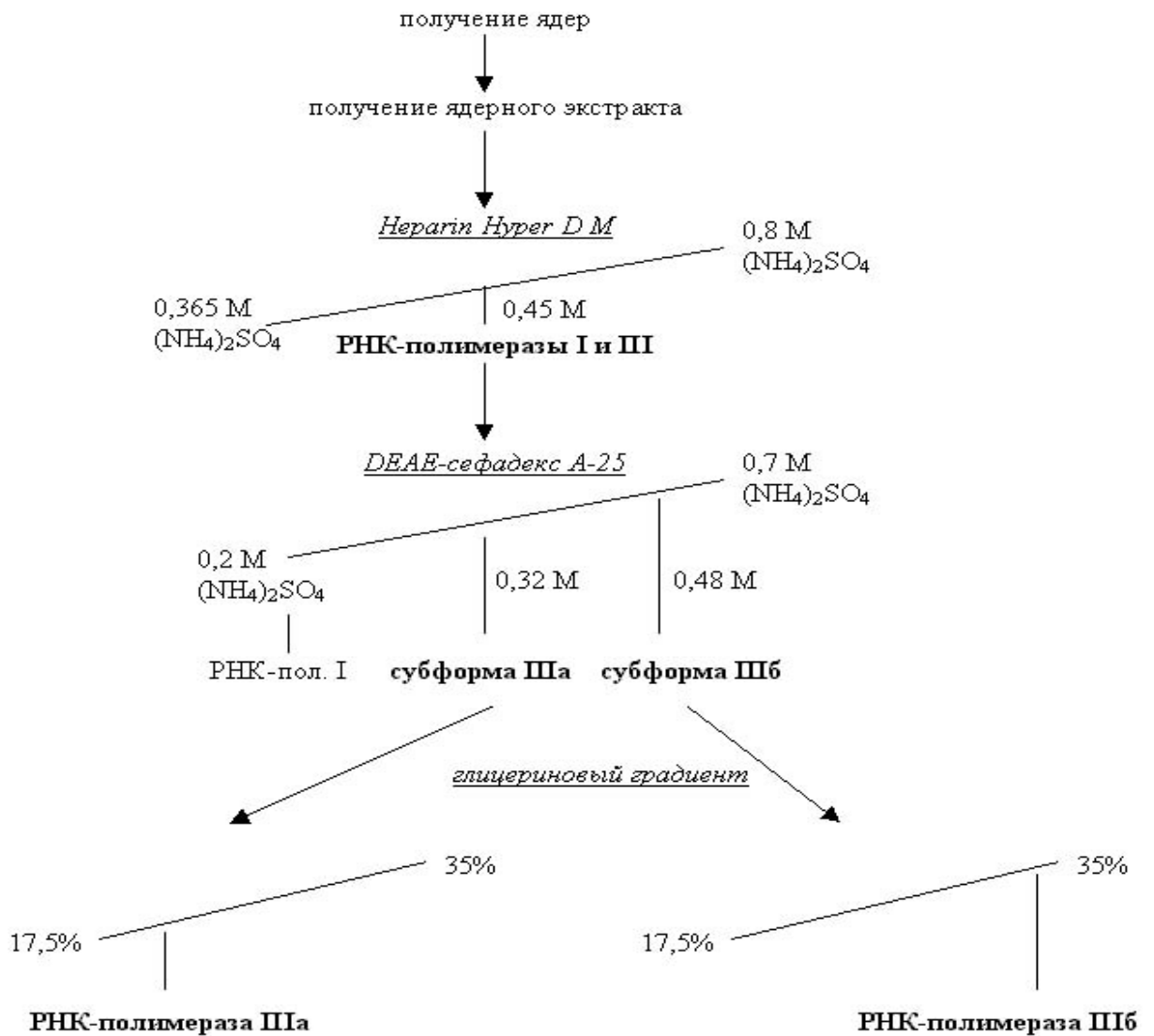


Рис. 2. Схема выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека и ядер клеток эпидермоидной карциномы человека A431 с использованием хроматографии на гепарине и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина.

3.6.1. Получение ядерного экстракта

Осадок ядер, полученных из примерно 40 г плаценты человека (см. п. 3.3.) или примерно 100 млн клеток эпидермоидной карциномы человека А431 (см. п. 3.4.), суспендировали в 3 мл буфера С и гомогенизировали во льду в течение 30 мин. За вскрытием ядер следили под микроскопом. Далее гомогенат центрифугировали при $25000\times g$, $4^{\circ}C$ в течение 30 мин. Надосадочную жидкость собирали и диализовали против 50 объемов буфера I с 0,3 М сульфатом аммония при $4^{\circ}C$ в течение ночи. Для удаления выпавших частиц белка раствор после диализа центрифугировали при $25000\times g$, $4^{\circ}C$ в течение 30 мин.

3.6.2. Разделение ядерного экстракта аффинной хроматографией на колонке Нерагін Нурег D M

Для отделения активностей РНК-полимераз I и III от активности РНК-полимеразы II использовали аффинную хроматографию на Нерагін Нурег D M, которая позволяет эффективно разделять ДНК-связывающие белки. Ядерный экстракт наносили на колонку Нерагін Нурег D M, уравновешенную буфером I с 0,3 М сульфатом аммония, и промывали колонку 6 объемами буфера I с 0,365 М сульфатом аммония. При этих условиях РНК-полимераза II не связывается с колонкой, что позволяет отделить от нее РНК-полимераз I и III. Далее проводили элюцию ядерного экстракта с колонки линейным градиентом 0,365–0,8 М сульфата аммония, приготовленного на буфере I. Собирали 35 фракций (объем каждой фракции примерно 1 мл). В каждой фракции определяли активность РНК-полимеразы III. РНК-полимеразы I и III выходят с колонки Нерагін Нурег D M в составе близких пиков, соответствующих ионной силе примерно 0,45 М сульфата аммония, поэтому для определения активности РНК-полимеразы III использовали пробы с высоким содержанием сульфата аммония – 100 мМ, который подавляет активность РНК-полимеразы I (см. п. 3.6.5.). Фракции, обладающие максимальной активностью, собирали.

Разделение РНК-полимераз I и III ионообменной хроматографией на колонке ДЕАЕ-сефадекс А-25

Полученный после разделения на Нерагін Нурег D M препарат содержал смесь РНК-полимераз I и III. Дальнейшее разделение этих полимераз проводили ионообменной хроматографией на колонке ДЕАЕ-сефадекс А-25. Для этого собранные фракции разбавляли до 0,12 М сульфата аммония постепенным добавлением буфера II (при быстром разбавлении белок может выпасть в осадок). Раствор белка наносили на колонку

ДЕАЕ-сефадекс А-25, уравновешенную буфером II с 0,2 М сульфатом аммония и промывали 5 объемами буфера II с 0,2 М сульфата аммония. В этих условиях РНК-полимераза I проходит через колонку, не сорбируясь на смоле. Элюцию вели линейным градиентом 0,2–0,7 М сульфата аммония, приготовленного на буфере II. Собирали 40 фракций объемом примерно по 1 мл. В каждой фракции определяли активность РНК-полимеразы III. Фракции, обладающие максимальной РНК-полимеразной активностью, объединяли, добавляли БСА в качестве носителя до конечной концентрации 50 мкг/мл и кристаллический сульфат аммония из расчета 42 г на 100 мл раствора (насыщение ~75% при 0°C). Осадок формировался в течение ночи. Раствор центрифугировали при 105000×g, 4°C в течение 1 ч, осадок собирали и растворяли в 200 мкл буфера I с 15% глицерином. Чтобы освободиться от избытка сульфата аммония, раствор фермента диализовали против 100 мл буфера I с 15% глицерином в течение 2 ч при 4°C.

3.6.4. Ультрацентрифугирование субформ РНК-полимеразы III в градиенте плотности глицерина

Раствор фермента наносили на градиент плотности глицерина 17,5–35,0% в буфере I, содержащем 0,1 М сульфат аммония. Разделение в градиенте осуществляли центрифугированием при 90000×g в течение 18 ч. Градиент фракционировали на 10 проб, в каждой из которых определяли активность РНК-полимеразы III. Фракции, соответствующие пику активности, собирали и диализовали против 20 объемов буфера MS-50 с 0,1 М сульфатом аммония в течение 2 ч при 4°C. Добавляли БСА до конечной концентрации 300 мкг/мл. Фермент разделяли на аликвоты и хранили в жидком азоте. Удельная активность препарата РНК-полимеразы III равнялась примерно 1 Е на 4–5 мкл фермента. Из-за малого количества РНК-полимеразы III в полученных препаратах определять концентрацию белка в препарате фермента традиционными количественными методами не представлялось целесообразным.

3.6.5. Определение транскрипционной активности РНК-полимеразы III

Определение РНК-полимеразной активности на каждом этапе проводили как описано в п. 3.5.5, но система содержала 100 мМ сульфат аммония и 5 мкл фракции, проверяемой на наличие РНК-полимеразной активности (Седова и др., 1997; Sedova e.a., 1998; Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002а).

3.7. Получение фракций ядерного экстракта S-100, содержащих базальные транскрипционные факторы РНК-полимеразы III - TFIIIB и TFIIIC

Ядерный экстракт S-100 получали из клеток плаценты человека по методу Дигнама с соавторами (Dignam *et al.*, 1983). Вскрытие ядер проводили в буфере MS-5 добавлением сульфата аммония до конечной концентрации 0,33 М с последующей гомогенизацией в течение 30 мин на холоду. Гомогенат центрифугировали при 105000×g, 4°C в течение 60 мин. Надосадочную жидкость, которая представляет собой ядерный экстракт, очищенный от нерастворимых компонентов, собирали и диализовали против буфера ТЭД с 0,1 М KCl при 4°C в течение ночи. Полученный после диализа ядерный экстракт S-100 дополнительно очищали центрифугированием при 12000×g, 4°C в течение 40 мин.

Фракции ядерного экстракта S-100 плаценты человека, содержащие транскрипционные факторы TFIIIB и TFIIIC, получали ступенчатой элюцией ядерного экстракта S-100 с колонки фосфоцеллюлозы P11 буфером ТЭД, содержащим 0,35 М и 0,6 М KCl, соответственно (Wang, Roeder, 1996).

Ядерный экстракт S-100 клеток плаценты человека наносили на колонку фосфоцеллюлозы P11, уравновешенную буфером ТЭД с 0,1 М KCl. Колонку отмывали от несвязанного белка буфером ТЭД с 0,1 М KCl до исчезновения поглощения в элюате при длине волны 230 нм. Затем проводили ступенчатую элюцию буфером ТЭД с 0,35 М KCl и с 0,6 М KCl. Поглощение каждой фракции измеряли при длине волны 230 нм. В каждой ступени элюцию вели до исчезновения поглощения в элюате. В отобранных фракциях с максимальным поглощением A_{230} определяли концентрацию белка по формуле:

$$c \text{ (мг/мл)} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260},$$

где A_{280} и A_{260} – поглощение фракции при длине волны 280 и 260 нм, соответственно (Warburg, Christian, 1941).

Затем эти фракции диализовали против буфера ТЭД без KCl при 4°C в течение ночи и использовали в опытах по проверке корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III *in vitro* (см. п. 3.10) (Никитина и др., 1998).

3.8. Плазмида pCRTM2.1 со вставкой AT, содержащей последовательность Alu-повтора

Для молекулярного клонирования последовательности AT, содержащей Alu-повтор шимпанзе, Чу с соавторами использовали вектор pCRTM2.1* (Chu e.a., 1995). Вектор pCRTM2.1 (рис. 3) имеет размер 3900 п.н. и содержит в своем составе следующие последовательности ДНК:

- ген альфа-фрагмента β-галактозидазы lacZ, внутри которого содержится полилинкер с уникальными сайтами рестрикции для ряда эндонуклеаз, в том числе EcoRI;
- гены устойчивости к антибиотикам ампициллину и канамицину;

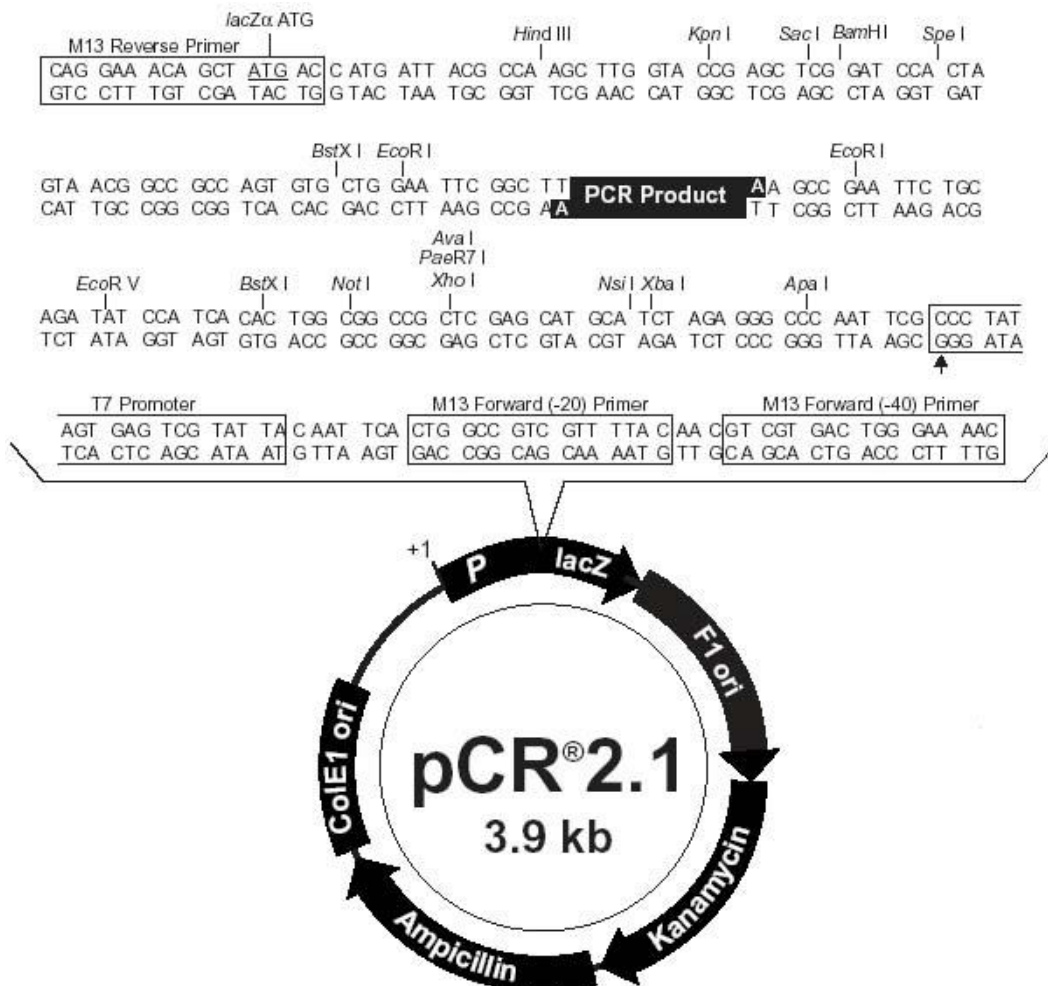


Рис. 3. Вектор pCRTM2.1 (Invitrogen Corporation, США). Фрагмент, вставленный по сайту рестрикции EcoRI, обозначен «PCR Product».

* Плазмида была любезно предоставлена проф. Н.В. Томилиным (Институт цитологии РАН).

- промотор для РНК-полимеразы фага T7;
- ориджины репликации: бактериальный Col EI и фаговый F1.

Вставка последовательности AT проводилась по уникальному сайту рестрикции Eco RI в составе гена *lac Z* вектора pCRTM2.1 (рис. 3). Последовательность Alu-повтора несет внутригенный промотор 2-го типа для РНК-полимеразы III, который состоит из двух консервативных участков - последовательностей А и В. В состав вставки AT был также внесен участок, состоящий из расположенных последовательно пяти остатков Т, который служит терминатором транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III (Chu e.a., 1995). При использовании вектора pCRTM2.1 со вставкой AT в качестве матрицы при транскрипции *in vitro* образуется в основном транскрипт длиной 282 нуклеотида, который соответствует терминации на участке из пяти последовательных остатков Т. Однако несмотря на то, что данный терминатор является достаточно сильным, он иногда преодолевается РНК-полимеразой III, и тогда возможно образование транскриптов большей длины, соответствующих терминации на участках матрицы, расположенных ниже первого терминатора (Chu e.a., 1995).

3.9. Трансформация клеток *E. coli* плазмидой pCRTM2.1 со вставкой AT и выделение плазмиды

Для амплификации плазмиды pCRTM2.1 со вставкой AT проводили трансформацию клеток *E. coli* этой плазмидой с использованием хлористого кальция (Маниатис и др., 1984). Для выделения плазмиды pCRTM2.1 со вставкой AT из трансформированных клеток *E. coli* использовали щелочной лизис клеток и очистку плазмиды центрифугированием в градиенте хлористого цезия (Маниатис и др., 1984). Концентрацию и степень очистки плазмидной ДНК определяли по поглощению раствора ДНК при длине волны 260 и 280 нм. Показатель A_{260}/A_{280} равнялся ~1,8, что соответствует достаточно высокой степени очистки ДНК. По значению A_{260} вычисляли концентрацию ДНК из расчета: 20 оптических единиц (при толщине кюветы спектрофотометра 1 см) соответствуют раствору ДНК с концентрацией 1 мг/мл.

Полученную плазмиду обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой Eco RI. Рестрикцию проводили в пробе, содержащей 1 мМ трис-НСl, рН 8,5, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 2,5 мкг плазмиды pCRTM2.1 со вставкой AT, 50 Е рестриктазы Eco RI. Конечный объем пробы составлял 25 мкл. Пробу инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Рестрикционные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,7% агарозе на 40 мМ TBE, рН 8,3, и анализировали сравнением с маркерами длины фрагментов ДНК

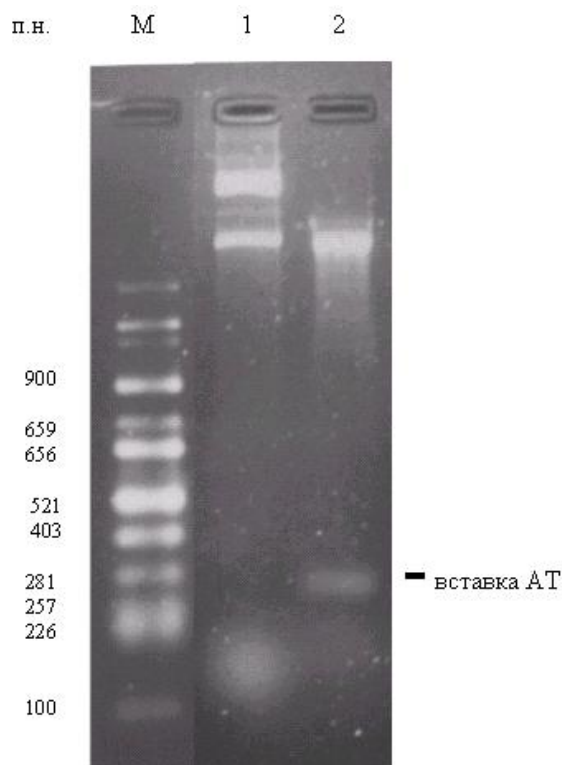


Рис. 4. Электрофоретическое разделение в 1,7% агарозном геле рестрикционных фрагментов, полученных в результате расщепления плазмиды pCR™2.1 со вставкой AT рестриктазой Eco RI.

- 1 - маркеры длины фрагментов ДНК (pBR322/Alu I)
- 2 - нерасщепленная плазида
- 3 - плазида после расщепления рестриктазой Eco RI.

после окрашивания бромистым этидием. Гель после окраски бромистым этидием фотографировали в УФ-свете (рис. 4).

3.10. Проверка корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III плаценты человека *in vitro*

Проверку корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III плаценты человека *in vitro* (т.е. способность полимеразы правильно инициировать и терминировать транскрипцию матрицы с образованием полноразмерного транскрипта), проводили в системе, содержащей 60 мМ трис-НСl, рН 7,9, 1,5 мМ MgCl₂, 0,05 мМ ЭДТА, 2,5 мМ ДТТ, 75 мМ (NH₄)₂SO₄, 15% глицерин, СТР, GTP, UTP и ATP в концентрации 0,5 мМ каждый, 0,09 МБк α[³²P]-ATP, 200 нг плазмиды pCR™2.1 со вставкой AT, содержащей последовательность Alu-повтора с внутренним промотором и терминаторами для РНК-полимеразы III, 0,3 Е РНК-полимеразы III, по 10 мкл фракций ядерного экстракта 0,35 М КСl и 0,6 М КСl, содержащих транскрипционные факторы TFIIIB и

ТФИПС, соответственно. Общий объем пробы – 125 мкл. Транскрипцию вели в течение 45 мин при 37°C. Затем пробы обрабатывали проназой в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 мин при 37°C. Для депротеинизации проб добавляли 1/2 объема смеси водонасыщенный фенол : хлороформ (10:1), встряхивали в течение 2 мин и центрифугировали на микроцентрифуге «Beckman» в течение 5 мин. Верхний водный слой, содержащий РНК, собирали и повторяли депротеинизацию до исчезновения белковой интерфазы. После депротеинизации РНК осаждали добавлением 1/10 объема 3 М ацетата натрия, рН 5,2 и 3 объемов 96° этилового спирта. Осадки образовывались в течение ночи на холоду. Осадки РНК собирали, промывали 1 раз 70° и 2 раза 96° этиловым спиртом, растворяли в 30 мкл буфера: 40 мМ ТВЕ, рН 8,3, 1 М мочевины, 5% глицерин. Электрофоретическое разделение РНК осуществляли в 6% ПААГ с 7 М мочевиной при 7 мА в течение 22 часов. По завершении электрофореза гель экспонировали с рентгеновской пленкой (Никитина и др., 1998).

3.11. Фосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью

Фосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека *in vitro* проводили в следующих условиях (Никитина и др., 2002а): 50 мМ трис-НСl, рН 7,9, 2,5 мМ MgCl₂, 0,14 мМ ЭДТА, 2,5 мМ ДТТ, 55 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2 мМ PMSF, 30% глицерин, 43,5 мМ KCl, 0,85 мМ АТФ (при изучении транскрипции *in vitro*) или 0,275 МБк γ^[32P]-АТФ (при изучении фосфорилирования *in vitro*) и 0,3 Е РНК-полимеразы III, содержащей также протеинкиназную активность. При изучении способности протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III, использовать GTP в качестве донора фосфатной группы пробы содержали 0,275 МБк γ^[32P]-АТФ и 0,85 мМ GTP. При изучении влияния различных ингибиторов протеинкиназ на фосфорилирование РНК-полимеразы III *in vitro* в пробу добавляли вортманнин до 200 нМ, DRB до 60 или 150 мкМ, или хелеритрин* до 2 мкМ. Общий объем пробы 100 мкл. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 40 мин (если не указано иначе) и анализировали диск-электрофорезом в 9% ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmly, 1970). Далее гель экспонировали с рентгеновской пленкой. Для изучения кинетики фосфорилирования рентгеновскую пленку сканировали и получали денситограмму с помощью программы Scion Image Beta 4.0.2 (Scion Corporation).

* Хелеритрин был любезно предоставлен к.б.н. Т.Н. Беляевой и к.б.н. Е. Леонтьевой (Институт цитологии РАН).

3.12. Фосфорилирование РНК-полимеразы III из клеток A431 с использованием цитоплазмы клеток A431

Фосфорилирование РНК-полимеразы III из клеток A431 с использованием цитоплазмы клеток A431 проводили в следующих условиях: 50 мМ трис-HCl, pH 7,97, 0,2 мМ ДТТ, 2,5 мМ MgCl₂, 2,5 мМ KCl, 50 мМ сульфат аммония, 0,1 мМ ЭДТА, 12,5% глицерин, 2 Е РНК-полимеразы IIIа из клеток A431, 10 мкл цитоплазмы клеток A431, 0,275 МБк γ [³²P]-АТФ. Объем пробы – 40 мкл. Пробы инкубировали при 37°C в течение 40 мин. Затем пробы анализировали диск-электрофорезом в 9% ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmly, 1970) с последующим экспонированием геля с рентгеновской пленкой (Никитина и др., 2002б).

3.13. Дефосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека щелочной фосфатазой

Дефосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека после ее фосфорилирования в присутствии меченого γ [³²P]-АТФ (см. п. 3.11.) осуществляли 0,7 Е иммобилизованной щелочной фосфатазы в тех же условиях, при которых происходило фосфорилирование (Никитина и др., 2002а). Объем пробы 100 мкл. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 40 мин (если не указано иначе). Затем иммобилизованную щелочную фосфатазу удаляли из пробы центрифугированием при 11000×g. Пробы анализировали диск-электрофорезом в 9% ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли (Laemmly, 1970). Далее гель экспонировали с рентгеновской пленкой. Для изучения кинетики дефосфорилирования рентгеновскую пленку сканировали и получали денситограмму с помощью программы Scion Image Beta 4.0.2 (Scion Corporation).

3.14. Изучение влияния фосфорилирования и дефосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека на интенсивность транскрипции *in vitro*

3.14.1. Транскрипция *in vitro* с участием фосфорилированной и дефосфорилированной РНК-полимеразы III плаценты человека

Фосфорилирование и дефосфорилирование РНК-полимеразы III проводили в условиях, описанных в пп. 3.11. и 3.13., соответственно. Оценку транскрипционной активности РНК-полимеразы III в фосфорилированной, нефосфорилированной и дефосфорилированной формах проводили в следующей системе (Никитина и др., 2002а): 60 mM трис-HCl, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM ЭДТА, 2,5 mM ДТТ, 75 mM (NH₄)₂SO₄, 15% глицерин, 25 mM KCl, CTP, GTP, UTP и ATP в концентрации 0,5 mM каждый, 0,09 МБк α[³²P]-ATP, 0,3 Е РНК-полимеразы III, 200 нг плазмиды pCR™2.1 со вставкой AT в качестве матрицы. Общий объем пробы – 125 мкл. Транскрипцию осуществляли в течение 45 мин при 37°C. Далее пробы обрабатывали проназой в концентрации 100 мкг/мл, при 37°C в течение 30 мин и депротеинизировали с использованием равного объема смеси фенол : хлороформ (10:1) до полного исчезновения белковой интерфазы. ³²P-меченую РНК осаждали 2 объемами 96° этилового спирта в присутствии 0,3 М ацетата натрия, pH 5,2. Осадки собирали и промывали один раз 70° и дважды 96° этиловым спиртом (Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002а). Результаты воспроизводились в не менее чем 3 опытах.

3.14.2. Анализ РНК-транскриптов в 6% ПААГ с 7 М мочевиной

Осадки ³²P-меченой РНК растворяли в 30 мкл буфера: 40 mM ТВЕ, pH 8,3, 7 М мочевины, 5% глицерин, и анализировали электрофорезом в 6% ПААГ с 7 М мочевиной с последующей автордиографией геля. Интенсивность транскрипции оценивали по включению меченого нуклеозидмонофосфата в РНК-транскрипты (Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002а).

3.15. Поиск потенциальных сайтов фосфорилирования и гликозилирования в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека

Для проверки наличия потенциальных сайтов модификаций (фосфорилирования и гликозилирования) в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека нами были использованы программы MotifScan, NetPhos 2.0 и YinOYang 1.2. Аминокислотные последовательности субъединиц РНК-полимеразы III человека были взяты из баз данных Genpept и Swiss-Prot путем поиска с использованием поисковой системы Entrez Protein

Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США, адрес сайта: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>) и данных из работы: [Hu e.a., 2002](#).

Поиск потенциальных сайтов фосфорилирования в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека проводили с использованием двух программ: MotifScan (адрес сайта: http://scansite.mit.edu/motifscan_id.phtml) и NetPhos 2.0 (Технический университет Дании; адрес сайта: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; описание программы дано в работе: [Blom e.a., 1999](#)).

Поиск потенциальных сайтов, которые могут подвергаться как фосфорилированию, так и гликозилированию (сайтов «инь-янь»), проводили с использованием программы YinOYang 1.2 (Технический университет Дании; адрес сайта: <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>).

3.16. Проточная цитофлуориметрия клеток A431 с использованием иодида пропидия

Клетки A431 выращивали на чашках Ø60 мм в 6 мл среды DMEM с 10% FCS и 40 мкг/мл гентамицина до примерно 50%-го заполнения поверхности чашки клетками. Далее клетки подвергали голоданию в бессывороточной среде DMEM в течение 48 ч. После этого этапа клетки с части чашек использовали для получения контроля (голодающих клеток), а остальные инкубировали в течение 24 ч в среде DMEM с 40 мкг/мл гентамицина и 0,1 нг/мл ЭФР (активация клеток) или 100 нг/мл ЭФР (индукция апоптоза). Клетки собирали с подложки обработкой 1 мл раствора трипсин-Версен (3:7), 250 мкл суспензии (примерно 1 млн. клеток) переносили в чистую пробирку и добавляли 250 мкл среды DMEM. Осадок клеток собирали при 1000×g, 4°C в течение 3 мин. Дважды промывали осадок клеток раствором Хэнкса, каждый раз хорошо ресуспендируя клетки и собирая при тех же условиях. Затем осадок клеток ресуспендировали в 1 мл буфера FACS (0,03% FCS, приготовленный на растворе Хэнкса), добавляли 10 мкл 1%-го раствора сапонина, приготовленного на растворе Хэнкса, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Клетки собирали центрифугированием при 1000×g, 4°C в течение 3 мин и дважды промывали раствором Хэнкса. Полученный осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл раствора Хэнкса, добавляли РНКазу А до концентрации 100 мкг/мл и иодид пропидия до концентрации 40 мкг/мл. Инкубировали при 37°C в течение 15 мин и хранили при 4°C до проведения проточной цитофлуориметрии.

Проточная цитофлуориметрия была выполнена сотрудником Института цитологии РАН, к.х.н. Н.Д. Аксеновым (группа проточной цитометрии и сортировки клеток, лаборатория физиологии клеточного цикла, зав. лаб. академик Н.Н. Никольский) на

проточном циклометре-сортировщике ODAM-ATC3000 (Bruker). Представленные результаты являются средним арифметическим для двух независимых проб.

3.17. Изучение фрагментации ДНК в клетках A431 при апоптозе

Клетки A431 выращивали на чашках Ø60 мм как описано в п. 3.16. Среду культивирования сливали и промывали слой клеток на подложке несколько раз свежей средой DMEM – для удаления отмерших клеток. Клетки A431 (примерно 5 млн) снимали с подложки обработкой раствором трипсин-Версен (3:7) и собирали центрифугированием при 1000×g, 4°C в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл буфера TE, pH 8,0 с 0,2% (v/v) тритона X-100 и выдерживали во льду в течение 10 мин для проведения лизиса клеток. Суспензию центрифугировали при 13000×g, 4°C в течение 15 мин. При этом в осадок выпадали целые ядра и крупные обломки клеточного содержимого. Надосадочную жидкость, содержащую низкомолекулярную ДНК, переносили в чистую пробирку, добавляли РНКазу А до концентрации 60-70 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Для проведения протеолиза белков добавляли SDS до 0,5% , протеиназу К до 150 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. ДНК осаждали равным объемом охлажденного до -20°C изопропилового спирта в присутствии 0,5 М NaCl как соосадителя. Выдерживали 10 мин на льду и собирали осадок центрифугированием при 13000×g, 4°C в течение 15 мин. Осадок ДНК растворяли в 20 мкл буфера TE, pH 8,0, и анализировали электрофорезом в 2% агарозном геле на 40 мМ TBE, pH 8,3, с последующей окраской бромистым этидием.

3.18. Выделение тотальной РНК из клеток A431

Выделение тотальной РНК из клеток A431 проводили с использованием реактива TRIzol[®] (GibcoBRL): к суспензии клеток в растворе RNAlater[™] (см. п. 3.2.) добавляли 10 объемов реактива TRIzol[®] и далее обрабатывали в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для лизирования клеточных мембран и разрушения комплексов белков с нуклеиновыми кислотами суспензию клеток в реактиве TRIzol[®] выдерживали в течение 8-10 мин при комнатной температуре, интенсивно перемешивая до исчезновения вязкости. Затем добавляли 0,2 объема (от объема реактива TRIzol[®]) хлороформа, интенсивно встряхивали в течение 15 с и выдерживали 3 мин при комнатной температуре. Органическую (содержащую ДНК и белки) и водную (содержащую РНК) фазы расслаивали центрифугированием при 12000 g, 4°C в течение 15 мин. Верхнюю водную фазу собирали, переносили в чистую пробирку и осаждали РНК 0,5 объемами (от объема

реактива TRIzol[®]) изопропилового спирта. Образец выдерживали 10 мин при комнатной температуре и собирали осадки РНК центрифугированием при 12000 g, 4°C в течение 10 мин. Осадки промывали 75° этиловым спиртом и собирали центрифугированием при 7500×g, 4°C в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбирали с помощью автоматической пипетки, осадки РНК высушивали под тягой в течение 5-10 мин, а затем растворяли в 15 мкл деионизированной воды, обработанной DEPC. Для полного растворения РНК пробы выдерживали при 55-60°C в течение 10 мин. Соотношение показателей поглощения полученных препаратов РНК при 260 и 280 нм было >1,9, что свидетельствовало о высокой степени очистки препаратов РНК от белков. Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм, считая, что 1 оптическая единица соответствует концентрации РНК 40 мкг/мл. Раствор РНК хранили при -70°C (Никитина и др., 2003а).

3.19. Исследование содержания 5S рРНК и тРНК_i^{Met1} в тотальной РНК клеток A431 двухэтапным методом RT-PCR в реальном времени

Изменение содержания 5S рРНК и тРНК при различных воздействиях на клетку в значительной мере определяется изменением активности РНК-полимеразы III. Поэтому мы изучили содержание 5S рРНК и тРНК_i^{Met1} в составе тотальной РНК клетки с помощью двухэтапного метода RT-PCR в реальном времени (Никитина и др., 2003). На первом этапе проводили реакцию обратной транскрипции и получали одноцепочечную кДНК на матрице тотальной РНК с участием статистического набора праймеров. На втором этапе полученную одноцепочечную кДНК амплифицировали с участием специфичных праймеров к исследуемым последовательностям соответствующих низкомолекулярных РНК методом PCR в реальном времени (Никитина и др., 2003а).

3.19.1. Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) на приборе GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Applied Biosystems). Реакционная смесь содержала: 6 мкг тотальной РНК, буфер для обратной транскрипции, статистический набор олигонуклеотидных праймеров, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и 250 Е обратной транскриптазы MultiScribe[™] Reverse Transcriptase. Конечный объем пробы – 100 мкл. Реакцию проводили в три этапа: 1 этап – 10 мин при 25°C (для отжига праймеров с РНК-матрицей); 2 этап – 120 мин при 37°C

(реакция синтеза кДНК на РНК-матрице); 3 этап – 5 мин при 95°C (инактивация обратной транскриптазы). Далее пробы с кДНК делили на аликвоты, хранили при –20 °С и по мере надобности использовали для PCR в реальном времени (Никитина и др., 2003).

3.19.2. PCR в реальном времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I

PCR в реальном времени проводили на установке ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I (Никитина и др., 2003). Последовательности праймеров конструировали с помощью программы Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Последовательности РНК были взяты: 5S рРНК (номер доступа V00589) – из базы данных Entrez Nucleotide Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США, адрес сайта: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>); тРНК^{Met}1 (последовательность chr6.trna58-MetCAT Sc: 62.43) – из базы данных «Genomic tRNA Database» на сайте: <http://rna.wustl.edu/tRNAdb/> и данных из работы: Lowe, Eddy, 1997. В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды (TAG Copenhagen A/S, Швеция):

- для тРНК^{Met}1 – 5'-AGC AGA GTG GCG CAG C-3' (прямой праймер) и 5'-TAG CAG AGG ATG GTT TAG ATC CA-3' (обратный праймер);
- для 5S рРНК – 5'-CGC CCG ATC TCG TCT GAT-3' (прямой праймер) и 5'-GGT CTC CCA TCC AAG TAC TAA CCA-3' (обратный праймер).

Реакционная смесь содержала в 30 мкл: кДНК-матрицу, прямой и обратный праймеры в концентрации 300 нМ каждый и SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), в состав которого входят краситель SYBR Green I, ДНК-полимераза AmpliTaq Gold[®], дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и оптимальный буфер для PCR. Для построения стандартных кривых использовали следующие количества кДНК: для 5S рРНК использовали кДНК, полученную из 0,0025, 0,025, 0,25 и 2,5 нг тотальной клеточной РНК, а для тРНК^{Met}1 – из 15, 30, 60 и 120 нг тотальной клеточной РНК. В экспериментальных пробах для 5S рРНК использовали кДНК, полученную из 1 нг тотальной клеточной РНК, для тРНК^{Met}1 – из 80 нг тотальной клеточной РНК. Условия проведения реакции: 10 мин при 95°C («горячий старт» для активации ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold[®]) и далее – 40 циклов: 15 сек при 95°C (денатурация) и 1 мин при 60°C (отжиг с праймерами и элонгация). Результаты PCR в реальном времени анализировали с помощью программного обеспечения ABI Prism 7000 SDS Software Version 1.0 (Applied Biosystems) в соответствии с рекомендациями фирмы Applied Biosystems. Кривая

диссоциации продуктов PCR строилась как зависимость отрицательной величины скорости изменения флуоресценции SYBR Green I ($-dF/dT$, где F – интенсивность флуоресценции, T – температура) от температуры в интервале температур от 63 до 92°C. По кривым амплификации (кривым зависимости интенсивности флуоресценции от цикла амплификации) определяли пороговый цикл (C_T) для каждой пробы. Пороговый цикл – цикл амплификации, при котором в пробе впервые детектируется статистически значимое повышение уровня флуоресценции относительно базального уровня (фона). Для достоверных и точных расчетов C_T должен соответствовать ранней экспоненциальной фазе амплификации кДНК, когда реакция синтеза ДНК не лимитирована недостатком каких-либо ее компонентов. Стандартные кривые, т.е. кривые зависимости C_T от десятичного логарифма количества внесенной кДНК ($\lg C_0$), для обеих исследованных последовательностей РНК на использованных интервалах концентраций кДНК соответствовали линейной регрессионной модели (коэффициент детерминации $R^2 > 0,95$). По стандартным кривым определяли эффективность амплификации для каждой последовательности по формуле: $E = 10^{-(1/\text{tg } \alpha)}$, где E – эффективность амплификации, показывающая, во сколько раз увеличивается количество ДНК в одном цикле PCR, α – угол наклона линии регрессии стандартной кривой к оси абсцисс. Соотношения уровней содержания исследуемой РНК (target) в контроле (control, медленно пролиферирующие клетки с удлинённым временем генерации) и в эксперименте (sample, клетки, обработанные ЭФР в концентрации 0,1 или 100 нг/мл) вычисляли по формуле:

$$r = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T \text{ target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_{T \text{ reference}}(\text{control-sample})}},$$

где E – эффективность амплификации, $\Delta C_T(\text{control-sample})$ – разница значений C_T в контроле и в эксперименте (Pfaffl, 2001). Для нормирования в качестве внутреннего контроля (reference) использовали мРНК белка RPLP0 (acidic ribosomal protein, large, P0). Для каждого физиологического состояния (контроль – клетки в состоянии медленной пролиферации, и эксперимент – клетки после обработки 0,1 нг/мл и 100 нг/мл ЭФР) было проведено три независимых эксперимента (по два повтора каждой пробы). Анализ полученных значений r проводили с помощью программы Microsoft Excel 2000. Значимость различий между экспериментальными и контрольными пробами оценивали по t -критерию Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$).

4. Результаты

4.1. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина

Выделенная из ядер плаценты человека фракция, содержащая тотальную РНК-полимеразную активность, подвергалась дальнейшей очистке фракционированием на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугированием в градиенте плотности глицерина (Седова и др., 1997; Sedova e.a., 1998; Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002а; Тищенко и др., 2002)

4.1.1. Фракционирование РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11

При фракционировании тотальной РНК-полимеразной активности на колонке ДЕАЕ-сефадекса А-25 линейным градиентом концентрации сульфата аммония от 250 до 500 мМ РНК-полимераза III элюируется в виде одного двуступенчатого пика. Мы модифицировали условия элюции, увеличив верхний предел концентрации сульфата аммония до 600 мМ. При этом РНК-полимераза III выходит с колонки в виде двух выраженных пиков, соответствующих двум её субформам, обозначенным IIIа (элюируется при более низкой ионной силе, примерно 0,42 М сульфата аммония) и IIIб (элюируется при более высокой ионной силе, примерно 0,53 М сульфата аммония). Принадлежность субформ IIIа и IIIб к РНК-полимеразе III подтверждается характерным для этой формы фермента подавлением их активности α -аманитином в концентрации 1 мкг/мл (не более чем на 60%) (рис. 5, А). Для очистки от контаминантных белков РНК-полимеразу IIIа и IIIб далее фракционировали на колонке фосфоцеллюлозы Р11 линейным градиентом концентрации сульфата аммония от 0,07 М до 0,6 М (рис. 5, Б). Фракции, обладающие максимальной транскрипционной активностью (~0,4 М сульфата аммония), собирали и центрифугировали в градиенте плотности глицерина (Никитина и др., 2002а).

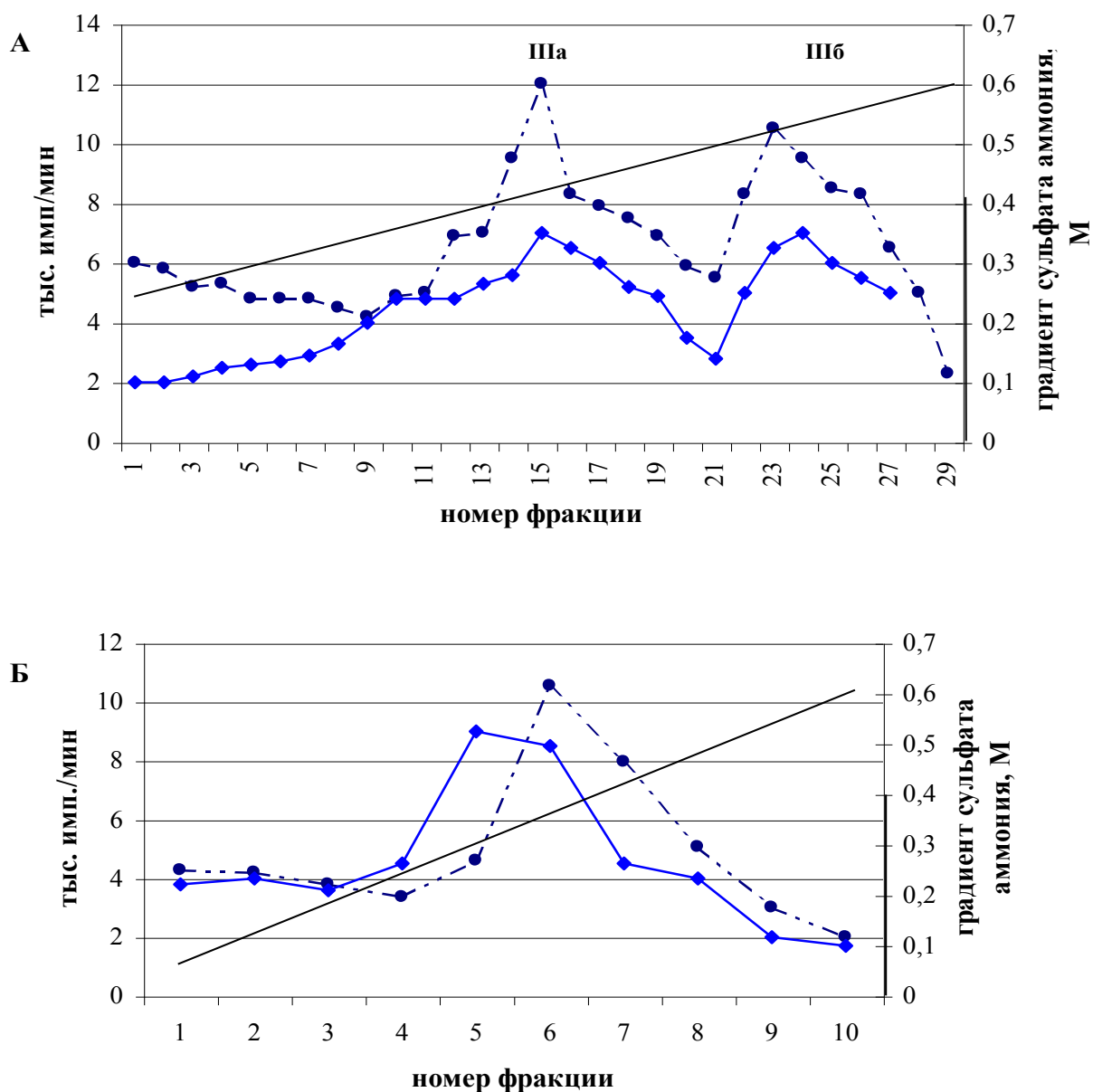


Рис. 5. А. Кривая элюции РНК-полимеразы III из плаценты человека с колонки ДЕАЕ-сефадекс А-25 линейным градиентом концентрации сульфата аммония:

- пробы без α-аманитина; - пробы с α-аманитином.

Б. Кривая элюции субфракций РНК-полимеразы III – IIIа и IIIб, из плаценты человека с колонки фосфоцеллюлозы Р11 линейным градиентом концентрации сульфата аммония:

● — РНК-полимераза IIIа; —◆— РНК-полимераза IIIб

РНК-полимеразную активность определяли как описано в «Материалах и методах».

4.1.2. Ультрацентрифугирование РНК-полимеразы III в градиенте плотности глицерина

При ультрацентрифугировании в градиенте плотности глицерина 22,5–35,0% (90000×g) субформы РНК-полимеразы III, IIIа и IIIб, выявляются в разных зонах градиента (рис. 6). РНК-полимераза IIIа выявляется в зоне с меньшей (~25%), а РНК-полимераза IIIб – в зоне с большей (~35%) плотностью глицерина. Это указывает на то, что РНК-полимераза IIIб имеет большую плавучую плотность, чем РНК-полимераза IIIа. Такое различие по плавучей плотности может объясняться либо несовпадением молекулярных масс субформ, либо различиями в упаковке молекул (Никитина и др., 2002а).

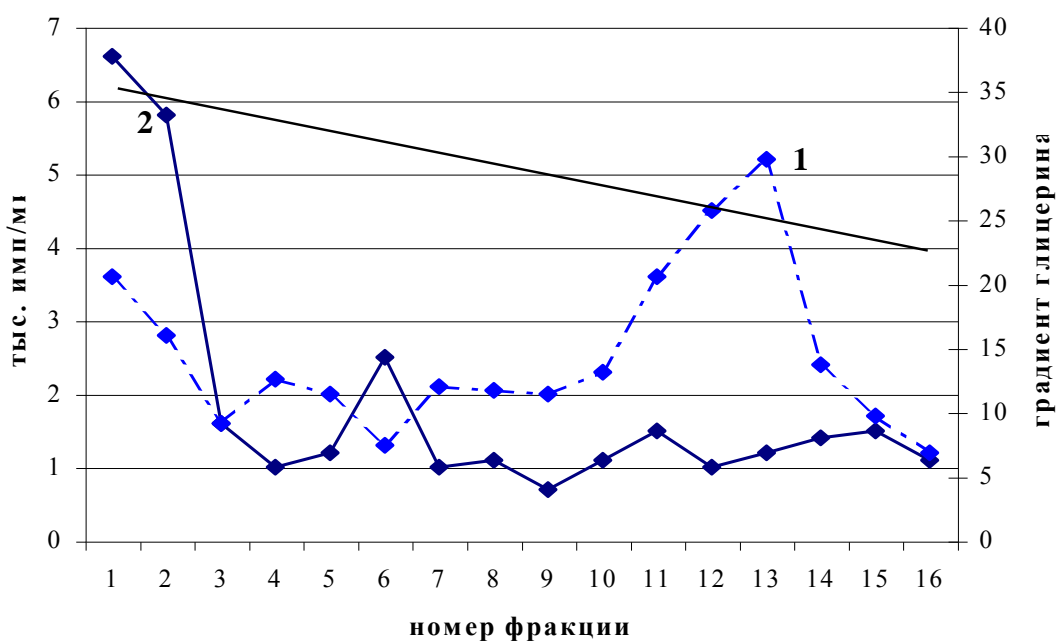


Рис. 6. Оценка РНК-полимеразной активности субфракций РНК-полимеразы III (IIIа и IIIб) из плаценты человека после ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина по включению в РНК [³H]-УТР:

1 – РНК-полимераза IIIа; 2 – РНК-полимераза IIIб.

4.1.3. Полипептидный состав препаратов РНК-полимеразы III плаценты человека

Анализ препарата РНК-полимеразы IIIa плаценты человека, полученного после ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина, диск-электрофорезом в присутствии SDS с последующей окраской геля серебром выявил наличие в его составе не менее 11 полипептидов (рис. 7, дорожка 1) (Седова и др., 1997; Тищенко и др., 2002; Никитина и др., 2002a), 7 из которых по электрофоретической подвижности соответствуют субъединицам РНК-полимеразы III человека (см. табл. 1).

Проведение анализа диск-электрофорезом в присутствии SDS с последующей окраской геля серебром препарата РНК-полимеразы IIIб не позволило определить ее субъединичную структуру из-за очень низкого содержания этой субформы фермента в препарате (рис. 7, дорожка 2). Однако поскольку для анализа бралось такое количество РНК-полимеразы IIIa и IIIб, что их активность была одинаковой (примерно по 5 Е РНК-полимеразной активности), то можно предположить, что РНК-полимераза IIIб является минорной субформой, но обладает более высокой ферментативной активностью, чем РНК-полимераза IIIa.

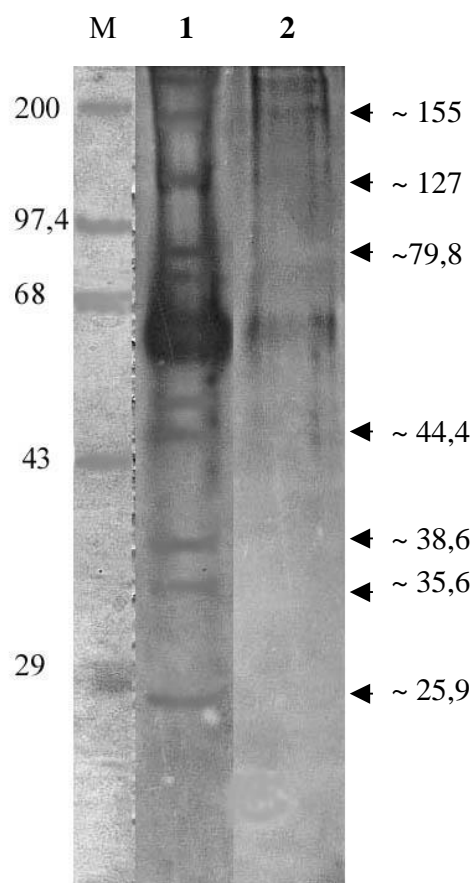


Рис. 7. Электрофореграмма препаратов РНК-полимераз IIIa и IIIб плаценты человека в 9% ПААГ с SDS. Гель окрашивали серебром.

1 – РНК-полимераза IIIa (5Е транскрипционной активности);

2 – РНК-полимераза IIIб (5Е транскрипционной активности);

М - маркёры молекулярных масс, кДа.

Стрелками указаны полипептиды, по электрофоретической подвижности соответствующие субъединицам РНК-полимеразы III человека, молекулярная масса которых указана справа в кДа (см. табл. 1 и работу: [Hu e.a., 2002](#)).

4.2. Фосфорилирование субформ РНК-полимеразы III плаценты человека – IIIа и IIIб, полученных с использованием хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина, ассоциированной протеинкиназной активностью

Фракции субформ РНК-полимеразы III – IIIа и IIIб, полученные из ядер плаценты человека, инкубировали в присутствии γ [^{32}P]-АТФ. Пробы анализировали диск-электрофорезом с SDS в 9 % ПААГ. На автордиограмме геля (рис. 8) видно, что в препаратах обеих субформ РНК-полимеразы III присутствует протеинкиназная активность, которая по-разному фосфорилирует субформы IIIа и IIIб. Наряду с не менее чем семью субъединицами, которые фосфорилируются в препаратах обеих субформ РНК-полимеразы III (молекулярные массы, определенные по графику зависимости относительной электрофоретической подвижности полипептида в геле от десятичного логарифма молекулярной массы, примерно 150, 105, 98, 67, 47, 44 и 23 кДа), как минимум еще две субъединицы (молекулярные массы около 30 и 93 кДа) фосфорилируются только

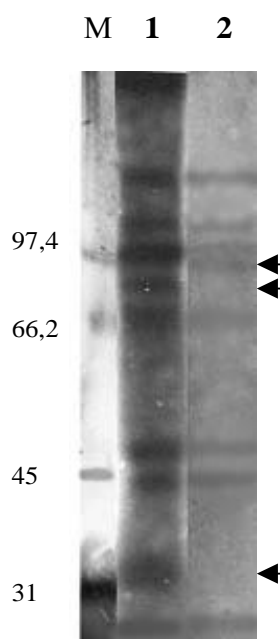


Рис. 8. Автордиограмма геля после диск-электрофореза в 9% ПААГ с SDS РНК-полимераз IIIа и IIIб из ядер плаценты человека, инкубированных в присутствии меченого γ [^{32}P]-АТФ:

- 1 – РНК-полимераза IIIа (0,3 Е транскрипционной активности);
- 2 – РНК-полимераза IIIб (0,3 Е транскрипционной активности).

Стрелками указано положение субъединиц, фосфорилированных только в одной из субформ РНК-полимеразы III; М – маркеры молекулярных масс, кДа.

в составе препарата РНК-полимеразы IIIa (рис. 8, дорожка 1) и одна субъединица (молекулярная масса около 95 кДа) – только в составе препарата РНК-полимеразы IIIb (рис. 8, дорожка 2) (Никитина и др., 2002a). Различие в интенсивности включения метки в пептиды в двух субформах может быть обусловлено меньшим количеством РНК-полимеразы IIIb по сравнению с РНК-полимеразой IIIa (см. п. 4.1.3.), различным уровнем протеинкиназной активности, а также присутствием в препарате РНК-полимеразы IIIb протеинфосфатазной активности (см. п. 4.6.) (Никитина, 2001a; Никитина, 2001b; Никитина и др., 2001; Никитина и др., 2002a). Так как мы не можем исключить, что в исходном препарате полимеразы присутствуют фосфорилированные *in vivo* полипептиды, мы называем наблюдаемое нами фосфорилирование *in vitro* «дополнительным».

4.3. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием хроматографии на гепарине Heparin Hyper D M и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина

Для выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека нами был модифицирован метод, используемый для получения этого фермента из клеток дрожжей (Huet *e.a.*, 1996). Модификация затрагивала первые этапы – получение ядер и ядерного экстракта. Так как, в отличие от клеток дрожжей, клетки человека не обладают клеточной стенкой, был применен более мягкий метод вскрытия клеток, предложенный Дигнамом с соавторами (Dignam *e.a.*, 1983). Мы также использовали ДЕАЕ-сефадекс А-25 вместо Mono Q (Никитина и др., 2002b).

4.3.1. Фракционирование РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека на гепарине Heparin Hyper D M

На первом этапе очистки использован гепарин – сорбент, аффинный к ДНК-связывающим белкам благодаря его структурному сходству с ДНК. При разделении ядерного экстракта клеток из плаценты человека на колонке гепарина Heparin Hyper D M РНК-полимеразы I и III выходят в виде одного или двух очень сближенных пиков при ионной силе 0,45 М сульфата аммония (рис. 9, А) (Huet *e.a.*, 1996). РНК-полимераза II связывается с гепарином при более низкой ионной силе, и в использованных нами

условиях – элюция градиентом сульфата аммония 0,365–0,8 М, проходит через колонку при нанесении, не сорбируясь на смоле (Huet e.a., 1996). Активность РНК-полимеразы III оценивали в пробах, содержащих 100 мМ сульфат аммония, то есть в условиях, при которых подавлена активность РНК-полимеразы I (Huet e.a., 1996). Во фракциях, соответствующих примерно 0,55 М сульфата аммония и более высокой ионной силе, при проверке РНК-полимеразной активности наблюдается довольно значительное включение метки в кислотонерастворимый материал, что приводит к образованию многочисленных пиков на кривой элюции (рис. 9, А). Присутствие таких пиков отмечалось и ранее, при использовании данного метода для получения РНК-полимеразы III из клеток дрожжей (Huet e.a., 1996). Авторы затруднялись объяснить наличие этих пиков, но отмечали, что содержание РНК-полимеразы III в них невелико, а от содержащихся в этих фракциях примесей белков далее трудно освободиться.

4.3.2. Очистка РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека фракционированием на ДЕАЕ-сефадексе А-25

Для дальнейшей очистки РНК-полимеразы III от соочищаются с ней на колонке Нерагін Нупег D М РНК-полимеразы I используется хроматография на ДЕАЕ-сефадексе А-25. При этом с колонки ДЕАЕ-сефадекса А-25 РНК-полимеразы I и III элюируются при существенно различающихся значениях ионной силы (см. п. 4.1.1.) Мы использовали условия элюции 0,2–0,7 М сульфата аммония, при которых РНК-полимераза I не связывается с колонкой, а РНК-полимераза III элюируется в виде двух хорошо разделяющихся пиков, соответствующих ионной силе примерно 0,32 М и 0,48 М сульфата аммония (рис. 9, Б). Эти пики соответствуют двум субформам РНК-полимеразы III – IIIа и IIIб, что подтверждается также их свойствами при центрифугировании в градиенте плотности глицерина (см. п. 4.3.3). При данном методе выделения и очистки РНК-полимеразы III субформы IIIа и IIIб элюируются с колонки ДЕАЕ-сефадекса А-25 при несколько более низких значениях ионной силы элюента, чем в случае использования метода очистки фермента, где данная колонка применяется на первом этапе (ср. рис. 5, А и 9, Б). Это может быть обусловлено тем, что получаемые разными методами комплексы, содержащие РНК-полимеразу III, различаются по составу и, соответственно, имеют разные свойства, влияющие на их удержание в колонке ДЕАЕ-сефадекса А-25. Фракции, соответствующие пикам транскрипционной активности, собирали.

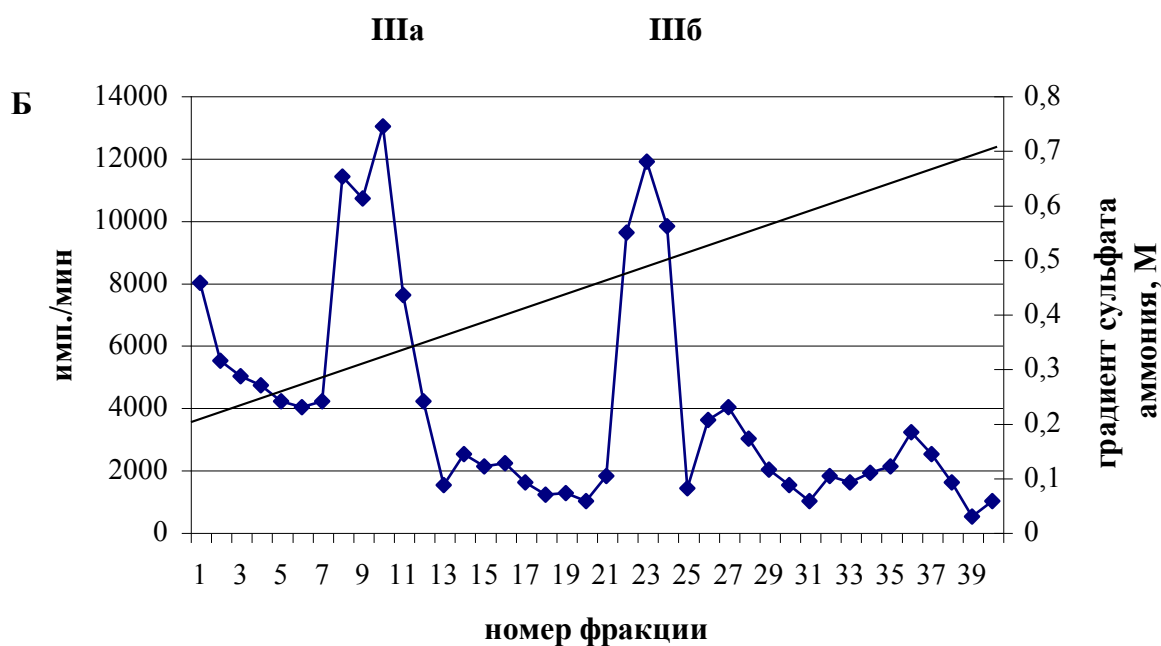
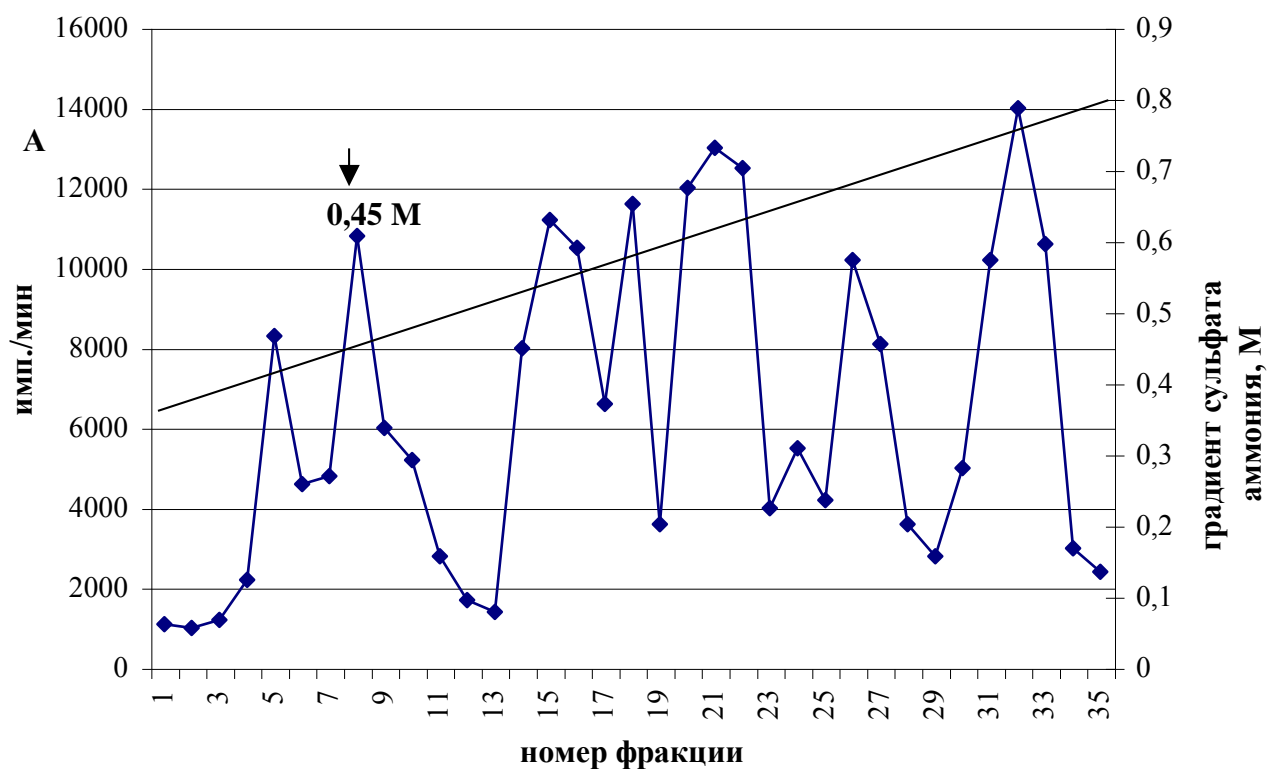


Рис. 9. А. Кривая элюции РНК-полимеразы III из плаценты человека с колонки Нерарин Нупер D М линейным градиентом концентрации сульфата аммония.

Б. Кривая элюции субфракций РНК-полимеразы III – IIIa и IIIб, из плаценты человека с колонки ДЕАЕ-сефадекс А-25 линейным градиентом концентрации сульфата аммония.

РНК-полимеразную активность определяли как описано в «Материалах и методах».

4.3.3. Ультрацентрифугирование РНК-полимеразы III в градиенте плотности глицерина

Далее субфракции РНК-полимеразы IIIа и IIIб очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности глицерина 17,5–35%. Как и в случае использования метода выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер плаценты человека с использованием ДЕАЕ-сефадекса А-25 и фосфоцеллюлозы Р11, при ультрацентрифугировании в градиенте плотности глицерина 17,5–35,0% (90000×g) субформы РНК-полимеразы IIIа и IIIб выявляются в разных зонах градиента (рис. 10). РНК-полимераза IIIа выявляется в зоне с меньшей (~25%), а РНК-полимераза IIIб – в зоне с большей (~33%) плотностью глицерина. Как уже отмечалось, это указывает на то, что РНК-полимераза IIIб имеет большую плавучую плотность, чем РНК-полимераза IIIа, что может объясняться либо несовпадением молекулярных масс субформ, либо различиями в упаковке молекул.

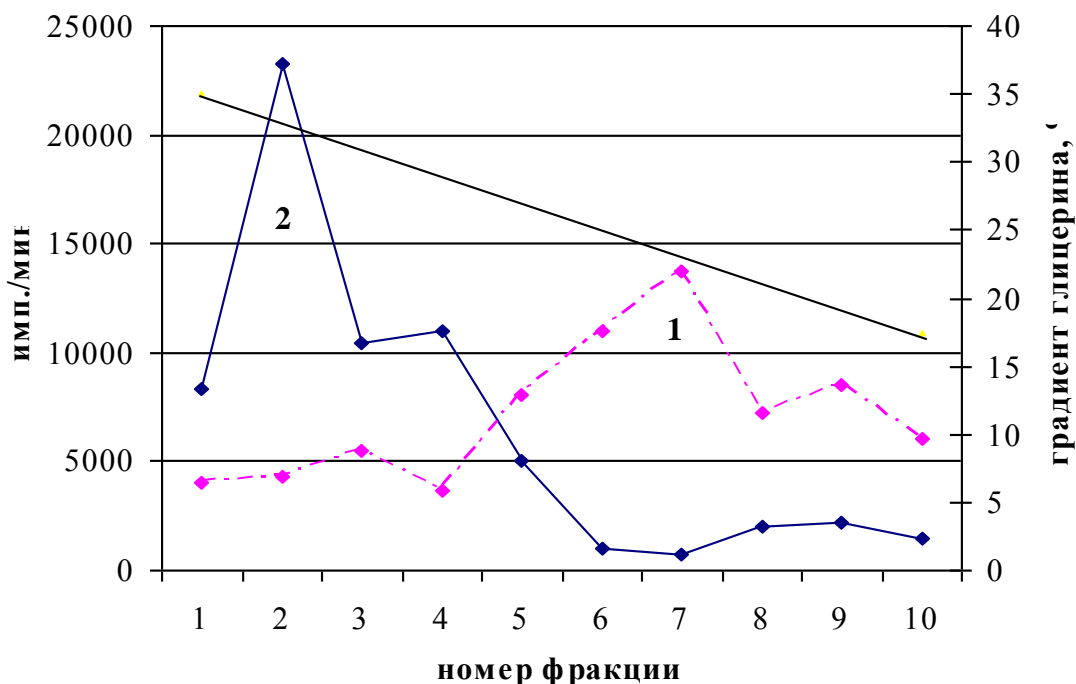


Рис. 10. Оценка РНК-полимеразной активности субфракций РНК-полимеразы III (IIIа и IIIб) из плаценты человека после ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина по включению в РНК [^3H]-УТР:

1 – РНК-полимераза IIIа; 2 – РНК-полимераза IIIб.

4.4. Фосфорилирование субформ РНК-полимеразы III плаценты человека – IIIа и IIIб, полученных с использованием хроматографии на гепарине Heparin Hyper D M и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина, ассоциированной протеинкиназной активностью

Мы проверили, соочищается ли протеинкиназная активность, фосфорилирующая РНК-полимеразу III *in vitro*, с субформами IIIа и IIIб, полученными новым методом – с использованием хроматографии на гепарине Heparin Hyper D M и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина. Для этого фракции субформ РНК-полимеразы III – IIIа и IIIб, полученные из ядер плаценты человека двумя разными

	М	1	2	3	4	5	6	7	8
$\gamma[^{32}\text{P}] \text{ АТР}$		+	+	+	+	+	+	+	+
GTP		-	-	-	-	+	+	+	+



Рис. 11. Фосфорилирование РНК-полимераз IIIа и IIIб из плаценты человека, полученных разными способами, ассоциированной протеинкиназной активностью в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}] \text{ АТР}$. На рисунке представлена автордиограмма геля после диск-электрофореза в 9% ПААГ с SDS РНК-полимераз IIIа и IIIб (по 0,3 Е транскрипционной активности), инкубированных в присутствии меченого $\gamma[^{32}\text{P}] \text{ АТР}$ в отсутствие (дорожки 1–4) или в присутствии (дорожки 5–8) холодного GTP.

1, 5 – РНК-полимераза IIIа, выделенная с применением ДЕАЕ-сефадекса А-25 и фосфоцеллюлозы Р11;

2, 6 – РНК-полимераза IIIб, выделенная с применением ДЕАЕ-сефадекса А-25 и фосфоцеллюлозы Р11;

3, 7 – РНК-полимераза IIIа, выделенная с применением Heparin Hyper D M и ДЕАЕ-сефадекса А-25;

4, 8 – РНК-полимераза IIIб, выделенная с применением Heparin Hyper D M и ДЕАЕ-сефадекса А-25;

М – маркеры молекулярных масс, кДа.

способами, инкубировали в присутствии γ [^{32}P]-АТФ. Пробы анализировали диск-электрофорезом с SDS в 9 % ПААГ. На автордиограмме геля (рис. 11, дорожки 1–4) можно видеть, что протеинкиназная активность присутствует в препаратах обеих субформ РНК-полимеразы III, полученных с помощью разных методов (Никитина и др., 2002б). Таким образом, поскольку применение нового метода выделения и очистки фермента из ядер плаценты человека не привело к потере препаратами протеинкиназной активностью, можно предположить, что протеинкиназа, фосфорилирующая РНК-полимеразу III *in vitro*, достаточно прочно ассоциирована с полимеразой и является либо одной из субъединиц РНК-полимеразы III, либо компонентом ее холофермента. Далее для экспериментов по исследованию свойств протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека, если не указано иначе, использовали препараты субфракций IIIа и IIIб, полученные с применением ДЕАЕ-сефадекса А-25, фосфоцеллюлозы P11 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина.

4.5. Изучение кинетики фосфорилирования РНК-полимеразы IIIа из ядер плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью

Препарат РНК-полимеразы IIIа с ассоциированной протеинкиназной активностью инкубировали в присутствии γ [^{32}P]-АТФ в течение 2, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120, 180 и 240 мин. Пробы анализировали методом диск-электрофореза в 9 % ПААГ с SDS. Анализируя радиоавтограф геля (рис. 12, А) и график зависимости уровня фосфорилирования белка от времени инкубации пробы (рис. 12, Б), можно видеть, что максимальный уровень включения метки в белок достигается через 120 мин после начала реакции. При дальнейшей инкубации проб уровень фосфорилирования белка остается постоянным, что свидетельствует об отсутствии в препарате РНК-полимеразы IIIа протеинфосфатазной активности (Никитина и др., 2002а).

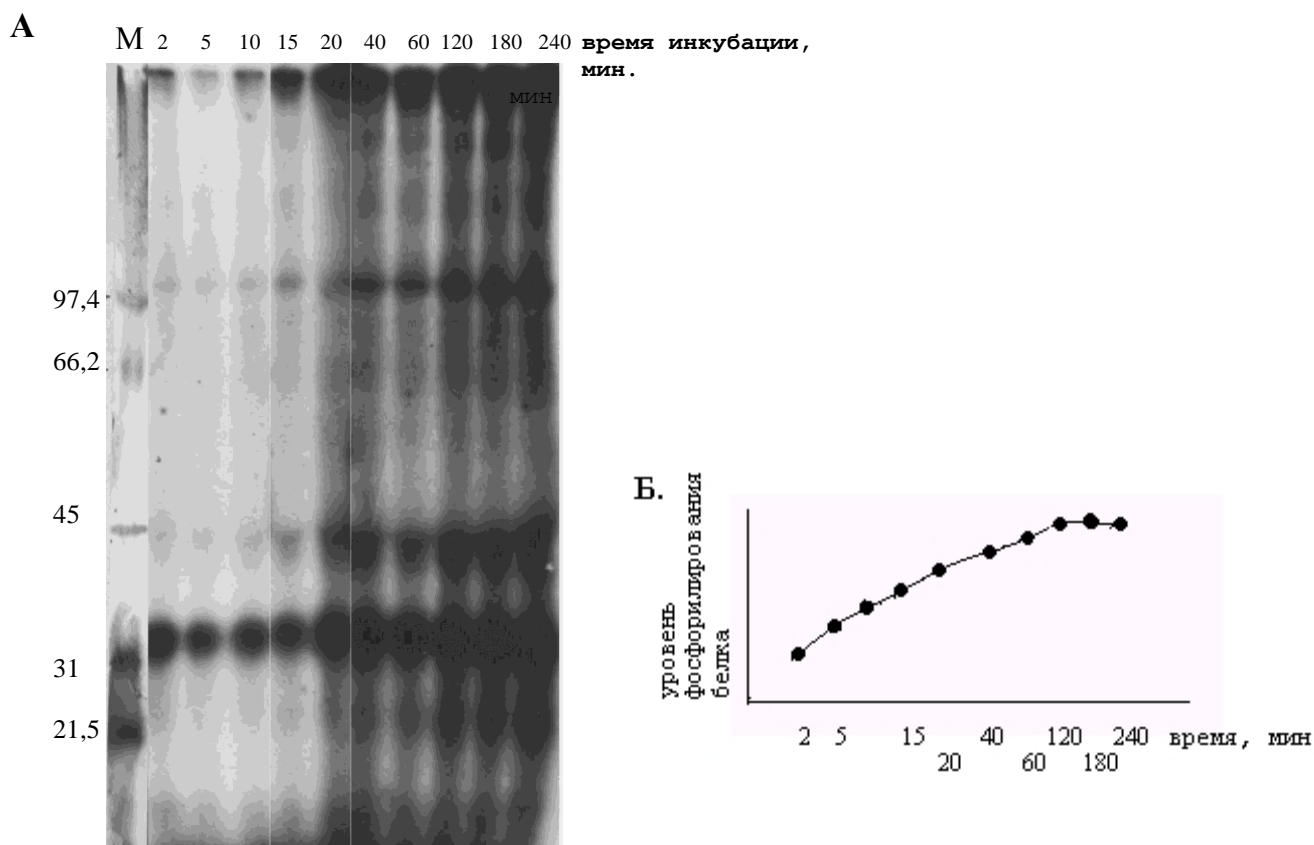


Рис. 12. Кинетика фосфорилирования РНК-полимеразы III ассоциированной протеинкиназной активностью. А – Авторадиограмма геля после диск-электрофореза в 9% ПААГ с SDS РНК-полимеразы III (0,3 Е транскрипционной активности), инкубированной в присутствии меченого γ [^{32}P]-АТФ в течение указанного времени; Б – график зависимости уровня включения метки в белок (для примера взят полипептид с молекулярной массой примерно 98 кДа; кинетика для всех полипептидов была одинаковой) от времени инкубации пробы (построен на основе денситограммы авторадиограммы геля).

М – маркеры молекулярных масс, кДа.

4.6. Изучение кинетики фосфорилирования РНК-полимеразы Шб из ядер плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью

Препарат РНК-полимеразы Шб плаценты человека с ассоциированной протеинкиназной активностью инкубировали в присутствии γ [^{32}P]-АТФ в течение 20, 40, 60, 120 и 180 мин. Пробы анализировали методом диск-электрофореза в 9 % ПААГ с SDS. При анализе радиоавтографа геля (рис. 13, А) и денситограммы радиоавтографа геля (рис. 13, Б) видно, что уровень включения метки в белок постепенно падает с увеличением времени инкубации, что свидетельствует о присутствии в препарате РНК-полимеразы Шб не только протеинкиназной, но и протеинфосфатазной активности. Можно предположить, что на первом этапе преобладает включение меченого фосфата в белок благодаря фосфорилированию, а затем в результате действия протеинфосфатазы происходит дефосфорилирование белков, и уровень включения метки падает. Полученные данные не позволяют нам исключить, что, возможно, ассоциированная с РНК-полимеразой Ш протеинфосфатаза дефосфорилирует не все сайты, по которым происходит фосфорилирование ассоциированной протеинкиназой.

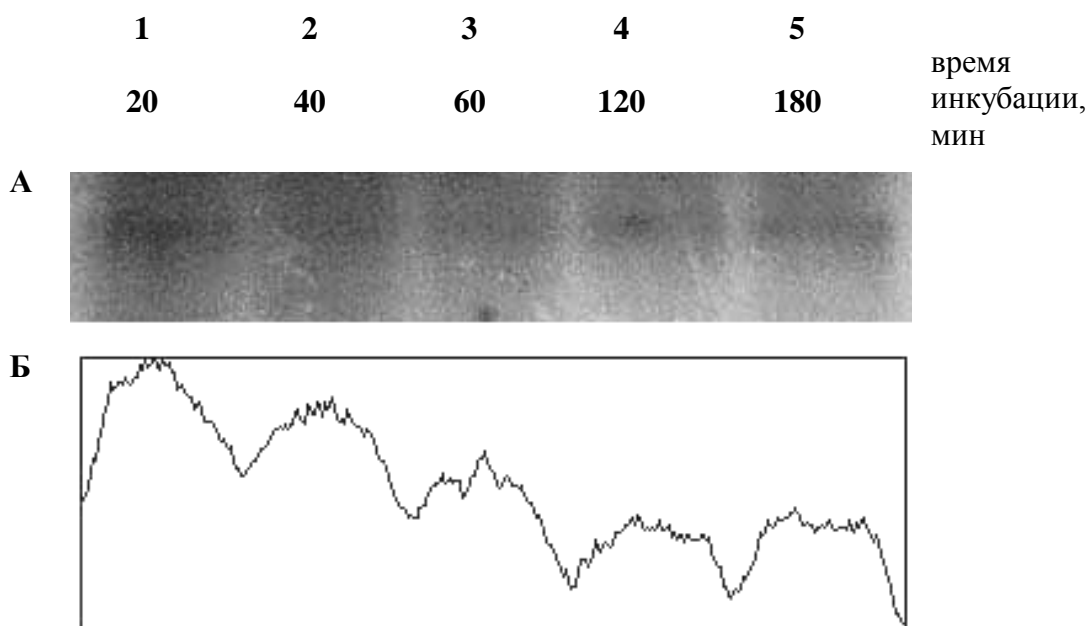
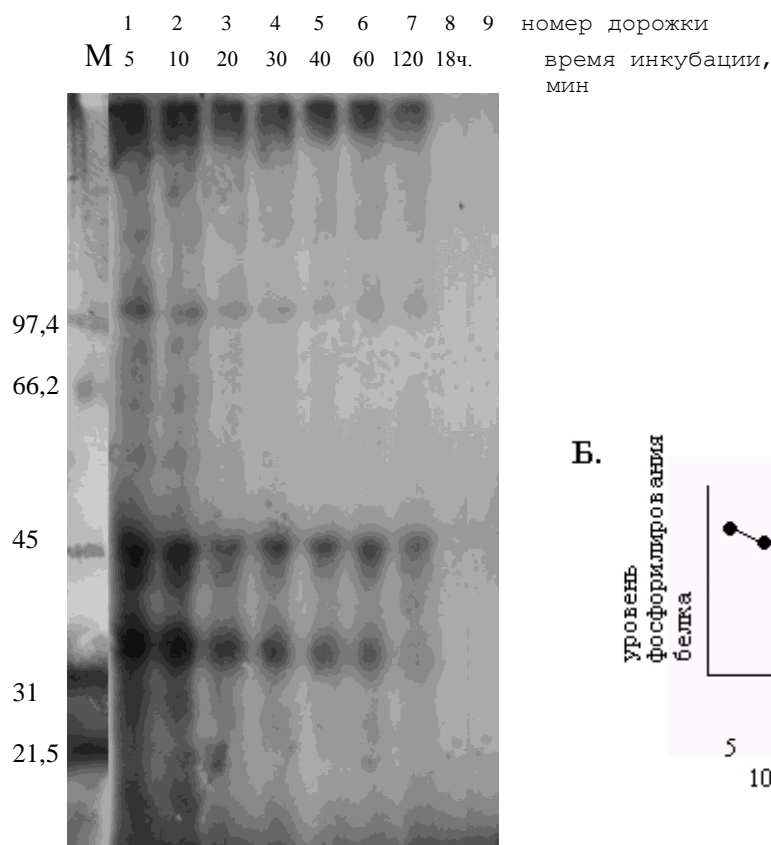


Рис. 13. Кинетика фосфорилирования РНК-полимеразы Шб ассоциированной протеинкиназной активностью. А – Авторадиограмма геля после диск-электрофореза в 9% ПААГ с SDS РНК-полимеразы Шб (0,3 Е транскрипционной активности), инкубированной в присутствии меченого γ [^{32}P]-АТФ в течение указанного времени; Б – денситограмма авторадиограммы геля (для примера взят полипептид с молекулярной массой примерно 98 кДа; кинетика для всех полипептидов была одинаковой).

4.7. Изучение кинетики дефосфорилирования РНК-полимеразы IIIa из ядер плаценты человека щелочной фосфатазой

Препарат РНК-полимеразы IIIa плаценты человека инкубировали в присутствии γ [32 P]-АТФ. Затем РНК-полимеразу III дефосфорилировали иммобилизованной на агарозе щелочной фосфатазой в течение 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120 мин и 18 ч (рис. 14, дорожки 1-8). Пробы анализировали методом диск-электрофореза в 9 % ПААГ с SDS. На радиоавтографе геля (рис. 14) видно, что щелочная фосфатаза дефосфорилирует все субъединицы, фосфорилированные протеинкиназой, ассоциированной с РНК-

А



Б.

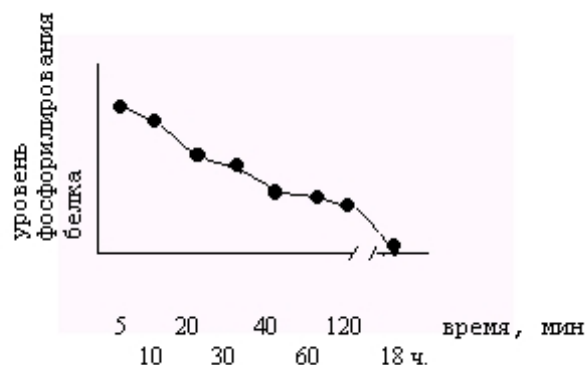


Рис. 14. Кинетика дефосфорилирования щелочной фосфатазой РНК-полимеразы IIIa, фосфорилированной ассоциированной протеинкиназой активностью в присутствии γ [32 P]-АТФ. А – Авторадиограмма геля после диск-электрофореза в 9% ПААГ с SDS 32 P-меченой РНК-полимеразы IIIa (0,3 Е транскрипционной активности), инкубированной в присутствии щелочной фосфатазы в течение указанного времени (дорожки 1–8) и РНК-полимеразы IIIa, дефосфорилированной щелочной фосфатазой, и затем инкубированной в присутствии γ [32 P]-АТФ (дорожка 9); Б – график зависимости уровня включения метки в белок (полипептид с молекулярной массой примерно 98 кДа) от времени инкубации пробы (построен на основе денситограммы авторадиограммы геля, дорожки 1–8).

М – маркеры молекулярных масс, кДа.

полимеразой III. Далее мы проверили, способна ли протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразой III, фосфорилировать РНК-полимеразу III, дефосфорилированную щелочной фосфатазой. Для этого после дефосфорилирования РНК-полимеразы IIIа иммобилизованную щелочную фосфатазу удаляли из системы центрифугированием, а препарат полимеразы, содержащий протеинкиназную активность, инкубировали в присутствии γ [^{32}P]-АТФ (рис. 14, дорожка 9). Можно видеть, что дефосфорилированная РНК-полимераза III не подвергается фосфорилированию протеинкиназой, ассоциированной с полимеразой (рис. 14, дорожка 9). Это может объясняться либо тем, что данная протеинкиназа может использовать как субстрат только уже частично фосфорилированную другой киназой РНК-полимеразу III, либо тем, что киназа сама инактивируется при дефосфорилировании щелочной фосфатазой (Никитина и др., 2002а).

4.8. Изучение способности протеинкиназной активности, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека, использовать GTP в качестве источника фосфатной группы

Мы проверили, способна ли протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразой III, использовать в качестве источника фосфатной группы кроме АТФ также и GTP. Для этого фосфорилирование РНК-полимеразы III из плаценты человека (обеих субформ, полученных двумя разными способами) проводили либо в присутствии только γ [^{32}P]-АТФ (рис. 11, дорожки 1–4), либо при одновременном присутствии γ [^{32}P]-АТФ и холодного GTP (рис. 11, дорожки 5–8). Можно видеть, что в присутствии холодного GTP включение меченого фосфата в пептиды значительно снижено (рис. 11, ср. дорожки 1–4 и 5–8). Это свидетельствует о том, что протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразами IIIа и IIIб, способна использовать в качестве субстрата как АТФ, так и GTP (Никитина и др., 2002в). Известно, что протеинкиназа СКII способна использовать в качестве субстрата и АТФ, и GTP (Pinna, 1997). Однако и некоторые другие протеинкиназы также могут использовать GTP как субстрат, поэтому мы не можем утверждать, что ассоциированная с РНК-полимеразой III протеинкиназа является киназой СКII.

4.9. Ингибиторный анализ протеинкиназной активности, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека

Для выяснения природы протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека, был проведен анализ с использованием специфических ингибиторов протеинкиназ, принадлежащих к различным семействам: вортманнина – специфического



Рис. 15. Ингибиторный анализ протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека. РНК-полимеразу IIIа (0,3 Е транскрипционной активности) фосфорилировали ассоциированной протеинкиназной активностью в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и ингибиторов, специфичных к различным протеинкиназам, и анализировали электрофорезом в 9% ПААГ с SDS. На рисунке представлена автордиограмма геля.

- 1 – контроль: РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ без ингибиторов;
- 2 – РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и DMSO (растворителя вортманнина);
- 3 – РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и 200 нМ вортманнина (ингибитора Р13-киназ);
- 4 – РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и этанола (растворителя DRB);
- 5 – РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и 60 мкМ DRB (ингибитора киназы СКII и киназы Р-TEFb);
- 6 – РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и 150 мкМ DRB;
- 7 – РНК-полимеразу IIIа инкубировали в присутствии $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и 2 мкМ хелеритрина (ингибитора протеинкиназы С).

ингибитора семейства PI3-киназ; DRB – ингибитора Р-TEFb-киназы, фосфорилирующей STD-домен РНК-полимеразы II, и киназы СКII; хелеритрина – ингибитора протеинкиназы С. РНК-полимеразу III фосфорилировали в присутствии γ [32 P]-АТФ и ингибиторов. Пробы анализировали диск-электрофорезом в 9 % ПААГ с SDS. Уровень фосфорилирования РНК-полимеразы III оценивали по включению метки в субъединицы полимеразы. На рис. 15 представлен радиоавтограф геля. Видно, что фосфорилирование РНК-полимеразы III ассоциированной протеинкиназой почти полностью подавляется вортманнином (ингибитором PI3-киназ) в концентрации 200 нМ (рис. 15, ср. дорожки 2 и 3) и не подавляется DRB в концентрации 60 и 150 мкМ (рис. 15, ср. дорожку 4 и дорожки 5, 6) и хелеритрином в концентрации 2 мкМ (рис. 15, ср. дорожки 4 и 7) (Никитина, 2001а; Никитина, 2001б; Никитина и др., 2001; Никитина и др., 2002а). Ранее мы показали, что протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразой III плаценты человека, способна использовать в качестве субстрата GTP, что характерно для киназы СКII (см. п. 4.8.). Данные ингибиторного анализа показали, что ингибитор киназы СКII – DRB, не подавляет исследуемую протеинкиназную активность (рис. 15, ср. дорожку 4 и дорожки 5, 6). Таким образом, ассоциированная с РНК-полимеразой III плаценты человека протеинкиназа, по-видимому, относится к семейству инозитолфосфат-3-киназ, т.к. её активность подавлялась специфичным ингибитором киназ данного семейства – вортманнином. Возможным кандидатом является TOR-киназа, для которой показано влияние на транскрипцию генов класса III у дрожжей (Schultz, 1999).

4.10. Проверка корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III плаценты человека *in vitro*

Прежде чем исследовать влияние фосфорилирования РНК-полимеразы III на интенсивность транскрипции *in vitro*, мы показали, что полимераза, выделенная из ядер плаценты человека многоступенчатым методом, включающим высаливание сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина, способна осуществлять корректную транскрипцию *in vitro*, (рис. 16) (Никитина, 1998; Никитина и др., 1998; Седова и др., 2000). В эксперименте в качестве матрицы использовали плазмиду pCRTM2.1 со вставкой AT, несущей последовательность A_n-повтора (представитель генов класса III с промотором 2-го типа и несколькими терминаторами для РНК-полимеразы III) (Chu *e.a.*, 1995). Согласно литературным данным, для корректной транскрипции генов класса III с промоторами 2-го типа РНК-полимеразе III человека необходимы базальные транскрипционные факторы TFIIIB, TFIIIC1 и TFIIIC2 (Wang, Roeder, 1996). Поэтому для контроля корректности транскрипции мы использовали фракции ядерного экстракта 0,35 М КСl и 0,6 М КСl,

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pol IIIa	+	+	+	+	-	-	-	-	-
pol IIIb	-	-	-	-	-	-	-	+	+
0,35M	-	+	-	+	+	+	-	-	+
0,6M	-	-	+	+	+	-	+	-	+

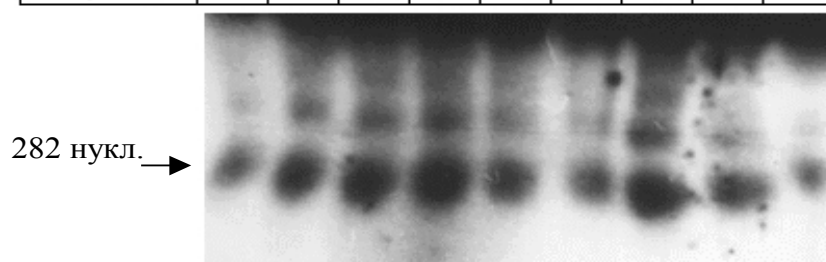


Рис. 16. Проверка корректности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III плаценты человека *in vitro*. Радиоавтограф геля после электрофореза в 6% ПААГ с 7 М мочевиной РНК-продуктов, меченных радиоактивным фосфором ³²P. Числами в таблице указаны номера дорожек, на которые нанесены пробы, содержащие (+) или не содержащие (-) соответствующие субформы РНК-полимеразы III и фракции ядерного экстракта.

pol IIIa и pol IIIb - РНК-полимераза IIIa и б,

0,35 М - фракция ядерного экстракта, элюируемая с фосфоцеллюлозы P11 0,35 М КСl,

0,6 М - фракция ядерного экстракта, элюируемая с фосфоцеллюлозы P11 0,6 М КСl.

содержащие эти транскрипционные факторы (Wang, Roeder, 1996). Транскрипцию *in vitro* осуществляли как описано в «Материалах и методах». Пробы 1-4, 8, 9 содержали 0,3 Е РНК-полимеразы III, пробы 2, 4-6, 9 – 10 мкл фракции 0,35 М КСl, пробы 3–5, 7, 9 – 10 мкл фракции 0,6 М КСl. Электрофорез меченых РНК-продуктов транскрипции и последующая автордиография геля показали, что обе субформы выделенной нами РНК-полимеразы III плаценты человека способны синтезировать полноразмерный транскрипт размером 282 нуклеотида (т.е. осуществлять корректную инициацию, элонгацию и терминацию транскрипции) как в присутствии фракций ядерного экстракта 0,35 М КСl и 0,6 М КСl, содержащих транскрипционные факторы TFIIIB, TFIIIC1 и TFIIIC2 (рис. 16, пробы 2-4 для субформы IIIa и проба 9 для субформы IIIб), так и в отсутствие этих фракций (рис. 16, проба 1 для субформы IIIa и проба 8 для субформы IIIб). Кроме того, фракции 0,35 М КСl и 0,6 М КСl также обладают транскрипционной активностью (рис. 16, пробы 5-7), что указывает на присутствие в них РНК-полимеразы III. Наличие нескольких РНК-продуктов транскрипции объясняется присутствием в составе ДНК-последовательности, используемой в качестве матрицы, нескольких терминаторов, причем наиболее сильному терминатору соответствует РНК-продукт наименьшего размера (рис. 16) (Никитина и др., 1998).

Полученные результаты могут свидетельствовать либо о возможности корректной транскрипции РНК-полимеразой III на Alu-матрице в отсутствие транскрипционных факторов TFIIIB, TFIIIC1 и TFIIIC2 либо о присутствии этих факторов в использованном препарате РНК-полимеразы III.

4.11. Влияние фосфорилирования РНК-полимеразы IIIa и IIIб плаценты человека на интенсивность транскрипции *in vitro*

Для изучения влияния фосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека на интенсивность транскрипции *in vitro* полимеразу фосфорилировали ассоциированной протеинкиназной активностью. Далее фосфорилированную РНК-полимеразу III использовали для проведения транскрипции *in vitro* на Alu-матрице (рис. 17 и 18).

Анализ ^{32}P -меченых РНК-продуктов транскрипции выявил, что усиление интенсивности транскрипции наблюдается в случае дополнительного фосфорилирования РНК-полимеразы IIIa в присутствии ДНК-матрицы до проведения транскрипции (рис. 17, проба 5), причем преинкубация РНК-полимеразы IIIa с матрицей препятствует этому эффекту (рис. 17, проба 4) (Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002б). Можно предположить, что протеинкиназа, фосфорилирующая РНК-полимеразу IIIa, является ДНК-зависимой, причем киназа должна связаться с матрицей раньше или одновременно с полимеразой. Происходящее в результате преинкубации связывание полимеразы с матрицей может делать недоступными для киназы те сайты фосфорилирования, которые должны модифицироваться для активации транскрипции. В пользу того, что

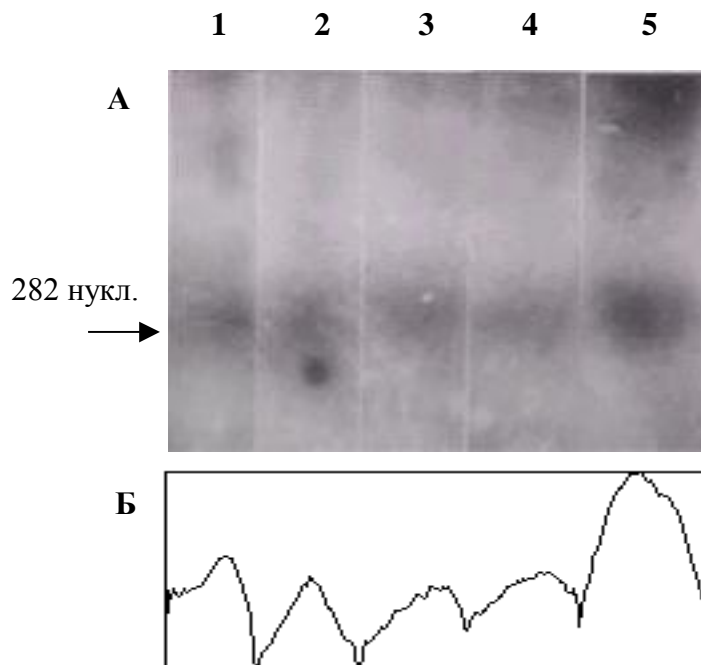


Рис. 17. Влияние фосфорилирования РНК-полимеразы IIIa ассоциированной протеинкиназной активностью на интенсивность транскрипции in vitro Alu-содержащей матрицы. Интенсивность транскрипции оценивали по включению $\alpha[^{32}\text{P}]$ -АТР в РНК. Меченые РНК-продукты анализировали электрофорезом в 6% ПААГ с 7 М мочевиной. На рисунке представлены: автордиограмма геля (А) и денситограмма автордиограммы (Б):

- 1 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, выделенной из ядер клеток плаценты человека;
- 2 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, фосфорилированной в отсутствие ДНК;
- 3 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa после её инкубации в течение 30 мин при 37°C в условиях, используемых для фосфорилирования, но в отсутствие АТР;
- 4 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, фосфорилированной после преинкубации с матрицей в течение 5 мин при комнатной температуре;
- 5 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, фосфорилированной в присутствии ДНК-матрицы до проведения транскрипции.

протеинкиназа является ДНК-зависимой, говорит и тот факт, что влияние на транскрипцию не наблюдается в случае фосфорилирования свободной РНК-полимеразы IIIa, в отсутствие матрицы (рис. 17, проба 2). Мы показали, что ассоциированная протеинкиназа может фосфорилировать РНК-полимеразу IIIa и в отсутствие ДНК (рис. 8, дорожка 1). Возможно, в состав этой фракции входит несколько протеинкиназ, способных фосфорилировать РНК-полимеразу IIIa, – ДНК-зависимые и ДНК-независимые. Нельзя также исключить того, что одна и та же протеинкиназа может фосфорилировать РНК-полимеразу IIIa *in vitro* как в присутствии, так и в отсутствие ДНК, причем лишь в первом случае фосфорилирование полимеразы происходит по «правильным» сайтам и вызывает активацию транскрипции. Кроме того, известно, что фосфорилирование должно проходить не только по определенным сайтам белка-мишени, но и на определенном этапе многостадийного процесса, каким является и процесс транскрипции. То есть, возможно, с матрицей должна связаться нефосфорилированная РНК-полимераза III, а для активации транскрипции она должна быть модифицирована киназой при переходе к синтезу РНК (инициации) или во время элонгации транскрипта. Если же фосфорилирование РНК-полимеразы III происходит до ее связывания с ДНК-матрицей, фосфорилированная полимеразы менее эффективно ассоциирует в состав преинициального комплекса, что препятствует активации транскрипции. Уровень транскрипционной активности зависит также от времени, в течение которого происходило фосфорилирование: если РНК-полимеразу III дополнительно фосфорилировали до проведения транскрипции, активность выше, чем в том случае, когда фосфорилирование и транскрипция осуществлялись одновременно (рис. 17, ср. дорожки 1 и 5; см. также рис. 12) (Никитина, 1998; Никитина и др., 1998; Седова и др., 2000; Никитина, 2001a; Никитина, 2001б; Никитина и др., 2001; Никитина и др., 2002б).

В случае РНК-полимеразы IIIб (рис. 18) не наблюдается увеличения уровня транскрипции *Alu*-матрицы после фосфорилирования полимеразы в присутствии ДНК (рис. 18, ср. дорожки 1 и 2) или после преинкубации с ДНК (рис. 18, ср. дорожки 1 и 4). Снижение уровня транскрипции происходит в случае фосфорилирования РНК-полимеразы III в отсутствие ДНК-матрицы (до начала транскрипции). Полученные данные свидетельствуют о том, что РНК-полимераза IIIб должна находиться в дефосфорилированном состоянии для эффективного связывания с ДНК-матрицей (рис. 18, дорожки 1, 2, 4). Такое дефосфорилированное состояние может поддерживать ассоциированная с полимеразой протеинфосфатаза (см. п. 4.6.). В том же случае, когда РНК-полимераза IIIб инкубируется с АТФ в отсутствие ДНК, происходит как

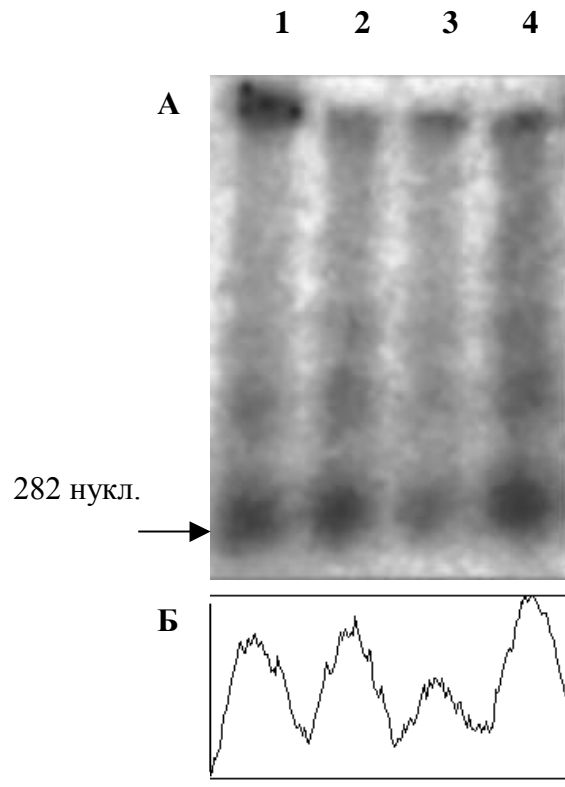


Рис. 18. Влияние фосфорилирования РНК-полимеразы Шб ассоциированной протеинкиназной активностью на интенсивность транскрипции *in vitro* Alu-содержащей матрицы. Интенсивность транскрипции оценивали по включению $\alpha[^{32}\text{P}]$ -АТР в РНК. Меченые РНК-продукты анализировали электрофорезом в 6% ПААГ с 7 М мочевиной. На рисунке представлены: автордиограмма геля (А) и денситограмма автордиограммы (Б).

- 1 – контроль: интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой Шб, выделенной из плаценты человека;
- 2 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой Шб, фосфорилированной в присутствии ДНК-матрицы до транскрипции;
- 3 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой Шб, фосфорилированной в отсутствие ДНК до транскрипции;
- 4 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой Шб, фосфорилированной после преинкубации с ДНК-матрицей до транскрипции.

фосфорилирование полимеразы ассоциированной протеинкиназой, так и ее дефосфорилирование ассоциированной протеинфосфатазой. При этом, как свидетельствуют данные по кинетике фосфорилирования РНК-полимеразы Шб (см. п. 4.6. и рис. 13), фосфорилирование происходит интенсивнее, чем дефосфорилирование: через 40 мин инкубации уровень включения меченого фосфата в белок достаточно высок. Можно предположить, что инкубация РНК-полимеразы Шб с АТР в отсутствие ДНК в течение 40 мин приводит к тому, что часть полимеразы переходит в фосфорилированное состояние и не может эффективно связаться с матрицей, что, в свою очередь, ведет к

падению уровня транскрипции *in vitro*. Как уже говорилось, мы не можем исключить, что протеинфосфатаза дефосфорилирует лишь некоторые сайты, фосфорилированные протеинкиназой. Тогда под действием киназы РНК-полимераза Шб переходит в «гиперфосфорилированное» состояние, а протеинфосфатаза переводит ее в «гипофосфорилированную» форму. Однако очевидно, что и в этом случае для активации транскрипции в использованной нами системе *in vitro* достаточно действия на препарат РНК-полимеразы Шб ассоциированной протеинфосфатазы с переводом первой в гипофосфорилированную форму.

Таким образом, наши данные позволяют предположить, что для эффективного связывания с матрицей РНК-полимераза Ш должна находиться в нефосфорилированном (или гипофосфорилированном) состоянии. Ассоциированная с полимеразой протеинкиназа может активировать транскрипцию только действуя уже после образования преинициального комплекса. Возможно, более высокая транскрипционная активность препарата РНК-полимеразы Шб может быть связана с присутствием в его составе как протеинкиназы, так и протеинфосфатазы. При этом протеинкиназа активирует инициацию транскрипции, а протеинфосфатаза переводит РНК-полимеразу Ш в компетентную к связыванию с промотором де- или гипофосфорилированную форму. Отсутствие протеинфосфатазы в препарате РНК-полимеразы Ша приводит к тому, что после первого раунда транскрипции полимеразы остается в гиперфосфорилированной форме и с низкой эффективностью связывается с ДНК для реинициации синтеза РНК.

4.12. Влияние дефосфорилирования РНК-полимеразы Ша и Шб плаценты человека на интенсивность транскрипции *in vitro*

РНК-полимеразу Ша и Шб дефосфорилировали щелочной фосфатазой, иммобилизованной на агарозе, затем фосфатазу удаляли центрифугированием и проводили транскрипцию *in vitro* на Alu-матрице. Уровень транскрипции оценивали по включению α [^{32}P]-АТФ-предшественника в РНК-транскрипты после их электрофоретического разделения в 6 % ПААГ в присутствии 7 М мочевины. На рис. 19 и 20 представлены авторадиограммы гелей. Наличие нескольких РНК-транскриптов объясняется присутствием в специфической матрице нескольких сайтов терминации для РНК-полимеразы Ш (Chu et al., 1995).

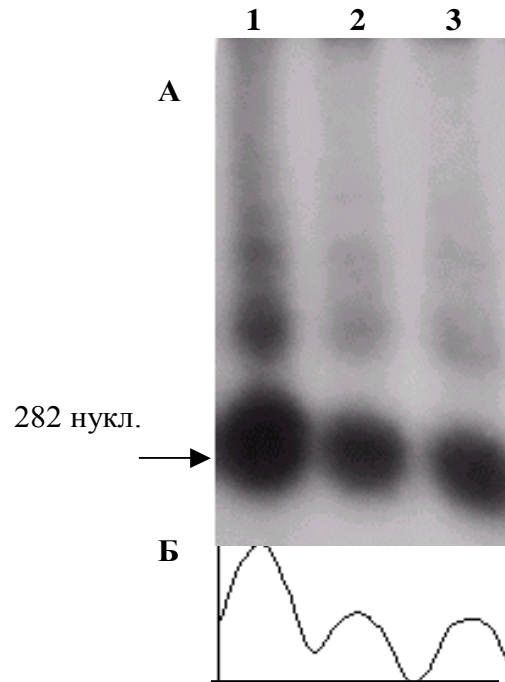


Рис. 19. Влияние дефосфорилирования РНК-полимеразы IIIa щелочной фосфатазой на уровень транскрипции *in vitro* Alu-содержащей матрицы. Интенсивность транскрипции оценивали по включению α [^{32}P]-АТФ в РНК. Меченые РНК-продукты анализировали электрофорезом в 6% ПААГ с 7 М мочевиной. На рисунке представлены: автордиограмма геля (А) и денситограмма автордиограммы (Б).
 1 – контроль: интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, выделенной из плаценты человека, при транскрипции на Alu-матрице;
 2 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, дефосфорилированной щелочной фосфатазой, иммобилизированной на агарозе, при транскрипции на Alu-матрице;
 3 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой IIIa, дефосфорилированной щелочной фосфатазой, иммобилизированной на агарозе, и затем инкубированной в присутствии АТФ, при транскрипции на Alu-матрице (иммобилизованную фосфатазу удаляли центрифугированием при 11000×g).

Можно видеть, что дефосфорилирование РНК-полимеразы IIIa снижает уровень транскрипции Alu-матрицы *in vitro* (рис. 19, дорожка 2) по сравнению с контролем (рис. 19, дорожка 1). Дефосфорилированная РНК-полимераза IIIa была подвергнута повторному фосфорилированию в присутствии АТФ, что не привело к восстановлению первоначального уровня транскрипции (рис. 19, дорожка 3). Это можно объяснить тем, что, как нами было показано, ассоциированная с полимеразой протеинкиназа не способна фосфорилировать РНК-полимеразу IIIa, дефосфорилированную щелочной фосфатазой (рис. 14, дорожка 9). Полученные данные свидетельствуют, что фосфорилирование РНК-полимеразы IIIa является регуляторной модификацией, способной повышать уровень транскрипции, а дефосфорилирование РНК-полимеразы IIIa снижает уровень транскрипции. Тот факт, что дефосфорилированная РНК-полимераза IIIa продолжает корректно транскрибировать матрицу, хотя и с меньшей эффективностью, говорит в пользу того, что фосфорилирование необходимо для активации базального уровня транскрипции, но не для правильной инициации и терминации транскрипции на Alu-матрице (Никитина, 2001a; Никитина, 2001б; Никитина и др., 2001; Никитина и др., 2002a).

Дефосфорилирование РНК-полимеразы Шб щелочной фосфатазой приводит к подавлению транскрипции *in vitro* на Alu-матрице лишь в том случае, если полимеразу дефосфорилируют до ее взаимодействия с ДНК-матрицей (рис. 20, ср. дорожки 1 и 3), но не в случае, когда щелочную фосфатазу добавляли в пробу уже после взаимодействия РНК-полимеразы Шб с ДНК (рис. 20, ср. дорожки 1 и 2). Таким образом, РНК-полимераза Шб после связывания с ДНК-матрицей недоступна для воздействия щелочной фосфатазы. Как было показано (см. п. 4.6.), с РНК-полимеразой Шб ассоциирована не только протеинкиназная, но и протеинфосфатазная активность. Можно предположить, что щелочная фосфатаза дефосфорилирует РНК-полимеразу Шб по другим сайтам, чем ассоциированная с полимеразой фосфатаза, так как действие последней необходимо для более высокого уровня транскрипции *in vitro*, по-видимому, для эффективного связывания РНК-полимеразы Ш с матрицей (рис. 18). Действие же щелочной фосфатазы до связывания полимеразы с ДНК снижает уровень транскрипции *in vitro* (рис. 20, дорожка 3).

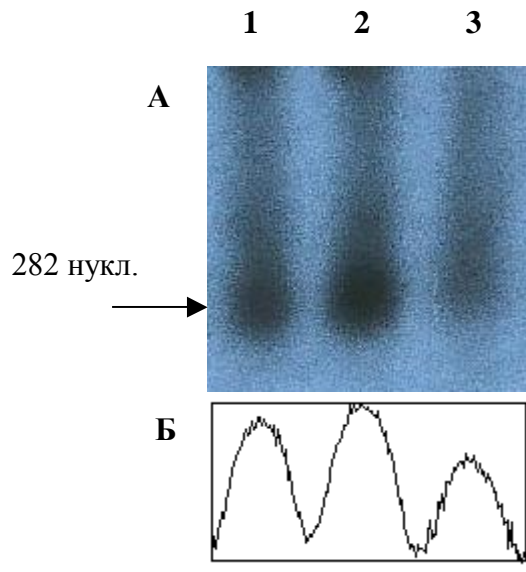


Рис. 20. Влияние дефосфорилирования РНК-полимеразы Шб щелочной фосфатазой на уровень транскрипции *in vitro* Alu-содержащей матрицы. Интенсивность транскрипции оценивали по включению α [^{32}P]-АТФ в РНК. Меченые РНК-продукты анализировали электрофорезом в 6% ПААГ с 7 М мочевиной. На рисунке представлены: автордиограмма геля (А) и денситограмма автордиограммы (Б).

- 1 – контроль: интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой Шб, выделенной из плаценты человека, при транскрипции на Alu-матрице
- 2 – интенсивность включения ^{32}P в РНК при транскрипции на Alu-матрице РНК-полимеразой Шб, дефосфорилированной щелочной фосфатазой после инициации транскрипции в присутствии ДНК и АТФ;
- 3 – интенсивность включения ^{32}P в РНК РНК-полимеразой Шб, дефосфорилированной щелочной фосфатазой, иммобилизированной на агарозе, при транскрипции на Alu-матрице.

4.13. Выделение и очистка РНК-полимеразы III из клеток эпидермоидной карциномы человека А431 с использованием хроматографии на гепарине и ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина

Для выделения и очистки РНК-полимеразы III из ядер клеток эпидермоидной карциномы человека А431 нами был модифицирован метод, используемый для получения этого фермента из клеток дрожжей (Huet *e.a.*, 1996). Как уже отмечалось, модификации касались этапов получения ядер и ядерного экстракта и использования ДЕАЕ-сефадекса А-25 вместо Моно Q (см. п. 4.3) (Никитина и др., 2002б).

4.13.1. Выделение РНК-полимеразы III из клеток А431 фракционированием на гепарине Нерагін Нупер D M

При разделении ядерного экстракта из клеток А431 на колонке Нерагін Нупер D M элюцией линейным градиентом концентрации сульфата аммония 0,365–0,8 М были получены фракции, соответствующие ионной силе примерно 0,45 М сульфата аммония и содержащие смесь РНК-полимераз I и III (рис. 21, А) (Huet *e.a.*, 1996).

4.13.2. Очистка РНК-полимераз III из клеток А431 на ДЕАЕ-сефадексе А-25

Разделение РНК-полимераз I и III далее проводили на колонке ДЕАЕ-сефадекса А-25. Для этого фракции, собранные после разделения ядерного экстракта на гепарине, наносили на колонку сефадекса и элюировали линейным градиентом концентрации сульфата аммония 0,2–0,7 М. Были выявлены два пика РНК-полимеразной активности, соответствующие двум субформам РНК-полимеразы III – IIIа и IIIб (рис. 21, Б).

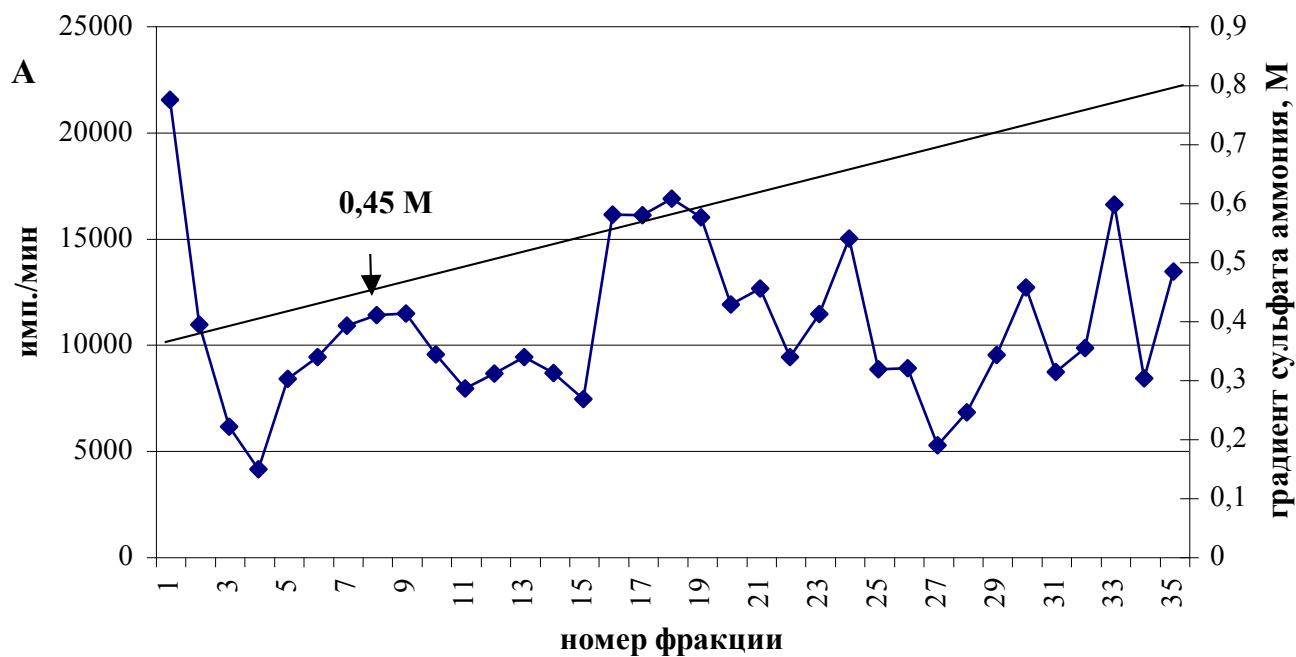


Рис. 21. А. Кривая элюции РНК-полимеразы III из клеток А431 с колонки Нерагип Нурер D M линейным градиентом концентрации сульфата аммония.

Б. Кривая элюции субфракций РНК-полимеразы III – IIIa и IIIб, из клеток А431 с колонки ДЕАЕ-сефадекс А-25 линейным градиентом концентрации сульфата аммония.

РНК-полимеразную активность определяли как описано в «Материалах и методах».

4.13.3. Ультрацентрифугирование РНК-полимеразы III из клеток A431 в градиенте плотности глицерина

Полученные субформы РНК-полимеразы III далее центрифугировали в градиенте плотности глицерина 17,5–35%. Так же как и в случае РНК-полимеразы III из плаценты человека, субформы РНК-полимеразы IIIа и IIIб клеток A431 выявляются в разных зонах градиента (рис. 22): РНК-полимераза IIIа – в зоне с меньшей, а РНК-полимераза IIIб – в зоне с большей плотностью глицерина. Таким образом, в клетках A431 также присутствуют две субформы РНК-полимеразы III, по своим свойствам схожие с двумя субформами РНК-полимеразы III ядер плаценты человека.

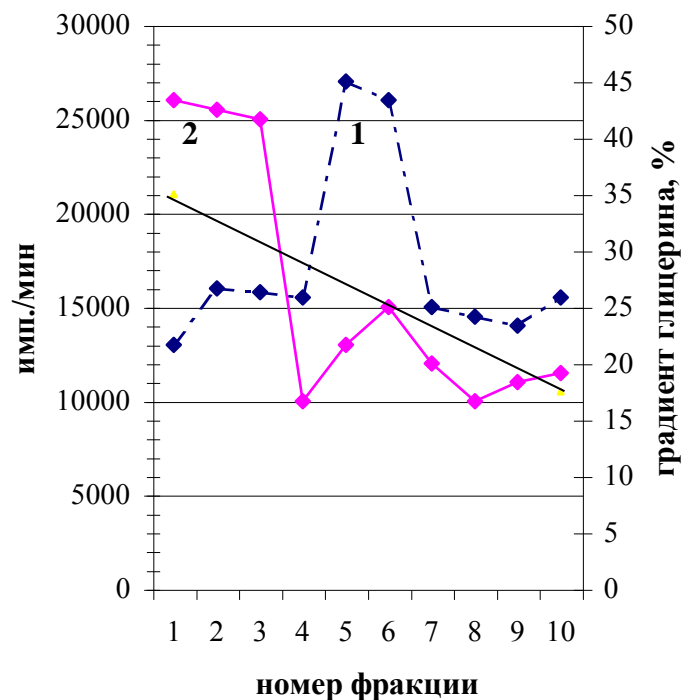


Рис. 22. Оценка РНК-полимеразной активности субфракций РНК-полимеразы III (IIIа и IIIб) из клеток A431 после ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина по включению в РНК [³H]-УТР:

1 – РНК-полимераза IIIа; 2 – РНК-полимераза IIIб.

4.14. С субформами РНК-полимеразы III из клеток A431 – IIIa и IIIb, не соочищается протеинкиназная активность

Субформы РНК-полимеразы III – IIIa и IIIb, полученные из клеток эпидермоидной карциномы человека A431, инкубировали в присутствии γ [32 P]-АТФ. Пробы анализировали диск-электрофорезом с SDS в 12% ПААГ. На автордиограмме геля видно, что в пробах, содержащих РНК-полимеразу IIIa (рис. 23, дорожка 1) и IIIb (рис. 23, дорожка 2), не происходит включения метки в пептиды. Таким образом, использованный нами метод не выявил присутствия протеинкиназной активности в составе препарата РНК-полимеразы III клеток A431 (Никитина и др., 2002б).



Рис. 23. Авторадиограмма геля после диск-электрофореза в 12% ПААГ с SDS препаратов РНК-полимераз IIIa и IIIb из клеток эпидермоидной карциномы человека A431, инкубированных в присутствии меченого γ [32 P]-АТФ:

- 1 – РНК-полимераза IIIa (2 Е транскрипционной активности);
- 2 – РНК-полимераза IIIb (2 Е транскрипционной активности);
- 3 – контроль: цитоплазма клеток A431.

4.15. В цитоплазме клеток A431 присутствует протеинкиназная активность, фосфорилирующая РНК-полимеразу IIIa из клеток A431 in vitro

Мы проверили, содержится ли в цитоплазме клеток A431 протеинкиназная активность, способная фосфорилировать РНК-полимеразу IIIa из клеток A431. Препарат РНК-полимеразы IIIa инкубировали в присутствии γ [^{32}P]-АТФ и цитоплазмы клеток A431. Пробы анализировали диск-электрофорезом с SDS в 12% ПААГ с последующей автордиографией. Видно, что при добавлении в пробу цитоплазмы клеток A431 появляется дополнительная полоса (рис. 24, дорожка 2), которой не наблюдается при инкубации цитоплазмы клеток A431 с γ [^{32}P]-АТФ в отсутствие РНК-полимеразы IIIa (рис. 24, дорожка 1). Это позволяет предположить, что в цитоплазме содержится киназа (или киназы), способная фосфорилировать РНК-полимеразу IIIa из клеток A431 in vitro.

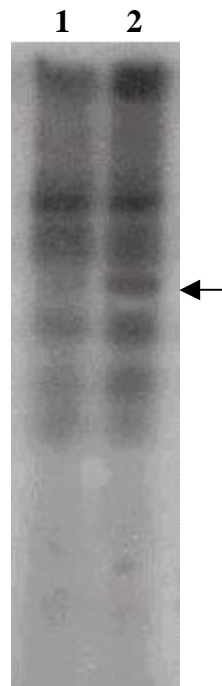


Рис. 24. Автордиограмма геля после диск-электрофореза в 12% ПААГ с SDS РНК-полимеразы IIIa из клеток эпидермоидной карциномы человека A431, инкубированной в присутствии цитоплазмы клеток A431 и меченого γ [^{32}P]-АТФ:

1 – контроль: включение ^{32}P в белок при инкубации цитоплазмы клеток A431 в присутствии γ [^{32}P]-АТФ;

2 – включение ^{32}P в белок при инкубации РНК-полимеразы IIIa (2 Е транскрипционной активности) из клеток A431 в присутствии цитоплазмы клеток A431 и γ [^{32}P]-АТФ.

Стрелкой указан полипептид, фосфорилирование которого наблюдается только в случае присутствия в пробе РНК-полимеразы IIIa.

4.16. Компьютерный поиск потенциальных сайтов фосфорилирования и гликозилирования в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека

Для проверки принципиальной возможности модификаций субъединиц РНК-полимеразы III человека мы использовали несколько программ, позволяющих идентифицировать потенциальные сайты фосфорилирования и гликозилирования в составе любых полипептидов с известной аминокислотной последовательностью. В настоящее время первичная структура всех субъединиц РНК-полимеразы III человека определена, поэтому поиск был проведен для всех 17 субъединиц фермента.

Поиск возможных сайтов фосфорилирования проводили с использованием двух программ – Motif Scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_id.phtml) и NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Blom e.a., 1999). Программа Motif Scan ищет в составе предложенной аминокислотной последовательности консенсусные сайты фосфорилирования для определенного набора протеинкиназ. Всего программой используются данные о сайтах для 26 киназ:

1. Тирозин-киназы: Abl, киназа рецептора ЭФР, Fgr, киназа инсулинового рецептора, Itk, Lck, PDGFR-киназа, Src.
2. Базофильные Ser/Thr-киназы: Akt, кальмодулин-зависимая киназа 2, Cdk2, протеинкиназа A, протеинкиназы C α / β / γ , протеинкиназа C δ , протеинкиназа C ϵ , протеинкиназа C ζ , протеинкиназа C ξ .
3. Киназы, действующие при повреждении ДНК: ATM, ДНК-зависимая киназа (DNA PK).
4. Ацидофильные Ser/Thr-киназы: CK I, CK II, GSK3.
5. Пролин-зависимые Ser/Thr-киназы: Cdc2, CDK5, Erk1, p38 MAP-киназа.

Результаты поиска потенциальных сайтов фосфорилирования в составе субъединиц РНК-полимеразы III с помощью программа Motif Scan приведены в табл. 3. Можно видеть, что программа идентифицировала возможные сайты фосфорилирования в составе семи субъединиц РНК-полимеразы III человека: RPC1, RPC3, RPC4, RPC5, RPC7, RPC9 и RPABC1.

Во второй программе, использованной для поиска потенциальных сайтов фосфорилирования – NetPhos 2.0, авторы применили принципиально иной подход – метод «искусственной нейронной сети». Этот метод позволяет «обучать» программу на основе известных данных (в рассматриваемом случае – на основе данных по экспериментально определенным сайтам фосфорилирования различных белков). Авторы утверждают, что, чувствительность метода составляет 69–96% (Blom e.a., 1999). Программа NetPhos 2.0

Таблица 3.

Идентификация возможных сайтов фосфорилирования и гликозилирования субъединиц РНК-полимеразы III человека с использованием программ MotifScan, NetPhos 2.0 и YinOYang 1.2.

Субъединица РНК-полимеразы III (идентификационный номер)	Программа MotifScan		Программа NetPhos 2.0			Программа YinOYang 1.2
	возможный сайт фосфорилирования	протеинкиназы	количество возможных сайтов фосфорилирования			
			Ser	Thr	Tyr	
RPC1 (AAB86536) ^a	T557 S147 и T485 T367	протеинкиназа Сε протеинкиназа Сξ казеинкиназа 1 (CKI)	31	19	13	S364 (+), S805 (+)
RPC2 (AAM18214) ^a	–	–	26	16	13	S205 (+), S466 (++)
RPC3 (AAN02586) ^a	S204 и S205	протеинкиназа А	12	6	6	T262 (+), S263 (+), T278 (+), S279 (+), S289 (+), T412 (++)
RPC4 (AAM18216) ^a	T49 S259 T36	протеинкиназа Akt протеинкиназа Сμ протеинкиназы GSK3 и Erk1	7	9	–	T12 (+), T36 (++) , T126 (+)
RPC5 (AAM18215) ^a	Y245 S162 T673 и S253	протеинкиназа инсулинового рецептора ДНК-зависимая киназа (DNA PK) протеинкиназа ATM	26	4	5	S90 (+), S337 (++) , T521 (+)
RPC6 (AAN12588) ^a	–	–	11	1	2	S141 (++) , S160 (+), S208 (+), S209 (++)
RPC7 (AAB63676) ^a	Y56 Y188	протеинкиназа инсулинового рецептора протеинкиназа Src	5	3	4	–
RPC8 (AAM18217) ^a	–	–	9	3	3	S161 (+), S166 (+++), S167 (++) , T172 (++) , S173 (+), S174 (+)
RPC9 (AAC25992) ^a	T56	протеинкиназы Cdc2 и Cdk5	7	2	1	S30 (++) , T56 (+) , T93 (+)
RPC10 (AAF18268) ^a	–	–	–	2	–	–
RPAC1 (AAC39892) ^a	–	–	5	4	3	S157 (+), S226 (+)
RPAC2 (AAD27777) ^a	–	–	6	5	2	T72 (+), S127 (++) , S131 (++)
RPABC1 (P19388) ^б	T29	протеинкиназа ATM	3	6	1	T205 (+)
RPABC2 (P41584) ^б	–	–	2	2	2	–
RPABC3 (P52434) ^б	–	–	5	4	4	T106 (++) , S113 (++)
RPABC4 (P53803) ^б	–	–	1	2	1	T3 (++)
RPABC5 (P52436) ^б	–	–	–	1	–	–

^a Идентификационный номер в базе данных Genpept;

^б идентификационный номер в базе данных Swiss-Prot.

S – серин, T – треонин, Y – тирозин. Жирным шрифтом выделены сайты фосфорилирования, найденные как программой Motif Scan, так и программой NetPhos 2.0.

Количество знаков «+» соответствует силе предсказания по данному сайту.

Подчеркнуты сайты «инь-янь», выявленные как программой Motif Scan, так и программой YinOYang 1.2.

была «обучена» авторами с использованием данных по известным сайтам фосфорилирования целого ряда белков (список приведен на сайте программы), в результате чего были выработаны алгоритмы поиска сайтов фосфорилирования по Ser, Thr и Tyr, учитывающие частоту встречаемости определенных аминокислотных остатков на определенных позициях в контексте модифицируемого Ser, Thr или Tyr (по четыре остатка с каждой стороны от сайта модификации). То есть, в этом случае программа не ищет консенсусные сайты и специфические детерминанты для известных протеинкиназ, а оценивает, насколько вероятно, что данный сайт может подвергаться фосфорилированию, исходя из общих свойств всех известных программе сайтов данной модификации (Blom *e.a.*, 1999). Как и ожидалось, с помощью NetPhos 2.0 в составе субъединиц РНК-полимеразы III было идентифицировано значительно больше потенциальных сайтов фосфорилирования: в каждой субъединице присутствует хотя бы один сайт (табл. 3). Некоторые сайты были выявлены обеими использованными программами (Motif Scan и NetPhos 2.0); в таблице 3 они выделены жирным шрифтом.

В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что в клетке одни и те же остатки Ser и Thr в составе белков часто подвергаются реципрокной регуляторной модификации либо фосфорилированием, либо гликозилированием (добавлением остатка N-ацетилглюкозамина). Такие сайты, которые могут служить субстратом как для протеинкиназ, так и для гликозилтрансфераз, называют сайтами «инь-янь» (Vosseller *e.a.*, 2001). Для поиска сайтов «инь-янь» в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека нами была использована программа YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>). Эта программа, так же как и NetPhos 2.0, использует метод «искусственных нейронных сетей» для поиска возможных сайтов гликозилирования в предложенной последовательности полипептида. Программа была «обучена» авторами с использованием данных по 40 сайтам гликозилирования, экспериментально выявленным в составе внутриклеточных белков. Помимо поиска собственно сайтов, по которым возможно гликозилирование, программа YinOYang 1.2 может работать параллельно с программой NetPhos 2.0 и выявлять таким образом сайты «инь-янь». В таблице 3 приведены результаты поиска возможных сайтов «инь-янь» в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека. Можно видеть, что подобные сайты были выявлены в 13 субъединицах. Два сайта были выявлены как программой Motif Scan, так и программой YinOYang 1.2 (в таблице 3 они подчеркнуты): это T36 в составе субъединицы RPC4 (потенциальный сайт для протеинкиназ GSK3 и Erk1) и T56 в составе субъединицы RPC9 (потенциальный сайт для протеинкиназ Cdc2 и CDK5).

Таким образом, из приведенных данных можно видеть, что практически все субъединицы РНК-полимеразы III человека могут являться мишенями для регуляторных модификаций. Были найдены как потенциальные сайты фосфорилирования для ряда

известных протеинкиназ (см. табл. 3, результаты, полученные с использованием программы Motif Scan), так и возможные сайты фосфорилирования для протеинкиназ, не учитываемых программой Motif Scan (см. табл. 3, результаты, полученные с использованием программы NetPhos 2.0). Кроме того, в большинстве субъединиц РНК-полимеразы III человека идентифицированы потенциальные сайты «инь-янь», которые могут подвергаться как фосфорилированию, так и гликозилированию (см. табл. 3, результаты, полученные с использованием программы YinOYang 1.2). При интерпретации полученных данных необходимо учитывать, что мы рассматривали только первичную структуру субъединиц РНК-полимеразы III, не учитывая их пространственное строение. Очевидно, не все сайты, идентифицированные использованными программами, могут быть доступны для модификации в составе целого фермента. Некоторые сайты могут располагаться в контексте пространственной структуры молекулы РНК-полимеразы III таким образом, что будут маскированы от действия протеинкиназ и гликозилтрансфераз. Можно также предположить, что доступность для модификации части сайтов может меняться в зависимости от изменения конформации полимеразы под действием различных регуляторных факторов (например, присоединения или диссоциации регуляторных белков, или осуществления различных модификаций фермента).

4.17. Исследование физиологического состояния клеток эпидермоидной карциномы человека A431 при воздействии ЭФР в низких и высоких концентрациях

В качестве модели для изучения содержания различных РНК-продуктов генов класса III *in vivo* при различных физиологических состояниях клетки нами были использованы клетки эпидермоидной карциномы человека A431 (Giard *e. a.*, 1973), так как известно, что эти клетки экспонируют на своей поверхности большое количество рецепторов к эпидермальному фактору роста (ЭФР), и результат воздействия ЭФР на клетки A431 зависит от концентрации ростового фактора. Так, обработка клеток ЭФР в низкой концентрации (0,1 нг/мл) приводит к активации пролиферации этих клеток, а воздействие ЭФР в высоких концентрациях (10-100 нг/мл) приводит к апоптозу (Barnes, 1982; Gulli *e.a.*, 1996; Chin *e.a.*, 1997; Cao *e.a.*, 2000; Rezgui *e.a.*, 2000; Fong *e.a.*, 2001; Leung *e.a.*, 2001). Кроме того, при выращивании в бессывороточной среде клетки A431 продолжают пролиферировать, но при этом удлиняется время генерации: 48 ч вместо 30 ч при культивировании в среде с сывороткой (Barnes, 1982). Для исследования физиологического состояния клеток A431, подвергнутых в нашем эксперименте бессывороточному голоданию и обработке ЭФР в высоких и низких концентрациях в бессывороточной среде, были применены два подхода: проточная цитофлуориметрия с использованием иодида пропидия и исследование характера фрагментации ДНК для подтверждения апоптоза клеток A431 при воздействии ЭФР в высокой концентрации (Никитина и др., 2003б; Nikitina *e.a.*, 2003).

4.17.1. Проточная цитофлуориметрия с использованием иодида пропидия клеток A431, подвергнутых бессывороточному голоданию и воздействию ЭФР в низких и высоких концентрациях

Проточная цитофлуориметрия была выполнена сотрудником Института цитологии РАН, к.х.н. Н.Д. Аксеновым (группа проточной цитометрии и сортировки клеток, лаборатория физиологии клеточного цикла, зав. лаб. академик Н.Н. Никольский). Результаты проточной цитофлуориметрии с использованием иодида пропидия приведены на рис. 25 и в табл. 4. Можно видеть, что при бессывороточном голодании клеток A431 в

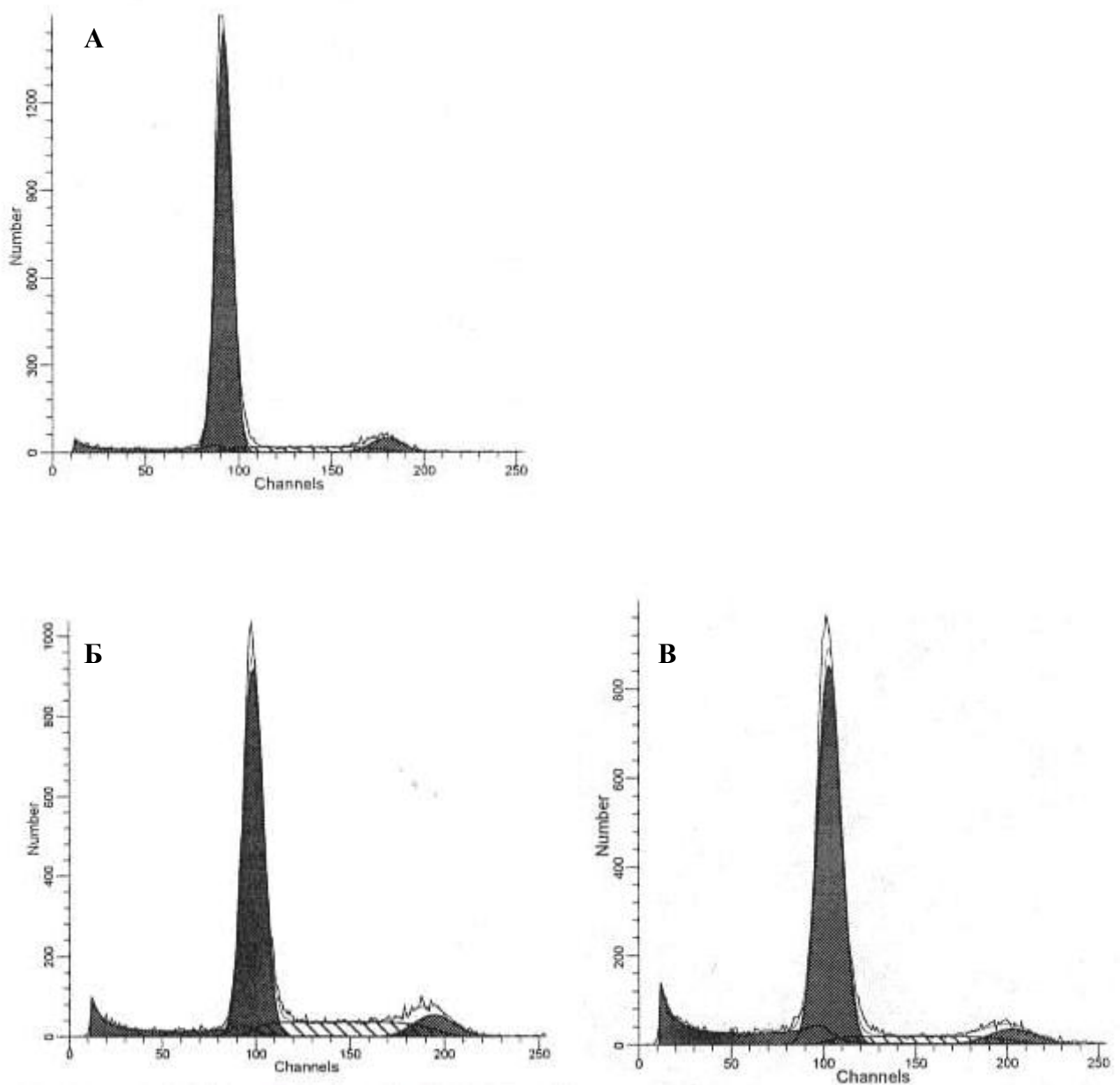


Рис. 25. Профили распределения клеток A431 в зависимости от количества ДНК, полученные методом проточной цитофлуориметрии с использованием иодида пропидия:

А – клетки A431 выращивали в бессывороточной среде в течение 48 ч (голодание);

Б – клетки A431 после голодания обрабатывали 0,1 нг/мл ЭФР в течение 24 ч;

В – клетки A431 после голодания обрабатывали 100 нг/мл ЭФР в течение 24 ч.

течение 48 ч (рис. 25, А, табл. 4) не происходит полной остановки пролиферации, а лишь ее замедление: 83% клеток находится на стадиях G_0-G_1 клеточного цикла, и только около 10% клеток – на стадии S клеточного цикла. Это соответствует литературным данным о том, что клетки эпидермоидной карциномы человека A431 продолжают медленную пролиферацию и в отсутствие сыворотки в среде (Barnes, 1982), по-видимому, благодаря аутокринной стимуляции фактором $TGF\alpha$ (Derynck e.a., 1987). В то же время, при бессывороточном голодании количество клеток с фрагментированной ДНК, то есть клеток в состоянии апоптоза, относительно невелико: 5,8% относительно числа клеток с нефрагментированной ДНК. При воздействии 0,1 нг/мл ЭФР в течение 24 ч (рис. 25, Б, табл. 4) клетки A431 начинают активно пролиферировать: количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла увеличивается вдвое – до 20%. Количество клеток с фрагментированной ДНК также увеличивается примерно в два раза – до 12%, так как клетки A431 являются эпителиальными и конечным этапом их дифференцировки является апоптоз. В случае обработки клеток A431 100 нг/мл ЭФР в течение 24 ч (рис. 25, В, табл. 4) распределение клеток по стадиям клеточного цикла соответствует замедленной пролиферации (табл. 4, ср. строки «Бессывороточное голодание» и «Воздействие 100 нг/мл ЭФР»), однако количество клеток с фрагментированной ДНК (клеток в состоянии апоптоза) приблизительно в три раза выше, чем в случае бессывороточного голодания: ~19% относительно числа клеток с нефрагментированной ДНК. Эти данные позволяют утверждать, что при воздействии ЭФР в высокой концентрации (100 нг/мл) клетки A431 переходят к апоптозу, что соответствует имеющимся в литературе данным (Cao e.a., 2000).

Таблица 4.

Результаты исследования проточной цитофлуориметрией с использованием иодида пропидия клеток A431, подвергнутых бессывороточному голоданию и воздействию ЭФР в низких и высоких концентрациях

	Количество клеток, находящихся на стадии клеточного цикла (%):			Количество клеток с фрагментированной ДНК (% относительно числа клеток с нефрагментированной ДНК)
	G_0-G_1	G_2-M	S	
Бессывороточное голодание	83,34	6,52	10,14	5,80
Воздействие 0,1 нг/мл ЭФР	71,22	8,44	20,34	12,27
Воздействие 100 нг/мл ЭФР	82,48	6,59	10,93	19,24

4.17.2. Исследование характера фрагментации ДНК при воздействии на клетки А431 ЭФР в высокой концентрации

Для подтверждения состояния апоптоза в клетках А431, подвергнутых воздействию ЭФР в концентрации 100 нг/мл в течение 24 ч, было проведено исследование характера фрагментации ДНК в этих клетках. Мы показали, что в этих клетках наблюдается более высокий уровень фрагментации ДНК, характерной для апоптотических клеток (так называемая «лестница» из фрагментов ДНК с длиной, кратной 180 п.н.), чем в клетках, обработанных ЭФР в концентрации 0,1 нг/мл (ср. дорожки 2 и 3 на рис. 26). Эти данные подтверждают, что при воздействии на клетки А431 ЭФР в высокой концентрации происходит гибель клеток в результате индукции апоптоза. Присутствие апоптотических клеток в культуре активно пролиферирующих под действием ЭФР в низкой концентрации клеток (дорожка 2, рис. 26) объясняется тем, что А431 – это эпителиальные клетки, и конечным этапом их дифференцировки является апоптоз.

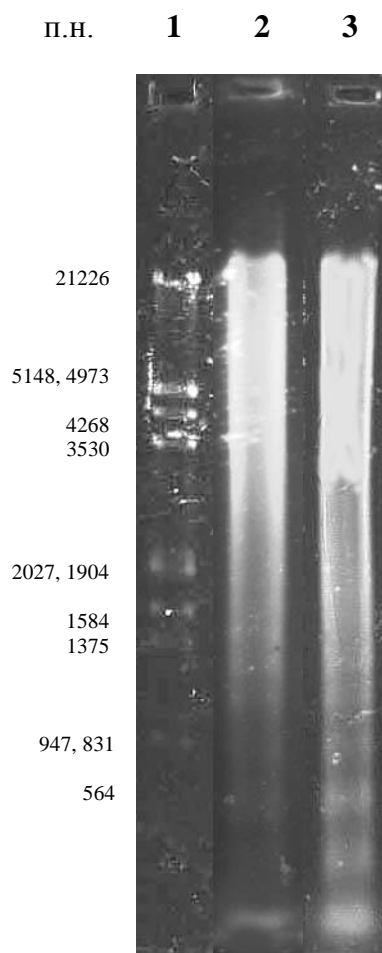


Рис. 26. Электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле низкомолекулярных фрагментов ДНК, полученных из клеток А431, обработанных ЭФР:

- 1 – маркеры длины фрагментов ДНК (λ ДНК / EcoRI+HindIII)
- 2 – контроль: ДНК из клеток А431, обработанных 0,1 нг/мл ЭФР;
- 3 – ДНК из клеток А431, обработанных 100 нг/мл ЭФР.

4.18. Оптимизация условий для эффективного анализа содержания 5S рРНК и тРНК в клетках A431 методом RT-PCR в реальном времени

Для определения оптимальных условий анализа содержания 5S рРНК и тРНК в клетках A431 методом RT-PCR в реальном времени проводили анализ, используя различные концентрации кДНК, полученной обратной транскрипцией на матрице тотальной РНК клетки. Тотальную РНК получали из клеток эпидермоидной карциномы человека A431 с замедленной пролиферацией (контроль), находящихся в состоянии активной пролиферации после обработки в течение 24 ч ЭФР в концентрации 0,1 нг/мл и находящихся в состоянии позднего апоптоза после обработки в течение 24 ч ЭФР в концентрации 100 нг/мл (экспериментальные пробы). Состояние активации пролиферации клеток после обработки ЭФР в низкой концентрации и апоптоза после обработки ЭФР в высокой концентрации было подтверждено методом проточной цитофлуориметрии с использованием иодида пропидия и исследованием фрагментации ДНК (см. п. 4.17.).

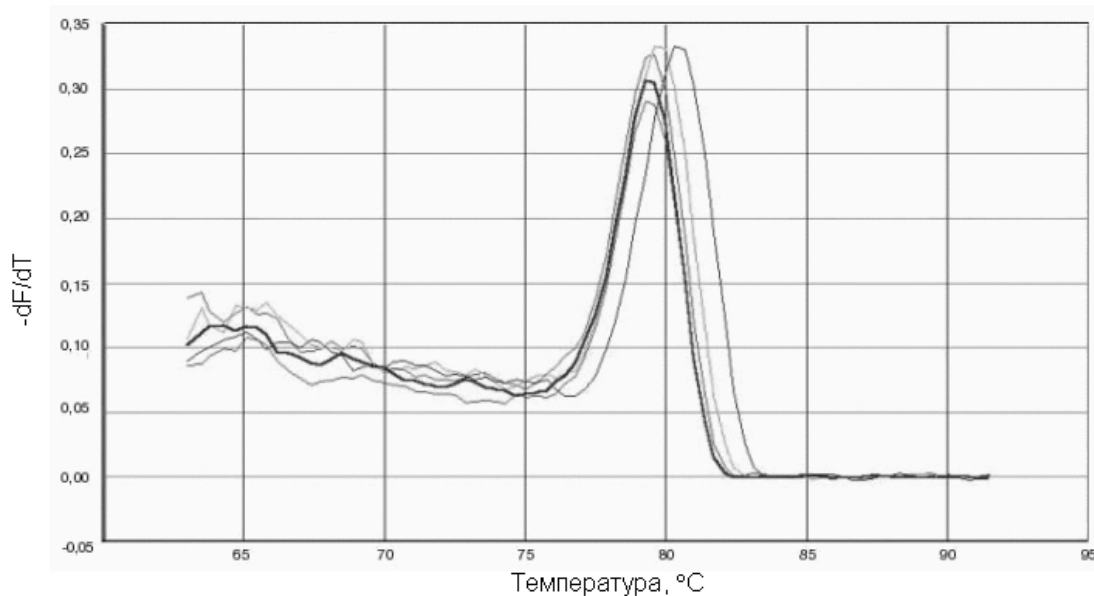


Рис. 27. Кривые диссоциации продуктов амплификации кДНК, полученных методом PCR в присутствии специфичных праймеров для последовательности 5S рРНК. кДНК получали обратной транскрипцией тотальной РНК клеток A431 с участием статистического набора праймеров. Далее различные количества кДНК использовали для амплификации в присутствии специфичных праймеров для последовательности 5S рРНК (в концентрации 300 нМ каждый). Кривые соответствуют пробам, содержащим 0,01, 0,012, 0,1, 1, 10 и 100 нг кДНК. Наблюдаемые пики соответствуют основному продукту амплификации; дополнительные пики, соответствующие побочным продуктам реакции, отсутствуют.
 $-dF/dT$ – отрицательная величина скорости изменения флуоресценции SYBR Green I, где F – интенсивность флуоресценции, T – температура.

Содержание 5S рРНК и тРНК^{Met1} в тотальной РНК клетки определяли двухэтапным методом RT-PCR в реальном времени. На первом этапе тотальная РНК была использована в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции с участием статистического набора праймеров, и таким образом была получена одноцепочечная кДНК. На втором этапе полученную кДНК амплифицировали с участием специфичных праймеров методом PCR в реальном времени для определения содержания специфичных последовательностей 5S рРНК и тРНК^{Met1} (Никитина и др., 2003а; Никитина и др., 2003в).

Анализ кривой диссоциации продуктов амплификации, полученных при внесении в пробу 0,01, 0,012, 0,1, 1, 10 и 100 нг кДНК и по 300 нМ прямого и обратного праймеров для последовательности 5S рРНК, показывает наличие одного хорошо выраженного пика при температуре около 80°C, который соответствует основному продукту амплификации – 5S кДНК, и отсутствие дополнительных пиков, соответствующих

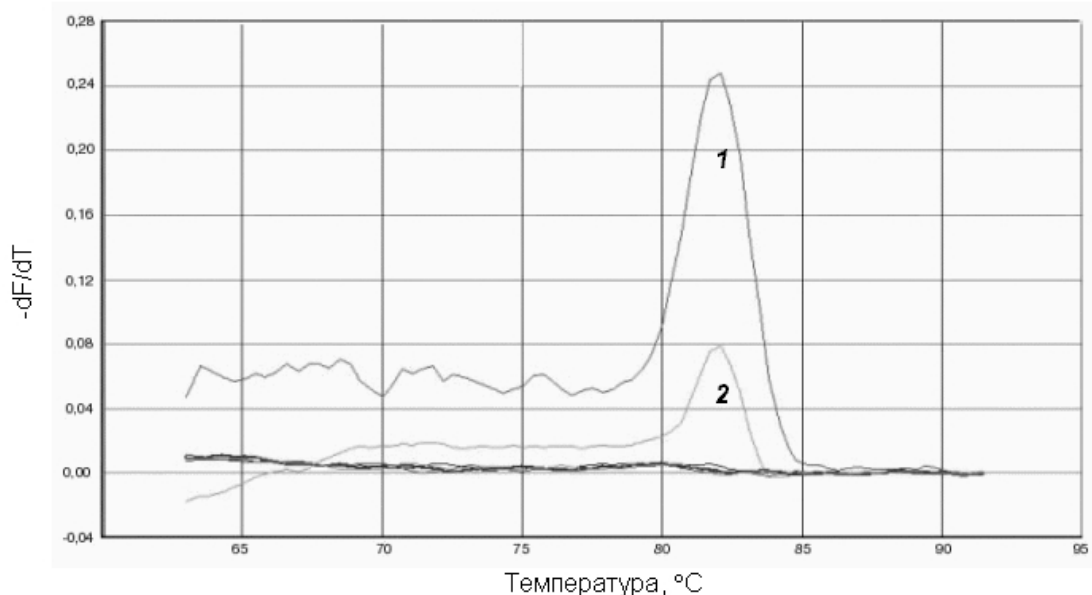


Рис. 28. Кривые диссоциации продуктов амплификации кДНК, полученных методом PCR в присутствии специфичных праймеров для последовательности тРНК^{Met1}. кДНК получали обратной транскрипцией тотальной РНК клеток A431 с участием статистического набора праймеров. Далее различные количества кДНК использовали для амплификации в присутствии специфичных праймеров для последовательности тРНК^{Met1} (в концентрации 300 нМ каждый);

1 – кривая, соответствующая пробе, содержавшей 100 нг кДНК;

2 – кривая, соответствующая пробе, содержавшей 10 нг кДНК.

Кривые, соответствующие пробам, содержавшим 0,01, 0,1 и 1 нг кДНК, не содержали выраженных пиков. Наблюдаемые пики соответствуют основному продукту амплификации; дополнительные пики, соответствующие побочным продуктам реакции, отсутствуют.

-dF/dT – отрицательная величина скорости изменения флуоресценции SYBR Green I, где F – интенсивность флуоресценции, T – температура.

побочным продуктам (димерам праймеров и др.) (рис. 27). Таким образом, для анализа содержания 5S рРНК методом RT-PCR в реальном времени достаточно было использовать в одной реакции 1 нг кДНК, синтезированной на тотальной РНК, при концентрации каждого из праймеров 300 нМ (Никитина и др., 2003а; Никитина и др., 2003в).

Анализ кривой диссоциации продуктов амплификации, полученных при внесении в пробу 0,01, 0,1, 1, 10 и 100 нг кДНК и по 300 нМ прямого и обратного праймеров для последовательности тРНК^{Met1}, показывает, что для получения заметного пика необходимо внести в пробу для PCR в реальном времени 100 нг кДНК, полученной при обратной транскрипции на тотальной РНК клетки (рис. 28, кривая 1). При внесении в пробу 10 нг кДНК наблюдается лишь очень слабый пик, соответствующий основному продукту амплификации (рис. 28, кривая 2), а при более низком содержании кДНК (1 нг и менее) вообще отсутствуют специфичные продукты амплификации (рис. 28) (Никитина и др., 2003а; Никитина и др., 2003в).

4.19. Исследование содержания 5S рРНК в клетках A431, находящихся в различных физиологических состояниях

Стандартная кривая для последовательности 5S рРНК на использованном интервале концентраций кДНК соответствовала линейной регрессионной модели, коэффициент детерминации $R^2=0,99$ (рис. 29). Эффективность амплификации последовательности 5S рРНК, определенная по стандартной кривой (рис. 29): $E=2,1$. Сравнение содержания 5S рРНК в клетках, находящихся в различных физиологических состояниях (табл. 5, рис. 30), показало, что содержание данной РНК в медленно пролиферирующих клетках (табл. 5, рис. 30, столбец 1) и в клетках, активированных к пролиферации ЭФР в низкой концентрации (табл. 5, рис. 30, столбец 2) практически одинаково, а при апоптозе, вызванном действием ЭФР в высокой концентрации (табл. 5, рис. 30, столбец 3) содержание 5S рРНК возрастает примерно в 2,5 раза. Уровни значимости различий были менее 0,05: $p=0,02$ для столбцов 1 и 2 и $p=0,00006$ для столбцов 1 и 3 и $p=0,0002$ для столбцов 2 и 3 (Никитина и др., 2003б; Никитина и др., 2003г; Nikitina e.a., 2003). Различия между содержанием 5S рРНК в медленно пролиферирующих клетках (рис. 30, столбец 1) и в активно пролиферирующих клетках (рис. 30, столбец 2) в нашем эксперименте были статистически значимы (согласно t-

критерию Стьюдента, с уровнем значимости $p=0,02$). Однако такое различие (20%) не является достаточно достоверным для метода RT-PCR ([Real-time PCR vs. traditional PCR. Tutorial. Applied Biosystems internal publication. www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf](http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf)).

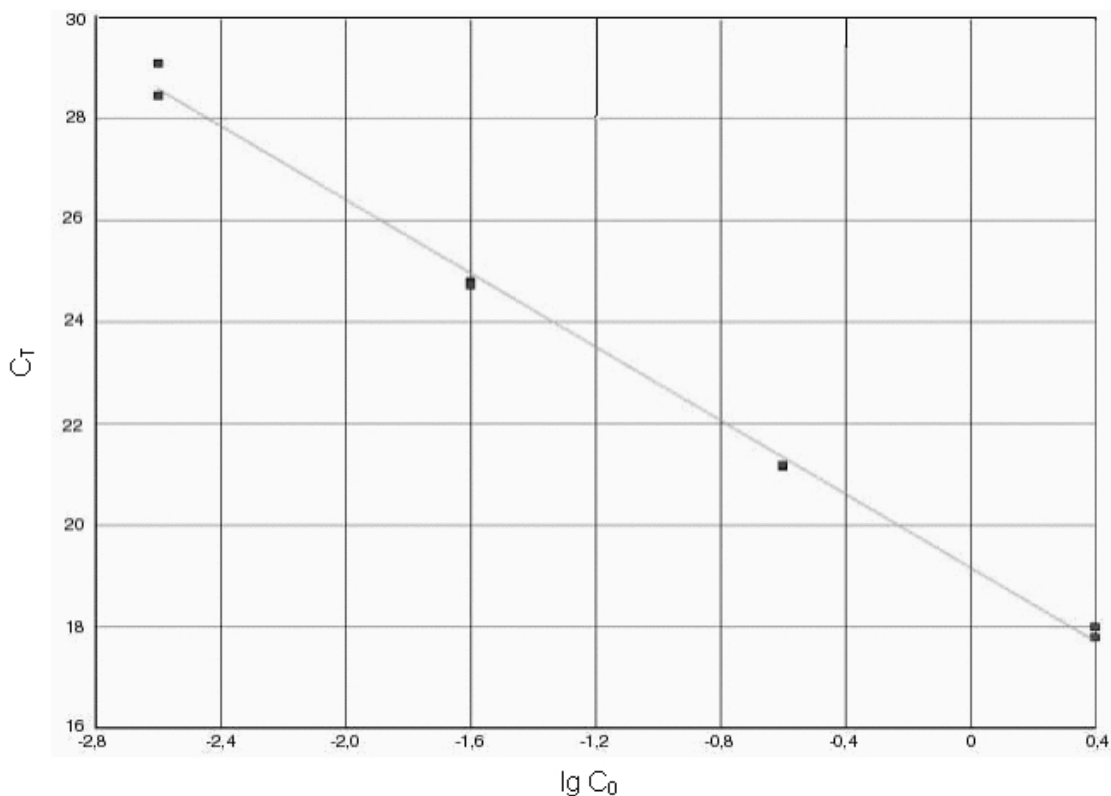


Рис. 29. Стандартная кривая зависимости порогового цикла (C_T) от десятичного логарифма количества кДНК (C_0), внесенного в пробу, для 5S рРНК. PCR проводили на матрице кДНК, полученной обратной транскрипцией тотальной РНК клеток A431, с участием 300 нМ специфических праймеров для последовательности 5S рРНК. Коэффициент детерминации $R^2=0,99$. Эффективность амплификации: $E=2,1$.

Пороговый цикл (C_T) амплификации кДНК, полученной обратной транскрипцией тотальной РНК клеток А431, в присутствии праймеров, специфичных для последовательности 5S рРНК, и относительное содержание (r) соответствующей РНК

РНК	Эффективность амплификации E	C_T в контроле	Активированные клетки			Апоптоз		
			C_T	r^a	$r_{cp} \pm SD^b$	C_T	r	$r_{cp} \pm SD$
5S рРНК	2,1	17,24	17,11	0,89	0,87±0,0 9	16,23	2,6	2,57±0,1 5
			17,34	0,86		16,38	2,7	
		17,12	17,11	0,88		16,23	2,6	
			17,34	0,85		16,38	2,6	
мРНК RPLP0	2,05	17,35	17,06	-		17,67	-	
			17,24	-		17,84	-	
		17,24	17,06	-		17,67	-	
			17,24	-		17,84	-	

Все значения C_T , представленные в таблице, являются средним арифметическим для двух повторов каждой пробы.

^a Соотношение уровней содержания РНК в контрольных клетках (с удлиненным временем генерации) и в опытных (активированных ЭФР и апоптотических) с учетом нормирования вычисляли как описано в «Материалах и методах».

^b r_{cp} – среднее значение r , SD – стандартное отклонение.

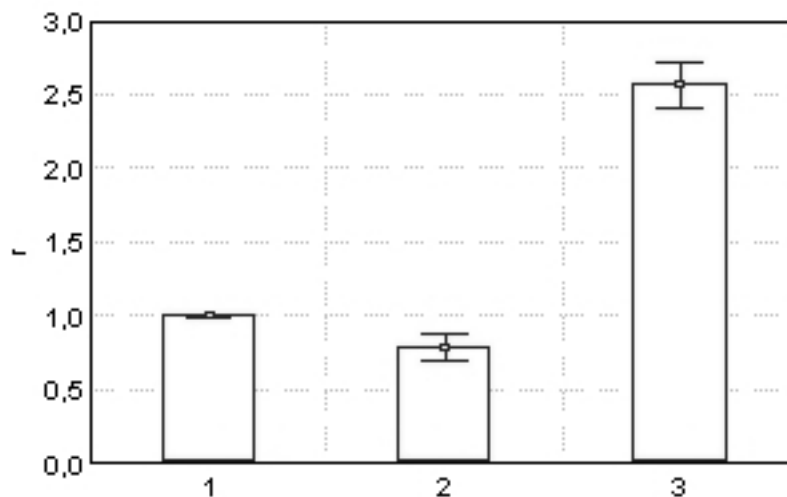


Рис. 30. Содержание 5S рРНК в клетках А431, находящихся в состоянии медленной и активной пролиферации и в апоптозе. Диаграмма, показывающая содержание 5S рРНК в активно пролиферирующих клетках, обработанных 0,1 нг/мл ЭФР (столбец 2), и апоптотических клетках, обработанных 100 нг/мл ЭФР (столбец 3), относительно содержания этой РНК в медленно пролиферирующих клетках (столбец 1). Высота столбца соответствует среднему значению отношения уровня содержания 5S рРНК в данных клетках к уровню этой РНК в медленно пролиферирующих клетках (показатель r ср., см. табл. 5). Интервалы соответствуют стандартному отклонению. Уровень значимости: $p=0,02$ для столбцов 1 и 2 и $p=0,00006$ для столбцов 1 и 3 и $p=0,0002$ для столбцов 2 и 3.

4.20. Исследование содержания тРНК^{iMet1} в клетках А431, находящихся в различных физиологических состояниях

Стандартная кривая для последовательности тРНК^{iMet1} на использованном интервале концентраций кДНК соответствовала линейной регрессионной модели, коэффициент детерминации $R^2=0,99$ (рис. 31). Эффективность амплификации последовательности тРНК^{iMet1}, определенная по стандартной кривой (рис. 31), составила $E=1,9$. Мы показали, что содержание тРНК^{iMet1} в клетках, подвергнутых воздействию ЭФР в низких и высоких концентрациях (табл. 6, рис. 32, столбцы 2 и 3), в 1,5–2 раза выше, чем в клетках, находящихся в состоянии медленной пролиферации (табл. 6, рис. 32, столбец 1). Уровень значимости: $p=0,004$ для столбцов 1 и 2, $p=0,0003$ для столбцов 1 и 3. Содержание данной РНК в клетках, активированных ЭФР в низкой концентрации, и клетках, обработанных ЭФР в высокой концентрации, различался незначительно (табл. 6, рис. 32, столбцы 2 и 3). Несмотря на то, что это различие в нашем исследовании было статистически значимым (уровень значимости $p=0,05$), оно недостаточно велико для того, чтобы уверенно утверждать о его статистической значимости, учитывая точность метода RT-PCR в реальном времени (см. п. 4.19.) (Никитина и др., 2003б; Nikitina e.a., 2003).

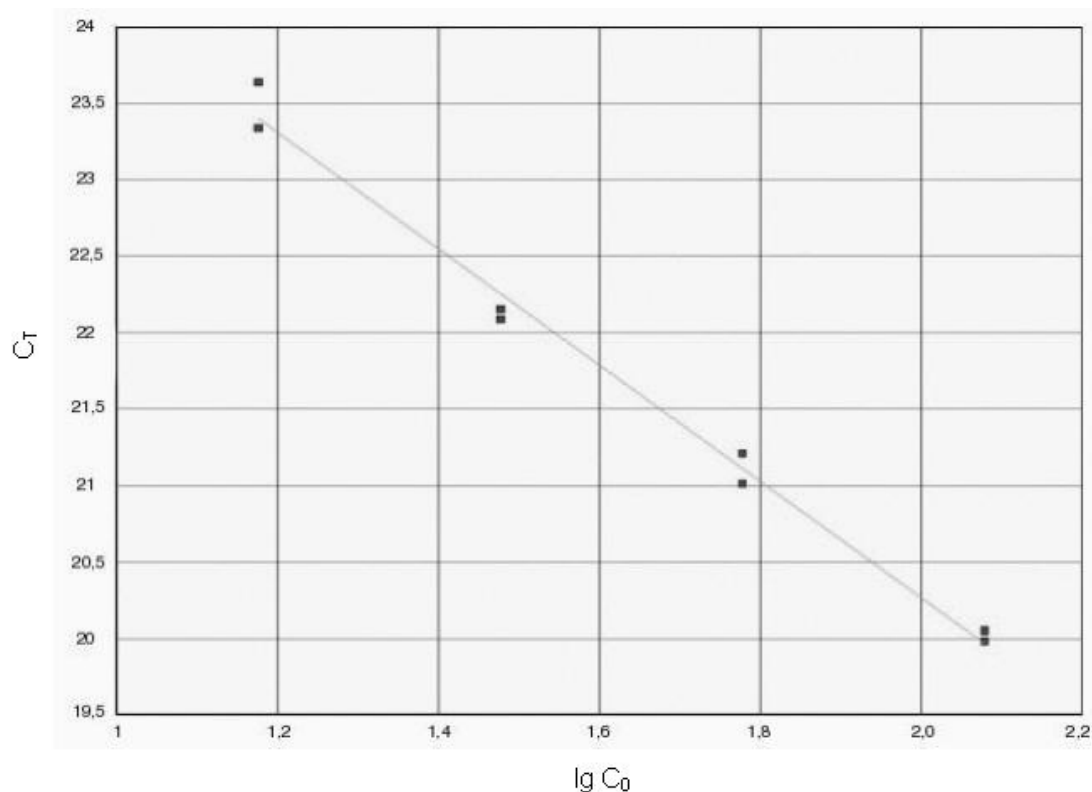


Рис. 31. Стандартная кривая зависимости порогового цикла (C_T) от десятичного логарифма количества кДНК (C_0), внесенного в пробу, для тРНК^{iMet1}. PCR проводили на матрице кДНК, полученной обратной транскрипцией тотальной РНК клеток А431, с участием 300 нМ специфичных праймеров для последовательности тРНК^{iMet1}. Коэффициент детерминации $R^2=0,99$. Эффективность амплификации: $E=1,9$.

Таблица 6.

Пороговый цикл (C_T) амплификации кДНК, полученной обратной транскрипцией тотальной РНК клеток А431, в присутствии праймеров, специфичных для последовательности тРНК^{Met1}, и относительное содержание (r) соответствующей РНК

РНК	Эффективность амплификации E	C_T в контроле	Активированные клетки			Апоптоз		
			C_T	r^a	$r_{cp} \pm SD^b$	C_T	r	$r_{cp} \pm SD$
тРНК ^{Met1}	1,9	21,22	21,31	1,57	1,55±0,3 9	21,06	1,48	1,50±0,0 6
			21,06	1,88		21,34	1,42	
		21,49	21,31	1,68		21,06	1,57	
			21,06	2,0		21,34	1,51	
мРНК RPLP0	2,1	19,20	19,89	-		19,59	-	
			19,91	-		19,78	-	
		19,35	19,89	-		19,59	-	
			19,91	-		19,78	-	

Все значения C_T , представленные в таблице, являются средним арифметическим для двух повторов каждой пробы.

^a Соотношение уровней содержания РНК в контрольных клетках (с удлинённым временем генерации) и в опытных (активированных ЭФР и апоптотических) с учетом нормирования вычисляли как описано в «Материалах и методах».

^b r_{cp} – среднее значение r , SD – стандартное отклонение.

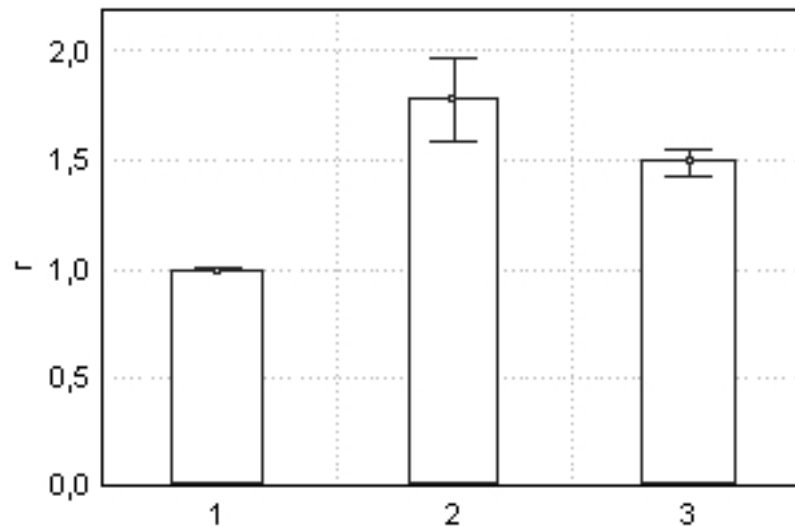


Рис. 32. Содержание тРНК^{Met1} в клетках А431, находящихся в состоянии медленной и активной пролиферации и в апоптозе. Диаграмма, показывающая содержание тРНК^{Met1} в активно пролиферирующих клетках, обработанных 0,1 нг/мл ЭФР (столбец 2), и апоптотических клетках, обработанных 100 нг/мл ЭФР (столбец 3), относительно содержания этой РНК в медленно пролиферирующих клетках (столбец 1). Высота столбца соответствует среднему значению отношения уровня содержания тРНК^{Met1} в данных клетках к уровню этой РНК в медленно пролиферирующих клетках (показатель r ср., см. табл. 6). Интервалы соответствуют стандартному отклонению. Уровень значимости: $p=0,004$ для столбцов 1 и 2, $p=0,0003$ для столбцов 1 и 3 и $p=0,05$ для столбцов 2 и 3.

5. Обсуждение

Из ядер плаценты человека многоступенчатым методом, включающим в себя высаливание сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина, выделена и очищена ДНК-зависимая РНК-полимераза III. О принадлежности полученных фракций к РНК-полимеразе III свидетельствует характерная для этой формы фермента чувствительность к α -аманитину (Serizawa *et al.*, 1992), а также способность корректно транскрибировать специфичную Alu-матрицу (ген класса III) *in vitro*. Использованный на первом этапе работы метод получения и очистки РНК-полимеразы III позволил выделить две субформы фермента, названные РНК-полимераза IIIа и IIIб и описанные ранее (Седова *et al.*, 1996). Эти субформы различаются по характеру элюции с колонки ДЕАЕ-сефадекса А-25, подвижности в градиенте концентрации глицерина и по уровню ферментативной активности. Субформа IIIб является более активной формой РНК-полимеразы III: одинаковый уровень транскрипции *in vitro* обеспечивает меньшее количество РНК-полимеразы IIIб, чем IIIа (Никитина *et al.*, 2002а). Кроме того, электрофорез с SDS с последующей окраской геля серебром выявил, что субформа IIIб является минорной формой РНК-полимеразы III, так как ее содержание в полученном препарате ниже, чем РНК-полимеразы IIIа. При использовании другого метода очистки фермента – с применением аффинной хроматографии на гепарине, ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирования в градиенте плотности глицерина, также были выделены две субформы РНК-полимеразы III клеток плаценты человека, по свойствам похожие на субформы IIIа и IIIб, полученные ранее. С помощью этого же метода из клеток эпидермоидной карциномы человека А431 также были выделены две субформы РНК-полимеразы III (Никитина *et al.*, 2002б). Наблюдаемые различия физико-химических свойств и уровней ферментативной активности двух субформ РНК-полимеразы III человека могут объясняться либо различиями в их субъединичном составе, либо присутствием различных посттрансляционных модификаций. Существование в клетке различающихся по субъединичному составу изоформ РНК-полимеразы III до сих пор не достаточно изучено, хотя ряд исследователей выявляли несколько субформ фермента при выделении и очистке РНК-полимеразы III из разных источников. Так, Скляр и Родер выделили из плазмоцитомы мышей МОРС15 две субформы РНК-полимеразы III, различающиеся по молекулярной массе одной субъединицы: у одной субформы она

составляла 32 кДа, а у другой – 33 кДа (Sklar, Roeder, 1976). Авторы предположили, что такое различие может объясняться модификацией этой субъединицы. Возможно, разные субформы РНК-полимеразы III участвуют в транскрипции генов класса III, содержащих промоторы различного типа. Это предположение подтверждается тем, что при выделении РНК-полимеразы III из клеток человека HeLa некоторые фракции, содержащие эту РНК-полимеразу, не были способны транскрибировать *in vitro* ген U6 мРНК с промотором 3-го типа даже при добавлении всех необходимых базальных транскрипционных факторов (Hu e.a., 2003).

Низкое содержание субформы IIIб в полученном нами препарате РНК-полимеразы III плаценты человека не позволило провести анализ ее субъединичного состава. Анализ полученного препарата РНК-полимеразы IIIа плаценты человека диск-электрофорезом в присутствии SDS с последующей окраской геля серебром выявил наличие в его составе не менее 11 полипептидов (Никитина и др., 2002а). В настоящее время субъединичный состав РНК-полимеразы III человека определен, выяснена первичная структура всех субъединиц этой полимеразы и клонированы их гены (Hu e.a., 2002). РНК-полимераза III была получена этими авторами из клеток HeLa методом двойной иммунопреципитации. Очищенный препарат фермента был разделен электрофорезом с SDS, и выявленные окрашиванием кумасси синим полипептиды были выделены из геля и проанализированы масс-спектрометрией. Субъединицы, принадлежащие РНК-полимеразе III, идентифицировали по гомологии их первичной структуры с известными последовательностями субъединиц этого фермента из дрожжей. С помощью этого подхода было показано, что в состав РНК-полимеразы III человека входит как минимум 17 субъединиц с молекулярными массами 155,6; 127,6; 79,8; 60,5; 44,4; 38,6; 35,6; 24,6; 25,9; 22,9; 17,1; 16,8; 15,2; 14,5; 12,3; 7,6 и 7,0 кДа (см. табл. 1). При сравнении молекулярных масс полипептидов, выявленных в полученном нами препарате РНК-полимеразы IIIа плаценты человека, с молекулярными массами субъединиц РНК-полимеразы III из клеток человека HeLa (Hu e.a., 2002), можно сделать вывод, что в нашем препарате окраска серебром выявила не все субъединицы РНК-полимеразы III, а лишь некоторые: с молекулярными массами ~155; 127; 79,8; 60,5; 44,4; 38,6; 35,6 и 25,9 кДа. По-видимому, это объясняется низким содержанием РНК-полимеразы в препарате: часть субъединиц не прокрашивается в данных условиях. Дополнительные выявленные полипептиды, которые, судя по их молекулярным массам, не являются субъединицами РНК-полимеразы III, могут являться какими-то белками, соочищающимися с полимеразой при использованном методе очистки. Необходимо отметить, что даже при выделении РНК-полимеразы III человека из клеток HeLa методом двойной иммунопреципитации с

последующей очисткой ионообменной хроматографией на колонке Mono Q с полимеразой соочищается целый ряд белков цитоскелета (β -актин, β -тубулин, кальмодулин и α -актинин) и протеинкиназа СКП (Hu e.a., 2002; Hu e.a., 2003). Полагают, что эти белки могут взаимодействовать с РНК-полимеразой III *in vivo*, и их соочищение с полимеразой не является случайным совпадением. Возможно, через эти белки происходит ассоциация РНК-полимеразы с ядерным скелетом (Hu e.a., 2002).

Далее мы показали, что с обеими субформами РНК-полимеразы III плаценты человека – IIIa и IIIb, соочищается протеинкиназная активность, фосфорилирующая ряд полипептидов в составе препаратов РНК-полимеразы. Протеинкиназная активность соочищается с РНК-полимеразой III плаценты человека как в случае использования метода очистки, включающего высаливание сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе P11 и ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина, так и при использовании метода, включающего аффинную хроматографию на гепарине, ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и ультрацентрифугирование в градиенте плотности глицерина (Никитина и др., 2002а; Никитина и др., 2002б). Это, а также тот факт, что данная протеинкиназная активность фосфорилирует компоненты полученных нами препаратов полимеразы и оказывает влияние на уровень транскрипции *in vitro*, может свидетельствовать в пользу того, что протеинкиназная активность прочно ассоциирована с РНК-полимеразой III плаценты человека и входит в состав ее холофермента. Недавно еще одна группа исследователей показала, что при очистке фермента с использованием высаливания сульфатом аммония, двойной иммунопреципитации и ионообменной хроматографии на колонке Mono Q с РНК-полимеразой III клеток человека HeLa соочищается протеинкиназа, а именно, – СКП (Hu e.a., 2003). Таким образом, наши данные и данные других исследователей свидетельствуют, что с большой долей вероятности протеинкиназа(ы) тесно ассоциированы с транскрипционной машиной РНК-полимеразы III человека и, вероятно, играют важную роль в ее работе. Нам не удалось выявить протеинкиназную активность в составе препаратов РНК-полимеразы III из клеток эпидермоидной карциномы человека А431. Однако нами было показано, что в цитоплазме клеток А431 присутствует протеинкиназная активность, фосфорилирующая как минимум одну субъединицу в составе препарата РНК-полимеразы IIIa из клеток А431 (Никитина и др., 2002в). Возможно, отсутствие ассоциированной протеинкиназной активности в препарате РНК-полимеразы III объясняется тем фактом, что для получения РНК-полимеразы III были использованы клетки А431 с замедленной пролиферацией. Можно предположить, что

действие протеинкиназы важно не для базальной транскрипции, а для активации транскрипции при переходе клетки к активной пролиферации, и в медленно пролиферирующих клетках протеинкиназа, способная фосфорилировать РНК-полимеразу III и/или ее транскрипционные факторы, находится в цитоплазме, а при переходе клетки к активной пролиферации протеинкиназа транспортируется в ядро, ассоциирует с транскрипционной машиной РНК-полимеразы III и активирует транскрипцию генов класса III. Однако это предположение требует еще дальнейших исследований.

Мы показали, что ассоциированная протеинкиназная активность фосфорилирует в составе препаратов обеих субформ РНК-полимеразы III плаценты человека полипептиды с молекулярными массами примерно 150, 105, 98, 67, 47, 44 и 23 кДа. Некоторые из этих полипептидов не выявлялись при анализе субъединичной структуры препарата РНК-полимеразы IIIа (см. ранее), что, по-видимому, объясняется их низким содержанием в наших препаратах полимеразы. Наряду с 7 субъединицами, которые фосфорилируются в препаратах обеих субформ РНК-полимеразы III, как минимум еще две субъединицы (с молекулярными массами примерно 33 и 93 кДа) фосфорилируются только в составе препарата РНК-полимеразы IIIа и одна субъединица (с молекулярной массой примерно 95 кДа) – только в составе препарата РНК-полимеразы IIIб (Никитина и др., 2002а). Мы предполагаем, что фосфорилированию подвергается несколько субъединиц РНК-полимеразы III, и эта модификация может участвовать в регуляции транскрипции. Выделенная нами РНК-полимераза III способна осуществлять корректную инициацию и терминацию транскрипции *Alu*-матрицы, поэтому нельзя исключить присутствие в препарате транскрипционных факторов TFIIIB и TFIIIC, необходимых для сборки преинициального комплекса на этой матрице. Известно, что фосфорилирование полипептидов может снижать их электрофоретическую подвижность в ПААГ с SDS (Cisek, Corden, 1989), следовательно, полученные нами данные позволяют лишь предположить, какие из выявленных фосфорилированных *in vitro* полипептидов могут являться субъединицами РНК-полимеразы III и базальных транскрипционных факторов. Так, полипептид с молекулярной массой примерно 150 кДа может представлять собой субъединицу RPC1 РНК-полимеразы III или субъединицу Vdp1 фактора TFIIIB, с молекулярной массой примерно 105 кДа – субъединицу TFIIIC120, с молекулярными массами примерно 98, 95 и 93 кДа – субъединицы Brf1 фактора TFIIIB или TFIIIC90, с молекулярной массой примерно 67 кДа – субъединицу RPC3 РНК-полимеразы III или субъединицу TFIIIC63, с молекулярной массой примерно 44 и 47 кДа – субъединицу RPC4 РНК-полимеразы III, с молекулярной массой 35 кДа – субъединицу RPC6 РНК-

полимеразы III, а с молекулярной массой примерно 23 кДа – субъединицы RPABC1 или RPC8 РНК-полимеразы III. Известно, что в клетках человека фосфорилированию могут подвергаться все субъединицы факторов TFIIIB и TFIIIC2 (Shen e.a., 1996; Johnston e.a., 2002). Фосфорилирование отдельных субъединиц РНК-полимеразы III человека в настоящее время не изучено, но у дрожжей было показано наличие этой модификации *in vivo* у субъединиц полимеразы с молекулярными массами 19 и 23 кДа (Bell e.a., 1977). О возможной модификации РНК-полимеразы III человека свидетельствует также тот факт, что при двумерном электрофорезе некоторые ее субъединицы выявляются в виде нескольких пятен (Wang, Reoder, 1997). Таким образом, можно предположить, что ассоциированная с РНК-полимеразой III плаценты человека протеинкиназная активность фосфорилирует некоторые субъединицы полимеразы и/или ее транскрипционных факторов.

На следующем этапе нашего исследования мы изучили свойства протеинкиназной активности, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека. Анализ кинетики фосфорилирования РНК-полимеразы IIIа плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью показал, что максимальный уровень включения меченого фосфата в белок достигается через 120 мин после начала реакции. При дальнейшей инкубации проб уровень фосфорилирования белка остается постоянным, что свидетельствует об отсутствии в препарате РНК-полимеразы IIIа протеинфосфатазной активности (Никитина и др., 2002а). Интересно, что анализ кинетики фосфорилирования РНК-полимеразы IIIб плаценты человека ассоциированной протеинкиназной активностью выявил присутствие в препарате этой субформы протеинфосфатазной активности, так как включение меченого фосфата в полипептиды снижается с увеличением времени инкубации пробы. Возможно, именно одновременное присутствие в составе препарата РНК-полимеразы IIIб и протеинкиназы, и протеинфосфатазы обеспечивает более высокую транскрипционную активность этой субформы по сравнению с субформой IIIа (см. далее). Ассоциированная протеинкиназная активность не способна фосфорилировать РНК-полимеразу IIIа плаценты человека после дефосфорилирования препарата полимеразы экзогенной щелочной фосфатазой (Никитина и др., 2002а). Следовательно, либо данная протеинкиназа может использовать как субстрат только уже частично фосфорилированную другой киназой РНК-полимеразу III, либо киназа сама является фосфобелком и инактивируется при дефосфорилировании щелочной фосфатазой. Ингибиторный анализ выявил, что киназная активность подавляется вортманнином в концентрации 200 нМ – специфичным ингибитором инозитол-фосфат-3 (PI3)-киназ, одного из семейств серин/треониновых (Ser/Thr)-киназ (Никитина и др., 2002а).

Известно, что в дрожжах протеинкиназа СКII активирует транскрипцию генов 5S рРНК и тРНК *in vivo* и *in vitro* (Hockman, Schultz, 1996; Ghavidel et al., 1999), а TOR-киназа (член семейства PI3-киназ) участвует в активации транскрипции генов класса III *in vivo* (Zaragoza et al., 1998). С другой стороны, в ооцитах *Xenopus laevis* ассоциированная с рибосомами циклин-зависимая киназа p34 ингибирует транскрипцию РНК-полимеразы III *in vitro* (Westmark et al., 1998). Наши данные о свойствах протеинкиназной активности, ассоциированной с холоэнзимом РНК-полимеразы III, позволяют предположить, что она принадлежит к семейству PI3-киназ. Возможно, она является TOR-киназой (принадлежащей к семейству PI3-киназ), для которой было показано, что она регулирует транскрипцию генов класса III у дрожжей в ответ на изменение концентрации питательных веществ в среде (Zaragoza et al., 1998). Как уже упоминалось, недавно было показано, что с РНК-полимеразой III клеток человека HeLa ассоциирована протеинкиназа СКII (Hu e.a., 2003). По нашим данным, ассоциированная с РНК-полимеразой III плаценты человека протеинкиназа может эффективно использовать как субстрат не только АТФ, но и GTP, что может указывать на ее принадлежность к СКII (Pinna, 1997). Однако мы не наблюдали существенного подавления активности этой протеинкиназы при действии ингибитора киназы СКII DRB в концентрации 60 и 150 мМ (Никитина и др., 2002а). Известно, что способность использовать GTP в качестве донора фосфатной группы не характерна для большинства протеинкиназ, но и не является уникальной для киназы СКII. Так, недавно в клетках медуллобластомы человека НВТ228 были обнаружены две ранее не известные протеинкиназы, тирозиновая и серин-треониновая, которые фосфорилируют O(6)-алкилгуанил-ДНК-алкилтрансферазу (AGT) и могут использовать в качестве источника фосфогрупп как АТФ, так и GTP, но активность которых не подавляется ингибиторами киназы СКII (Mullapudi e.a., 2000). Таким образом, можно предположить, что исследуемая нами протеинкиназа является TOR-киназой, но это предположение, безусловно, требует дальнейшего изучения.

Мы проверили, присутствуют ли в составе субъединиц РНК-полимеразы III человека сайты, по которым возможно фосфорилирование. Для этого были использованы две компьютерные программы – Motif Scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_id.phtml) и NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Blom e.a., 1999), позволяющие идентифицировать потенциальные сайты фосфорилирования в составе любых полипептидов с известной аминокислотной последовательностью. Поиск был проведен для всех 17 субъединиц РНК-полимеразы III человека. Программа Motif Scan идентифицировала возможные сайты фосфорилирования известными протеинкиназами в составе семи субъединиц РНК-полимеразы III человека: RPC1, RPC3, RPC4, RPC5, RPC7,

RPC9 и RPAVC1, а программа NetPhos 2.0, использующая метод “нейронных сетей”, – во всех субъединицах фермента. Двенадцать потенциальных сайтов фосфорилирования были выявлены обеими использованными программами. С помощью программы YinOYang 1.2. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) в составе 13 субъединиц РНК-полимеразы III человека были идентифицированы потенциальные сайты “инь-янь”, которые могут подвергаться реципрокной регуляторной модификации как фосфорилированием, так и гликозилированием. Таким образом, в составе всех субъединиц РНК-полимеразы III человека присутствуют сайты, которые могут быть мишенью протеинкиназ и гликозилтрансфераз, что служит подтверждением нашего предположения о возможности регуляторных модификаций этой полимеразы. В настоящее время экспериментально показано фосфорилирование лишь одного сайта: протеинкиназа СКII фосфорилирует *in vivo* и *in vitro* остаток Ser2 в составе общей для всех эукариотических РНК-полимераз субъединицы RPAVC2 (Kayukawa e.a., 1999). Необходимо отметить, что обе использованные программы – Motif Scan и NetPhos 2.0, – не идентифицировали этот сайт как потенциальную мишень для фосфорилирования. Это, по-видимому, объясняется тем, что данные программы ищут сайты модификации в контексте нескольких аминокислотных остатков по обе стороны от модифицируемого остатка, и находящиеся близко к концам полипептида остатки, как, например рассматриваемый Ser2 в составе субъединицы RPAVC2, заведомо игнорируются. Как уже говорилось, мы предполагаем, что протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразой III плаценты человека, может являться TOR-киназой. Полученные при анализе первичной структуры субъединиц РНК-полимеразы III человека данные не позволяют определить, имеются ли в составе этой полимеразы потенциальные сайты фосфорилирования TOR-киназой, так как эта протеинкиназа не входит в список киназ, сайты для которых способна узнавать программа Motif Scan.

На следующем этапе нашей работы мы показали, что РНК-полимераза III ядер плаценты человека, полученная высаливанием сульфатом аммония, ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и фосфоцеллюлозе Р11 и ультрацентрифугированием в градиенте плотности глицерина, способна осуществлять корректную транскрипцию *in vitro* (Никитина и др., 1998). В качестве матрицы использовали полученную нами рекомбинантную плазмиду, содержащую последовательность *Alu*-повтора с внутригенным промотором 2-го типа и терминаторами для РНК-полимеразы III. Выделенная РНК-полимераза III корректно считывает матрицу, образуя полноразмерные транскрипты как в присутствии фракций ядерного экстракта 0,35 М и 0,6 М KCl, содержащих транскрипционные факторы TFIIIB и TFIIIC2, так и в

отсутствие этих фракций. Из литературы известно, что для корректной транскрипции с промоторов 2-го типа РНК-полимеразе III млекопитающих требуется присутствие двух базальных транскрипционных факторов – TFIIIB и TFIIIC2 (Wang, Roeder, 1996). На первом этапе сборки преиницирующего комплекса фактор TFIIIC2 узнает специфические последовательности внутригенного промотора и связывается с ними. Затем происходит взаимодействие фактора TFIIIB с TFIIIC2. Фактор TFIIIB отвечает за связывание РНК-полимеразы III и её правильное расположение относительно точки начала транскрипции (Gabielsen, Sentenac, 1991). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что либо РНК-полимераза III способна корректно связываться с промотором Alu-матрицы независимо от транскрипционных факторов, либо в использованном нами препарате РНК-полимераза III существует в виде холофермента, в составе которого присутствуют факторы TFIIIB и TFIIIC2, остающиеся прочно ассоциированными с РНК-полимеразой III в процессе её выделения и очистки (Никитина и др., 1998).

Роль фосфорилирования РНК-полимеразы III в регуляции транскрипции генов класса III практически не изучена. Поэтому мы использовали модель транскрипции *in vitro* на Alu-матрице для исследования роли фосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека и/или компонентов ее транскрипционной машины ассоциированной протеинкиназной активностью в регуляции транскрипции. Усиление транскрипции Alu-матрицы *in vitro* наблюдается только если РНК-полимеразу IIIа фосфорилировать ассоциированной протеинкиназой в присутствии ДНК-матрицы, но не тогда, когда фосфорилирование осуществляется до или после взаимодействия полимеразы с ДНК (Никитина и др., 1998; Никитина и др., 2002б). В случае РНК-полимеразы IIIб, которая, как уже отмечалось, обладает более высокой транскрипционной активностью, чем РНК-полимераза IIIа, не наблюдается повышения уровня транскрипции Alu-матрицы *in vitro* при фосфорилировании полимеразы ассоциированной протеинкиназой. Однако в том случае, когда фосфорилирование РНК-полимеразы IIIб проводится до ее взаимодействия с ДНК-матрицей, наблюдается снижение уровня транскрипции, что может быть связано с наличием в этом препарате протеинфосфатазной активности (см. далее). Было также показано, что дефосфорилирование РНК-полимераз IIIа и IIIб щелочной фосфатазой снижает уровень транскрипции Alu-матрицы *in vitro* в том случае, если дефосфорилирование произошло до взаимодействия полимеразы с ДНК-матрицей. Инкубация дефосфорилированной РНК-полимеразы IIIа в присутствии АТР не приводит к восстановлению первоначального уровня транскрипции, что можно объяснить тем, что ассоциированная с полимеразой протеинкиназа не способна фосфорилировать РНК-

полимеразу IIIa, дефосфорилированную щелочной фосфатазой (Никитина и др., 2002a). Полученные данные свидетельствуют, что фосфорилирование РНК-полимеразы III и/или ассоциированных с ней транскрипционных факторов является регуляторной модификацией, способной влиять на уровень транскрипции, а их дефосфорилирование снижает уровень транскрипции. Тот факт, что дефосфорилированный препарат РНК-полимеразы III продолжает корректно транскрибировать матрицу, хотя и с меньшей эффективностью, говорит в пользу того, что фосфорилирование необходимо для активации базального уровня транскрипции, но не для правильной инициации и терминации транскрипции на Alu-матрице. Интересно, что усиление интенсивности транскрипции наблюдается лишь в случае фосфорилирования РНК-полимеразы III в присутствии матрицы, то есть на этапе сборки преиницирующего комплекса, инициации транскрипции или перехода к элонгации. В тех же случаях, когда фосфорилируется свободная или уже связавшаяся с матрицей РНК-полимераза III, интенсивность транскрипции не изменяется. В литературе также имеются данные о том, что действие протеинкиназы на РНК-полимеразу III зависит от того, на каком этапе транскрипционного цикла происходит фосфорилирование. Так, активация транскрипции *in vitro* гена U6 мРНК происходит только если ассоциированная киназа СКII фосфорилирует компоненты транскрипционной машины до инициации транскрипции (Hu e.a., 2003). Следует отметить, что полученный нами препарат РНК-полимеразы IIIb плаценты человека обладает, по-видимому, повышенной транскрипционной активностью на Alu-матрице *in vitro*, так как в использованной нами системе для оценки транскрипционной активности мы наблюдали только понижение уровня транскрипции, но не его повышение. Можно предположить, что этот факт объясняется присутствием в этом препарате не только протеинкиназной, но и протеинфосфатазной активности. Возможно, для активации транскрипции должно происходить не только фосфорилирование РНК-полимеразы на первых этапах транскрипционного цикла, но и дефосфорилирование полимеразы после окончания транскрипции, так как фосфорилированная РНК-полимераза III, по-видимому (как и РНК-полимераза II), не может эффективно иницировать новый раунд считывания гена. Так, известно, что для активации транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II, необходимо, чтобы при переходе от инициации к элонгации транскрипции С-терминальный домен (СТД) ее самой крупной субъединицы должен быть гиперфосфорилирован протеинкиназой, входящей в состав фактора ТFIIN. Но ассоциировать в преиниционный комплекс, собираемый на промоторе гена, может только гипофосфорилированная (по СТД) полимеразы. Поэтому для активации транскрипции необходимо присутствие в системе не только СТД-киназы, но и СТД-фосфатазы (Riedle,

Egly, 2000). С другой стороны, на данном этапе мы не можем исключить, что различие ферментативных активностей субформ РНК-полимеразы III, – IIIa и IIIb, обусловлено не фосфорилированием-дефосфорилированием, а другими факторами (различие в субъединичном составе субформ IIIa и IIIb, присутствие в препаратах разных белковых факторов и т.п.). В этом случае отсутствие повышения уровня транскрипции Alu-матрицы *in vitro* при фосфорилировании РНК-полимеразы IIIb ассоциированной протеинкиназой может объясняться тем, что присутствующая в препарате протеинфосфатаза не позволяет достигнуть максимального уровня фосфорилирования полимеразы, необходимого для активации транскрипции.

Как уже упоминалось, гены класса III отличаются большим разнообразием промоторов, и в транскрипции с разных промоторов участвуют разные комплексы транскрипционных факторов (Geiduschec, Tocchini-Valentini, 1988). Исходя из этого, можно предположить, что фосфорилирование РНК-полимеразы III необходимо для транскрипции только с промоторов некоторых типов. Нельзя также исключить возможности того, что разные протеинкиназы могут участвовать в активации транскрипции разных генов. Так, было показано, что ассоциированная с РНК-полимеразой III клеток HeLa киназа СКП участвует в активации транскрипции *in vitro* гена U6 мРНК с внешним промотором 3-го типа (Hu e.a., 2003). Мы же показали влияние протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III плаценты человека и являющейся, по-видимому, TOR-киназой, на транскрипцию гена Alu-повтора с промотором 2-го типа (Никитина и др., 2002б). Участие нескольких протеинкиназ в регуляции РНК-полимеразной активности лучше всего изучено на примере РНК-полимеразы II (Lin e.a., 2003). Различные киназы действуют на разных этапах транскрипции и фосфорилируют строго определенные аминокислотные остатки в последовательности СТД полимеразы, что играет существенную роль в том, какой эффект окажет данная модификация. Так, у дрожжей описаны две СТД-киназы, имеющие различные функции в клетке. Киназа CDK7 является компонентом базального транскрипционного фактора TFIIH и действует на самых ранних этапах синтеза пре-мРНК, фосфорилируя СТД при переходе от инициации к элонгации транскрипции. Таким образом, киназа CDK7 оказывает позитивный эффект, переводя РНК-полимеразу II в гиперфосфорилированное состояние, что необходимо для элонгации транскрипта. Другая СТД-киназа, CDK8 (у дрожжей она носит название Srb10), является компонентом холофермента РНК-полимеразы II и в ряде случаев оказывает негативный эффект на транскрипцию, фосфорилируя РНК-полимеразу II до инициации, что препятствует вхождению полимеразы в преиницирующий комплекс (Berk, 1999). Из клеток человека

HeLa были выделены СТД-киназы CDK7, CDK8 и CDK9 (Gold, Rice, 1998). Первые две киназы являются в клетках человека гомологами соответствующих ферментов из дрожжей и обладают схожими функциями. Показано, что CDK8 фосфорилирует в СТД остатки серина в положениях 2 и 5, в то время как CDK7 – только остаток серина в положении 5. Возможно, добавочный сайт фосфорилирования (остаток серина в положении 2) и обуславливает ингибирование транскрипции в результате действия киназы CDK8 (Berk, 1999). Киназа CDK9 входит в состав фактора элонгации P-TEFb, и ее функция заключается в поддержании СТД в гиперфосфорилированном состоянии, что необходимо для высокой процессивности РНК-полимеразы II (Berk, 1999).

Имеются данные, свидетельствующие о том, что фосфорилирование РНК-полимеразы III может влиять на процесс транскрипции. Так, для РНК-полимеразы III из низших эукариот (дрожжей) показано, что две её субъединицы, с молекулярными массами 19 и 23 кДа, фосфорилированы *in vivo* (Bell e.a., 1977). Кроме того, Хокманом и Шульцем было установлено, что для достижения высокого уровня базальной транскрипции генов тРНК и 5S рРНК, осуществляемой РНК-полимеразой III дрожжей *in vivo* и *in vitro*, необходима протеинкиназа СКII (Hockman, Schultz, 1996). Показано, что активность киназы СКII не является необходимой для правильного выбора точки начала транскрипции и распознавания терминатора. Вероятно, киназа СКII необходима на этапе сборки транскрипционного комплекса и (или) инициации транскрипции (Hockman, Schultz, 1996). В 1998 году Вестмарк с соавторами выделили из ооцитов *Xenopus laevis* циклин-зависимую киназу p34^{cdc2}, ассоциированную с рибосомами, которая ингибировала транскрипцию генов 5S рРНК и тРНК *in vitro* (Westmark e.a., 1998). Для киназы p34^{cdc2} выявлено, что она ингибирует транскрипцию генов класса III, фосфорилируя фактор ТФIIВ, а протеинкиназа СКII может оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на транскрипционную активность РНК-полимеразы III (Hu e.a., 2003). Однако субстрат СКII не был идентифицирован. Возможно, этим субстратом является не сама РНК-полимераза III, а один из базальных транскрипционных факторов. Показано, что активация транскрипции *in vitro* гена U6 мяРНК происходит в том случае, если фосфорилирование киназой СКII осуществляется в системе, содержащей РНК-полимеразу III, базальные транскрипционные факторы и ДНК-матрицу. В том же случае, когда фосфорилированию киназой СКII подвергают базальный фактор ТФIIВ в отсутствие РНК-полимеразы III, происходит ингибирование транскрипции (Hu e.a., 2003). Таким образом, эффект модификации может зависеть от того, какая протеинкиназа участвует в фосфорилировании, и от того, на каком этапе транскрипционного цикла происходит фосфорилирование. Это положение подтверждают и наши данные о том, что

влияние фосфорилирования РНК-полимеразы III и/или ассоциированных с ней транскрипционных факторов на транскрипцию Alu-гена *in vitro* зависит от этапа транскрипционного цикла, на котором осуществляется эта модификация.

В заключительной части нашего исследования мы изучили изменение активности РНК-полимеразы III в зависимости от физиологического состояния клетки. В качестве модели для этого эксперимента были выбраны клетки эпидермоидной карциномы человека A431, так как известно, что эти клетки экспонируют на своей поверхности большое количество рецепторов к эпидермальному фактору роста (ЭФР), и результат воздействия ЭФР на клетки A431 зависит от концентрации ростового фактора: ЭФР в низкой концентрации (0,1 нг/мл) приводит к активации пролиферации этих клеток, а ЭФР в высокой концентрации (10-100 нг/мл) приводит к апоптозу (Barnes, 1982; Gulli e.a., 1996; Chin e.a., 1997; Cao e.a., 2000; Rezgui e.a., 2000; Fong e.a., 2001; Leung e.a., 2001). Кроме того, при выращивании в бессывороточной среде клетки A431 продолжают пролиферировать, но при этом удлиняется время генерации: 48 ч вместо 30 ч при культивировании в среде с сывороткой (Barnes, 1982). С помощью метода RT-PCR в реальном времени мы определили изменение содержания транскриптов генов класса III – 5S рРНК и тРНК^{Met1}, – в тотальной РНК клеток A431, находящихся в состоянии медленной пролиферации при выращивании в бессывороточной среде, в состоянии активной пролиферации под действием эпидермального фактора роста (ЭФР) в низкой концентрации (0,1 нг/мл) и в состоянии апоптоза под действием ЭФР в высокой концентрации (100 нг/мл) (Никитина и др., 2003б).

Метод RT-PCR в реальном времени достаточно широко используется для определения абсолютного и относительного количества различных мРНК (Bustin, 2000). Но этот метод не описан для исследования содержания РНК-продуктов, синтезированных РНК-полимеразой III. Поэтому его применение потребовало оптимизации условий реакции (количества кДНК и концентрации праймеров в пробе) для каждого конкретного гена, так как уровень экспрессии генов 5S рРНК и тРНК сильно различается даже в одной и той же клетке (Никитина и др., 2003а). Известно, что содержание рибосомальных РНК составляет до 80 % от массы всей РНК клетки; количество же молекул 5S рРНК точно соответствует количеству молекул трех других рРНК (5,8S, 18S и 28S рРНК). Следовательно, содержание 5S рРНК в клетке велико (примерно 1,5% от массы тотальной РНК клетки). Содержание тРНК в клетке значительно уступает количеству рРНК (на все виды тРНК приходится около 15 % от массы тотальной РНК клетки). Геном человека содержит 17 генов для тРНК^{Met}, из них только два – для инициаторной тРНК^{Met1} и тРНК^{Met2} (Lowe, Eddy, 1997). Мы исследовали ген инициаторной метиониновой

тРНК^{iMet1}. Известно, что первичная структура большинства тРНК^{Met} высоко консервативна, однако, незначительные отличия последовательности тРНК^{iMet1} от последовательностей других тРНК^{Met} (Lowe, Eddy, 1997) и использование соответствующих высокоспецифичных праймеров (см. “Материалы и методы”) позволили нам амплифицировать последовательность именно инициаторной тРНК^{iMet1}. В литературе отсутствуют данные о количестве каждой из тРНК в клетке, но из вышеизложенного очевидно, что содержание тРНК^{iMet1} значительно меньше, чем 5S рРНК. Это нашло подтверждение и в полученных нами результатах: для анализа содержания 5S рРНК было достаточно использовать в пробе 1 нг кДНК, синтезированной на тотальной РНК, а для анализа содержания тРНК^{iMet1} – не менее 80 нг кДНК (Никитина и др., 2003а).

Методом RT-PCR в реальном времени мы показали, что доля 5S рРНК практически не меняется при переходе клеток от медленной к активной пролиферации, но повышается примерно в 2,5 раза в клетках на поздних стадиях апоптоза (Никитина и др., 2003б; Nikitina e.a., 2003). Полученные нами данные об одинаковой доле 5S рРНК в тотальной РНК медленно пролиферирующих и активно пролиферирующих клеток хорошо согласуются с данными, полученными ранее для других трех рРНК с использованием нозерн-блоттинга (Clarke e.a., 1996). Полагают, что синтез и деградация рРНК регулируются таким образом, что ее количество увеличивается пропорционально росту клетки, а ее доля в тотальной РНК не изменяется (Kief, Warner, 1981). В литературе отсутствуют данные о содержании 5S рРНК в клетках при апоптозе. Ранее было показано, что при индукции апоптоза в лимфоцитах человека γ -облучением через 15 мин происходит активация транскрипции РНК-полимеразой I генов пре-рРНК (предшественника трех рРНК: 28S, 18S и 5,8S). Однако на более поздних стадиях апоптоза происходит деградация 28S рРНК, вызванная пока не идентифицированной эндогенной РНКазной активностью (Houge et al., 1995). Надано и Сато проследили судьбу всех четырех рРНК (28S, 18S, 5,8S и 5S) при апоптозе в Т-клетках лейкемии человека Jurkat и клетках монобластной лейкемии человека U937 (Nadano, Sato, 2000). С помощью метода электрофореза РНК в агарозно-полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием было показано специфичное расщепление 28S рРНК, детектированное по появлению дополнительной полосы в геле. Подобной деградации других рРНК авторы не наблюдали (Nadano, Sato, 2000). Таким образом, наблюдаемое нами увеличение доли 5S рРНК в тотальной РНК клетки может объясняться двумя причинами: на начальном этапе апоптоза может происходить увеличение синтеза 5S рРНК, наряду с РНК других типов, а на поздних этапах высокостабильная 5S рРНК деградирует медленнее, чем другие виды РНК.

Мы показали, что доля тРНК^{Met1} в тотальной РНК возрастает примерно в 1,5-2 раза в активно пролиферирующих клетках (по сравнению с медленно пролиферирующими клетками) и остаётся такой же высокой в апоптотических клетках (Никитина и др., 2003б; Nikitina e.a., 2003). Можно полагать, что повышение содержания тРНК^{Met1} при активации клеток А431 низкими концентрациями ЭФР происходит из-за повышенной потребности активно делящихся клеток в инициаторных тРНК, необходимых для синтеза белка. Так, известно, что у дрожжей содержание инициаторной тРНК может влиять на скорость роста клетки: показано, что инактивация трех генов инициаторных тРНК (из четырех имеющихся в геноме) вызывает существенное замедление роста клеток (Francis, Rajbhandary, 1990). Интересно, что доля тРНК^{Met1} в тотальной РНК одинакова для активно пролиферирующих клеток и для клеток в состоянии апоптоза. При воздействии на клетки А431 высоких концентраций ЭФР первые морфологические признаки апоптоза наблюдаются уже через 7-8 ч (Gulli e.a. 1996), а мы исследовали клетки А431 после 24 ч обработки высокими концентрациями ЭФР, т.е. когда примерно 70% клеток находились на стадии раннего апоптоза, а ~17% клеток – на стадии позднего апоптоза. Наблюдаемое увеличение доли тРНК^{Met1} в тотальной РНК может быть вызвано двумя причинами. На ранних стадиях апоптоза ЭФР вызывает небольшое увеличение экспрессии тРНК, что, возможно, необходимо для обеспечения активной трансляции на ранних стадиях апоптоза для синтеза каспаз и других специфических проапоптотических белков. На более поздних стадиях апоптоза, когда трансляция, по-видимому, уже не осуществляется, доля тРНК в тотальной РНК не изменяется (по сравнению с активно пролиферирующими клетками). Это может свидетельствовать об отсутствии в клетках механизма избирательной деградации тРНК на поздних стадиях апоптоза.

В настоящее время регуляция транскрипции генов класса III при различных физиологических состояниях клетки изучена мало. Имеющиеся в литературных источниках данные касаются в основном изменения уровня транскрипции генов класса III при опухолевой трансформации и изменении скорости роста клетки. Полностью отсутствуют данные о регуляции работы РНК-полимеразы III при апоптозе. Известно, что уровень транскрипции генов класса III (генов 5S рРНК, тРНК, 7SL РНК и др.) в трансформированных клетках значительно выше, чем в нормальных благодаря дисфункции супрессоров опухолей p53, pRB и других покетных белков, и ряду других механизмов. Но в то же время уровень транскрипции этих генов в трансформированных клетках подвержен строгой регуляции в соответствии со скоростью роста клетки (Brown e.a., 2000). Так, клетки эпидермоидной карциномы человека А431 продолжают медленно пролиферировать даже в отсутствие ростовых факторов в среде (при бессывороточном

голодании), по-видимому, из-за мутаций в гене опухолевого супрессора p53 и аутокринной индукции ростовым фактором TGF- α (Derynck e.a., 1987). При добавлении в ростовую среду ЭФР в низкой концентрации эти клетки переходят к активному росту и пролиферации (Barnes, 1982).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что разные гены класса III (гены 5S рРНК и инициаторной тРНК) в клетках A431 транскрибируются с различной эффективностью, что является следствием регуляции их транскрипции под действием различных внешних стимулов. Экспрессия гена 5S рРНК регулируется таким образом, что доля 5S рРНК, как и других трех рРНК, транскрибируемых РНК-полимеразой I, в тотальной РНК клетки остается достаточно высокой и постоянной, поэтому должен существовать механизм, с помощью которого транскрипция гена 5S рРНК согласуется со скоростью роста клетки. Известно, что ключевым звеном сигнального пути, передающего в клетку информацию о наличии питательных веществ и ростовых факторов, необходимых для роста, является TOR-киназа, относящаяся к семейству инозитолфосфат-3-киназ (PI3-киназ) (Schmelzle, Hall, 2000). Наши результаты свидетельствуют, что активность протеинкиназы, ассоциированной с РНК-полимеразой III ядер плаценты человека, фосфорилирующей РНК-полимеразу III и/или компоненты ее транскрипционной машины *in vitro*, подавляется специфичным ингибитором PI3-киназ вортманнином. Таким образом, эта киназа, по-видимому, является TOR-киназой. Полагают, что TOR-сигнальный путь может действовать на транскрипцию генов класса III у дрожжей как напрямую, через фосфорилирование TOR-киназой фактора TFIIB и РНК-полимеразы III (Schultz, 1999) или супрессорного белка Maf1p (Upadhyya e.a., 2002), так и опосредованно, через регуляцию трансляции мРНК субъединиц РНК-полимеразы III (Schultz, 1999). Регуляция транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой III через TOR-сигнальный путь в клетках млекопитающих еще не исследована, но было показано, что в клетках некоторых линий TOR-киназа локализована преимущественно в ядре, а не в цитоплазме. Функции, которые TOR-киназа выполняет в ядре, пока не выяснены (Zhang e.a., 2002). Возможно, она служит посредником, обеспечивающим регуляцию транскрипции, согласованную со скоростью роста клетки.

Мы показали, что в случае апоптоза доля 5S рРНК в тотальной РНК клетки значительно повышена, что говорит об усилении экспрессии гена 5S рРНК на ранних этапах апоптоза и более медленной деградации 5S рРНК (по сравнению с тотальной РНК) – на поздних. В случае тРНК^{Met}1 увеличение доли этой РНК в тотальной РНК в 1,5-2 раза при переходе к активной пролиферации клеток может отражать потребность к усилению трансляции, т.к. для эффективной трансляции необходимо увеличение числа

инициаторных тРНК. Известно несколько механизмов, регулирующих транскрипцию генов класса III, которые активируются в клетке в ответ на действие ростовых факторов. Например, механизмы, включающие в себя действие протеинкиназы СКII (Ghavidel e.a., 1999), ERK-киназ (Felton-Edkins e.a., 2003a), фосфорилирование pRb или активацию синтеза онкобелка c-Мус (Felton-Edkins e.a., 2003b). Однако до сих пор не ясно, как достигается различная регуляция генов класса III с промоторами разного типа. Обычно в качестве основной мишени для регуляции рассматривается фактор TFIIIB. Это объясняется тем, что TFIIIB является универсальным фактором, необходимым для транскрипции всех генов класса III. Однако в последнее время в клетках многоклеточных организмов было идентифицировано несколько форм TFIIIB, различающихся по составу и, по крайней мере в некоторых случаях, по предпочтению к промотору определенного типа (Takada e.a., 2000). Наличие в клетке нескольких форм TFIIIB может объясняться необходимостью в независимой регуляции генов класса III с разными промоторами, которые могут использовать разные формы этого фактора. Такая независимая регуляция может достигаться как действием одного и того же сигнального пути на разные формы TFIIIB, так и активацией разных форм TFIIIB разными сигнальными путями. В то же время, нельзя исключать возможность того, что различие в регуляции синтеза 5S рРНК и тРНК является результатом воздействия сигнальных путей на фактор TFIIIA, специфичный только для генов 5S рРНК, и/или на фактор TFIIIC, который по-разному взаимодействует с компонентами преиниционных комплексов на промоторах генов 5S рРНК и тРНК (Geiduschek, Kassavetis, 2001). Таким образом, для изучения специфичной регуляции различных генов класса III представляется важным в дальнейшем исследовать участие в ней как разных форм фактора TFIIIB, так и факторов, специфичных для определенных генов – TFIIIA и TFIIIC, а также продолжить исследование различных модификаций РНК-полимеразы III.

В данной работе нам удалось показать, что из клеток плаценты человека можно выделить как минимум две, различающиеся по уровню транскрипционной активности, субформы РНК-полимеразы III, с одной из которых ассоциирована протеинкиназная активность, а с другой – протеинкиназная и протеинфосфатазная. Полученные результаты позволяют также предположить, что фосфорилирование и дефосфорилирование РНК-полимеразы III на определенных этапах транскрипционного цикла могут быть важны регуляции транскрипции генов класса III. Мы также показали, что содержание транскриптов разных генов класса III, – 5S рРНК и тРНК^{Met1}, по-разному изменяется в зависимости от физиологического состояния клетки, что указывает на существование

механизмов регуляции транскрипции, специфичных для разных генов класса III. Таким образом, данные нашего исследования свидетельствуют, что транскрипция генов класса III тонко регулируется, и ее интенсивность зависит от фосфорилирования компонентов транскрипционной машины РНК-полимеразы III и физиологического состояния клетки.

6. Выводы

1. Из ядер плаценты человека и клеток эпидермоидной карциномы человека A431 выделены две субформы ДНК-зависимой РНК-полимеразы III, названные IIIа и IIIб, которые корректно транскрибируют специфичную Alu-матрицу *in vitro* и различаются при фракционировании на ДЕАЕ-сефадексе А-25 и по плавучей плотности в градиенте концентрации глицерина. Субформа IIIб является минорной формой РНК-полимеразы III, и при транскрипции в системе *in vitro* на Alu-матрице обнаруживает более высокую удельную активность, по сравнению с субформой IIIа.
2. С обеими субформами РНК-полимеразы III плаценты человека – IIIа и IIIб, ассоциирована протеинкиназа, фосфорилирующая 7 полипептидов в составе препаратов обеих субформ, и дополнительно 2 полипептида в составе препарата РНК-полимеразы IIIа и один – в составе препарата РНК-полимеразы IIIб. Препарат субформы IIIб обладает также протеинфосфатазной активностью.
3. Методом ингибиторного анализа показано, что протеинкиназа, ассоциированная с РНК-полимеразой III плаценты человека, относится к семейству инозитол-фосфат-3 (PI3)-киназ, поскольку ее активность подавляется 200 нМ вортманнином, специфичным ингибитором этого семейства, и не подавляется 60 и 150 мкМ DRB, ингибитором киназы СКП, и 2 мкМ хелеритрином, ингибитором протеинкиназы С. Ассоциированная протеинкиназа может эффективно использовать в качестве субстрата не только АТР, но и GTP.
4. Фосфорилирование РНК-полимеразы IIIа ассоциированной протеинкиназой в присутствии ДНК-матрицы вызывает усиление транскрипции Alu-матрицы *in vitro*. Фосфорилирование РНК-полимеразы IIIб до ее взаимодействия с ДНК-матрицей приводит к снижению уровня транскрипции. Дефосфорилирование препаратов РНК-полимераз IIIа и IIIб экзогенной щелочной фосфатазой до взаимодействия полимеразы с ДНК-матрицей снижает уровень транскрипции Alu-матрицы *in vitro*.
5. Компьютерный анализ первичной последовательности субъединиц РНК-полимеразы III человека выявил в их составе не только потенциальные сайты фосфорилирования по остаткам серина, треонина и тирозина, но и сайты реципрокного гликозилирования и фосфорилирования по остаткам серина и треонина (сайты «инь-янь»).

6. Методом RT-PCR в реальном времени показано, что содержание РНК-продуктов различных генов класса III по-разному изменяется в зависимости от физиологического состояния клетки. Доля 5S рРНК в тотальной РНК клеток эпидермоидной карциномы человека А431 практически не изменяется при переходе клеток от медленной к активной пролиферации, но повышается примерно в 2,5 раза в апоптотических клетках. Доля же тРНК^{Met1} в тотальной РНК возрастает примерно в 1,5–2 раза в активно пролиферирующих клетках и остаётся такой же высокой в апоптотических клетках.

7. Благодарности

Автор с чувством глубокой признательности благодарит всех, кто помогал в проведении исследований, лежащих в основе данной диссертации, и особенно:

- заведующего лабораторией биохимических основ репродукции клетки Института цитологии РАН проф. В.И. Воробьева, ст.н.с., к.б.н. В.М. Седову и всех сотрудников лаборатории – за помощь в проведении исследований;
- заведующего лабораторией анатомии Медицинской школы Университета Тампере (Финляндия) доктора Пентти Туохимаа и сотрудницу этой лаборатории Н.Ю. Назарову – за помощь в проведении исследования содержания РНК методом RT-PCR в реальном времени.

Работа была поддержана грантами Федеральной целевой программы «Интеграция» (проекты А0144 и Б0030), грантами РФФИ 01-04-49307, 02-04-06778 и 03-04-06117, грантами для молодых ученых Администрации Санкт-Петербурга, грантом для аспирантов фонда Сороса и стипендией Президента РФ.

8. Список литературы

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 С.
- Никитина Т. В., Назарова Н. Ю., Тищенко Л. И., Туохимаа П., Седова В. М. Использование метода RT-PCR в реальном времени для изучения уровня экспрессии малых стабильных РНК в клетках эпидермоидной карциномы человека А431. // Цитология. 2003а. Т. 45 (№4). С.392-402.
- Никитина Т. В., Назарова Н. Ю., Тищенко Л. И., Туохимаа П., Седова В. М. Изучение уровня экспрессии *in vivo* малых стабильных РНК методом RT-PCR в реальном времени. // Сборник материалов конференции «Актуальные проблемы генетики». 2003в. Т. 2. С. 170.
- Никитина Т. В., Назарова Н. Ю., Тищенко Л. И., Туохимаа П., Седова В. М. Содержание в клетке малых стабильных ядерных нетранслируемых РНК зависит от ее физиологического состояния. // Тезисы докладов и сообщений, представленные на 1-й Съезд Общества клеточной биологии. Цитология. 2003г. Т. 45, № 9. С.905.
- Никитина Т.В. Влияние фосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека на интенсивность транскрипции *in vitro*. // Труды победителей конкурса грантов 1998 года для студентов, аспирантов и молодых ученых Санкт-Петербурга. Направление Биология".: Сборник трудов. - СПб: НИИХ СПбГУ. 1998. С.162-163.
- Никитина Т.В. Фосфорилирование РНК-полимеразы III плаценты человека активирует транскрипцию специфичной Alu-матрицы *in vitro*. // Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов». 2001а. С. 29-30.
- Никитина Т.В. Фосфорилирование РНК-полимеразы III протеинкиназной фракцией ядерного экстракта плаценты человека активирует транскрипцию специфичной Alu-матрицы *in vitro*. // Материалы 5^{ой} Пушкинской конференции молодых ученых «Биология – наука 21^{го} века». 2001б. С. 41-42.
- Никитина Т.В., Назарова Н.Ю., Тищенко Л.И., Туохимаа П., Седова В.М. Изучение уровня малых стабильных нетранслируемых РНК в клетках А431. // Материалы 7^{ой} Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21^{го} века». 2003б. С. 357.
- Никитина Т.В., Перова А.А., Гудзик К.А., Медведева Н.Д., Тищенко Л.И., Седова В.М. Фосфорилирование по тирозину ДНК-зависимой РНК-полимеразы III человека. // Цитология. 2002в. Т. 44 (№9). С. 896-897.
- Никитина Т.В., Седова В.М., Тищенко Л.И. Влияние фосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека на интенсивность транскрипции *in vitro* (предварительные результаты). // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3. 1998. Вып. 4 (№24). С. 86-91.
- Никитина Т.В., Седова В.М., Тищенко Л.И. Фосфорилирование *in vitro* РНК-полимеразы III протеинкиназной фракцией ядерного экстракта плаценты человека. // Материалы Четвертой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье». 2001. С. 187-188.
- Никитина Т.В., Тищенко Л.И., Седова В.М. Фосфорилирование-дефосфорилирование холоэнзима РНК-полимеразы III – модификации, регулирующие уровень транскрипции *in vitro*. // Цитология. 2002а. Т. 44 (№ 3). С. 277-284.
- Никитина Т.В., Тищенко Л.И., Седова В.М. Функциональная роль фосфорилирования РНК-полимеразы III. // Третий съезд биохимического общества Российской академии наук. 2002б. С. 409.
- Седова В.М., Никитина Т.В., Тищенко Л.И. Взаимосвязь фосфорилирования РНК-полимеразы III плаценты человека и интенсивности транскрипции *in vitro*. // XIII

- Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра». Цитология. 2000. Т. 42 (№ 3). С. 306.
- Седова В.М., Тищенко Л.И., Арбузова Е.Г. Гетерогенность РНК-полимеразы III плаценты человека и ее фосфорилирование. // Тезисы докладов и сообщений 12 Симпозиума «Структура и функция клеточного ядра». Санкт-Петербург. 1996. С. 39.
- Седова В.М., Тищенко Л.И., Арбузова Е.Г., Никитина Т.В. Фосфорилирование *in vitro* РНК-полимеразы III плаценты человека. // Второй съезд биохимического общества Российской академии наук. 1997. С. 93-94.
- Тищенко Л.И., Никитина Т.В., Седова В.М. Фосфорилирование РНК-полимеразы III ядерными протеинкиназами. // Сб. «Нервная система; Вып. 37». 2002. С. 242-252.
- Ahmed K., Gerber D.A., Cochet C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. // *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. P. 226-230.
- Andrau J.C., Sentenac A., Werner M. Mutagenesis of yeast TFIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 288. P. 511-520.
- Asturias F.J., Craighead J.L. RNA polymerase II initiation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003. V. 100. P. 6893-6895.
- Baker R.E., Camier S., Sentenac A., Hall B.D. Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor tau to two intragenic regions. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1987. V. 84. P. 8768-8772.
- Bannister A.J., Miska E.A. Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2000. V. 57. P. 1184-1192.
- Barnes D.W. Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. // *J. Cell Biol.* 1982. V. 93. P. 1-4.
- Bartholomew B., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P. Two components of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIB (TFIIB) are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIC. // *Mol Cell. Biol.* 1991. V. 11. P. 5181-5189.
- Bell G.I., Valenzuela P., Rutter W.J. Phosphorylation of yeast DNA-dependent RNA polymerases *in vivo* and *in vitro*. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3082-3091.
- Berk A.J. Activation of RNA polymerase II transcription. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. V. 11. P. 330-335.
- Bertram P.G., Choi J.H., Carvalho J., Chan T.-F., Ai W., Zheng X.F.S. Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 1246-1252.
- Besser D., Gotz F., Schulze-Forster K., Wagner H., Kroger H., Simon D. DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. // *FEBS Lett.* 1990. V. 269. P. 358-362.
- Bjerregaard B., Wrezycki C., Philimonenko V.V., Hozak P., Laurincik J., Niemann H., Motlik J., Maddox-Hyttel P. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phases of porcine oocyte growth. // *Biol. Reprod.* 2003. 10.1095/bioreprod.103.020941.
- Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 294. P. 1351-1362.
- Boguta M., Czerska K., Zoladek T. Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Gene.* 1997. V. 185. P. 291-296.
- Bollen M., Beullens M. Signaling by protein phosphatases in the nucleus. // *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. P. 138-145.
- Braun B.R., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P. Bending of the *Saccharomyces cerevisiae* 5S rRNA gene in transcription factor complexes. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 22562-22569.
- Breedon L.L. Periodic transcription: a cycle within a cycle. // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. R31-R38.

- Briand J.-F., Navarro F., Gadal O., Thuriaux P. Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 189-195.
- Brivanlou A.H., Darnell J.E. Signal transduction and the control of gene expression. // *Science*. 2002. V. 295. P. 813-818.
- Brooks C.L., Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. P. 164-171.
- Brow D.A., Guthrie C. Transcription of a yeast U6 snRNA gene requires a polymerase III promoter element in a novel position. // *Genes Dev.* 1990. V. 4. P. 1345-1356.
- Brown T.R., Scott P.H., Stein T., Winter A.G., White R.J. RNA polymerase III transcription: its control by tumor suppressors and its deregulation by transforming agents. // *Gene Expr.* 2000. V. 9. P. 15-28.
- Burnol A.F., Margottin F., Huet J., Almouzni G., Prioleau M.N., Mechali M., Sentenac A. TFIIC relieves repression of U6 snRNA transcription by chromatin. // *Nature*. 1993. V. 362. P. 475-477.
- Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. // *J. Mol. End.* 2000. V. 25. P. 169-193.
- Cairns C.A., White R.J. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 3112-3123.
- Cans C., Mangano R., Barila D., Neubauer G., Superti-Furga G. Nuclear tyrosine phosphorylation: the beginning of the map. // *Biochem. Pharmac.* 2000. V. 60. P. 1203-1215.
- Cao L., Yao Y., Lee V., Kiani C., Spaner D., Lin Z., Zhang Y., Adams M.E., Yang B.B. Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion. // *J. Cel. Biochem.* 2000. V. 77. P. 569-583.
- Carbon P., Krol A. Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA gene: a system that combines an internal B box and upstream element also found in U6 snRNA genes. // *The EMBO J.* 1991. V. 10. P. 599-606.
- Carbon P., Murgo S., Ebel J.-P., Krol A., Tebb G., Mattaj I.W. A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II. // *Cell.* 1987. V. 51. P. 71-79.
- Carpenter G. Nuclear localization and possible function of receptor tyrosine kinases. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. P. 143-148.
- Chedin S., Riva M., Schultz P., Sentenac A., Carles C. The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3857-3871.
- Chesnokov I., Chu W.M., Botchan M.R., Schmid C.W. p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 7084-7088.
- Cheung W.L., Ajiro K., Samejima K., Kloc M., Cheung P., Mizzen C.A., Beeser A., Etkin L.D., Chernoff J., Earnshaw W.C., Allis C.D. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. // *Cell.* 2003. V. 113. P. 507-517.
- Chin Y.E., Kitagawa M., Kuida K., Flavell R.A., Fu X.-Y. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 5328-5337.
- Chu W. M., Liu W. M., Schmid C. W. RNA polymerase III promoter and terminator elements affect Alu RNA expression. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1750-1757.
- Cisek L. J., Corden J. L. Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. // *Nature.* 1989. V. 339. P. 679-694.
- Clarke E.M., Peterson C.L., Brainard A.V., Riggs D.L. Regulation of the RNA polymerase I and III transcription systems in response to growth conditions. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 22189-22195.

Comer F.I., Hart G.W. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 29179-29182.

Conaway R.C., Brower C.S., Conaway J.W. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. // *Science.* 2002. V. 296. P. 1254-1258.

Crichton D., Woiwode A., Zhang C., Mandavia N., Morton J.P., Warnock L.J., Milner J., White R.J., Johnson D.L. p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIB. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 2810-2820.

Dahmus M.E. Phosphorylation of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 3332-3339.

Davie J.K., Dent S.Y.R. Transcriptional control: an activating role for arginine methylation. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. P. R59-R61.

Dean N., Berk A.J. Ordering promoter binding of class III transcription factors TFIIC1 and TFIIC2. // *Mol Cell Biol.* 1988. V. 8. P. 3017-3025.

Dechampsme A.M., Koroleva O., Leger-Silvestre I., Gas N., Camier S. Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 145. P. 1369-1380.

DeRizi J.L., Iyer R., Brown P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. // *Curr. Opin. Genet.* 1997. V. 7. P. 680-686.

Derynck R., Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 707-712.

Dignam J.D., Lebovitz R.M., Roeder R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. // *Nucleic Acids Res.* 1983. V. 11. P. 1475-1477.

Dumay H., Rubbi L., Sentenac A., Marck C. Interaction between yeast RNA polymerase III and transcription factor TFIIC via ABC10alpha and tau131 subunits. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 33462-33468.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 2245-2262.

Englander E.W., Wolffe A.P., Howard B.H. Nucleosome interactions with a human Alu element. Transcriptional repression and effects of template methylation. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 19565-19573.

Fan H., Sakulich A.L., Goodier J.L., Zhang X., Qin J., Marais R.J. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. // *Cell.* 1997. V. 88. P. 707-715.

Fath S, Milkereit P., Peyroche G., Riva M., Carles C., Tschochner H. Differential roles of phosphorylation in the formation of transcriptionally active RNA polymerase I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 14334-14339.

Felton-Edkins Z.A., Fairley J.A., Graham E.L., Johnston I.M., White R.J., Scott P.H. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. // *EMBO J.* 2003b. V. 22. P. 2422-2432.

Felton-Edkins Z.A., Kenneth N.S., Brown T.R., Daly N.L., Gomez-Roman N., Grandori C., Eisenman R.N., White R.J. Direct Regulation of RNA Polymerase III Transcription by RB, p53 and c-Myc. // *Cell Cycle.* 2003a. V. 2. P. 181-184.

Felton-Edkins Z.A., White R.J. Multiple mechanisms contribute to the activation of RNA polymerase III transcription in cells transformed by papovaviruses. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 48182-48191.

Fischle W., Wang Y., Allis C.D. Histone and chromatin cross-talk. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. P. 172-183.

Flores A., Briand J.-F., Gadal O., Andrau J.-C., Rubbi L., Van Mullem V., Boschiero C., Goussot M., Marck C., Carles C., Thuriaux P., Sentenac A., Werner M. A protein-protein

- interaction map of yeast RNA polymerase III. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 7815-7820.
- Fong W.F., Leung C.-H., Lam W., Wong N.-S., Cheng S.-H. Epidermal growth factor induces Gadd45 (growth arrest and DNA damage inducible protein) expression in A431 cells. // *Biochem. et Biophys. Acta*. 2001. V. 1517. P. 250-256.
- Francis M.A., Rajbhandary U.L. Expression and function of a human initiator tRNA gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell. Biol*. 1990. V. 10. P. 4486-4494.
- Gabrielsen O.S., Sentenac A. RNA polymerase III (C) and its transcription factors. // *Trends Biochem. Sci*. 1991. V. 16. P. 412-416.
- Geiduschec E. P., Kassavetis G.A. The RNA polymerase III transcription apparatus. // *J. Mol. Biol*. 2001. V. 310. P. 1-26.
- Geiduschec E. P., Tocchini-Valentini G. P. Transcription by RNA polymerase III. // *Annu. Rev. Biochem*. 1988. V. 57. P. 873-914.
- Gerlach V.L., Whitehall S.K., Geiduschek E.P., Brow D.A. TFIIB placement on a yeast U6 RNA gene in vivo is directed primarily by TFIIC rather than by sequence-specific DNA contacts. // *Mol Cell Biol*. 1995. V. 15. P. 1455-1466.
- Ghavidel A., Schultz M.C. TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. // *Cell*. 2001. V. 106. P. 575-584.
- Ghavidel A., Hockman D. J., Schultz M. C. A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of the TATA binding protein. // *Mol. Cell. Biochem*. 1999. V. 191. P. 143-148.
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. // *J. Natl. Cancer Inst*. 1973. V. 51. P. 1417-1423.
- Gokal P.K., Cavanaugh A.H., Thompson E.A. The effect of cycloheximide upon transcription of rRNA, 5S rRNA, and tRNA genes. // *J. Biol. Chem*. 1986. V. 261. P. 2536-2541.
- Gold M.O., Rice A.P. Targeting of CDK8 to a promoter-proximal RNA element demonstrates catalysis-dependent activation of gene expression. // *Nucleic Acids Res*. 1998. V. 26. P. 3784-3788.
- Gomez-Roman N., Grandori C., Eisenman R.N., White R.J. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. // *Nature*. 2003. V. 421. P. 290-294.
- Goodier J.L., Maraia R.J. Terminator-specific recycling of a B1-Alu transcription complex by RNA polymerase III is mediated by the RNA terminus-binding protein La. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 26110-26116.
- Gottesfeld J. M., Wolf V. J., Dang T., Forbes D. J., Hartl P. Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIB component. // *Science*. 1994. V. 263. P. 81-84.
- Gottlieb E., Steitz J.A. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. // *EMBO J*. 1989. V. 8. P. 841-850.
- Grandori C., Cowley S.M., James L.P., Eisenman R.N. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. // *Cell Dev. Biol*. 2000. V. 16. P. 653-660.
- Grove A., Kassavetis G.A., Johnson T.E., Geiduschek E.P. The RNA polymerase III-recruiting factor TFIIB induces a DNA bend between the TATA box and the transcriptional start site. // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 285. P. 1429-1440.
- Grummt I. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. // *Prog. Nucleic Acids. Res. Mol. Biol*. 1999. V. 62. P. 109-154.
- Gulli L.F., Palmer K.C., Chen Y.Q., Reddy K.B. Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. // *Cell Growth Differ*. 1996. V. 7. P. 173-178.

- Hall B.D., Clarkson S.G., Tocchini-Valentini G. Transcription initiation of eucaryotic transfer RNA genes. // *Cell*. 1982. V. 29. P. 3-5.
- Haltiwanger R.S., Busby S., Grove K., Li S., Mason D., Medina L., Moloney D., Philipsberg G., Scartozzi R. O'glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 231. P. 237-242.
- Hampsey M., Reinberg D. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. // *Cell*. 2003. V. 113. P. 429-432.
- Hannan R. D., Hempel W. M., Cavanaygh A., Arino T., Dimitrov S. I., Moss T., Rothblum L. Affinity purification of mammalian RNA polymerase I. Identification of an associated kinase. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 1257-1267.
- Hazzalin C.A., Mahadevan L.C. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? // *Mol Cell.Biol.* 2002. V. 3. P. 30-40.
- Henry R.W., Ma B., Sadowski C.L., Kobayashi R., Hernandez N. Cloning and characterization of SNAP50, a subunit of the snRNA-activating protein complex SNAPc. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 7129-7136.
- Hirsch J., Martelo O.J. Phosphorylation of rat liver ribonucleic acid polymerase I by nuclear protein kinases. // *J. Biol. Chem.* 1976, V. 251. P. 5408-5413.
- Hockman D. J., Schultz M. C. Casein kinase II is required for efficient transcription by RNA polymerase III. // *Mol Cell.Biol.* 1996. V. 16. P. 892-898.
- Hoeffler W.K., Kovelman R., Roeder R.G. Activation of transcription factor IIIc by the adenovirus E1A protein. // *Cell*. 1988. V. 53. P. 907-920.
- Holmberg C.I., Tran S.E.F., Eriksson J.E., Sistonen L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. // *Trends Biol. Sci.* 2002. V. 27. P. 619-627.
- Houge G., Robaye B., Eikhom T.S., Golstein J., Mellgren G., Gjertsen B.T., Lanotte M., Doskeland S.O. Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 2051-2062.
- Hu P., Wu S., Hernandez N. A minimal RNA polymerase III transcription system from human cells reveals positive and negative regulatory roles for CK2. // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. P. 699-709.
- Hu P., Wu S., Sun Y., Yuan C.C., Kobayashi R., Myers M.P., Hernandez N. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 8044-8055.
- Huang Y., Marais R. J. Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. 2675-2690.
- Huet J., Manadu N., Dieci G., Peyroche G., Conesa C., Lefebvre O., Ruet A., Riva M., Sentenac A. RNA polymerase III and class III transcription factors from *Saccharomyces cerevisiae*. // *Methods Enzymol.* 1996. V. 273. P. 249-267.
- Hunter T. Signaling – 2000 and beyond. // *Cell*. 2000. V. 100. P. 113-127.
- Inostroza J.A., Mermelstein F.H., Ha I., Lane W.S., Reinberg D. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. // *Cell*. 1992. V. 70. P. 477-489.
- Jahn D., Wingender E., Seifart K.H. Transcription complexes for various class III genes differ in parameters of formation and stability towards salt. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 193. P. 303-313.
- James C.B.L., Carter T.H. Activation of protein kinase C inhibits adenovirus VA gene transcription in vitro. // *J. Gen. Virol.* 1992. V. 73. P. 3133-3139.
- Jensen R.C., Wang Y., Hardin S.B., Stumph W.E. The proximal sequence element (PSE) plays a major role in establishing the RNA polymerase specificity of *Drosophila* U-snRNA genes // *Nucleic Acids Res.* 1998. V.26. P. 616-622.

- Joazeiro C.A., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P. Alternative outcomes in assembly of promoter complexes: the roles of TBP and a flexible linker in placing TFIIB on tRNA genes. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 725-739.
- Johnson L.N., O'Reilly M. Control by phosphorylation. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996. V.6. P. 762-769.
- Johnston I.M., Allison S.J., Morton J.P., Schramm L., Scott P.H., White R.J. CK2 forms a stable complex with TFIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 3757-3768.
- Juttermann R., Hosokawa K., Kochanek S., Doerfler W. Adenovirus type 2 VAI RNA transcription by polymerase III is blocked by sequence-specific methylation. // *J. Virol.* 1991. V. 65. P. 1735-1742.
- Kandolf H. The H1A histone variant is an in vivo repressor of oocyte-type 5S gene transcription in *Xenopus laevis* embryos. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994. V. 91. P. 7257-7261.
- Kassavetis G.A., Braun B.R., Nguyen L.H., Geiduschek E.P. *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. // *Cell.* 1990. V. 60. P. 235-245.
- Kassavetis G.A., Kumar A., Letts G.A., Geiduschek E.P. A post-recruitment function for the RNA polymerase III transcription-initiation factor IIB. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998. V. 95. P. 9196-9201.
- Kassavetis G.A., Riggs D.L., Negri R., Nguyen L.H., Geiduschek E.P. Transcription factor IIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. // *Mol Cell. Biol.* 1989. V. 9. P. 2551-2566.
- Kayukawa K., Makino Y., Yogosawa S., Tamura T. A serine residue in the N-terminal acidic region of rat RPB6, one of the common subunits of RNA polymerases, is exclusively phosphorylated by casein kinase II in vitro. // *Gene.* 1999. V. 234. P. 139-147.
- Kief D.R., Warner J.R. Coordinate control of syntheses of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell. Biol.* 1981. V. 1. P. 1007-1015.
- Kovelman R., Roeder R. G. Purification and characterization of two forms of human transcription factor IIC. // *J Biol Chem.* 1992. V. 267. P. 24446-24456.
- Kranias E.G., Schweppe J.S., Jungmann R.A. Phosphorylative and functional modifications of nucleoplasmic RNA polymerase II by homologous adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from calf thymus and by heterologous phosphatase. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 6750-6758.
- Kraus V.B., Inostroza J.A., Yeung K., Reinberg D., Nevins J.R. Interaction of the Dr1 inhibitory factor with TATA binding protein is disrupted by adenovirus E1A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994. V. 91. P. 6279-6282.
- Kruppa M., Moir R.D., Kolodrubetz D., Willis I.M. Nhp6, an HMG1 protein, functions in SNR6 transcription by RNA polymerase III in *S. cerevisiae*. // *Mol. Cell.* 2001. V. 7. P. 309-318.
- Kundu T.K., Wang Z., Roeder R.G. Human TFIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. // *Mol Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 1605-1615.
- Lachner M., Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. // *Curr. Opin. cell biol.* 2002. V. 14. P. 286-298.
- Laemmly O. Maturation of head of bacteriophage T4. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680-685.
- Lagna G., Kovelman R., Sukegawa J., Roeder R. Cloning and characterization of an evolutionarily divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIC. // *Mol Cell. Biol.* 1994. V. 14. P. 3053-3064.
- Landick R. RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. // *Cell.* 1997. V. 88. P. 741-744.

- Larminie C.G., Cairns C.A., Mital R., Martin K., Kouzarides T., Jackson S.P., White R.J. Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 2061-2071.
- Larminie C.G., Sutcliffe J.E., Tosh K., Winter A.G., Felton-Edkins Z.A., White R.J. Activation of RNA polymerase III transcription in cells transformed by simian virus 40. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 4927-4934.
- Lassar A.B., Martin P.L., Roeder R.G. Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. // *Science.* 1983. V. 222. P. 740-748.
- Leung C.-H., Lam W., Zhuang W.-J., Wong N.-S., Fong W.F. PKC δ -dependent deubiquitination and stabilization of Gadd45 in A413 cells overexposed to EGF. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 285. P. 283-288.
- Li Y., Moir R.D., Sethy-Coraci I.K., Warner J.R., Willis I.M. Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 3843-3851.
- Lin P.S., Tremeau-Bravard A., Dahmus M.E. The repetitive C-terminal domain of RNA polymerase II: multiple conformational states drive the transcription cycle. // *The Chemical Record.* 2003. V. 3. P. 235-245.
- Lin-Marq N., Clarkson S.G. Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 2033-2041.
- Liu W.M., Schmid C.W. Proposed roles for DNA methylation in Alu transcriptional repression and mutational inactivation. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 1351-1359.
- Loening V. E. The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. // *Biochem. J.* 1967. V. 102. P. 251-257.
- Lopez S., Livingstone-Zatchej M., Jourdain S., Thoma F., Sentenac A., Marsolier M.C. High-mobility-group proteins NHP6A and NHP6B participate in activation of the RNA polymerase III SNR6 gene. // *Mol Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 3096-3104.
- Lowe T.M., Eddy S.R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 955-964.
- Mahajan P. Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin. // *Int. J. Immunopharmacol.* 1994. V. 16. P. 711-721.
- Mann C., Micouin J.Y., Chiannikulchai N., Treich I., Buhler J.M., Sentenac A. RPC53 encodes a subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase C (III) whose inactivation leads to a predominantly G1 arrest. // *Mol Cell Biol.* 1992. V. 12. P. 4314-4326.
- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. // *Science.* 2002. V. 298. P. 1912-1918.
- Maraia R.J. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996. V. 93. P. 3383-3387.
- Martinez E. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. // *Plant Mol. Biol.* 2002. V. 50. P. 925-947.
- Matthews J.L., Zwick M.G., Paule M.R. Coordinate regulation of ribosomal component synthesis in *Acanthamoeba castellanii*: 5S RNA transcription is down regulated during encystment by alteration of TFIIIA activity. // *Mol Cell Biol.* 1995. V. 15. P. 3327-3335.
- McCulloch V., Hardin P., Peng W., Ruppert J.M., Lobo-Ruppert S.M. Alternatively spliced hBRF variants function at different RNA polymerase III promoters. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 4134-4143.
- Meissner W., Thomae R., Seifart K.H. The activity of transcription factor IIIC1 is impaired during differentiation of F9 cells. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 7148-7156.
- Mullapudi S.R., Ali-Osman F., Shou J., Srivenugopal K.S. DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumour cells. // *Biochem J.* 2000. V. 351. P. 393-402.

- Miller J., McLachlan A.D., Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 1609-1614.
- Mital R., Kobayashi R., Hernandez N. RNA polymerase III transcription from the human U6 and adenovirus type 2 VAI promoters has different requirements for human BRF, a subunit of human TFIIIB. // *Mol Cell Biol.* 1996. V. 16. P. 7031-7042.
- Mitchell M.T., Hobson G.M., Benfield P.A. TATA box-mediated polymerase III transcription in vitro. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1995-2005.
- Mittal V., Hernandez N. Role for the amino-terminal region of human TBP in U6 snRNA transcription. // *Science.* 1997. V. 275. P. 1136-1140.
- Mittal V., Ma B., Hernandez N. SNAP(c): a core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by the Oct-1 POU domain. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 1807-1821.
- Murphy S., Di Liegro C., Melli M. The in vitro transcription of the 7S K RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter. // *Cell.* 1987. V. 51. P. 81-87.
- Nadano D., Sato T.-A. Caspase-3-dependent and -independent degradation of 28S ribosomal RNA may be involved in the inhibition of protein synthesis during apoptosis initiated by death receptor engagement. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 13967-13973.
- Nikitina T.V., Nazarova N.Y., Tishchenko L.I., Tuohimaa P., Sedova V.M. The level of 5S rRNA and tRNA depends on the physiological state of the cell. // Abstract book of the Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics. Kiev. 2003. P. 109.
- Nolte R.T., Conlin R.M., Harrison S.C., Brown R.S. Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998. V. 5. P. 2938-2943.
- Oelgeschlager T. Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. // *J. Cell. Physiol.* 2002. V. 190. P. 160-169.
- Oettel S., Hartel F., Kober I., Iben S., Seifart K.H. Human transcription factors IIC2, IIC1 and a novel component IIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2440-2447.
- Oettel S., Kober I., Seifart K.H. The activity binding to the termination region of several pol III genes represents a separate entity and is distinct from a novel component enhancing U6 snRNA transcription. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 4324-4331.
- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. P. 431-432.
- Ory S., Zhou M., Conrads T.P., Veenstra T.D., Morrison D.K. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 1356-1364.
- Park K.-Y., Pfeifer K. Epigenetic interplay. // *Nature.* 2003. V. 34. P. 126-128.
- Paule M.R., White R.J. Transcription by RNA polymerases I and III. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 1283-1298.
- Pelham H.R., Brown D.D. A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1980. V. 77. P. 4170-4174.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 2002-2007.
- Pieler T., Hamm J., Roeder R.G. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. // *Cell.* 1987. V. 48. P. 91-100.
- Pinna L.A. Protein kinase CK2. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997. V. 29. P. 551-554.
- Pluta K., Lefebvre O., Martin N.C., Smagowicz W.J., Stanford D.R., Ellis S.R., Hopper A.K., Sentenac A., Boguta M. Maf1p, a negative effector of RNA polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. P. 5031-5040.

- Powers T., Walter P. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Biol. Cell*. 1999. V. 10. P. 987-1000.
- Ramanathan Y., Rajpara S. M., Reza S. M., Lees E., Shuman S., Mathews M. B., Pe'ery T. Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. // *J Biol Chem*. 2001. V. 276. P. 10913–10920.
- Real-time PCR vs. traditional PCR. Tutorial. Applied Biosystems internal publication. http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf
- Rezgui S.S., Honore S., Rognoni J.-B., Martin P.-M., Penel C. Up-regulation of $\alpha 2\beta 1$ integrin cell-surface expression protects A431 cells from epidermal growth factor-induced apoptosis. // *Int. J. Cancer*. 2000. V. 87. P. 360-367.
- Riedl T., Egly J. M. Phosphorylation in transcription: the CTD and more. // *Gene Expr*. 2000. V. 9. P. 3–13.
- Roberts D.N., Stewart A.J., Huff J.T., Cairns B.R. The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relations. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 14695–14700.
- Roeder RG, Rutter WJ. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. // *Nature*. 1969 Oct 18;224(216):234-7.
- Russanova V.R., Driscoll C.T., Howard B.H. Adenovirus type 2 preferentially stimulates polymerase III transcription of Alu elements by relieving repression: a potential role for chromatin. // *Mol Cell Biol*. 1995. V. 15. P. 4282-4290.
- Schenk P.W., Snaar-Jagalska B.E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1999. V. 1449. P. 1–24.
- Schmelzle T., Hall M. N. TOR, a central controller of cell growth. // *Cell*. 2000. V. 103. P. 253–262.
- Schramm L., Hernandez N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. // *Genes Dev*. 2002. V. 16. P. 2593-2620.
- Schramm L., Pendergrast P.S., Sun Y., Hernandez N. Different human TFIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. // *Genes Dev*. 2000. V. 14. P. 2650-2663.
- Schreiber S.L., Bernstein B.E. Signaling network model of chromatin. // *Cell*. 2002. V. 111. P. 771-778.
- Schuhmacher M., Staeger M.S., Pajic A., Polack A., Weidle U.H., Bornkamm G.W., Eick D., Kohlhuber F. Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. // *Curr. Biol*. 1999. V. 9. P. 1255-1258.
- Schultz M.C. Target of rapamycin (TOR) signaling coordinates tRNA and 5S rRNA gene transcription with growth rate in yeast. // *Gene Ther. Mol. Biol*. 1999. V. 4. P. 339-348.
- Schultz P., Marzouki N., Marck C., Ruet A., Oudet P., Sentenac A. The two DNA-binding domains of yeast transcription factor tau as observed by scanning transmission electron microscopy. // *EMBO J*. 1989. V. 8. P. 3815-3824.
- Schwartz Z.B., Sklar V.E.F., Jaehning J.A., Weinmann R., Roeder R.G. Isolation and partial characterization of the multiple forms of DNA dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. // *J. Biol. Chem*. 1974. V. 249. P. 5889-5897.
- Scott P.H., Cairns C.A., Sutcliffe J.E., Alzuherri H.M., McLees A., Winter A.G., White R.J. Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 1005-1014.
- Sedova W.M., Nikitina T.V., Tishchenko L.I. The phosphorylation of the human placenta nuclei RNA polymerase III in vitro. // *The Wilhelm Bernhard Workshop. 15th International Workshop on the Cell Nucleus*. Canada. 1998. P. 108.
- Segall J., Matsui T., Roeder R.G. Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. // *J. Biol. Chem*. 1980. V. 255. P. 11986-11991.

- Sentenac A. Eukaryotic RNA polymerases. // *CRC Critical Rev. Biochem.* 1985. V. 18. P. 31–89.
- Serizawa H., Conaway R.C., Conaway J.W. A carboxyl-terminal-domain kinase associated with RNA polymerase II transcription factor from rat liver. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 7476-7480.
- Shen Y., Igo M., Yalamanchili P., Berk A.J., Dasgupta A. DNA binding domain and subunit interactions of transcription factor IIC revealed by dissection with poliovirus 3C protease. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 4163-4171.
- Sherr C.J., McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. // *Cancer Cell.* 2002. V. 2. P. 103–112.
- Siaut M., Zaros C., Levivier E., Ferri M.L., Court M., Werner M., Callebaut I., Thuriaux P., Sentenac A., Conesa C. An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 195-205.
- Simmen K.A., Mattaj I.W. Complex requirements for RNA polymerase III transcription of the *Xenopus* U6 promoter. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5649-5657.
- Sinn E., Wang Z., Kovelman R., Roeder R.G. Cloning and characterization of a TFIIC2 subunit (TFIIC beta) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 675-685.
- Sklar V. E. F., Roeder R. G. Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase III from the mouse plasmacytoma, MOPC 315. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 1064–1073.
- Smale S.T., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 449–479.
- Smith G. C., Jackson S. P. The DNA-dependent protein kinase. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 916–934.
- Stacey D.W. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. V. 15. P. 158-163.
- Stefano J.E. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. // *Cell.* 1984. V. 36. P. 145-154.
- Studitsky V.M., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P., Felsenfeld G. Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. // *Science.* 1997. V. 278. P. 1960–1963.
- Sun Z.W., Allis C.D. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. // *Nature.* 2002. V. 418. P. 104-108.
- Svejstrup J.Q. Histones Face the FACT. // *Science.* 2003. V. 301. P. 1053-1054.
- Takada S., Lis J.T., Zhou S., Tjian R. A TRF1:BRF complex directs *Drosophila* RNA polymerase III transcription. // *Cell.* 2000. V. 101. P. 459-469.
- Tan Q., Prysak M.H., Woychik N.A. Loss of the Rpb4/Rpb7 subcomplex in a mutant form of the Rpb6 subunit shared by RNA polymerases I, II, and III. // *Mol Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 3329-3338.
- Teichmann M., Seifart K.H. Physical separation of two different forms of human TFIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 5974-5983.
- Teichmann M., Wang Z., Roeder R.G. A stable complex of a novel transcription factor IIB-related factor, human TFIIB50, and associated proteins mediate selective transcription by RNA polymerase III of genes with upstream promoter elements. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000. V. 97. P. 14200-14205.
- Telford J.L., Kressmann A., Roski R.A., Grosschedl R., Muller F., Clarkson S.G., Birnstiel M.L. Delimitation of a promoter for RNA polymerase III by means of a functional test. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 2590-2594.

- Trivedi A., Young L.S., Ouyang C., Johnson D.L., Sprague K.U. A TATA element is required for tRNA promoter activity and confers TATA-binding protein responsiveness in *Drosophila Schneider-2* cells. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 11369-11375.
- Tsang C.K., Bertram P.G., Ai W., Drean R., Zheng X.F.S. Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA pol I localization by TOR. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 6045–6056.
- Tupler R., Perini G., Green M.R. Expressing the human genome. // *Nature.* 2001. V. 409. P. 832-833.
- Upadhyaya R., Lee J., Willis I.M. Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. // *Mol. Cell.* 2002. V. 10. P. 1489-1494.
- van Zyl W., Huang W., Sneddon A.A., Stark M., Camier S., Werner M., Marck C., Sentenac A., Broach J.R. Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. P. 4946-4959.
- Vermeulen K., Berneman Z.N., Van Bockstaele D.R. Cell cycle and apoptosis. // *Cell Prolif.* 2003b. V. 36. P. 165–175.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer // *Cell Prolif.* 2003a. V. 36. P. 131–149.
- Virshup D. M. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000. V. 12. P. 180–185.
- Vosseller K., Wells L., Hart G.W. Nucleoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. // *Biochimie.* 2001. V. 83. P. 575-581.
- Waibel G., Filipowicz W. RNA polymerase specificity of transcription of *Arabidopsis* U snRNA genes determined by promoter element spacing. // *Nature.* 1990. V. 346. P. 199-202.
- Wang Z., Bai L., Hsieh Y.J., Roeder R.G. Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 6823-6832.
- Wang Z., Luo T., Roeder R.G. Identification of an autonomously initiating RNA polymerase III holoenzyme containing a novel factor that is selectively inactivated during protein synthesis inhibition. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 2371-2382.
- Wang Z., Roeder R.G. DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. // *Mol. Cell.* 1998. V. 1. P. 749-757.
- Wang Z., Roeder R.G. TFIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIC2 binding to RNA polymerase III promoters. // *Mol Cell Biol.* 1996. V. 16. P. 6841-6850.
- Wang Z., Roeder R.G. Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 1315-1326.
- Warburg O., Christian W. Isolierung und Kristallisation des G?rungsferments Enolase. // *Biochem. Z.* 1941. V. 310. P. 384-421.
- Warner J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. // *Trends Biol. Sci.* 1999. V. 24. P. 437-440.
- Werner M., Chaussivert N., Willis I.M., Sentenac A. Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor III_B. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 20721-20724.
- Weser S., Riemann J., Seifart K.H., Meissner W. Assembly and isolation of intermediate steps of transcription complexes formed on the human 5S rRNA gene. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31? P. 240-2416.
- Westmark C.J., Ghose R., Huber P.W. Inhibition of RNA polymerase III transcription by a ribosome-associated kinase activity // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 4758-4764.
- Westmark C.J., Ghose R., Huber P.W. Phosphorylation of *Xenopus* transcription factor III_A by an oocyte protein kinase CK2. // *Biochem. J.* 2002. V. 362. P. 375-382.

- White R.J. Transcription factor IIIB: an important determinant of biosynthetic capacity that is targeted by tumour suppressors and transforming proteins. // *Int. J. Oncol.* 1998. V. 12. P. 741-748.
- White R.J., Gottlieb T.M., Downes C.S., Jackson S.P. Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 6653-6662.
- White R.J., Khoo B.C., Inostroza J.A., Reinberg D., Jackson S.P. Differential regulation of RNA polymerases I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. // *Science.* 1994. V. 266. P. 448-450.
- White R. J., Trouche D., Martin K., Jackson S. P., Kouzarides T. Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. // *Nature (London).* 1996. V. 382. P. 88-90.
- Whitmarsh A.J., Davis R.J. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2000. V. 57. P. 1172-1183.
- Wingender E., Jahn D., Seifart K.H. Association of RNA polymerase III with transcription factors in the absence of DNA. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 1409-1413.
- Winter A.G., Sourvinos G., Allison S.J., Tosh K., Scott P.H., Spandidos D.A., White R.J. RNA polymerase III transcription factor TFIIC2 is overexpressed in ovarian tumors. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000. V. 97. P. 12619-12624.
- Wong M.W., Henry R.W., Ma B., Kobayashi R., Klages N., Matthias P., Strubin M., Hernandez N. The large subunit of basal transcription factor SNAPc is a Myb domain protein that interacts with Oct-1. // *Mol Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 368-377.
- Wray W., Wu P. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. // *Analyt. Biochem.* 1981. V. 118. P. 197-203.
- Yeo M., Lin P.S., Dahmus M.E., Gill G.N. A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. // *J. Biol. Chem.* 2003. V.
- Yoon J.B., Murphy S., Bai L., Wang Z., Roeder R.G. Proximal sequence element-binding transcription factor (PTF) is a multisubunit complex required for transcription of both RNA polymerase II- and RNA polymerase III-dependent small nuclear RNA genes. // *Mol Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 2019-2027.
- Yoshinaga S.K., Boulanger P.A., Berk A.J. Resolution of human transcription factor TFIIC into two functional components. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1987. V. 84. P. 3585-3589.
- Yoshinaga S.K., L'Etoile N.D., Berk A.J. Purification and characterization of transcription factor IIC2. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 10726-10731.
- Zaragoza D., Ghavidel A., Heitman J., Schultz M. C. Rapamycin induces the G₀ program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signalling pathway. // *Mol Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 4463-4470.
- Zhang G., Campbell E.A., Minakhin L., Richter C., Severinov K., Darst S.A. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. // *Cell.* 1999. V. 98. P. 811-824.
- Zhang X., Shu L., Hosoi H., Murti K.C., Houghton P.J. Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 28127-28134.
- Zhao X., Pendergrast P.S., Hernandez N. A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. // *Mol. Cell.* 2001. V. 7. P. 539-549.
- Zhu L., Skoultschi A. I. Coordinating cell proliferation and differentiation. // *Curr. Opin. Genes Dev.* 2001. V. 11. P. 91-97.
- Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways // *Biochem. Pharmacol.* 2000. V. 60. P. 1225-1235.