

ПИСЬМА
РЕДАКТОРУ

УДК 577.214.(337+622)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА *hRPC11*,
САМОЙ МАЛОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III ЧЕЛОВЕКА*© 1998 г. Г. В. Шпаковский[#], Е. Н. ЛебеденкоИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 03.07.98 г. Принята к печати 27.07.98 г.

Среди транскриптов человека с помощью метода ОТ-ПЦР идентифицирована полноразмерная кДНК гена *hRPC11*, кодирующего самую малую специфическую субъединицу ядерной РНК-полимеразы III. Клонирование первого ортолога субъединицы *RPC11* из многоклеточного организма и сопоставление выведенной из кДНК первичной структуры субъединицы *hRPC11 Homo sapiens* (108 а.о.; M_r 12.3 кДа; pI 8.05) с гомологичными компонентами РНК-полимеразы III *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* позволили выявить наиболее важные в функциональном отношении домены: на N-конце характерный Zn-связывающий мотив классического типа (CxxCxx₁₆₋₁₇CxxC), а в центральной части и на C-конце – два протяженных инвариантных участка, KEVDDVLGG и RSADEPM. Выраженная гомология C-концевой части субъединиц *RPC11* с уникальным Zn-связывающим доменом фактора транскрипции TFIIS указывает на возможное участие этой субъединицы в элонгации и/или терминеции синтеза РНК.

Ключевые слова: *Homo sapiens*; РНК-полимераза III, специфическая субъединица; ген *hRPC11*; ОТ-ПЦР.

Базовый аппарат транскрипции эукариот устроен довольно сложно и включает в себя три ядерные ДНК-зависимые РНК-полимеразы I, II и III, специфичные в отношении считываемых ими генов. К настоящему времени лучше всего охарактеризованы ядерные РНК-полимеразы I, II и III дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: клонированы гены почти всех субъединиц, входящих в состав этих сложных ферментных комплексов. Определение первичной структуры всех 12 субъединиц РНК-полимеразы II было завершено в 1993 г. [3], первичная структура последней из 14 субъединиц РНК-полимеразы I установлена в 1995 г. [4]. В случае РНК-полимеразы III ситуация оказалась более сложной: хотя определение полной первичной структуры всего генома *S. cerevisiae* было завершено в 1996 г. [5], только совсем недавно были окончательно идентифицированы все 17 субъединиц этого фермента, включая *RPC11*.*

Существенный прогресс достигнут в последнее время также в изучении РНК-полимеразы II человека [6, 7] и другого вида дрожжей – *Schizosaccharomyces pombe* [8, 9]. В то же время РНК-полимеразы I и III этих организмов остаются менее изученными.

Недавно мы клонировали ген *rpc11*⁺, кодирующий субъединицу *Rpc11* РНК-полимеразы III *Sz. pombe*, необходимую для жизнедеятельности этих дрожжей и родственную субъединицам *RPA12* и *RPB9* ядерных РНК-полимераз I и II, соответственно [9]. Сравнение аминокислотной последовательности субъединицы *Rpc11 Sz. pombe* с гомологичной последовательностью из *S. cerevisiae* (GenBank/EMBL Z49209, открытая рамка считывания YD9609.01c) выявило два района почти полной структурной идентичности, что побудило нас к поиску ортологичного белка у многоклеточных организмов. Полученная информация была использована при конструировании специфических праймеров для ОТ-ПЦР на препаратах суммарной мРНК из клеток HeLa и клеток крайней плотности человека (рис. 1). Продукты ОТ-ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI и клонировали в плазмидном векторе pGEN [6], расщепленном теми же рестриктазами.

Секвенирование нескольких клонов, отобранных с помощью гибридизации *in situ* со специфическими праймерами, показало, что большинство из них, как и ожидалось, несут открытые рамки

*Впервые результаты данной работы были представлены на Международной конференции по молекулярной генетике и биотехнологии, г. Минск, Беларусь, 6–8 апреля 1998 г. [1] и на 25-м Юбилейном съезде Федерации европейских биохимических обществ, г. Копенгаген, Дания, 5–10 июля 1998 г. [2].

Сокращения: ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, сопряженная с ПЦР (RT-PCR).

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

* Частное сообщение Chedin S., Sentenac A., Riva M., Carles C.

<i>S. cerevisiae</i>	MLSFCPSCNNMLLITSGDSGVYTLACRSCPYEFPIEGIEIYDRKKLPKEVDDVLGGG--	58
	** *** * * *++ *+ ** +*** *	
<i>H. sapiens</i>	MLLFCPGCGNLIVEEGQRCHR-FACNTCPYVHNITRKVTN-RKYPKLKEVDDVLGGAA-	57
	+ *** *** *++ * * *+++ *+ + **	
<i>Sz. pombe</i>	MQFCPTCGNHLIVAVDEEGRNAFTCRTCPYHFPISTFLYS-RHEFAQKEVDDVLGGEE-	57
	* *** * *++ ++ *+ + * * *	
<i>S. acidocald.</i>	MKFCEPKCGSMMPRKEN-GKTVYKCSKCAIDTENQKEAKITTVIKHSAKAKTLVLAS-	57
	***** +*** + + * * * * + ++ + **** *	
<i>T. celer</i>	MKFCEPKCGNMLLPDRK---RKVWVCRSCGYEEPFDEEKDREKTVIKQEVKHKPDEGIVV	56
<i>S. cerevisiae</i>	-WDNVDQTKTQCPNYDTGGESAYFFQLQIRSADEPMTTFYKCVN--CGHRWKEN	110
	*+*** *	
<i>H. sapiens</i>	AWENV DST---AESCPKCEHPRAYFMQLQIRSADEPMTTFYKCCNAQCGHRWRD	108
	* * + *	
<i>Sz. pombe</i>	AFESTQQT-EVTCENTKCDNNRAYFFQLQIRSADEPMTTFYRCTK--CKFQWREN	109
	* *+ ***+ * * ***** + **+*** *	
<i>S. acidocald.</i>	DMPNPGVQLTRGISCPSCGNDEAYFWILQTRSADEPATRFYKCTK--CGKVVWREYE	111
	+ * *+*** ***** *+*** * * * * *	
<i>T. celer</i>	IEQDLKTLPTTKITCPKCGNDTAYWWMQTRAGDEPSTIFYKCTK--CGHTWRSYE	110
	* + * * * + +++++ * * * * *	
<i>D. melanog.</i>	270 ...TDLLKCAKCKKRNCTYNQLQTRSADEPMTTFVMCNE--CGNRWKFC	313

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей субъединицы hRPC11 РНК-полимеразы III человека и ее ортологов из *Sz. pombe* [9] и *S. cerevisiae* (GenBank/EMBL Z49209), а также факторов транскрипции TFIIIS из архебактерий *Sulfolobus acidocaldarius* (GenBank/EMBL X70805), *Thermococcus celer* (GenBank/EMBL L27650) и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (GenBank/EMBL X53670; приведен только гомологичный участок аминокислотной последовательности). Рамками выделены наиболее консервативные участки, обсуждаемые в тексте. Жирным шрифтом приведены остатки цистеина, участвующие в связывании ионов цинка. Звездочками отмечены идентичные аминокислотные остатки соседних последовательностей, плюсами – консервативные замены.

считывания, кодирующие полипептид, высоко гомологичный субъединицам RPB11 из *S. cerevisiae* и Rpc11 из *Sz. pombe*. Все эти клоны содержат во вставке ДНК характеристические сайты узнавания рестриктаз *Bgl*I, *Pst*I и *Pvu*II (рис. 2), которые и были использованы для дальнейшего отбора клонов с кДНК *hRPC11* человека. В результате было отобрано 11 клонов, в 7 из которых вставки были секвенированы по обоим цепям. Пять клонов содержали идентичную последовательность полноразмерной кДНК гена *hRPC11* человека (рис. 2). Ген *hRPC11* кодирует белок из 108 а.о. с расчетной молекулярной массой 12.3 кДа и *pI* 8.05. В двух других клонх обнаружены точечные замены в кодирующей части, являющиеся либо аллельным вариантом, либо артефактом ПЦР (клон № 11, аминокислотная замена G7S; клон № 15, аминокислотная замена I34T) (рис. 2). Кроме того, клон № 15 несет делецию 2 п.о. (GT) в 3'-некодирующей части вставки кДНК. Интересно, что эта делеция обнаружена в клетках раковой линии HeLa в пределах динуклеотидного GT-повтора. Известно, что такого рода делеции (и/или встав-

ки) дестабилизируют геном и могут быть одной из причин ракового перерождения клетки [10].

Осуществленное впервые клонирование гена субъединицы Rpc11 ядерной РНК-полимеразы III из многоклеточного организма существенно расширяет наши представления об изменчивости этой субъединицы в процессе эволюции. Действительно, сравнение структуры hRPC11 с гомологичными субъединицами из дрожжей *S. cerevisiae* и *Sz. pombe* (рис. 3) показало, что эти компоненты РНК-полимеразы III достаточно консервативны (59 и 61% гомологии соответственно). В центральной части и на С-конце каждой из субъединиц обнаружены два участка с инвариантными последовательностями длиной соответственно 9 (KEVDDVLGG) и 7 (RSADEPM) аминокислотных остатков. Причем второй из этих блоков идентичности расположен в центре чрезвычайно гомологичного района протяженностью в 21 а.о. (рис. 3). Все три субъединицы содержат на N-конце характерный Zn-связывающий мотив классического типа (CxxC_nCxxC). Кроме того, на С-конце каждой из этих субъединиц содержится

по 4 (5 – в случае hRPC11 человека) остатка цистеина (рис. 3). Хотя расположение этих остатков цистеина несколько варьирует от белка к белку, представляется вероятным, что они также участвуют в связывании двухвалентных катионов.

Весьма показательной в функциональном смысле представляется нам гомология Rpc11-семейства субъединиц РНК-полимеразы III с факторами элонгации TFIIS РНК-полимеразы II эукариот и РНК-полимеразы архей. В то время как Zn-связывающий домен CxxC₁₆₋₁₇CxxC на N-конце молекулы характерен для всего RPA12-RPB9-RPC11-суперсемейства родственных субъединиц ядерных РНК-полимераз [9], цистеинбогатая протяженная консервативная область на C-конце выявляется только в факторах элонгации TFIIS и субъединицах Rpc11 РНК-полимераз III из разных организмов (рис. 3). Поэтому представляется вероятным, что функции этих компонентов аппарата транскрипции сходны, и что субъединица Rpc11 особенно важна именно на стадиях элонгации и терминации синтеза РНК (см. [11]).

Идентифицированная в данной работе hRPC11 стала пятой (наряду с hRPC53 [12], hRPC32, hRPC39 и hRPC62 [13]) специфической субъединицей РНК-полимеразы III, обнаруженной у человека.

Настоящая работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 96-04-49867) и Государственной научно-технической программы “Новейшие методы биоинженерии” (направление “Генная и клеточная инженерия”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебеденко Е.Н., Шпаковский Г.В. // Тезисы докладов Международной конференции “Молекулярная генетика и биотехнология”, Минск, 1998. С. 63–64.
2. Shpakovski G.V., Lebedenko E.N. // Abstracts of papers presented at the 25th Silver Jubilee FEBS Meeting “FEBS’98”, Copenhagen, 1998. P. 122 [abstract P14.06].
3. Woychik N.A., McKune K., Lane W.S., Young R.A. // Gene Expr. 1993. V. 3. P. 77–82.
4. Smid A., Riva M., Bouet F., Sentenac A., Carles C. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 13534–13540.
5. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dion J., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jancq C., Johnston M. et al. // Science. 1996. V. 274. P. 546–567.
6. Shpakovski G.V., Acker J., Wintzerith M., Lacroix J.-F., Thuriaux P., Vigneron M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 4702–4710.
7. Khazak V., Estojak J., Cho H., Majors J., Sonoda G., Testa J.R., Golemis E.A. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 1935–1945.
8. Sakurai H., Miyao T., Ishihama A. // Gene. 1996. V. 180. P. 63–67.
9. Шпаковский Г.В., Лебеденко Е.Н. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 988–991.
10. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. // Science. 1993. V. 260. P. 816–819.
11. Reines D., Conaway J.W., Conaway R.C. // Trends Biochem. Sci. 1996. V. 21. P. 351–355.
12. Ittmann M., Greco A., Basilico C. // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. P. 3386–3390.
13. Wang Z., Roeder R.G. // Genes & Develop. 1997. V. 11. P. 1315–1326.

Molecular Identification and Characterization of hRPC11, the Smallest Subunit Specific for Human RNA Polymerase III

G. V. Shpakovski[#] and E. N. Lebedenko

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

Full-length copies of cDNA of the hRPC11 gene encoding the smallest specific subunit of nuclear RNA polymerase III were identified among human transcripts with the use of the RT-PCR technique. The cloning of the first orthologue of the subunit RPC11 from a multicellular organism and the comparison of subunit hRPC11 of *Homo sapiens* (108 aa; *M*_r 12.3 kDa; pI 8.05) deduced from the cDNA primary structure with the homologous components of RNA polymerase III from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* revealed the most important functional domains: a Zn-binding motif of the classic type (CxxC₁₆₋₁₇CxxC) at the N-terminal region, and two extended regions of homology (KEVDDVLGG and RSADEPM) in the central and C-terminal parts of the molecule, respectively. The C-terminus of the RPC11 subunits is highly homologous to the unique zinc ribbon of the elongation factor TFIIS, which suggests a role for this subunit in the elongation or termination of RNA synthesis.

Key words: *Homo sapiens*; RNA polymerase III, specific subunit; hRPC11 gene; RT-PCR

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-6583; fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: gvs@ibch.siohc.ras.ru.