



УДК 577.214.(337+622)

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА *rpb8⁺* *Schizosaccharomyces pombe*, КОДИРУЮЩЕГО СУБЪЕДИНИЦУ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I–III, СПЕЦИФИЧНУЮ ТОЛЬКО ДЛЯ ЭУКАРИОТ*

© 1998 г. Г. В. Шпаковский#, С. А. Прошкин,
А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева, Е. Н. Лебеденко

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

Поступила в редакцию 14.08.97 г. Принята к печати 20.10.97 г.

Из экспрессирующей клонотекы делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* выделена полно-размерная кДНК гена *rpb8⁺*, кодирующего общую субъединицу Rpb8 ядерных РНК-полимераз I–III, характерную только для Eucarya. Установлена также первичная структура соответствующего фрагмента генома *Sz. pombe*: ген *rpb8⁺* содержит два коротких интрона длиной 59 и 48 п. о. При сравнении субъединиц Rpb8 различных эукариот выявлена лишь островковая гомология, причем между этими белками у одноклеточных и многоклеточных организмов имеются существенные различия. Субъединица Rpb8 *Sz. pombe* оказалась самой маленькой из всех известных родственных ей белков: в ней отсутствует 21-звенный фрагмент, соответствующий аминокислотным остаткам 68–88 центральной части ее гомолога, субъединицы ABC14.5 из *Saccharomyces cerevisiae*. В соответствии с этим субъединица Rpb8 делящихся дрожжей оказалась неспособной замещать *in vivo* субъединицу ABC14.5 в ядерных РНК-полимеразах пекарских дрожжей.

Ключевые слова: делящиеся дрожжи, ядерные РНК-полимеразы I–III, общая субъединица Rpb8, ген *rpb8⁺*, интроны.

Общие субъединицы ядерных РНК-полимераз I–III эукариот (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 и Rpc10) не имеют гомологов среди субъединиц бактериальных РНК-полимераз. При этом только две из них, Rpb8 и Rpc10, характерны исключительно для представителей эволюционного домена (надцарства) Eucarya, тогда как для трех других общих субъединиц, Rpb10, Rpb6 и Rpb5, обнаружены родственные белки в составе РНК-полимераз архей (домен Archaea) [2–4] и ряда больших цитоплазматических ДНК-содержащих вирусов животных (вирус осповакцины, вирус африканской лихорадки свиней) [5–8]. К настоящему времени функционально охарактеризованы гомологи субъединицы Rpb8 только из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (субъединица ABC14.5) [9] и *Homo sapiens* (субъединица hRPB17) [10].

В процессе изучения аппарата транскрипции делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* мы клонировали генетические детерминанты всех пяти общих субъединиц РНК-полимераз I–III [1, 11–14].

В данной работе определена нуклеотидная последовательность гена *rpb8⁺* и выявлены структурные особенности субъединицы Rpb8, что создает предпосылки для ее последующего функционального изучения путем направленного мутагенеза.

Клонирование кДНК и гена *rpb8⁺* *Sz. pombe*

Сравнение субъединицы ABC14.5 из *S. cerevisiae* с ее гомологами из других эукариотических организмов, прежде всего *H. sapiens* [10], позволило сконструировать вырожденные олигонуклеотидные праймеры, соответствующие N- и C-концевым участкам аминокислотной последовательности этих субъединиц: oGVS54 (5' GCGG-GATCCTACAAAATGKSKGRRWSYSTNYT; степень вырожденности 3048) и oGVS53 (5' GCGGA-ATTCTTAUYCTYCTWARWRRWARRTA; степень вырожденности 1024). В результате ПЦР с этими праймерами на матрице суммарной кДНК *Sz. pombe* (см. [4]) получили два преобладающих фрагмента длиной ~410 и ~520 п.о. (рис. 1), которые были частично секвенированы. Это позволило получить структурную информацию для конструирования праймеров, специфических для гена *rpb8⁺* *Sz. pombe*. Эти праймеры, oGVS318 (5' CCAGGATCCAAAATGTCGGAATCCG) и oGVS319 (5' TGGGAATTCATGACAAAGATACCC),

*Результаты данной работы были впервые доложены на XII Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра", Санкт-Петербург, 22–24 октября 1996 г. (см. краткое сообщение [1]).

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

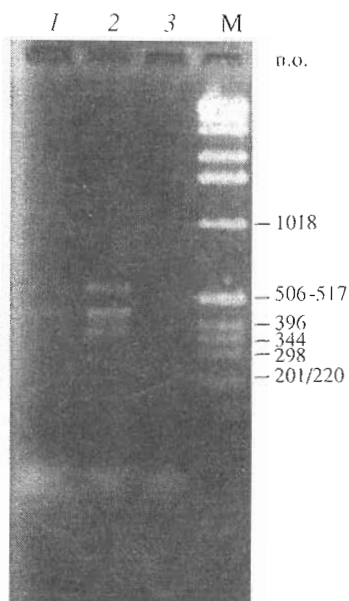


Рис. 1. Электрофорез в 2% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных с вырожденными праймерами oGVS53 и oGVS54 на суммарной кДНК *Sz. pombe*. Пробы ПЦР, соответствующие дорожкам 1–3, различались содержанием ионов Mg^{2+} в инкубационной смеси (соответственно 4, 2 и 1 мМ). М – маркеры молекулярной массы (1 Kb Ladder фирмы BRL, США).

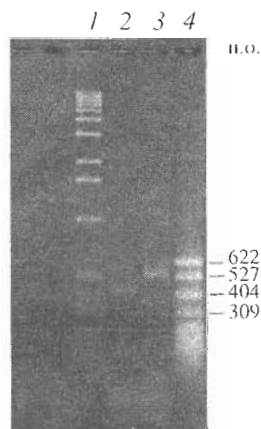


Рис. 2. Анализ в 1.5% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных со специфическими праймерами oGVS318 и oGVS319 на суммарной кДНК (2) и геномной ДНК (3) делящихся дрожжей *Sz. pombe*. 1 и 4 – маркеры молекулярной массы (1 Kb Ladder фирмы BRL, США, и ДНК pBR322/*MspI* соответственно).

были использованы для просеивания кДНК-клонотеки *Sz. pombe* методом последовательных разведений, описанным нами ранее [4, 11].

Из 12 проанализированных первичных разведений клонотеки только два (№ 5 и 6) дали положительный сигнал. Дальнейший анализ разведения № 6 после трех циклов последовательных субразведений позволил получить плазмиду

pYUK9 (#6-1-3-9), содержащую искомую вставку кДНК *rpb8⁺* *Sz. pombe*.

Аmplификация геномной ДНК делящихся дрожжей с теми же специфическими праймерами привела к образованию более длинного фрагмента, что свидетельствует о присутствии в гене *rpb8⁺* по крайней мере одной прерывающей последовательности длиной около 110 п.о. (рис. 2). Полученный фрагмент геномной ДНК *Sz. pombe* был клонирован в векторе pBR322 по участкам расщепления эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BamHI*; 6 независимых клонов (плазмиды pSP81–86) были секвенированы.

В результате установлена первичная структура полноразмерной копии кДНК и гена *rpb8⁺* *Sz. pombe* (рис. 3), кодирующего белок из 125 а. о. с молекулярной массой 14.3 кДа и изоэлектрической точкой *pI* 5.66. В своей кодирующей части кДНК *rpb8⁺* отличается от недавно депонированных в GenBank/EMBL двух различающихся по длине 3'-некодирующей области последовательностей кДНК этого же гена (A. Voutsina, D. Alexandraki, неопубликованные данные; номера депонирования Y07643 и Y07644) дополнительным звеном Т в позиции 365 (см. радиоавтограф на рис. 3). Не приходится сомневаться в точности именно нашей структуры, поскольку только в этом случае восстанавливается гомология последних четырех аминокислотных остатков С-конца субъединиц Rpb8 *Sz. pombe* и ABC14.5 *S. cerevisiae* (рис. 4). По сравнению с нуклеотидными последовательностями, депонированными греческими авторами, изолированная нами копия кДНК содержит наиболее протяженный 5'-некодирующий участок, в то время как ее 3'-конец укорочен.

Интересной особенностью участка инициации трансляции *rpb8⁺* *Sz. pombe* оказалось наличие 8-звенного АТ-палиндрома непосредственно перед иницирующим кодоном (рис. 3). Сходные палиндромные структуры присутствуют также в генах соответствующей субъединицы из многоклеточных эукариот *Caenorhabditis elegans* и *H. sapiens* [10]:

<i>Sz. pombe</i>	5'	CGCCAGTTTTTAAAAATGTCG
<i>H. sapiens</i>	5'	GTGGCCCCCTCGCGATGGCG
<i>C. elegans</i>	5'	CTTTATTTTAGAAAAATGGCT

Наличие палиндромных структур не характерно для участков инициации трансляции и может служить указанием на особую регуляцию этого процесса при экспрессии генов субъединицы Rpb8 у этих организмов.

Было установлено, что ген *rpb8⁺* содержит два коротких интрона длиной 59 и 48 п. о., причем оба нарушают триплеты, кодирующие аминокислоту

	<i>KpnI</i> <i>HindIII</i>	
aacgaatttaaaaaattgataggtaccacaagctttattgtttgtaaaataattactgctcattattacgctcttttct		76
tggggaaaataattctgtattgtttttgggaaacgcccagttttaaaa		147
	Met Ser Glu Ser Val Leu Leu Asp	[8]
CAG ATT TTT ACA GTC ACT TCA GTT GAT AAA CAA AAG TAT CAA AGA G	gtttgtgaaatta	209
Glu Ile Phe Thr Val Thr Ser Val Asp Lys Gln Lys Tyr Gln Arg		[23]
aaaaaaaaaacaagaagaagaataactaactaaccttaccag	TT TCA CGA ATT ACG GCT GTC TCA GGC	278
	Val Ser Arg Ile Thr Ala Val Ser Gly	[32]
CAA AAT GAC ATG AAT CTT ACT CTT GAC ATT AAT TCG CAA ATT TAT CCT TTA GAA AAG GAT		338
Gln Asn Asp Met Asn Leu Thr Leu Asp Ile Asn Ser Gln Ile Tyr Pro Leu Glu Lys Asp		[52]
GCA ACC TTT AGT TTG CAA ATC ACA AGC AAT TTG AAT AGC CCT GAT TTA AAG GAA GCT GCT		398
Ala Thr Phe Ser Leu Gln Ile Thr Ser Asn Leu Asn Ser Pro Asp Leu Lys Glu Ala Ala		[72]
GAT TAT ATT ATG TAT GGA AAA GTC TAT CGG GTG GAA GAA GAT GAG AAA GT	gta	457
Asp Tyr Ile Met Tyr Gly Lys Val Tyr Arg Val Glu Glu Ala Lys Asp Glu Lys Val		[91]
agtgtaaaagcagttgttaattattattattataacccaattacaaga	A TCT GTT TAT GTA AGC TTT GGC GGT	527
	Ser Val Tyr Val Ser Phe Gly Gly	[99]
	<i>MunI</i>	
TTA TTG ATG GCA ATT GAG GGC TCT CAT AGA AAA TTG TAT CGT TTG TCA TTA GAC CAT GTT		587
Leu Leu Met Ala Ile Glu Gly Ser His Arg Lys Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Asp His Val		[119]
	<i>HindIII</i>	
	TAT STA TTA CTT AGA AGG TAA ataatgatcgtgggtatctttgtca	633
	Tyr Leu Leu Leu Arg Arg stop	[125]



Рис. 3. Нуклеотидная последовательность полноразмерной кДНК *rpb8⁺* (плазмида pYUK9) и интронов, содержащихся в гене *rpb8⁺* *Sz. pombe* (плазмида pSP81-86). Кодированная часть набрана заглавными буквами. Выделенная из первичной структуры кДНК аминокислотная последовательность субъединицы Rpb8 приведена внизу в трехбуквенном обозначении. Цифры указывают нумерацию нуклеотидов, цифры в квадратных скобках – нумерацию аминокислотных остатков. Отмечены участки узнавания рестриктаз, уникальные для гена *rpb8⁺*. Жирным шрифтом выделен тимидиновый нуклеотид, отсутствующий в последовательностях Y07643 и Y07644 из базы данных GenBank/EMBL. Его присутствие в конце гена *rpb8⁺* *Sz. pombe* продемонстрировано радиоавтографом фрагмента секвенирующего 8% геля данной области плазмиды pYUK9.

валин. В самом начале обоих интронов присутствуют терминирующие кодоны (в каждом случае по два), препятствующие трансляции несплайсированной матрицы. Следует отметить, что гены всех пяти общих субъединиц РНК-полимераз I–III *Sz. pombe* содержат один или два интрона [11, 14, 16, 17] с характерными участками сплайсинга и последовательностью, участвующей в образовании лассо (см. таблицу). При этом интроны гена *rpb8⁺* так же, как и интроны гена *rpb10⁺* [17], расположены в участках, отвечающих границам консервативных структурных доменов соответствующих белков. В этом смысле особенно показательна позиция второго интрона *rpb8⁺*, соответствующая положению между двумя, пожалуй, самыми консервативными участками гомологов субъединицы Rpb8. Интересно, что именно в этом месте наблюдается наиболее характерное различие между белками из одноклеточных и многоклеточных эукариот – 4–5 добавочных аминокислотных остатков у высших организмов (рис. 4).

Как видно из приведенных в таблице консенсусов, интроны в генах *Sz. pombe* и млекопитающих очень похожи. Действительно, как было показано ранее [19], интрон транскрипта малого Т-антигена вируса SV40 выщепляется в клетках *Sz. pombe*. Вместе с тем в интронах *Sz. pombe* в отличие от интронов млекопитающих отсутствует полипиримидиновый тракт (Py)_n между участком ветвления и 3'-границей интрона. Эта область редуцирована у делящихся дрожжей до 3–13 п.о.

Сравнение субъединицы Rpb8 *Sz. pombe* с ее гомологами из других эукариот

Сравнительный анализ первичных структур субъединицы Rpb8 и ее гомологов из *S. cerevisiae* (субъединица ABC14.5) [9] и *H. sapiens* (субъединица hRPB17) [10], а также полипептидов, кодируемых нуклеотидными последовательностями с открытой рамкой считывания из *C. elegans* (номера депонирования U12964 и U13875) и *Oryza sativa* (номер депонирования D15823), не позволил выделить протяженные структурно-функциональные домены. Наблюдается лишь островковая гомология отдельных участков этих белков (рис. 4). Так, например, в С-концевой части молекул высококонсервативны последовательности YVMYGKVY и в особенности Y(V/A)SFGLLM. Более существенная гомология обнаружена только между субъединицами *H. sapiens* и *C. elegans*.

Такое расхождение в первичной структуре субъединиц Rpb8 из одноклеточных и многоклеточных организмов, не типичное для других общих субъединиц [10, 12], возможно, указывает на интенсивную эволюционную историю этого компонента ядерных РНК-полимераз. Вместе с тем субъединица Rpb8, по-видимому, выполняет совершенно необходимую для транскрипции эука-

риотических геномов функцию. Действительно, ген, кодирующий предполагаемый гомолог субъединицы Rpb8, недавно обнаружен даже в сильно редуцированном, самом миниатюрном из эукариотических геномов – в нуклеоморфе вторичного постоянного эндосимбионта, формирующего пластиду хлороконтной водоросли *Pedinomonas minutissima* (номер депонирования в GenBank U58510; см. рис. 4, а также заметку в серии “Новости науки” этого номера “Биоорганической химии”, с. 154–155).

Функциональное тестирование гена *rpb8⁺* *Sz. pombe* в клетках *S. cerevisiae*

Субъединица ABC14.5 (RPB8), как и большинство других субъединиц ядерных РНК-полимераз пекарских дрожжей, незаменима для роста клеток. Ранее нами было установлено, что ее человеческий гомолог, субъединица hRPB17, способна замещать нативную субъединицу в клетках дрожжей *S. cerevisiae* только при оптимальной температуре (30°C), тогда как при повышенной температуре (37°C) дрожжевой штамм YGVS-045, несущий человеческий ген *hRPP17* (*POLR2H*) вместо нативного RPB8, нежизнеспособен [10]. Мы использовали этот термочувствительный мутант для тестирования гена *rpb8⁺* *Sz. pombe* на способность к межвидовой комплементации в *S. cerevisiae*.

Штамм YGVS-045 трансформировали плазмидой pYUK9 (*URA3⁺*) и отбирали трансформанты на среде без лизина, триптофана и урацила. Полученный таким образом штамм YGVS-051, несущий сразу две челночные плазмиды (pGEN-Hs8 [10] и pYUK9), так же как и исходный штамм, не растет при повышенной температуре. Даже при очень продолжительном культивировании этого штамма на богатой среде YPD [20] не происходит потери триптофанового маркера (т.е. плазмиды pGEN-Hs8), что свидетельствует о неспособности кДНК *rpb8⁺* *Sz. pombe* комплементировать нулевой аллель *rpb8-Δ1::LYS2* *S. cerevisiae*. По-видимому, неспособность к межвидовой комплементации в случае субъединицы Rpb8 *Sz. pombe* связана с отсутствием в ней фрагмента, гомологичного 21-звенному участку (68–88) в срединной части субъединицы RPB8 *S. cerevisiae* (см. рис. 4). Парадоксальность полученных результатов – функциональная взаимозаменяемость компонента РНК-полимераз I–III лишь у эволюционно более отдаленных организмов, одноклеточных дрожжей *S. cerevisiae* и человека – свидетельствует о том, что, несмотря на эволюционную консервативность аппарата транскрипции у всех эукариот, детали организации каждого из комплексов могут иметь свои отличительные особенности. Разработанный нами метод межвидовой комплементации в применении к аппарату транскрипции эукариот позволяет выявлять эти отличия.

Rpb8 (ABC14.5)

<i>Sz. pombe</i>	1	MSESVLLDEIFTVTSVDKQ--KYQVRSRITAVSG-QNDMNLTLDINSQIYPLEKDATFSLQITSNLNSPD-----	67
		***+ **++ ** * * * * * **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++	
<i>S. cerevisiae</i>	1	MSNT-LFDDIFQVSEVDPG--RYNKVCRIEAASTQDQCKLTLIDINVELFPVAAQDSLTVTIASSLNLEDTPANDSSATR	77
		*+ **++**++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++*	
<i>H. sapiens</i>	1	MAGI-LFEDIFDVKIDIDPEGKDFRSLHCESES-FKMDLILDVNIQIYPVDLGDKFRLVIASTLYEDGTLDGGEYNP-	77
		***+ **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++*	
<i>C. elegans</i>	1	MAGI-IFDDMFVKVSDPDGKDFRVSRYFCDAES-FKELIIDLINSQIYPLKQNDKVRVLVATTLREDGLADEGEYDP-	77
		++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++ **++	
<i>P. minutissima</i>	1	MRQLSIQYQCNDIIKILSKDPDGKLYEKVSRIIAQSY-LNMEIWFIDINSHLFPYVVGDSNLISIYIISDESFNSTIK----	77
		D I F V D P V S R S L D I N P D L I L	
<i>Sz. pombe</i>	68	-----LKEAADYIMYGKVVYRVEEAKDE-----KVSVVYVFGGLLMAIEGSHRKLRYRLSLD-HVYLLLR	125
		*+ **++**++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++*	
<i>S. cerevisiae</i>	78	SWRPPQAGDRSLADDYVMYGTAYKFEVSKD-----LIAVYVYSGGLLMRLEGNRYRNLNLLKQE-NAVLLIRR	146
		* **++**++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++*	
<i>H. sapiens</i>	78	-----TDDRPSRADQFEYVMYGKVVYRIEGDETSTEAATRLSAYVYSGGLLMRLQGDANNLHGFVDSRVYLLMCKLAF	150
		+ * * **++**++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++*	
<i>C. elegans</i>	78	-----KAEYP-RIKQYEVMYGKVVYRLEDDDTGTDGG-KLAAAYASFGGLLMRLKGEAINLHGFVDMNLYLLMCKTDF	148
		*+ **++**++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++* **++*	
<i>P. minutissima</i>	78	---DNQFSY--LVDKYEFMIGKVFNIITSIERETS--FNLIYASFGGLLLKLVKVKYLLKSFPLNSHLCIGLNRIN	147
		Y M Y G K V Y E Y S F G G L L M L G L Y L L	

Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей гомологов субъединицы Rpb8 (ABC14.5) из различных эукариотических организмов. Звездочками отмечены идентичные аминокислотные остатки соседних последовательностей, плюсами – консервативные замены. Последовательности из *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *Saenohabditis elegans* и *Pedinotomas minutissima* были определены в работах [9, 10 и 15], а структура субъединицы из *Sz. pombe* установлена в настоящей работе. В нижнюю строку вынесены аминокислотные остатки, присутствующие по крайней мере в четырех последовательностях; инвариантные остатки выделены жирным шрифтом.

Структурная организация интронов в генах, кодирующих общие субъединицы РНК-полимераз I–III *Schizosaccharomyces pombe*

Ген	Донорный (5'-концевой) участок сплайсинга	Участок ветвления (образования лассо)	Акцепторный (3'-концевой) участок сплайсинга	Длина интрона
<i>rpb5</i> ⁺	5'..GTatGt..(N) ₃₅tatГААс..	..(N) ₁₃ ..tAG..	64
<i>rpb6</i> ⁺	5'..GTatGt..(N) ₁₉₀tgСТААт..	..(N) ₅ ..tAG..	211
<i>rpb8</i> ⁺	5'..GTgaGt..(N) ₁₉₄ttСТААс..	..(N) ₉ ..tAG	219
<i>rpb8</i> ⁺	5'..GTttGt..(N) ₃₇taСТААс..	..(N) ₆ ..cAG	59
<i>rpb10</i> ⁺	5'..GTaaGt..(N) ₂₈acСТААт..	..(N) ₄ ..aAG	48
<i>rpb10</i> ⁺	5'..GTaaGg..(N) ₂₉₆tgСТААт..	..(N) ₄ ..cAG	316
<i>rpb10</i> ⁺	5'..GTaaGt..(N) ₃₉aaСТААс..	..(N) ₈ ..tAG	63
<i>rpb10</i> ⁺	5'..GTatGa..(N) ₃₄gaCTgAc..	..(N) ₃ ..cAG	53
Консенсус*	5'..GTaWGt..(N) ₂₈₋₂₉₆	..wnСТААу..	..(N) ₃₋₁₃ ..YAG	48–316
Консенсус для интронов генов млекопитающих [18]	5'..GTRAGT..	..TNCTRAC..	..(Py) _n ..CAG	

* В консенсусе подчеркнута точка ветвления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дрожжевые штаммы и челночные плазмиды.

Гаплоидный штамм *S. cerevisiae* YGVS-045 (MAT α *his3*- Δ 200 *lys2** *lys2*-801 или *lys2*- Δ 201/ *leu2** *leu2*-3,112 или *leu2*- Δ 1/ *trp1*- Δ 63 *ura3*-52 *ade2*-1 *rpb8*- Δ 1::*LYS2* [pGEN-Hs8: 2 μ m *TRP1* pPGK-*hRPB17*]), плазида pGEN-Hs8 и основные генетические методы описаны нами в работе [10]. Для селекции штаммов дрожжей использовали минимальную среду SD (0.67% дрожжевой источник азота без аминокислот [Difco], 2% глюкоза, 2% бактоагар) [20] со следующими концентрациями селективных добавок (мг/л): 30 (лизин), 20 (урацил), 20 (триптофан), 20 (гистидин), 30 (лейцин) и 20 (аденин).

Полимеразную цепную реакцию с вырожденными праймерами oGVS53 и oGVS54 на матрице суммарной кДНК *Sz. pombe* проводили в течение 40 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг – 1 мин при 40°C и элонгация – 2 мин при 50°C. Условия ПЦР со специфическими праймерами oGVS318 и oGVS319 на суммарной кДНК и геномной ДНК *Sz. pombe*: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг – 1 мин при 55°C и элонгация – 1.5 мин при 72°C. Использовали *Taq*-полимеразу и буфер для ПЦР фирмы Perkin-Elmer/Cetus. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1.5 или 2% агарозном геле.

Просеивание кДНК-клонотеки *Sz. pombe* осуществляли методом последовательных разведений, описанным нами ранее [4, 11].

Клонирование геномного фрагмента *Sz. pombe*, содержащего *rpb8*⁺. Для конструирования плазмид pSP81–86 фрагмент геномной ДНК *Sz. pombe* был амплифицирован с помощью ПЦР со специфическими для гена *rpb8*⁺ праймерами oGVS318 и oGVS319 (см. выше). Полученный фрагмент длиной 550 п.о. обработали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI, очистили электрофорезом в 1.5% агарозном геле с последующей прямой элюцией в трис-ацетатный буфер для электрофо-

реза с добавкой 0.3 М ацетата Na [21] и клонировали в векторе pBR322, расщепленном теми же рестриктазами.

Секвенирование ДНК и сравнение аминокислотных последовательностей белков. Двухцепочечную ДНК секвенировали после щелочного лизиса методом дидезоксинуклеотидных терминаторов [22] с использованием набора для секвенирования с модифицированной ДНК-полимеразой фага T7, Sequenase 2.0 (USB, США). Для секвенирования pYUK9 и pSP81–86 использовали праймеры oGVS318, oGVS319, а также олигонуклеотиды oGVS156 (5' TCCTGTCATTGT-TCTCGTTCCCTTC) и oGVS157 (5' CATCTTTTCGTAATAATTTCTGGCAAGGT), отвечающие участкам вектора клонотеки pDB20 [23], окаймляющим вставку кДНК *Sz. pombe*. Метками служили [α -³³P]dATP (ИБХ РАН) и [α -³⁵S]dATP (ЛИЯФ РАН). Отжиг праймера oGVS318 на секвенируемой матрице проводили при повышенной температуре (45°C), так как при стандартной для этой процедуры температуре (37°C) отжига не происходило – вероятно, из-за возникновения стабильной шпильки на 3'-конце этого праймера (структуру праймера oGVS318 см. выше).

Трансформация дрожжей и селекция. Гаплоидный штамм YGVS-045 дрожжей *S. cerevisiae* с хромосомным нуль-аллелем *rpb8*- Δ 1::*LYS2*, поддерживаемый в жизнеспособном состоянии благодаря плазмиде pGEN-Hs8 с геном *TRP1* в качестве селективного маркера, трансформировали по методу [24, 25] с модификациями плазмидой pYUK9, экспрессирующей кДНК *rpb8*⁺ *Sz. pombe* и несущей в качестве маркера ген *URA3* *S. cerevisiae*. Трансформанты отбирали на среде без лизина, урацила и триптофана. Затем индивидуальные колонии, выросшие в этой среде, т.е. содержащие обе плазмиды, неоднократно пассировали вначале на твердой, а затем на жидкой среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза, 2% бакто-

агар) [20]. После ~20–30 генераций клетки рассеивали до единичных колоний на богатой среде YPD и с помощью реплик на селективную среду без триптофана проверяли сохранение триптофанового маркера. Параллельно, в качестве контроля, с помощью реплик, а также позитивной селекцией на среде с 5-FOA [26] проверяли возможность утраты маркера *URA3*.

Последовательности, установленные в этой работе, депонированы в GenBank под номерами AF020780 (кДНК *rpb8*⁺ *Sz. pombe*) и AF029688 (ген *rpb8*⁺ *Sz. pombe*).

Настоящая работа частично финансирована грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 96-04-49867) и Государственной научно-технической программы “Новейшие направления биотехнологии” (направление “Генная и клеточная инженерия”).

Авторы признательны Ю.А. Берлину за поддержку этих исследований и интерес к нашей работе и О.Л. Корольчук за помощь в проведении ряда экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Цитология. 1997. Т. 39. С. 122–123.
2. Lanzendorfer M., Langer D., Hain J., Klenk H.-P., Holz I., Arnold-Ammer I., Zillig W. // System. Appl. Microbiol. 1994. V. 16. P. 656–664.
3. Langer D., Hain J., Thuriaux P., Zillig W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 5768–5772.
4. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н., Тюрью П. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 110–117.
5. Amegadzie B.Y., Ahn B.Y., Moss B. // J. Virol. 1992. V. 66. P. 3003–3010.
6. Moss B. // Fields Virology / Eds B.N. Fields, S.M. Knipe, P.M. Howley. San Diego; London; Sydney; Tokyo: Acad. Press, 1996. V. 2. P. 2637–2671.
7. Lu Z., Kutish G.F., Sussman M.D., Rock D.L. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2940.
8. Yanez R.J., Rodriguez J.M., Nogal M.L., Yuste L., Enriquez C., Rodriguez J.F., Vinuela E. // Virology. 1995. V. 208. P. 249–278.
9. Woychik N.A., Liao S.-M., Kolodziej P., Young R.A. // Genes Dev. 1990. V. 4. P. 313–323.
10. Shpakovski G.V., Acker J., Wintzerith M., Lacroix J.-F., Thuriaux P., Vigneron M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 4702–4710.
11. Shpakovski G.V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
12. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 938–940.
13. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 441–448.
14. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 987–991.
15. Gilson P.R., McFadden G.I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7737–7742.
16. Miyao T., Yasui K., Sakurai H., Yamagishi M., Ishihama A. // Genes Cells. 1996. V. 1. P. 843–854.
17. Шпаковский Г.В., Прошкин С.А., Лебедеко Е.Н. // Молекулярная биология. 1998. В печати.
18. Kreivi J.-P., Lamond A.I. // Curr. Biol. 1996. V. 6. P. 802–805.
19. Kaufer N.F., Simanis V., Nurse P. // Nature. 1985. V. 318. P. 78–80.
20. Sherman F. // Methods Enzymol. 1991. V. 194. P. 3–20.
21. Hansen H., Lemke H., Bodner U. // BioTechniques. 1993. V. 14. P. 28–30.
22. Murphy G., Ward E.S. // Nucleic Acids Sequencing. A Practical Approach / Eds C.J. Howe, E.S. Ward. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press, 1989. P. 99–115.
23. Becker D.M., Fikes J.D., Guarente L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1968–1972.
24. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. // J. Bacteriol. 1983. V. 153. P. 163–168.
25. Rose M.D., Winston F., Hieter P. Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. P. 122–123.
26. Boeke J.D., Trueheart J., Natsoulis G., Fink G.R. // Methods Enzymol. 1987. V. 154. P. 164–175.

Structural and Functional Characterization of the *rpb8*⁺ Gene of *Schizosaccharomyces pombe* Encoding a Subunit of RNA Polymerases I–III Only Specific for Eukaryotes

G. V. Shpakovski, S. A. Proshkin, A. L. Kayushin, M. D. Korosteleva, and E. N. Lebedenko

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

A full-length cDNA of the *rpb8*⁺ gene encoding a common subunit Rpb8 of nuclear RNA polymerases I–III only specific for Eucarya was isolated from an expression library of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The primary structure of the corresponding fragment of the *Sz. pombe* genome was also established. The *rpb8*⁺ gene contains two short introns, 59 and 48 bp long. Only short segments of homology were found upon comparing the Rpb8 subunit homologs from various eukaryotic species, and substantial differences exist between the corresponding proteins of unicellular and multicellular organisms. Subunit Rpb8 of *Sz. pombe* proved to be the smallest one among the known related proteins: it lacks the 21-aa fragment corresponding to amino acids residues 68–88 of the central part of the homologous subunit ABC14.5 of *Saccharomyces cerevisiae*. Accordingly, subunit Rpb8 of the fission yeast was not capable of substituting *in vivo* subunit ABC14.5 in nuclear RNA polymerases of the baker's yeast.

Key words: fission yeast, nuclear RNA polymerases I–III, common subunit Rpb8, rpb8⁺ *gene, introns*