



УДК 577.214.(337+622)

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА кДНК ГЕНА *rpc10<sup>+</sup>*, КОДИРУЮЩЕГО САМУЮ МАЛУЮ СУБЪЕДИНИЦУ ЯДЕРНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ *Schizosaccharomyces pombe*\*

© 1997 г. Г. В. Шпаковский<sup>#</sup>, 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 6.12.96 г.

Клонирована полноразмерная кДНК гена *rpc10<sup>+</sup>*, кодирующая мини-субъединицу Rpc10, общую для всех ядерных РНК-полимераз делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, и установленна ее первичная структура. Субъединица Rpc10 *Sz. pombe* и ее гомологи из *Saccharomyces cerevisiae* и *Homo sapiens* представляют собой положительно заряженные белки с чрезвычайно консервативным С-концом и инвариантным Zn-связывающим доменом классического типа YxC<sub>2</sub>C<sub>X</sub><sub>12</sub>RC<sub>X</sub><sub>2</sub>CG<sub>X</sub>R. Функциональный тест на межвидовую комплементацию – с помощью тетрадного анализа и путем перетасовки плазмид – показал, что субъединица Rpc10 *Sz. pombe* успешно замещает гомологичную субъединицу ABC10α в составе ядерных РНК-полимераз I–III *S. cerevisiae*.

*Ключевые слова:* ядерные РНК-полимеразы I–III, общие субъединицы, делящиеся дрожжи, ген *rpc10<sup>+</sup>*, межвидовая комплементация, цинксвязывающий домен.

Интересной особенностью ядерных РНК-полимераз I, II, III (или A, B, C) эукариот является существование пяти субъединиц, входящих в состав всех трех ферментных комплексов. Эти пять общих субъединиц были впервые обнаружены в составе ядерных РНК-полимераз из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1, 2] и названы ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10α и ABC10β [3, 4]. Впоследствии для этих субъединиц были клонированы кодирующие их гены, названные соответственно *RPB5*, *RPB6*, *RPB8*, *RPC10* и *RPB10* [5–8].

Функции общих субъединиц ядерных РНК-полимераз I–III, этих незаменимых компонентов аппарата транскрипции эукариот, не имеющих гомологов в эубактериальном ферменте, неизвестны и представляют значительный интерес. До недавнего времени было невозможно выявить структурные особенности (степень структурной консервативности, характерные структурно-функциональные домены, важные для функции аминокислотные остатки и т.д.) общих субъединиц, поскольку первичные структуры этих белков были известны только для *S. cerevisiae*.

В последнее время были клонированы генетические детерминанты всех пяти общих субъединиц *Homo sapiens* [9], а также появилась информация о строении ряда гомологов субъединиц Rpb6 и Rpb10 из других эукариот [9–11]. Наряду с этим для общих субъединиц Rpb5, Rpb8 и Rpc10 выявлено лишь по 2–3 гомолога (см. [9]), и такого насыщения структурными данными пока не наблюдается. К тому же недавно выяснилось, что в составе РНК-полимераз архебактерий (царство Archaea) и ряда цитоплазматических вирусов животных входят белки с некоторым структурным сходством лишь с общими субъединицами Rpb10, Rpb6 и Rpb5 [12]. Таким образом, наверное, только общие субъединицы Rpb8 и Rpc10 характерны исключительно для представителей царства Eucarya.

Для выявления структурных особенностей субъединицы Rpc10 и создания предпосылок для ее последующего направленного мутагенеза мы извлекли из экспрессирующей клонотеки *Sz. pombe* кДНК, кодирующую эту субъединицу РНК-полимераз I–III, и установили ее первичную структуру.

*Клонирование кДНК гена *rpc10<sup>+</sup>* *Sz. pombe*  
из экспрессирующей клонотеки  
делящихся дрожжей*

Проведенный нами компьютерный поиск гомологов субъединицы ABC10α *S. cerevisiae* выявил два коротких гипотетических продукта

\*Мы посвящаем эту статью памяти Михаила Николаевича Колосова, в лаборатории которого еще студентами нам посчастливилось начинать свой путь в науке. В широком спектре научных интересов Михаила Николаевича проблемы транскрипции и регуляции генной активности занимали достойное место.

Сокращения: 5-FOA – 5-фтороротовая кислота.

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

ABC10 $\alpha$ :	32	AECSSKLSLRTDAVRCCKDCGHRILLKARTKRLVQFEAR	70	23	RTATLKYICA	32
		++C + ++ + +RC++CGHR++ K RTKR+VQFEAR			R AT+ Y+CA	
X82444:	1888	SDCGRRTIQAKEVIRCRCGHRVYMKRTKRMVQFEAR	2004	1808	RPATMIYLCA	1837

Рис. 1. Результаты компьютерного поиска гомологов субъединицы ABC10 $\alpha$  *S. cerevisiae*. Представлены найденные с помощью программы TBLASTN (версия 1.4 6MP) [13] два коротких участка гомологии между аминокислотной последовательностью (а.о. 32–70 и 23–32) субъединицы ABC10 $\alpha$  из *S. cerevisiae* и продуктом трансляции участка нуклеотидной последовательности (нуклеотиды 1888–2004 и 1808–1837) из генома *Sz. pombe*, депонированной в EMBL под номером X82444. На средней строке показаны идентичные аминокислотные остатки, а также консервативные замены (+).

трансляции, структурная информация о которых содержалась в 3'-некодирующей области гена *pml1*<sup>+</sup> *Sz. pombe* (номер депонирования в базе данных EMBL X82444) (рис. 1). Мы предположили существование короткого интрона между фрагментами, кодирующими эти два продукта, что дало возможность объединить их в единую рамку считывания. При этом по местам сочленения нами были обнаружены 5'-донорный (GTATGA) и 3'-акцепторный (CAG) участки сплайсинга, удовлетворяющие приведенному в литературе консенсусу для структуры участков сплайсинга мРНК *Sz. pombe* [14].

На основании этой структурной информации мы сконструировали два олигонуклеотидных праймера – oGV50, (5')TTTAACTGGATC-

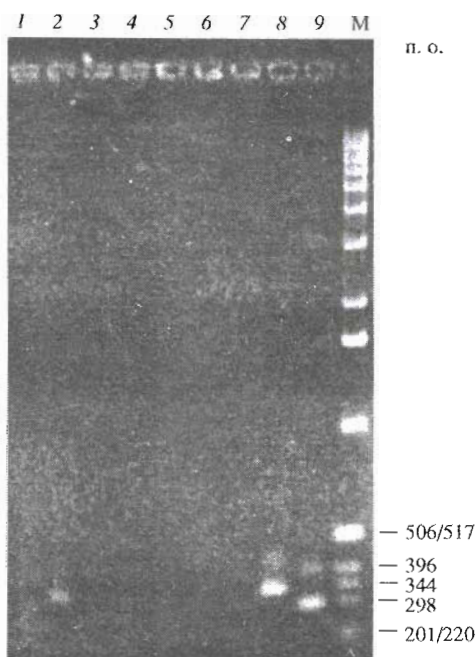


Рис. 2. Электрофорез в 1.5% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных со специфическими праймерами oGV50 и oGV51 на ДНК из различных разведений кДНК-клонотек *Sz. pombe* (дорожки 1–7), на геномной ДНК *Sz. pombe* (8) и на суммарной кДНК *Sz. pombe* (9). Дорожка М – маркеры молекулярной массы (1 Kb DNA Ladder фирмы BRL, США).

ССААТАСАСТАААААААГТТ, и oGV51, (5') AAGTTAGAATTCCGTTTTTCTCTTTTCATAG, окаймляющие область предполагаемого гена с интроном.

В результате ПЦР с этими праймерами продукт, полученный на суммарной геномной ДНК *Sz. pombe*, действительно оказался на ~50 п.о. длиннее продукта амплификации кДНК *Sz. pombe* (рис. 2), что согласуется с размером предсказанного нами интрона.

Далее, используя эти же праймеры, мы провели поиск соответствующей кДНК гена *rpc10*<sup>+</sup> в экспрессирующей клонотеке *Sz. pombe* [15] методом последовательных разведений, описанным нами ранее [10, 16]. Оказалось, что из 12 проанализированных первичных разведений клонотеки три (№ 2, 3 и 12) дают положительный сигнал. Для дальнейшего поиска мы использовали разведение № 12 (рис. 2, дорожка 2), соответствующее 730 первичным трансформантам. Для приготовления 8 последующих субразведений мы рассеяли 1670 колоний из ранее законсервированной суспензии разведения № 12; положительным оказалось субразведение № 12-6. Дальнейший анализ колоний этого субразведения привел к плазмиде pENL21, содержащей искомую вставку кДНК *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* (рис. 3). К сожалению, ориентация кДНК-вставки в этой плазмиде по отношению к ADC1-промотору вектора клонотеки *Sz. pombe* pDB20 [15] оказалась неэкспрессирующей, что не позволило использовать эту плазмиду для функционального тестирования.

Кодирующая часть *rpc10*<sup>+</sup> и область, предшествующая иницирующему кодону ATG, идентичны соответствующим структурам, обнаруженным нами в последовательности, депонированной в EMBL под номером X82444. Наряду с этим в пределах 170 п. о. 3'-некодирующей области (см. рис. 3) мы обнаружили семь расхождений: вместо G в позиции 271 в последовательности X82444 было два звена G; обнаруженные нами звенья А, А, С и G соответственно в позициях 280, 310, 315 и 320 в последовательности X82444 отсутствовали; кроме того, в позиции 302 мы нашли А вместо G, а в позиции 355 – G вместо Т (рис. 3). Едва ли все эти расхождения можно объяснить вариабельностью использованного в обоих слу-

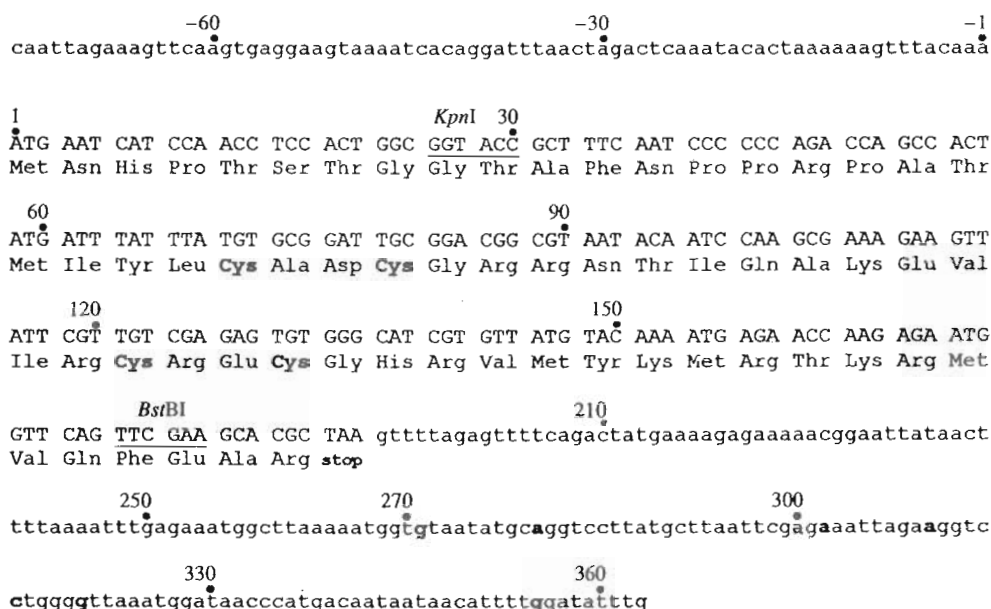


Рис. 3. Нуклеотидная последовательность кДНК *rpc10<sup>+</sup>* *Sz. pombe* и выведенная из нее аминокислотная последовательность субъединицы Rpc10. Цифры вверху строк обозначают нумерацию нуклеотидов, отрицательные номера использованы для нуклеотидов 5'-некодирующей области, предшествующей иницирующему кодону ATG. Подчеркнуты участки узнавания рестриктаз, уникальные для гена *rpc10<sup>+</sup>*. Жирным шрифтом выделены четыре инвариантных остатка цистеина, формирующие цинк-связывающий домен [9], а также нуклеотидные позиции, по которым нами обнаружены расхождения с последовательностью, депонированной в EMBL под номером X82444.

чаях штамма 972h<sup>-</sup> делящихся дрожжей *Sz. pombe*. Скорее всего, авторы, секвенировавшие ген *pm1<sup>+</sup>*, не уделили должного внимания последовательности, находящейся далеко за пределами интересующего их гена, в его дальней 3'-некодирующей области. Действительно, в статье, посвященной гену *pm1<sup>+</sup>* [17], авторы даже не приводят структуру этого района и не упоминают о нахождении каких-либо других рамок считывания в последовательности X82444.

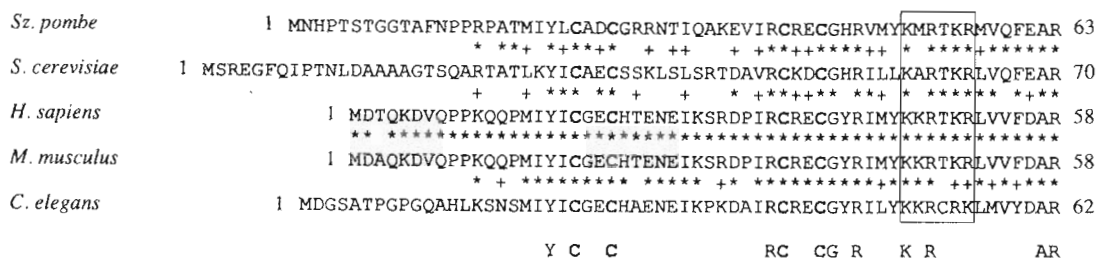
#### Сравнительная характеристика субъединицы Rpc10 *Sz. pombe* и ее гомологов из других эукариот

Обнаруженная кДНК гена *rpc10<sup>+</sup>* *Sz. pombe* кодирует белок из 63 а. о. с молекулярной массой 7.3 кДа и предсказанным значением изоэлектрической точки pI 10.2. До недавнего времени были известны три структурных гомолога субъединицы Rpc10 *Sz. pombe*: из *S. cerevisiae* (субъединица ABC10α) [7], *H. sapiens* (субъединица hRPB7.0) [9] и *Mus musculus* (продукт гена *MafY*) [18]. Следует отметить, что аминокислотные последовательности субъединиц человека и мыши практически идентичны, различаясь лишь единственным аминокислотным остатком в позиции 3 (рис. 4).

Недавно мы обнаружили еще один потенциальный гомолог, из нематоды *Caenorhabditis ele-*

*gans* (Г.В.Ш. и Е.Н.Л., неопубликованные результаты). Как видно из рис. 4, отличительной чертой всех известных гомологов субъединицы Rpc10 является высокая консервативность 25 а. о. С-концевой области (более 84% гомологии). Действительно, эта область содержит 9 инвариантных аминокислотных остатков (36% идентичности). Она же содержит большое число положительно заряженных аминокислотных остатков и, вероятно, определяет ядерную локализацию субъединицы. Наряду с этим N-концевая часть этих гомологичных белков весьма вариабельна – как по длине, так и по первичной структуре (рис. 4).

Во всех гомологах представлен также строго консервативный Zn-связывающий домен классического типа Yx<sub>2</sub>Cx<sub>2</sub>Cx<sub>12</sub>RCx<sub>2</sub>CGxR (аминокислотная последовательность приведена в однобуквенном коде, x – любой аминокислотный остаток), что хорошо согласуется со способностью этой маленькой субъединицы связывать ионы цинка *in vitro* [19]. Интересно, что, как и в случае гомологов субъединицы Rpb10 [16], в координации ионов цинка участвуют, по-видимому, и положительно заряженные аминокислотные остатки аргинина, находящиеся в непосредственном окружении двух из четырех остатков цистеина, формирующих Zn-палец.

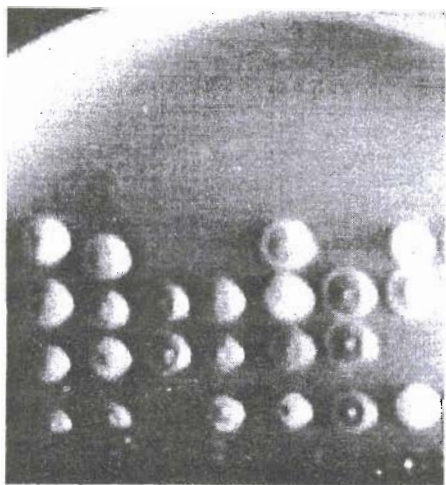


**Рис. 4.** Сравнение аминокислотных последовательностей гомологов субъединицы Rpc10 (ABC10 $\alpha$ ) из различных эукариотических организмов. Звездочками отмечены идентичные аминокислотные остатки соседних последовательностей, плюсами – консервативные замены. Последовательности из *S. cerevisiae*, *H. sapiens* и *M. musculus* были определены соответственно в работах [7, 9 и 17], а структуры гомологов из *Sz. pombe* и *Caenorhabditis elegans* установлены в настоящей работе. В нижнюю строку вынесены аминокислотные остатки, инвариантные во всех пяти последовательностях. Жирным шрифтом выделены обсуждаемые в статье четыре инвариантных остатка цистеина, формирующие цинксвязывающий домен классического типа. В прямоугольник заключена область, определяющая, вероятно, ядерную локализацию этих белков.

#### Функциональное тестирование кДНК гена *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* путем межвидовой комплементации

Чтобы доказать, что клонированная нами кДНК *Sz. pombe* действительно кодирует общую субъединицу ядерных РНК-полимераз I–III, мы сконструировали челночную плазмиду pGVS121, экспрессирующую эту кДНК (см. “Экспериментальную часть”), и провели ее функциональное тестирование путем межвидовой комплементации в *S. cerevisiae*. Для этого мы использовали два генетических подхода: тетрадный анализ и перетасовку плазмид.

Экспрессирующую плазмиду pGVS121 с кДНК *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* и геном *TRP1* в качестве селективного маркера вводили путем трансформации в



**Рис. 5.** Тестирование межвидовой комплементации нулевого аллеля *rpc10-Δ::HIS3* *S. cerevisiae* путем тетрадного анализа. Представлено разделение мейотических тетрад диплоидного штамма LS137, трансформированного плазмидой pGVS121, экспрессирующей кДНК *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe*.

диплоидный штамм дрожжей LS137 *S. cerevisiae*, гетерозиготный по гену *RPC10*. Один из аллелей этого гена был дикого типа, а другой представлял собой летальный нулевой аллель *rpc10-Δ::HIS3*. После трансформации дрожжевые клетки переносили на среду с повышенным содержанием калия, где они претерпевали несколько делений, а затем спорулировали в течение 3–5 сут при 30°C.

Когда число образующихся асков, или тетрад, содержащих четыре аскоспоры и представляющих собой промежуточную стадию превращения вегетативных дрожжевых клеток в споры, достигало более 10% клеточной популяции, клеточную стенку асков разрушали препаратом геликазы улитки и отдельные тетрады разделяли на четыре споры каждую с помощью микроманипулятора под микроскопом. В результате из 16 разделенных полных тетрад в 9 случаях проросли все четыре споры, а в семи оставшихся – три (рис. 5).

Генотип выросших из спор дрожжевых колоний проверяли, делая реплики на селективные среды, лишенные гистидина или триптофана. Как и следовало ожидать, по гистидиновому маркеру наблюдали типичное для менделевских признаков расщепление 2 : 2, причем все колонии, выросшие на среде без гистидина, т.е. несущие нулевой аллель гена *RPC10* в гаплоидном состоянии, росли также и на среде без триптофана, а значит, содержали введенную нами плазмиду с кДНК *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe*.

Таким образом, данные тетрадного анализа однозначно свидетельствуют, что кДНК гена *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* комплементирует нулевой аллель *rpc10-Δ::HIS3* *S. cerevisiae*, а значит, субъединица Rpc10 *Sz. pombe* заменяет субъединицу ABC10 $\alpha$  во всех трех РНК-полимеразных комплексах.

Межвидовая комплементация субъединиц Rpc10 *Sz. pombe* и ABC10 $\alpha$  *S. cerevisiae* была

подтверждена другим независимым методом – перетасовкой плазмид. Один из вариантов этого подхода, основанный на изменении цвета колоний при утрате гена аденинового обмена *ADE2*, описан нами в статье, посвященной клонированию кДНК гена *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* [16]. В настоящей работе мы использовали позитивную селекцию на среде с 5-фтороротовой кислотой (5-FOA) [20].

Жизнеспособность гаплоидного штамма YGVS-019 дрожжей *S. cerevisiae*, несущего хромосомный нуль-аллель *rpc10*-Δ::*HIS3*, поддерживали благодаря плазмиде pFL44-RPC10 с геном *URA3* в качестве селективного маркера. Тестируемую кДНК *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* в составе экспрессирующей плазмиды pGVS121 с другим селективным маркером, геном *TRP1*, вводили путем трансформации в штамм YGVS-019, проводя селекцию на среде без гистидина, урацила и триптофана.

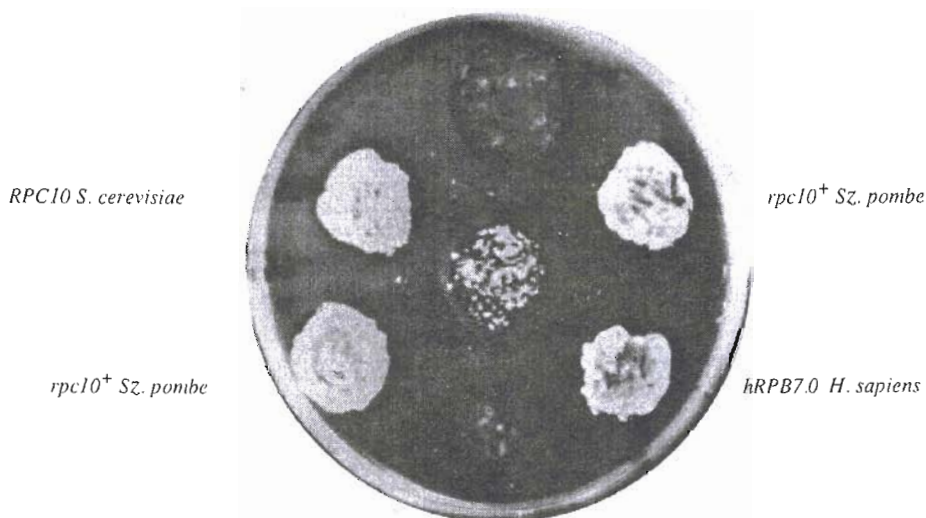
Затем индивидуальные колонии, выросшие на этой среде, т.е. содержащие обе плазмиды, пересевали густым штрихом на среду с 5-FOA. На такой среде штаммы с геном *URA3*, кодирующим один из ферментов биосинтеза урацила, оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу, нежизнеспособны из-за накопления ядовитого продукта (вероятно, 5-фторурацила), образующегося в результате декарбоксилирования 5-FOA. Поэтому на среде с 5-FOA вырастали лишь клетки дрожжей, утратившие плазмиду pFL44-RPC10 с нативным геном *RPC10 S. cerevisiae*. Это было возможно только в том случае, если кДНК *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe*

из плазмиды pGVS121 комплементировала нулевой аллель на хромосоме (рис. 6).

*Особенности межвидовой комплементации субъединицы ABC10α (RPC10) S. cerevisiae на среде, лишенной инозита*

Ранее мы продемонстрировали, что четыре из пяти общих субъединиц человека способны функционировать в клетках *S. cerevisiae*, эффективно замещая соответствующие гомологи пекарских дрожжей [9]. Изучая межвидовую комплементацию общих субъединиц ядерных РНК-полимераз I–III, следует иметь в виду, что вносимый гетерологичный генный продукт становится компонентом сразу трех разных ферментных комплексов со сложным гетеромультимерным строением. Естественно предположить, что даже в случаях эффективной комплементации встраивание чужеродной субъединицы в такую многокомпонентную систему может приводить к некоторым нарушениям, выявляющимся при неоптимальных условиях.

Действительно, комплементация субъединицы RPB8 *S. cerevisiae* ее человеческим гомологом hRPB17 наблюдается при 30°C, но не при 37°C, т.е. термочувствительна [9]. Анализируя другие случаи успешной межвидовой комплементации, мы обнаружили дефекты при замене субъединицы RPB10 *S. cerevisiae* гомологичной ей субъединицей hRPB7.6 из *H. sapiens* на селективной среде без инозита [9, 16]. Поскольку неспособность расти на среде без инозита показана также для цело-



**Рис. 6.** Тестирование межвидовой комплементации нуль-аллеля *rpc10*-Δ::*HIS3 S. cerevisiae* методом перетасовки плазмид. Рост оценивали после 3-суточной инкубации при 30°C на селективной среде с урацилом и 5-FOA. Тестировали дикий тип гена *RPC10 S. cerevisiae*, ген *rpc10*<sup>+</sup> *Sz. pombe* (pGVS121) и их человеческий гомолог – ген *hRPB7.0* (pGEN-Hs10α). В центре чашки – положительный контроль с геном *RPC10 S. cerevisiae* (ночная культура в разведении 1 : 100). Вверху и внизу высевали в качестве отрицательного контроля штаммы *S. cerevisiae*, содержащие нативный ген *URA3*.

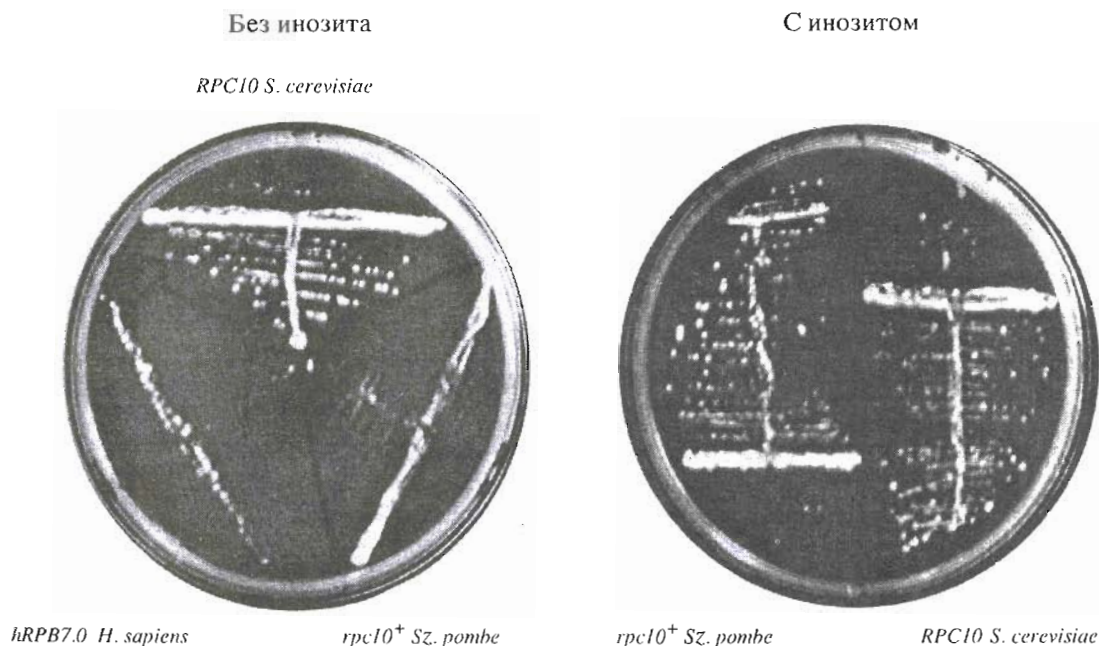


Рис. 7. Зависимость межвидовой комплементации нуль-аллеля *rpc10-Δ::HIS3* *S. cerevisiae* от присутствия в среде инозита. Тестировали гены *rpc10+* *Sz. pombe* (штамм YGVS-040) и *hRPB7.0* *H. sapiens* (YGVS-039), положительным контролем служил дикий тип гена *RPC10* *S. cerevisiae* (YGVS-019); в остальном эти три штамма являются изогенными. Показан рост после 3 сут инкубации при 37°C на среде с инозитом и без него.

го ряда штаммов *S. cerevisiae*, которые несут мутации в генах, кодирующих субъединицы РНК-полимеразы II (*RPB1*, *RPB2*, *RPB4* и *RPB6*) [21–23], предполагается, что основные дефекты в этом случае обусловлены неправильным функционированием именно этой РНК-полимеразы и связаны с пониженным уровнем транскрипции гена *INO1*, кодирующего инозит-1-фосфатсинтетазу.

Оказалось, что комплементация субъединицы ABC10α (*RPC10*) *S. cerevisiae* также чувствительна к отсутствию в среде инозита, причем этот эффект наблюдается не только в случае гомолога из *H. sapiens* [9], но и для субъединицы Rpc10 делящихся дрожжей *Sz. pombe*, описанной в настоящей статье. Нарушения комплементации в обоих случаях обнаруживаются даже при оптимальной для роста дрожжей температуре (30°C), однако наиболее заметны при 37°C. В этих условиях (селективная среда без инозита, 37°C) наблюдается почти полное отсутствие роста штаммов *S. cerevisiae*, несущих мозаичные РНК-полимеразы I–III, в которых субъединица ABC10α *S. cerevisiae* заменена на гомологичные ей белки *hRPB7.0* из *H. sapiens* и *Rpc10* из *Sz. pombe* (рис. 7).

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы дрожжей и челночные плазмиды.** Дрожжевые штаммы (LS137, YGVS-020 и YGVS-039) и основные генетические методы описаны нами в работе [9], а плаزمида pFL44-

*RPC10* – в публикации [16]. Использованные в работе селективные среды для выращивания дрожжей содержали гистидин (20 мг/л), урацил (20 мг/л) и триптофан (20 мг/л). Для конструирования экспрессирующей плазмиды pGVS121 получили фрагмент ДНК с помощью ПЦР на матрице плазмиды pENL21 с праймерами oGVS50 и oGVS51 (см. выше), обработали его рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI и клонировали в вектор pGEN [9], расщепленный теми же рестриктазами. Гаплоидный штамм YGVS-019 (*MATα his3-Δ200 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-1 rpc10-Δ::HIS3* [pFL44-*RPC10*: 2μm *URA3 RPC10*]) представляет собой один из сегрегантов, полученных при разделении тетрады диплоида LS137, трансформированного плазмидой pFL44-*RPC10*. Гаплоид YGVS-040 (*MATα his3-Δ200 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 ade2-1 rpc10-Δ::HIS3* [pGVS121: 2μm *TRP1 rpc10+*]) получен из штамма YGVS-020, трансформированного плазмидой pGVS121, с помощью перетасовки плазмид на среде с 5-FOA.

**Полимеразную цепную реакцию** со специфическими праймерами oGVS50 и oGVS51 на матрице кДНК или геномной ДНК *Sz. pombe* проводили в течение 30 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг – 1 мин при 40°C и элонгация – 2 мин при 50°C. Использовали *Taq*-полимеразу, буфер для ПЦР и амплификатор DNA Thermal Cycler фирмы Perkin-Elmer. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1.5% агарозном геле.

**Просеивание кДНК-клонотеки *Sz. pombe*** проводили методом последовательных разведений, описанным нами ранее [16].

**Секвенирование ДНК и сравнение аминокислотных последовательностей белков.** Двухцепочечную ДНК секвенировали после щелочного лизиса методом дидезоксинуклеотидных терминаторов [24] с использованием набора для секвенирования с модифицированной ДНК-полимеразой фага T7, Sequenase 2.0 (USB, США). Для секвенирования рENL21 использовали оGVS50, оGVS51, праймер оGVS301, (5')CAGACTATGAAAAGAGAAAACGG, соответствующий участку, расположенному за стоп-кодоном *rpc10<sup>+</sup>*, а также олигонуклеотиды оGVS156, (5')TCCTCGT-CATTGTTCTCGTTCCSTTTC и оGVS157, (5')CATCTTTTCGTAATTCTGGCAAGGT, отвечающие участкам вектора клонотеки рDB20, окаймляющим вставку кДНК *Sz. pombe*. В качестве метки использовали [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (ИБХ РАН) и [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP (ПИЯФ РАН). Поиск белковых гомологов в банках данных и сравнение их первичных структур проводили с помощью программы TBLASTN [13].

**Тетрадный анализ.** Диплоидный штамм дрожжей LS137 *S. cerevisiae*, гетерозиготный по гену *RPC10*, трансформировали по методу [25] экспрессирующей плазмидой рGVS121 с кДНК *rpc10<sup>+</sup>* *Sz. pombe* и геном *TRP1* в качестве селективного маркера. После трансформации дрожжевые клетки переносили на среду для споруляции, содержащую 1% ацетат калия, 0.1% дрожжевой экстракт, 0.05% глюкозу и 2% бактоагар, и инкубировали 3–5 сут при 30°C [26].

Клеточную стенку асков разрушали разведенным в 200 раз соком улитки *Helix pomatia* (L'Industrie Biologique Française (IBF), Женвилье, Франция) и отдельные тетрады разделяли на четыре споры каждую с помощью микроманипулятора под микроскопом. Споры из каждой разделенной тетрады инкубировали в течение 3–5 сут при 30°C на YPD-среде, содержащей 1% дрожжевой экстракт, 2% бактопептон, 2% глюкозу и 2–4% бактоагар.

**Перетасовка плазмид.** Гаплоидный штамм YGVS-019 дрожжей *S. cerevisiae* с хромосомным нуль-аллелем *rpc10-Δ::HIS3*, поддерживаемый в жизнеспособном состоянии благодаря плазмиде рFL44-RPC10 с геном *URA3* в качестве селективного маркера, трансформировали по методу [25] плазмидой рGVS121, экспрессирующей кДНК *rpc10<sup>+</sup>* *Sz. pombe* и несущей ген *TRP1*. Трансформанты отбирали на среде без гистидина, урацила и триптофана. Затем индивидуальные колонии, выросшие на этой среде, т.е. содержащие обе плазмиды, пересевали густым штрихом на среду YPD (или минимальную среду с урацилом), содержащую 1 г/л 5-FOA (PCR Incorporated; Гейнсвил,

Флорида, США) [20], где вырастали лишь клетки дрожжей, избавившиеся от маркерного гена *URA3*, т.е. утратившие плазмиду рFL44-RPC10 с нативным геном *RPC10* *S. cerevisiae*.

Последовательность кДНК *rpc10<sup>+</sup>* *Sz. pombe*, установленная в этой работе, депонирована в GenBank под номером U80217.

Настоящая работа была поддержана грантами MWE000 и MWE300 Международного научного фонда (МНФ), грантом № 96-04-49867 Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) и грантом ГКНТ "Новейшие направления биоинженерии" (Генная и клеточная инженерия).

Авторы благодарны П. Тьюрю (Сакле, Франция) за 5-FOA и предоставленную возможность работы на микроманипуляторе де Фонбрюна; Г.А. Багияну (ПИЯФ РАН) за [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP, А.Л. Каюшину за синтез олигонуклеотидов, Ю.А. Берлину за поддержку этих исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valenzuela P., Bell G.I., Weinberg F., Rutter W.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. P. 1319–1325.
2. Buhler J.M., Iborra F., Sentenac A., Fromageot P. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 1712–1717.
3. Sentenac A. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1985. V. 18. P. 31–90.
4. Carles C., Treich I., Bouet F., Riva M., Sentenac A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 24092–24096.
5. Woychik N.A., Liao S.-M., Kolodziej P., Young R.A. // Genes Dev. 1990. V. 4. P. 313–323.
6. Woychik N.A., Young R.A. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 17816–17819.
7. Treich I., Carles C., Riva M., Sentenac A. // Gene Expr. 1992. V. 2. P. 31–37.
8. Lalo D., Carles C., Sentenac A., Thuriaux P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 5524–5528.
9. Shpakovski G.V., Acker J., Wintzerith M., Lacroix J.-F., Thuriaux P., Vigneron M. // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 4702–4710.
10. Shpakovski G.V. // Gene. 1994. V. 147. P. 63–69.
11. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 938–940.
12. Langer D., Hain J., Thuriaux P., Zillig W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 5768–5772.
13. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
14. Prabhala G., Rosenberg G.H., Käufer N.F. // Yeast. 1992. V. 8. P. 171–182.
15. Becker D.M., Fikes J.D., Guarente L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1968–1972.
16. Шпаковский Г.В., Лебедеко Е.Н., Тьюрю П. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 110–117.
17. Wilkinson C.R.M., Bartlett R., Nurse P., Bird A. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 203–210.
18. Xu C. // DNA Cell Biol. 1993. V. 12. P. 517–525.

19. Treich I., Riva M., Sentenac A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 21971–21976.
20. Boeke J.D., Lacroute F., Fink G.R. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 197. P. 345–346.
21. Nonet M.L., Young R.A. // Genetics. 1989. V. 123. P. 715–724.
22. Woychik N.A., Young R.A. // Mol. Cell. Biol. 1989. V. 9. P. 2854–2859.
23. Archambault J., Schappert K.T., Friesen J.D. // Mol. Cell. Biol. 1990. V. 10. P. 6123–6131.
24. 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.
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. Sherman F. // Methods Enzymol. 1991. V. 194. P. 3–20.

## Molecular Cloning and Characterization of cDNA of the *rpc10<sup>+</sup>* Gene Encoding the Smallest Subunit of Nuclear RNA Polymerases of *Schizosaccharomyces pombe*

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

Received December 6, 1996

**Abstract**—The full-length cDNA of the *rpc10<sup>+</sup>* gene encoding mini-subunit Rpc10, which is common for all three nuclear RNA polymerases of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, was cloned and sequenced. The Rpc10 subunit of *Sz. pombe* and its homologs from *S. cerevisiae* and *H. sapiens* are positively charged proteins with a highly conserved C-terminal region and an invariant zinc-binding domain (Zn-finger) of a typical amino acid composition: YxC<sub>x</sub>C<sub>x</sub><sub>12</sub>RC<sub>x</sub><sub>2</sub>CGxR. Functional tests on heterospecific complementation, using tetrad analysis or plasmid shuffling, showed that the Rpc10 subunit of *Sz. pombe* can successfully replace the homologous ABC10 $\alpha$  subunit in nuclear RNA polymerases I–III of *S. cerevisiae*.

**Key words:** nuclear RNA polymerases I–III, common subunits; fission yeast, *rpc10<sup>+</sup>* gene; heterospecific complementation; zinc-binding domains.

Сдано в набор 03.02.97 г.

Подписано к печати 11.04.97 г.

Формат бумаги 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>

Офсетная печать

Усл. печ. л. 16.5

Усл. кр.-отт. 6.1 тыс.

Уч.-изд. л. 16.2

Бум. л. 8.0

Тираж 359 экз.

Зак. 1581