



УДК 577.214.(337+622)

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК СУБЪЕДИНИЦЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗ ДЕЛЯЩИХСЯ ДРОЖЖЕЙ *Schizosaccharomyces pombe* ПУТЕМ МЕЖВИДОВОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ В *Saccharomyces cerevisiae*

© 1997 г. Г. В. Шпаковский*, **, #, Е. Н. Лебеденко*, П. Тюрью***

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Институт биоорганической химии АН Белоруссии, Минск

*** Отдел биохимии и молекулярной генетики Центра атомной энергии (Сакле),
Жиф-сюр-Иветт, Франция

Поступила в редакцию 15.08.96 г.

Клин клином вышибают (народная мудрость).

Из экспрессирующей кДНК-клонотеки делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* двумя независимыми подходами – путем поиска с помощью полимеразной цепной реакции и прямой супрессией с помощью межвидовой комплементации соответствующего термочувствительного мутанта *Saccharomyces cerevisiae* – выделена кДНК гена *rpb10*, который кодирует одну из пяти малых субъединиц, входящих в состав всех трех ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз. Клонированная кДНК *Sz. pombe* кодирует белок Rpb10 с молекулярной массой 8275 Да, состоящий из 71 аминокислотного остатка, 51 из которых (71%) идентичны соответствующим позициям гомологичной субъединицы ABC10β РНК-полимераз I–III *S. cerevisiae*. Все эукариотические члены этого семейства белков имеют одинаковую общую организацию: два чрезвычайно консервативных мотива (RCFT/SCGK и RYCCRRM) формируют атипичный цинксвязывающий домен (Zn-палец), а на С-конце, причем только у гомологов из эукариот, расположен еще один инвариантный мотив – HVDLIEK. В полном соответствии с такой замечательной структурной консервативностью обнаруженный нами гомолог из *Sz. pombe* полностью комплементирует мутантный штамм *S. cerevisiae*, лишенный субъединицы ABC10β (нулевой аллель *rpb10-Δ1::HIS3*).

Ключевые слова: эукариотическая транскрипция, РНК-полимеразы I–III, общие субъединицы, делящиеся дрожжи, ген *rpb10*, межвидовая комплементация, супрессоры, цинксвязывающий домен.

Ядерные ДНК-зависимые РНК-полимеразы I–III (КФ 2.7.7.6) представляют собой сложные гетеромультимерные ферменты, содержащие от 12 до 17 различных полипептидов. Большинство из этих субъединиц являются незаменимыми компонентами транскрипционного аппарата эукариот, о чем свидетельствует нежизнеспособность гаплоидных и гомозиготных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, несущих нуль-аллели по соответствующим генам. Кроме того, для некоторых субъединиц получены условные мутанты с четко охарактеризованными дефектами транскрипции [1, 2]. Пять незаменимых субъединиц (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10α и ABC10β из *S. cerevisiae*) содержатся во всех трех РНК-полимеразах [3–7]. Эти субъединицы не имеют гомологов среди компонентов эубактериального фермента, но три из них (ABC27, ABC23 и ABC10β), как недавно было установлено, проявляют заметное структурное

сходство с малыми субъединицами РНК-полимераз архебактерий [8]. Все пять общих субъединиц структурно и функционально консервативны у эукариот, как это было впервые продемонстрировано методом межвидовой комплементации на примере субъединицы Rpb6 из *Schizosaccharomyces pombe*, способной полностью заменять субъединицу ABC23 в *S. cerevisiae* [9]. Сходные результаты были получены для кДНК китайского хомячка [10]. В дальнейшем были клонированы также кДНК человека, кодирующие все пять общих субъединиц [11, 12]; все они, за исключением гомолога субъединицы ABC27, комплементируют соответствующие нуль-аллели *S. cerevisiae* in vivo [12].

Роль этих общих субъединиц в функционировании ядерного аппарата транскрипции можно прояснить путем сравнительного изучения РНК-полимераз из эволюционно далеких видов дрожжей *Sz. pombe* и *S. cerevisiae* с применением как биохимических, так и генетических методов, хорошо разработанных для обоих организмов. К настоящему

Автор для переписки (тел.: (095) 330-65-83; e-mail: gvs@ibch.siohc.ras.ru; факс: (095) 335-71-03).



Рис. 1. Гель-электрофорез в 10% ПААГ продуктов ПЦР, полученных со специфическими праймерами при просеивании кДНК-клонотеки *Sz. pombe*. Дорожка М – маркеры молекулярной массы (pBR322/*Msp*I), дорожка К – позитивный контроль (ПЦР на ДНК плазмиды pGVS72), остальные дорожки – ПЦР на ДНК из различных разведений кДНК-клонотеки. Номера над дорожками с позитивным результатом (16, 9, 12) соответствуют номерам разведений.

времени из *Sz. pombe* клонирован ген *rpb6* [9] и кДНК *rpb10* [12], кодирующие общие субъединицы Rpb6 и Rpb10 РНК-полимераз I–III. Экспрессированные под контролем дрожжевого промотора (из *S. cerevisiae*), они полностью комплементируют делеционные мутанты *S. cerevisiae* с инактивированными субъединицами ABC23 или ABC10 α соответственно [9, 12]. Таким образом, сразу три химерные РНК-полимеразы, содержащие в составе ферментного комплекса *S. cerevisiae* субъединицу из *Sz. pombe*, нормально функционируют *in vivo*, несмотря на большую эволюционную дистанцию, разделяющую эти виды, и сложное гетеромультимерное строение их РНК-полимераз. Примененный в настоящей работе подход показывает возможность прямого клонирования генетических детерминант, кодирующих компоненты аппарата транскрипции *Sz. pombe* или других эукариот, путем межвидовой комплементации соответствующих условных мутантов *S. cerevisiae*.

Клонирование кДНК *rpb10* с использованием амплификации методом ПЦР

Клонирование кДНК гена *rpb10* путем амплификации из суммарной кДНК *Sz. pombe* проводили методом ПЦР с двумя вырожденными праймерами: oGVS120, (5') TGCGGATCCGTYGTYGGYGA-YAARTGGGA (степень вырожденности 32), и oGVS122, (5') ACGTGAATTCRRATCATNCKNC-KRCARCA (степень вырожденности 1024), соответствующими консервативным участкам эукариотических и археобактериальных гомологов субъединицы ABC10 β из *S. cerevisiae*. Эти праймеры были сконструированы с учетом частоты встречаемости кодонов у *Sz. pombe* [13], а для облегчения последующего клонирования в них были введены участки узнавания рестриктаз *Vam*HI и *Eco*RI (подчеркнуты). Полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК длиной около 120 п. о. клонировали в векторе pGEN, предварительно обработанном рестриктазами *Vam*HI и *Eco*RI и дефосфорилированным фосфатазой из кишечника теленка; в результате получили плазмиду pGVS72.

Секвенирование содержащейся в этой плазмиде вставки ДНК из *Sz. pombe* показало, что она содержит открытую рамку считывания длиной 72 п. о., кодирующую пептид, гомологичный внутреннему фрагменту аминокислотной последовательно-

сти субъединицы ABC10 β из *S. cerevisiae*. Исходя из первичной структуры этой вставки были синтезированы специфические праймеры oGVS65, (5') GATAAGTGGGACACCTATCTC, и oGVS66, (5') CATTCGCCGGCAGCAATAAC, которые использовали для поиска интересующей нас открытой рамки считывания в кДНК-клонотеке *Sz. pombe* [14] методом последовательных разведений [9].

За четыре цикла последовательных разведений было проанализировано с помощью ПЦР более 12000 первичных клонов, разбитых первоначально на 24 разведения в среднем по 500 колоний в каждом. Положительные разведения (или субразведения) отбирали по наличию в продуктах ПЦР фрагмента ДНК длиной около 90 п. о. Из 24 первичных разведений кДНК-клонотеки три (№ 9, 12 и 16) дали положительный сигнал (рис. 1). Для дальнейшего поиска гена выбрали разведение № 12, соответствующее 730 исходным колониям. После следующих трех циклов последовательных разведений обнаружили плазмидный клон pENL44, несущий полноразмерную копию кДНК гена *rpb10* *Sz. pombe* (рис. 2). 5'-Конец этой кДНК начинается с позиции –34 по отношению к иницирующему кодону ATG, которому предшествует А-богатая последовательность, что типично для дрожжевых генов. Открытая рамка считывания длиной 213 п. о. заканчивается стоп-кодоном TAA (позиции 214–216), вблизи которого находится еще один стоп-кодон TGA (позиции 232–234) в той же рамке считывания.

Структурные особенности субъединицы Rpb10 *Sz. pombe*

Клонированная кДНК гена *rpb10* *Sz. pombe* кодирует белок из 71 а. о. с вычисленной молекулярной массой 8276 Да и предсказанным значением изоэлектрической точки *pI* 7.6. В дополнение к шести уже идентифицированным гомологам субъединицы ABC10 β [12, 15] банки данных содержат еще две дополнительные эукариотические последовательности, из *Mus musculus* и *Brugia malayi* (депонированы в GenBank соответственно под номерами D19252 и H74353), высокоомологичные ABC10 β и, по-видимому, кодирующие соответствующие субъединицы РНК-полимераз в этих организмах.

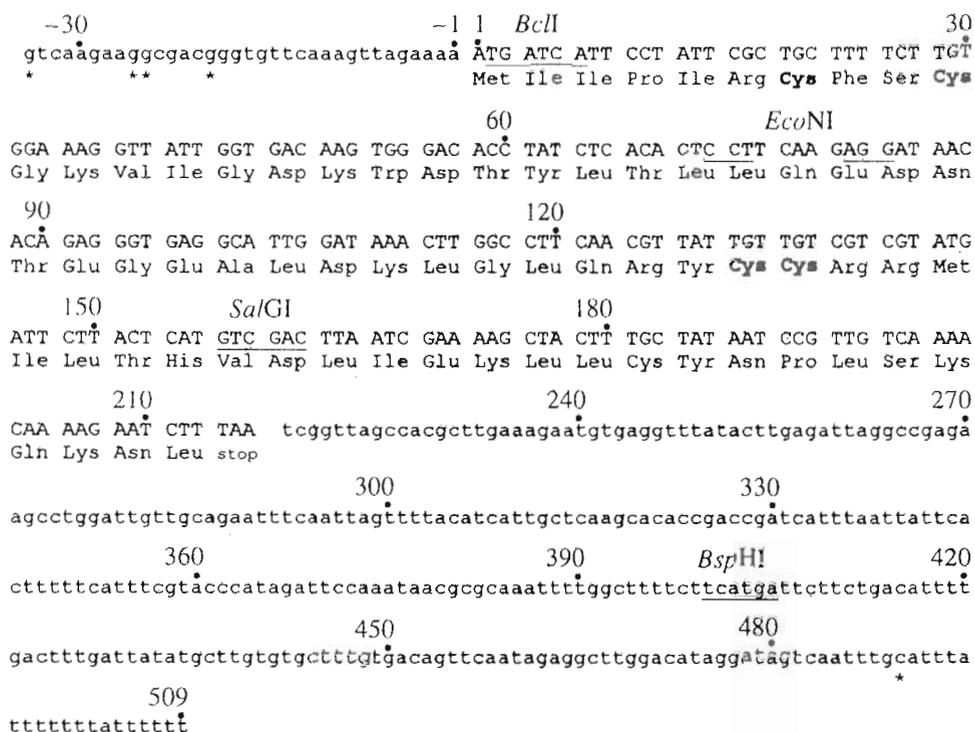


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность кДНК *rpb10 Sz. pombe* и выведенная из нее аминокислотная последовательность соответствующего белка. Нуклеотидная последовательность соответствует идентичным вставкам клонов pGVS413 (выделен межвидовой комплементацией) и рENL44 (выделен с помощью ПЦР). Звездочками обозначены 5'- и 3'-концевые нуклеотиды ряда других индивидуальных кДНК, выделенных в настоящей работе. Цифры сверху строк обозначают нумерацию нуклеотидов, отрицательные номера использованы для нуклеотидов 5'-некодирующей области, предшествующей иницирующему кодону ATG. Подчеркнуты уникальные участки узнавания эндонуклеаз рестрикции в гене *rpb10*. Жирным шрифтом выделены четыре инвариантных остатка цистеина, формирующих атипичный цинксвязывающий домен [12].

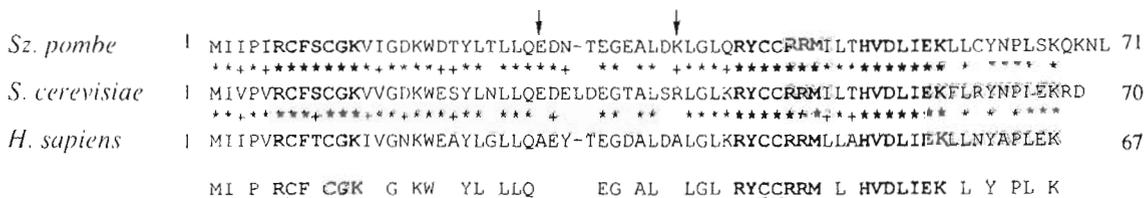


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей трех взаимозаменяемых форм субъединицы ABC10β из *Sz. pombe*, *S. cerevisiae* и *H. sapiens*. Звездочками отмечены идентичные аминокислотные остатки соседних последовательностей, плюсами – консервативные замены. Последовательности из *H. sapiens* и *S. cerevisiae* были определены в работах [12, 17]. На нижнюю строку вынесены аминокислотные остатки, инвариантные во всех трех последовательностях. Жирным шрифтом выделены обсуждаемые в статье консервативные области. Подчеркнуты четыре инвариантных остатка цистеина, формирующих атипичный цинксвязывающий домен. Стрелки указывают положение заряженных аминокислотных остатков дрожжевых субъединиц, замещенных в человеческом гомологе неполярным аланином.

Открытая рамка считывания несколько большей длины (90 а. о.), кодирующая возможный гомолог ABC10β, была также идентифицирована в геноме вируса лихорадки африканской свиньи, ASFV (номер депонирования в EMBL Sequence Data Library: U18466). В полностью установленной первичной структуре генома этого цитоплазматического вируса были обнаружены также гены, кодирующие гомологи двух самых больших субъединиц ядерных РНК-полимераз, а также гены белков, отдаленно напоминающих общие субъединицы ABC23 и ABC27 из *S. cerevisiae* [16].

Удивительная консервативность аминокислотной последовательности трех функционально взаимозаменяемых форм (гомологов) субъединицы ABC10β – из *Homo sapiens*, *Sz. pombe* и *S. cerevisiae* – проиллюстрирована рис. 3. Как уже отмечалось [12], четыре инвариантных остатка цистеина в окружении положительно заряженных аминокислот (**RCFT/SCGK... RYCCRRM**) предположительно образуют атипичный цинксвязывающий домен (Zn-палец). Если остатки цистеина в первом мотиве этого Zn-пальца разделены, как обычно, двумя аминокислотными остатками, то

во втором мотиве цистеиновые остатки до предела сближены, что еще ни разу не отмечалось для цинксвязывающих доменов. Несмотря на это, субъединица ABC10 β способна эффективно связывать ионы цинка *in vitro* [18]. Расстояние между вторым и третьим остатками цистеина равняется 33 а. о. для *S. cerevisiae* и 34 а. о. для всех других изученных к настоящему времени эукариот, включая дрожжи *Sz. pombe*. Кроме того, субъединица Rpb10 из *Sz. pombe* содержит еще один (пятый) цистеиновый остаток в позиции 61.

Инвариантный мотив HVDLIEK вблизи С-конца отсутствует в аминокислотных последовательностях архебактерий и цитоплазматических вирусов животных (ASFV и вирус осповакцины) [12] и, похоже, является отличительным признаком эукариотических членов семейства субъединицы ABC10 β [15]. В целом гомологи субъединицы ABC10 β из *H. sapiens*, *Sz. pombe* и *S. cerevisiae* имеют 44 инвариантных остатка. По многим из этих позиций путем направленного мутагенеза получены точковые мутации в гене *RPB10* *S. cerevisiae* (О. Гадаль (О. Gadal, Сакле), Г. В. Ш. и П. Т., неопубликованные данные), детальное исследование которых проводится в наших лабораториях.

Межвидовая комплементация

Вначале мы сконструировали термочувствительный штамм *S. cerevisiae* YGVS-047, который несет в составе челночной плазмиды pGVS125 гибридную форму гена *RPB10*, кодирующую N-концевую половину (а. о. 1–31) субъединицы N РНК-полимеразы археонта (архебактерии) *Sulfolobus acidocaldarius* [8], слитую с С-концевой половиной (а. о. 33–70) субъединицы ABC10 β *S. cerevisiae**. Следует отметить, что жизнеспособность штамма YGVS-047, несущего в своих клетках вместо незаменимой субъединицы ABC10 β химерный белок N'-ABC10 β ', является первым прямым доводом в пользу не просто структурного, но и функционального родства субъединиц РНК-полимераз Archaea и Eucarya.

Экспрессия химерного гена *proN'-RPB10'* осуществляется в pGVS125 под контролем индуцируемого промотора гена *ADH2* *S. cerevisiae* из вектора pYADE4 [19]. Штамм YGVS-047 неспособен к эффективному росту при 37°C. Мы рассчитывали найти гетерологичные супрессоры этого дефекта, трансформировав термочувствительный штамм образцом ДНК представительной экспрессирующей кДНК-клетки делящихся дрожжей *Sz. pombe* [14]. После трансформации клетки немедленно помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение недели. В результате было отобрано восемь единичных дрожжевых колоний, стабильно подтверждающих свою термоустойчивость

* Конструирование этого мутантного штамма дрожжей будет детально описано в отдельной публикации.

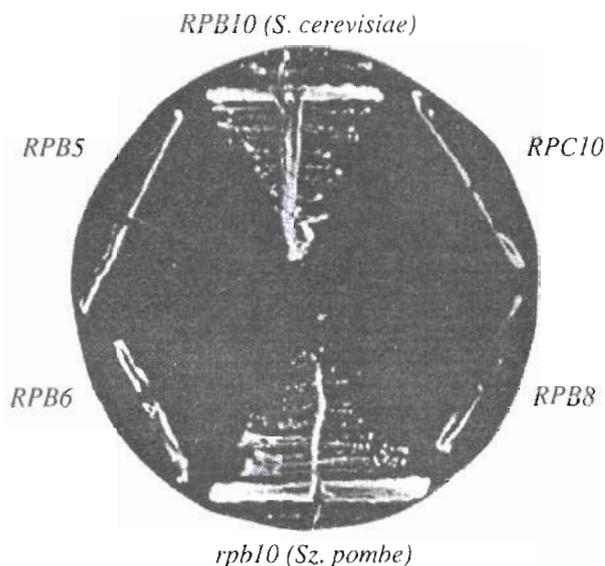


Рис. 4. Межвидовая комплементация термочувствительного штамма YGVS-047 *S. cerevisiae*. Рост трансформантов оценивали после 4-суточной инкубации при 37°C на среде без урацила. Тестировали трансформанты штамма YGVS-047, несущие кДНК гена *RPB10* *S. cerevisiae* (pGVS102), кДНК гена *rpb10* *Sz. pombe* (pGVS413) и плазмиду pFL44L со вставками генов *RPB5*, *RPB6*, *RPB8* и *RPC10* *S. cerevisiae*, кодирующих каждую из четырех остальных общих субъединиц РНК-полимераз I, II и III.

как в жидкой, так и на твердой селективной среде. Плазмидную ДНК из этих колоний выделяли по методу [20]. Из двух плазмид, выделявшихся из каждой дрожжевой колонии (pGVS125 и плазмиды с супрессирующей кДНК *Sz. pombe*), детально анализировали только супрессирующую.

Рестриктивный анализ с использованием эндонуклеаз *Hind*III, *Not*I и *Sal*GI, дающих характерные расщепления, и секвенирование показали, что семь супрессирующих плазмид содержат различные по длине вставки полноразмерной кДНК гена *rpb10* (рис. 2). Большинство клонов различаются только положением 5'-конца, изменяющимся от позиции –34 до позиции –20 по отношению к иницирующему кодону ATG; некоторые клоны укорочены с 3'-конца (рис. 2). Отметим, что 5'-концевым нуклеотидом во всех секвенированных *rpb10* кДНК является остаток гуанозина, что типично для эукариотических мРНК. Вставка кДНК, начинающаяся на 5'-конце с позиции –34 и заканчивающаяся на 3'-конце позицией 509 (pGVS413, супрессор № 1), идентична вставке клона pENL44, обнаруженного с помощью ПЦР (см. выше). Восьмой супрессорный клон (супрессор № 5) содержит вставку нового гена *Sz. pombe* (Г. В. Ш. и Е. Н. Л., в печати).

Как видно из рис. 4, степень гетероспецифической (межвидовой) комплементации термочувствительного аллеля штамма YGVS-047 сравнима с

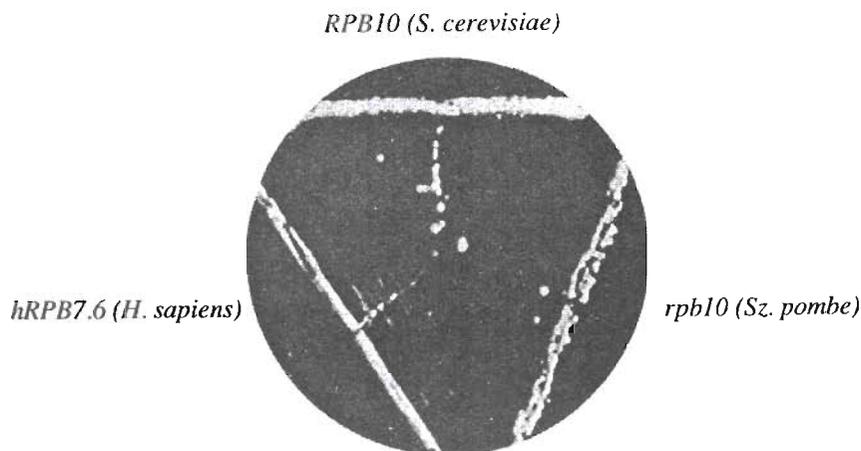


Рис. 5. Межвидовая комплементация нуль-аллеля *rpb10-Δ1::HIS3 S. cerevisiae*. Рост оценивали после 3-суточной инкубации при 30°C на среде без инозита. Тестировали дикий тип гена *RPB10 S. cerevisiae* (pGVS102), ген *rpb10 Sz. pombe* (pGVS413) и их человеческий гомолог – ген *hRPB7.6* (pGEN-Hs10β). Отметим отсутствие комплементации на среде без инозита в случае человеческого гомолога.

гомоспецифической комплементацией нативным для *S. cerevisiae* геном *RPB10*. В противоположность этому плазмиды, кодирующие другие общие субъединицы *S. cerevisiae*, неспособны восстанавливать рост этого мутанта при повышенной температуре (37°C) (рис. 4). Это косвенно свидетельствует против существования в составе ядерных РНК-полимераз единой структурной сердцевины (кора) из тесно взаимодействующих между собой пяти общих субъединиц и указывает на то, что общая субъединица *ABC10β* имеет, возможно, в составе РНК-полимеразного комплекса особую функцию.

Мы наблюдали также межвидовую комплементацию полной делеции гена *RPB10 S. cerevisiae* (нулевой аллель *rpb10-Δ1::HIS3*) посредством кДНК гена *rpb10 Sz. pombe*. Рост дрожжей при этом практически не отличался от роста контрольного штамма дикого типа (с нативным аллелем *RPB10 S. cerevisiae*) при всех условиях тестирования (стандартная богатая среда YPD при 15, 24, 30 и 37°C; минимальная среда с инозитом и без него).

Ранее отмечалась особая чувствительность штаммов дрожжей, содержащих мутантные формы РНК-полимераз, к росту на среде без инозита [12, 21]. Действительно, именно на этой среде нам впервые удалось заметить разницу в степени комплементационного эффекта между гомологами *ABC10β* из *Sz. pombe* и *H. sapiens*. Комплементация на лишенной инозита среде была полноценной только в случае гомолога из делящихся дрожжей в отличие от соответствующего гомолога человека, для которого комплементация была менее эффективной (лишь частичной), и приводила к явно замедленному росту клеток (рис. 5).

Этот результат не является полностью неожиданным, так как белок Rpb10 из *Sz. pombe* ближе по структуре к *ABC10β*, чем гомологичная субъединица *hRPB7.6* человека, в которой отрицательно и положительно заряженные аминокислотные остатки 27 (глутаминовая кислота) и 38 (аргинин или лизин) субъединиц обоих видов дрожжей заменены на неполярный аланин (рис. 3). По литературным данным, на безинозитной среде особенно хорошо выявляются *in vivo* дефекты РНК-полимеразы II [21, 22], что, по-видимому, связано со сложной регуляцией транскрипции ключевого гена (*INO1*) каскада синтеза инозита [23]. Можно предположить, что основные неполадки аппарата транскрипции в случае частичной комплементации вызваны именно этой мозаичной РНК-полимеразой, содержащей гомолог человека.

До сих пор для клонирования генов субъединиц РНК-полимераз использовали, как правило, следующие подходы: просеивание* экспрессирующих клонотек либо с помощью специфических антител к белковым субъединицам, либо с помощью олигонуклеотидных зондов, сконструированных на основе данных по секвенированию коротких пептидных фрагментов, а также гибридизацию с фрагментами уже известных генов *S. cerevisiae* [1, 2]. В последнее время к этому арсеналу методов прибавились подходы, использующие ПЦР (см., например, [12]). Некоторые гены субъединиц РНК-полимераз были клонированы с помощью генетического анализа индуцированных мутаций, таких, как, например, устойчивость к α-аманитину

* Данное русское слово кажется нам гораздо естественнее чужеродного, хотя и утвердившегося в специальной литературе, слова-кальки с английского "скрининг". Действительно, скрининг кДНК-клонотек представляет собой не что иное, как отделение зерен от плевел.

[24–26]. А гены *RPO26* (*RPB6*, по терминологии других авторов [5]) и *RPB10* *S. cerevisiae* были обнаружены еще и как супрессоры некоторых термочувствительных штаммов дрожжей, т.е. путем гомологичной (внутривидовой) супрессии [17, 27].

Что касается РНК-полимераз *Sz. pombe*, то к настоящему времени идентифицированы генетические детерминанты, кодирующие следующие субъединицы РНК-полимераз делящихся дрожжей: самую большую субъединицу РНК-полимеразы I [28, 29], три самые большие субъединицы РНК-полимеразы II [30–32] и общие субъединицы *Rpb6* и *Rpc10* [9, 12]. Клонирование третьей общей субъединицы путем межвидовой комплементации открывает возможность дальнейшего выделения кДНК *Sz. pombe*, кодирующих субъединицы РНК-полимераз, с помощью условных мутантов. В настоящее время доступны такие мутанты для большинства из 28 различных субъединиц РНК-полимераз *S. cerevisiae* [1, 2, 33].

Межвидовая комплементация представляет собой особенно быстрый и эффективный метод клонирования генов, кодирующих компоненты сложных ферментных комплексов, ибо приводит к клонам с правильной (экспрессирующей) ориентацией вставки, что позволяет непосредственно использовать их для генетического анализа функций отдельных субъединиц в хорошо изученной системе дрожжей *S. cerevisiae*. Учитывая генетическую отдаленность друг от друга делящихся (*Sz. pombe*) и почкующихся (*S. cerevisiae*) дрожжей, представляется несомненным, что аналогичный подход может быть успешно использован для клонирования кДНК субъединиц РНК-полимераз и более сложных эукариот, таких, как *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *H. sapiens*.

Следует подчеркнуть, что клонирование гена *rpb10* было успешным, несмотря на неблагоприятную ситуацию, когда гетерологичный генный продукт является компонентом сразу трех разных ферментов со сложным гетеромультимерным строением (ядерные РНК-полимеразы I–III) и когда штамм-хозяин *S. cerevisiae* также содержит функциональную, хотя и дефектную, форму этой субъединицы РНК-полимеразы, которая может конкурировать с продуктом гена *Sz. pombe*. Полученные данные свидетельствуют не только о высокой консервативности продуктов гена *rpb10* *Sz. pombe* и *RPB10* *S. cerevisiae*, но и о том, что субъединица *Rpb10* *Sz. pombe* может успешно встраиваться в три разных гетеромультимерных комплекса *S. cerevisiae*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы дрожжей и челночные плазмиды. Дрожжевые штаммы и использованные генетические методы описаны нами в работе [12]. Термочув-

ствительный мутант YGVS-047 (*MAT α* *ura3-52* *his3- Δ 200* *leu2* *lys2* *ade2-101* *trp1- Δ 63* *rpb10- Δ 1::HIS3*) несет плазмиду pGVS125 (2 μ *TRP1* *pADH2::rpoN'/RPB10'*), которая является производным плазмиды pYADE4 [19]. *pADH2::rpoN'/RPB10'* обозначает химерную конструкцию, кодирующую N-концевую часть (аминокислотные остатки 1–31) субъединицы N из археонта (археобактерии) *S. acidocaldarius* (кодируется геном *rpoN*), слитую с C-концевой частью субъединицы ABC10 β из *S. cerevisiae* (ген *RPB10*) и экспрессирующуюся под контролем индуцируемого промотора *pADH2* (Г. В. Ш. и П. Т., неопубликованные результаты).

Плазмиды pGEN, pRPB10-5, pGVS102, pGEN-Hs10 β [12], pRP56, pRP67, pSL106 [5], pLS193 [7] и pYADE4 [19] были описаны ранее. Плазмиды pFL44-RPB5, pFL44-RPB6, pFL44-RPB8 и pFL44-RPC10 являются производными плазмиды pFL44L [34] со вставками из *S. cerevisiae*, содержащими соответственно *SacI*–*SalGI*-фрагмент гена *RPB5* длиной 1.1 т. п. о. (из pRP56, после промежуточного клонирования в pUC19), *BamHI*–*XhoI*-фрагмент гена *RPB6* длиной 1.6 т. п. о. (из pRP67), *SacI*–*SalGI*-фрагмент гена *RPB8* длиной 2.5 т. п. о. (из pSL106) и *SalGI*–*BamHI*-фрагмент гена *RPC10* длиной 2.2 т. п. о. (из pLS193). Эти плазмиды были сконструированы встраиванием соответствующих фрагментов в полилинкерный участок плазмиды pFL44L с использованием участков узнавания *BamHI* и *SalGI* в случае pFL44-RPB6.

Poly(A)⁺ РНК *Sz. pombe* готовили как описано ранее [35] и использовали в реакции обратной транскрипции с применением набора для синтеза кДНК фирмы Amersham. Полученную суммарную кДНК амплифицировали с двумя вырожденными праймерами, oGVS120 и oGVS122, в течение 45 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг – 1 мин при 40°C и элонгация – 1 мин при 50°C.

Просеивание кДНК-клонотеки *Sz. pombe* проводили методом последовательных разведений, аналогичным описанному в работе [9]. Предварительно кДНК-клонотека была рассеяна на 24 чашки Петри (~500 колоний на каждой). После инкубации в течение 1 сут при 37°C колонии были смыты с каждой чашки по отдельности и из каждой порции клеток была выделена суммарная плазмидная ДНК. Образцы ДНК всех 24 разведений кДНК-клонотеки анализировали, проводя ПЦР со специфическими праймерами oGVS65 и oGVS66 в течение 30 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг – 1 мин при 45°C и элонгация – 2 мин при 57°C, с последующим гель-электрофорезом продуктов амплификации в 10% ПААГ. Одно из разведений, дающее положительный сигнал, использовали для дальнейшего поиска с помощью ПЦР в тех же условиях. Для этого около 500 колоний положительного разведения пересевали на 20 чашек по 20–25 колоний на каждой и повторяли

процедуру смыва колоний, выделения и анализа ДНК из 20 полученных таким образом субразведений кДНК-клонотеки. Из каждой колонии положительного субразведения выделяли индивидуальную плазмидную ДНК и снова анализировали с помощью ПЦР.

Межвидовая комплементация. Дрожжевой штамм YGVS-047, несущий термочувствительный мутантный аллель (см. выше), трансформировали по методу [36] образцом ДНК представительной кДНК-клонотеки *Sz. pombe*, сконструированной на основе вектора pDB20 с геном *URA3* в качестве селективного маркера [14], и отбирали трансформанты, выросшие при 37°C на среде без урацила и триптофана. Плазмиды из отдельных термоустойчивых дрожжевых колоний переносили в *E. coli* путем трансформации по методу [20] и плазмиды, происходящие из кДНК-клонотеки, проверяли на способность восстанавливать рост при 37°C термочувствительного штамма YGVS-047.

Межвидовую комплементацию полной делеции гена *RPB10 S. cerevisiae* (нулевой аллель *rpb10Δ1::HIS3*) тестировали методом перетасовки плазмид, описанным ранее [12]. Плазмиду pGVS413, полученную межвидовой комплементацией как описано выше, вводили путем трансформации в тестируемый дрожжевой штамм YGVS-017 (*ade2 ura3-52 his3-Δ200 rpb10Δ1::HIS3*), несущий плазмиду pRPB10-5 (*ADE2 RPB10*). Способность соответствующего трансформанта терять плазмиду pRPB10-5 обнаруживали по образованию красных (*ade2⁻*) секторов в колониях первичных трансформантов, которые отбирали на селективной среде без урацила и гистидина, а затем выращивали на среде YPD. Красные секторы и колонии легко выявлялись как на минимальной, так и на богатой средах.

Секвенирование ДНК и сравнение первичных структур белков. Двухцепочечную плазмидную ДНК секвенировали после щелочного лизиса методом дидезоксинуклеотидных терминаторов [37] с использованием набора для секвенирования с ДНК-полимеразой фага T7 (НПО "Фермент", Литва). Анализ последовательностей проводили с помощью программы DNA Strider [38], а также программ компьютерного центра НИИ физико-химической биологии МГУ.

Установленная в настоящей работе последовательность кДНК *rpb10 Sz. pombe* депонирована в GenBank под номером U80219.

Мы благодарим Дж. Файкса, Д. Беккера и Л. Гаранте за образец ДНК сконструированной ими экспрессирующей кДНК-клонотеки *Sz. pombe*; А.Л. Каюшина за синтез олигонуклеотидов, Ю.Г. Борескова за помощь при компьютерной обработке последовательности; С. Лабарр и К. Босшиеро за плазмидные конструкции серии pFL44-

RPB; О. Гадаля за полезные дискуссии, Ю.А. Берлина и А. Сентенака за дружескую поддержку.

Настоящая работа была поддержана грантами MWE000 и MWE300 Международного научного фонда (МНФ), грантом № 96-04-49867 Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) и грантом B102-CT92-0090 Европейского сообщества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thuriaux P., Sentenac A. // The Molecular Biology of Yeast / Eds E.W. Jones, J.R. Pringle, J.R. Broach. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. V. 2. P. 1-48.
2. Woychik N.A., Young R.A. // Transcription Mechanisms and Regulation / Eds R.C. Conaway, J.W. Conaway. N.Y.: Raven Press, 1994. P. 227-242.
3. Valenzuela P., Bell G.I., Weinberg F., Rutter W.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. P. 1319-1325.
4. Buhler J.-M., Iborra F., Sentenac A., Fromageot P. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 1712-1717.
5. Woychik N.A., Liao S.-M., Kolodziej P., Young R.A. // Genes Dev. 1990. V. 4. P. 313-323.
6. Carles C., Treich I., Bouet F., Riva M., Sentenac A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 24092-24096.
7. Treich I., Carles C., Riva M., Sentenac A. // Gene Expr. 1992. V. 2. P. 31-37.
8. Langer D., Hain J., Thuriaux P., Zillig W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 5768-5772.
9. Shpakovski G.V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63-69.
10. McKune K., Woychik N.A. // Mol. Cell. Biol. 1994. V. 14. P. 4155-4159.
11. Pati U.K., Weissman S.M. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 13114-13121.
12. Shpakovski G.V., Acker J., Wintzerith M., Lacroix J.-F., Thuriaux P., Vigneron M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 4702-4710.
13. Forsburg S.L. // Yeast. 1994. V. 10. P. 1045-1047.
14. Becker D.M., Fikes J.D., Guarente L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1968-1972.
15. Шпаковский Г.В., Лебедево Е.Н. // Биооргани. химия. 1996. Т. 22. С. 938-940.
16. Yanez R.J., Bournsnel M., Nogal M.L., Yuste L., Vinuela E. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2423-2427.
17. Lalo D., Carles C., Sentenac A., Thuriaux P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 5524-5528.
18. Treich I., Riva M., Sentenac A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 21971-21976.
19. Brunelli J.P., Pall M.L. // Yeast. 1993. V. 9. P. 1299-1308.
20. Hoffman C.S., Winston F. // Gene. 1987. V. 57. P. 267-272.
21. Arndt K.T., Styles C.A., Fink G.R. // Cell. 1989. V. 56. P. 527-537.
22. Nonet M.L., Young R.A. // Genetics. 1989. V. 123. P. 715-724.

23. Swift S., McGraw P. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1426–1433.
24. Greenleaf A.L. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 13403–13406.
25. Yano R., Nomura M. // Mol. Cell. Biol. 1991. V. 11. P. 754–759.
26. James P., Whelen S., Hall B.D. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 5616–5620.
27. Archambault J., Schappert K.T., Friesen J.D. // Mol. Cell. Biol. 1990. V. 10. P. 6123–6131.
28. Yamagishi M., Nomura M. // Gene. 1988. V. 74. P. 503–515.
29. Hirano T., Konoha G., Toda T., Yanagida M. // J. Cell. Biol. 1989. V. 108. P. 243–253.
30. Azuma Y., Yamagishi M., Ueshima R., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 461–468.
31. Kawagishi M., Yamagishi M., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 469–473.
32. Azuma Y., Yamagishi M., Ishihama A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3749–3754.
33. Archambault J., Friesen J.D. // Microbiol. Rev. 1993. V. 57. P. 703–724.
34. Bonneaud N., Ozier-Kalogeropoulos O., Li G., Labouesse M., Minvielle-Sebastia L., Lacroute F. // Yeast. 1991. V. 7. P. 609–615.
35. Levin H.L., Weaver D.C., Boeke J.D. // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. P. 6791–6798.
36. Rose M.D., Winston F., Hieter P. Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. P. 122–123.
37. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
38. Marck C. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 1829–1836.

Cloning of an RNA Polymerase Subunit cDNA of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* by Heterospecific Complementation in *Saccharomyces cerevisiae*

G. V. Shpakovski^{*,**}, E. N. Lebedenko^{*}, and P. Thuriaux^{***}

^{*}*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

^{**}*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences, Minsk, Belarus*

^{***}*Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay), Gif-sur-Yvette, France*

Abstract—The *rpb10* cDNA of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, encoding one of the five small subunits common to all three nuclear DNA-dependent RNA polymerases, was isolated from an expression cDNA library by two independent approaches: PCR-based screening and direct suppression by means of heterospecific complementation of a temperature-sensitive mutant defective in the corresponding gene of *Saccharomyces cerevisiae*. The cloned *Sz. pombe* cDNA encodes a protein Rpb10 of 71 amino acids with an *M* of 8275 Da, sharing 51 amino acids (71% identity) with the subunit ABC10 β of RNA polymerases I–III from *S. cerevisiae*. All eukaryotic members of this protein family have the same general organization featuring two highly conserved motifs (RCFT/SCGK and RYCCRRM) around an atypical zinc finger and an additional invariant HVDLIEK motif toward the C-terminal end. The last motif is only characteristic for homologs from eukaryotes. In keeping with this remarkable structural conservation, the *Sz. pombe* cDNA also fully complemented a *S. cerevisiae* deletion mutant lacking subunit ABC10 β (null allele *rpb10- Δ 1::HIS3*).

Key words: eukaryotic transcription, RNA polymerases I–III, common subunits, fission yeast, *rpb10* gene, heterospecific complementation, suppressors, zinc finger.