

ЯДЕРНЫЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I, II И III: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

© 2005 г. С. А. ПРОШКИН, Г. В. ШПАКОВСКИЙ

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. **II.** Субъединичный состав ядерных РНК-полимераз I—III. **III.** Общий план строения РНК-полимераз I—III. **IV.** Субъединицы ядерных РНК-полимераз I—III, родственные субъединицам ко́ра ($\beta'\beta\alpha_2$) эубактерий. **V.** Общие субъединицы ядерных РНК-полимераз I—III. **VI.** Специфические субъединицы РНК-полимераз I—III. **VII.** Структурно-функциональная консервативность РНК-полимераз I—III. **VIII.** Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Транскрипция, осуществляемая ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, — ключевой этап экспрессии генов и клеточной регуляции. ДНК-зависимая РНК-полимераза — фермент, осуществляющий синтез РНК на матрице ДНК. На основе субъединичного состава все РНК-полимеразы можно разделить на два больших семейства. К первому относятся односубъединичные ферменты, представленные РНК-полимеразами ряда бактериофагов (например, T3, T7 или SP6), а также РНК-полимеразами митохондрий и хлоропластов, кодируемыми ядерной ДНК у некоторых эукариот [1]. Второе семейство составляют многосубъединичные ферменты. Оно включает в себя РНК-полимеразы хлоропластов, кодируемые ДНК этих органелл, РНК-полимеразы эубактерий, архей и эукариот, а также РНК-полимеразы некоторых эукариотических вирусов (ASFV, CIV, вирус осповакцины) [2—4]. У эукариот найдены три ядерные РНК-полимеразы, считывающие разные наборы генов [5]. РНК-полимераза I (или A) осуществляет транскрипцию генов высокомолекулярных рРНК, РНК-полимераза II (B) синтезирует все мРНК и многие малые ядерные РНК, РНК-полимераза III (C) ответственна за синтез всех тРНК, 5S рРНК и ряда других низкомолекулярных РНК (7SL, U6, 7SK, РНК-компонент рибонуклеаз Р и MRP млекопитающих).

Адрес для корреспонденции: gvs@ibch.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 04-04-48987) и Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

За последнее десятилетие накоплен большой объем информации о составе и функциях РНК-полимераз. Недавнее установление детальных пространственных структур РНК-полимеразы эубактерий [6–9], эукариотической РНК-полимеразы II [10–13], тройного элонгационного комплекса РНК-полимеразы II [14, 15], а также комплексов РНК-полимеразы II с некоторыми транскрипционными факторами [16, 17] позволяет представить детальный механизм работы много-субъединичных РНК-полимераз. Настоящий обзор посвящен организации ядерных РНК-полимераз I–III, структурным и функциональным особенностям как самих ферментных комплексов, так и каждого из составляющих их компонентов.

II. СУБЪЕДИНИЧНЫЙ СОСТАВ ЯДЕРНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I–III

Ядерные РНК-полимеразы I–III — сложные гетеромультимерные комплексы, общей массой 0,5–0,7 МДа. В настоящее время наиболее изученными, как с биохимической, так и генетической точек зрения, являются РНК-полимеразы I–III почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Обнаружено, что РНК-полимераза I *S. cerevisiae* состоит из 14, РНК-полимераза II — из 12, а РНК-полимераза III — из 17 субъединиц [5, 18]. Среди компонентов всех этих ядерных ферментов можно выделить две самые большие субъединицы, гомологичные субъединицам β' и β бактериальной РНК-полимеразы [19, 20]; два компонента, родственные бактериальной субъединице α [21, 22]; а также белок, аналогичный субъединице ω [23]. Помимо этих субъединиц, эквивалентных субъединицам кора $\beta'\beta\alpha\omega$ бактериальной РНК-полимеразы, в составе РНК-полимераз I–III имеется целый набор белков, не имеющих аналогов у эубактерий. Так, интересной особенностью ядерных РНК-полимераз I–III является наличие пяти незаменимых общих субъединиц, входящих в состав всех трех ферментов [24–28]. Кроме того, каждая из этих РНК-полимераз содержит специфические субъединицы (см. табл.). Большинство субъединиц РНК-полимеразы II имеет родственные субъединицы в РНК-полимеразе архей [29, 30].

К сожалению, до сих пор не выработано общепринятой классификации субъединиц эукариотических РНК-полимераз и их генов. Хотя каждая субъединица РНК-полимераз и кодирующий ее ген имеют свое исторически сложившееся и устоявшееся название, гомологичные компоненты РНК-полимераз из разных организмов часто называют по-разному, что создает ненужную путаницу. Поскольку гены практически всех субъединиц эукариотических РНК-полимераз были впер-

Таблица.
Субъединичный состав ДНК-зависимых РНК-полимераз эубактерий, архей и эукариот*

		РНК-полимераза						
эубактерий		архей	I	II		III		
β'	$\longleftrightarrow$	A	$\longleftrightarrow$	Rpa1	$\longleftrightarrow$	Rpb1	$\longleftrightarrow$	Rpc1
β	$\longleftrightarrow$	B	$\longleftrightarrow$	Rpa2	$\longleftrightarrow$	Rpb2	$\longleftrightarrow$	Rpc2
α_1	$\longleftrightarrow$	D	$\longleftrightarrow$	Rpc40	$\longleftrightarrow$	Rpb3	$\longleftrightarrow$	Rpc40
		F	$\longleftrightarrow$	Rpa14	$\longleftrightarrow$	Rpb4	$\longleftrightarrow$	Rpc17
		H	$\longleftrightarrow$	Rpb5	$\longleftrightarrow$	Rpb5	$\longleftrightarrow$	Rpb5
ω	$\longleftrightarrow$	K	$\longleftrightarrow$	Rpb6	$\longleftrightarrow$	Rpb6	$\longleftrightarrow$	Rpb6
		E	$\longleftrightarrow$	Rpa43	$\longleftrightarrow$	Rpb7	$\longleftrightarrow$	Rpc25
			$\longleftrightarrow$	Rpb8	$\longleftrightarrow$	Rpb8	$\longleftrightarrow$	Rpb8
		X	$\longleftrightarrow$	Rpa12	$\longleftrightarrow$	Rpb9	$\longleftrightarrow$	Rpc11
		N	$\longleftrightarrow$	Rpb10	$\longleftrightarrow$	Rpb10	$\longleftrightarrow$	Rpb10
α_{II}	$\longleftrightarrow$	L	$\longleftrightarrow$	Rpc19	$\longleftrightarrow$	Rpb11	$\longleftrightarrow$	Rpc19
		M (P)	$\longleftrightarrow$	Rpb12	$\longleftrightarrow$	Rpb12	$\longleftrightarrow$	Rpb12
				Rpa49				Rpc82
				Rpa34				Rpc53
								Rpc37
								Rpc34
								Rpc31

* Жирным шрифтом выделены общие субъединицы ядерных РНК-полимераз I–III. Стрелками показаны родственные субъединицы многокомпонентных РНК-полимераз.

вые идентифицированы в геноме *S. cerevisiae*, представляется логичным следовать именно этой номенклатурной системе, несмотря на ее некоторую неоднородность. Итак, у дрожжей *S. cerevisiae* гены, кодирующие полипептиды РНК-полимеразы II, обозначаются «**RPB**» (RNA polymerase **B**) и номером, присвоенным каждой субъединице РНК-полимеразы II по убыванию ее молекулярной массы: **RPB1–RPB12**. Гены малых специфических субъединиц РНК-полимераз I и III обозначаются, соответственно, с помощью трехбуквенных сочетаний «**RPA**» (RNA polymerase **A**) и «**RPC**» (RNA polymerase **C**), а также последующего числа, соответствующего молекулярной массе данной субъединицы в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (**RPA49, RPA43, RPA34, RPA14, RPA12** и **RPC82, RPC53, RPC37, RPC34, RPC31, RPC25, RPC17, RPC11**). Название генов **RPC40** и **RPC19**, кодирующих общие субъединицы РНК-полимераз I и III, происходят от «**RNA polymerase common subunit**» и числа, соответствующего молекулярной массе этих субъединиц, вычисленной по подвижности в денатурирующем полиакриламидном геле. И, наконец, практически уже общепринятая поправка должна быть сделана для генов

больших субъединиц РНК-полимераз I и III: их удобно называть **RPA1**, **RPA2** и **RPC1**, **RPC2**. Дело в том, что гомологи этих субъединиц у всех организмов являются всегда, без исключения, соответственно первым и вторым по величине белком в очищенных препаратах РНК-полимераз I и III, хотя молекулярные массы этих белков у разных организмов могут существенно различаться [31, 32].

III. ОБЩИЙ ПЛАН СТРОЕНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I–III

Особое значение для понимания функционирования РНК-полимераз I–III на молекулярном уровне имело выяснение детальной пространственной структуры 10-субъединичного комплекса РНК-полимеразы II дрожжей на основе ее двух кристаллических форм (с разрешением 2,8 Å и 3,1 Å), а также транскрибирующей РНК-полимеразы II (3,3 Å) [10, 11, 14, 15]. В этих комплексах отсутствовали две несущественные для элонгации субъединицы Rpb4 и Rpb7. Получение именно таких неполных комплексов было вызвано неоднородностью (из-за субмолярного количества гетеродимера Rpb4-Rpb7) препаратов РНК-полимеразы II, выделяемых из клеток дрожжей на экспоненциальной фазе роста, что препятствовало образованию кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Однако вскоре эту проблему удалось решить и предложить модель полипептидного остова (для C α -атомов) полного, 12-субъединичного комплекса РНК-полимеразы II [12, 13] (рис. 1).

По форме 10-субъединичный комплекс напоминает клешню краба или полукруглый рот лягушки. Между клешнями (челюстями) расположен канал L-образной формы шириной порядка 27 Å. «Нижняя клешня» преимущественно составлена полипептидной цепью самой большой субъединицы РНК-полимеразы II (Rpb1), «верхняя клешня» — второй по размеру субъединицей (Rpb2), хотя некоторые модули этих субъединиц внедряются друг в друга. Каждая из малых субъединиц представлена одной копией и расположена на периферии фермента. Тесное взаимодействие субъединиц Rpb1 и Rpb2 подкреплено на одном конце субкомплексом Rpb3-Rpb11-Rpb10-Rpb12. Активный центр фермента, содержащий ион магния, находится в конце канала и образуется двумя большими субъединицами (Rpb1 и Rpb2). Наличие канала, в котором может располагаться двухцепочечная ДНК, было обнаружено еще при изучении структуры РНК-полимеразы, полученной с низким разрешением [33, 34]. Оказалось, что в канале имеется α -спиральный мостик, связывающий обе «клешни». Он образован центральной частью консервативного домена F самой большой субъединицы. К F-мостику прилегает домен, содержащий G-район субъеди-

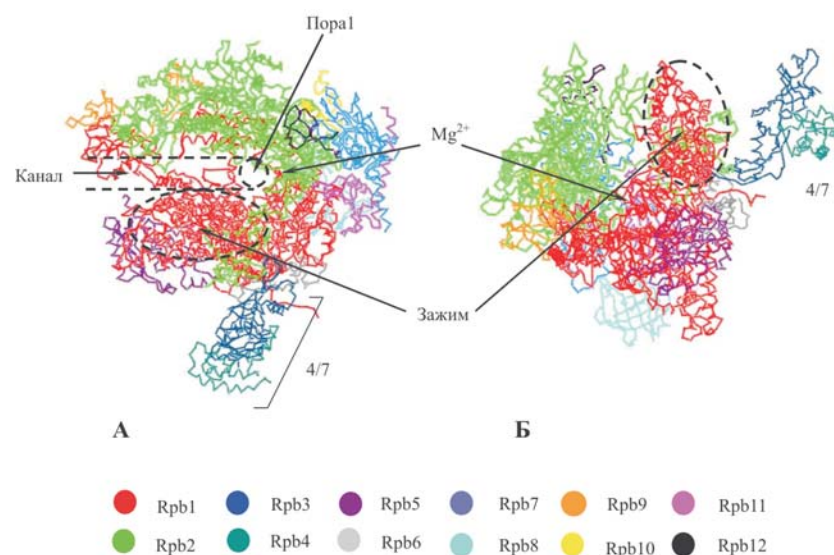


Рис. 1. Пространственная структура РНК-полимеразы II *S. cerevisiae*.

(А) Вид сверху. (Б) Вид спереди.

Схематично показаны положения иона Mg²⁺, основного канала, поры 1, домена «зажим» и гетеродимера Rpb4-Rpb7 (4/7), несущественного для элонгации и отсутствующего в структуре 10-субъединичной РНК-полимеразы II [11].

В нижней части рисунка дано условное цветовое обозначение субъединиц. Рисунок подготовлен с помощью программы DS ViewerPro 5.0 (www.accelrys.com), используя координаты РНК-полимеразы II (номер депонирования 1NT9) из Банка белковых структур (Protein Data Bank) (см. также [12, 13]).

ницы Rpb1. Вместе они образуют перегородку, разделяющую дно канала на две поры. Так называемая пора 1 или вторичный канал (~12 Å) расположена как раз под активным центром фермента и может служить для поступления в него нуклеозидтрифосфатов. Важнейшей чертой РНК-полимеразы, имеющей принципиальное значение для ее функции, является подвижность частей фермента (доменов, блоков и модулей) относительно друг друга. Выявлено по крайней мере пять таких взаимно подвижных модулей [11]. Мультифункциональный подвижный домен, формирующий одну сторону канала и названный «зажимом» (clamp), удерживает ДНК и гибридный участок РНК-ДНК.

Пространственная структура РНК-полимеразы I установлена с помощью электронной микроскопии с разрешением 30 Å [35]. Ее сопоставление со структурой 10-субъединичной РНК-полимеразы II

позволило выявить дополнительные электронные плотности, которые, очевидно, соответствуют полипептидным цепям специфических субъединиц РНК-полимеразы I. Примерное расположение этих субъединиц в комплексе удалось установить с помощью их иммунометечения моноклональными антителами. Оказалось, что «выступ» (stalk), локализованный рядом с «зажимом» (clamp), содержит специфические для РНК-полимеразы I субъединицы Rpa43 и Rpa14. Другие специфические субъединицы, Rpa49 и Rpa34, расположены соответственно на «зажиме» и в конце канала.

Структуры ни РНК-полимеразы III, ни отдельных ее специфических компонентов не установлены. Пока можно лишь схематично представить карту взаимодействий ее субъединиц, основываясь на биохимических и генетических данных (рис. 2, [36]). Однако, принимая во внимание, что все 12 субъединиц РНК-полимеразы II имеют гомологов среди субъединиц РНК-полимеразы III (а 5 субъединиц просто идентичны), можно предположить существенное сходство в их пространственном строении.

IV. СУБЪЕДИНИЦЫ ЯДЕРНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I–III, РОДСТВЕННЫЕ СУБЪЕДИНИЦАМ КОРА ($\beta'\beta\alpha_2$) ЭУБАКТЕРИЙ

β' - и β -ПОДОБНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ

Две самые большие субъединицы ядерных РНК-полимераз I–III (соответственно **Rpa1** и **Rpa2**; **Rpb1** и **Rpb2**; **Rpc1** и **Rpc2**) являются гомологами субъединиц β' и β РНК-полимеразы бактерий. В последовательностях всех β' -подобных субъединиц можно выделить 8 консервативных доменов (А–Н), а в первичных структурах β -подобных субъединиц – 9 консервативных доменов (А–I) [19, 20]. Вместе две большие субъединицы образуют активный центр фермента, участвуют в связывании матрицы ДНК и растущей цепи РНК (см. ниже).

Примечательной особенностью самой большой субъединицы РНК-полимеразы II Rpb1 является наличие необычного С-концевого домена (CTD, carboxy-terminal domain), состоящего из многократно повторяющегося гептапептида с консенсусной последовательностью Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 [37, 38]. Отметим, что CTD отсутствует в β' -субъединице *E. coli*, равно как и в других субъединицах ядерных РНК-полимераз эукариот. Число повторов в CTD различно у исследованных организмов (от 26–27 в CTD дрожжей до 52-х в CTD человека). CTD играет очень важную роль в транскрипции. Известно, что мутации, приводящие к полной или частичной делеции этого домена, являются летальными для дрожжей [39] и дрозофилы [40].

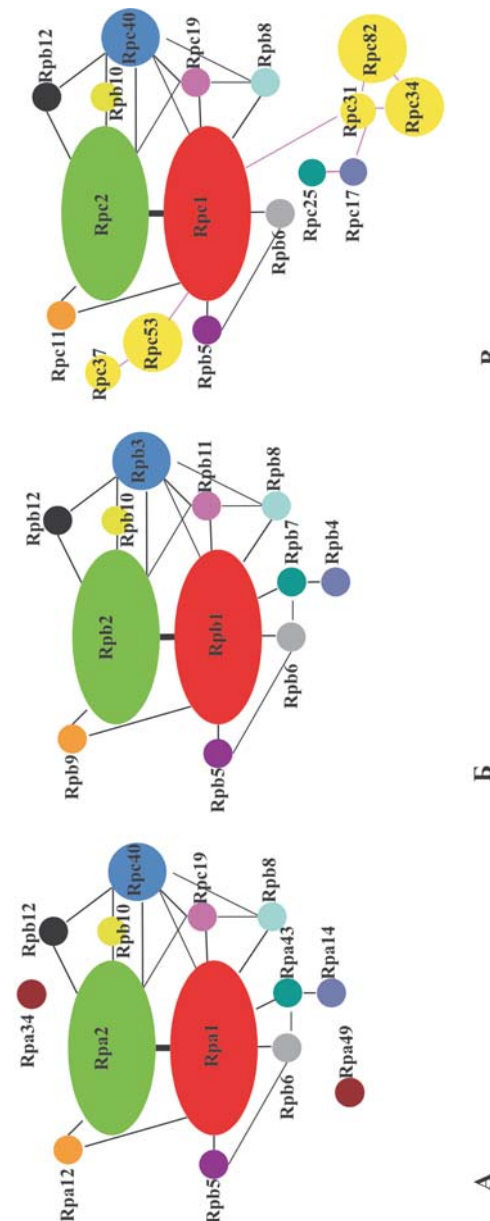


Рис. 2. Схемы взаимодействий субъединиц РНК-полимераз I (А), II (Б) и III (В), построенные на основе структурных [11–13, 35], биохимических и генетических данных [36].

Условное цветовое обозначение субъединиц РНК-полимеразы II, а также родственных им субъединиц РНК-полимераз I и III – как на рис. 1. Специфические субъединицы РНК-полимеразы III, не имеющие гомологов в РНК-полимеразах I и II, показаны желтым цветом; специфические для РНК-полимеразы I Rpa49 и Rpa34 – коричневым.

Установлено, что CTD необходим для реализации ответа на сигналы активации [41]. CTD соединен с РНК-полимеразой II посредством подвижного линкера (~90 а.о.) и располагается поблизости от места выхода из фермента 5'-конца РНК (см. ниже) [11]. В установленных структурах РНК-полимеразы II CTD не виден, по-видимому, из-за его подвижности и/или неструктурированности. При переходе от инициации к элонгации CTD активно фосфорилируется и именно с этой формой домена взаимодействуют белки, участвующие в процессинге мРНК [42, 43]. В начальной фазе транскрипции осуществляется фосфорилирование CTD по остаткам Ser5. Этой модификации достаточно для связывания с CTD фермента, осуществляющего эпирование 5'-конца мРНК. Элонгация сопровождается дальнейшим фосфорилированием по остаткам Ser2, которое необходимо для эффективного процессинга 3'-конца РНК. Таким образом, разные типы посттрансляционных модификаций могут соотносить отдельные события в процессинге мРНК с разными фазами транскрипционного цикла [44]. С помощью спектроскопических методов продемонстрировано преимущественно неструктурированное состояние свободного нефосфорилированного CTD-пептида и возможность образования β -изгибов двух типов [45]. Сравнение между собой структур CTD-пептида, фосфорилированного по разным положениям, в комплексах с разными белками (WW-доменом пролизомеразы Pin1, РНК-гуанилилтрансферазы Cgt1 и CID-доменом Pcf11), позволяет сделать вывод о разнообразии конформаций CTD [46–48]. Компактная левозакрученная спираль, включающая β -изгибы, может представлять одну из возможных конформаций CTD, которая, вероятно, легко изменяется во время транскрипционного цикла [48]. Структурная пластичность CTD в совокупности с его модификациями, осуществляемыми киназами и фосфатазами, обеспечивает гибкий механизм, с помощью которого CTD может рекрутировать структурно неродственные белки на отдельных этапах транскрипции.

Взаимодействие РНК-полимераз с ДНК и РНК

Анализ пространственных структур бактериальной РНК-полимеразы и РНК-полимеразы II эукариот и интерпретация данных по контактам белков с матрицей ДНК и растущей цепью РНК, полученных методом химических сшивок, позволили построить модель комплекса РНК-полимеразы с нуклеиновыми кислотами в процессе удлинения РНК [49–51]. Эта модель подтверждается недавно установленными структурами транскрибирующей РНК-полимеразы II [14, 15] (рис. 3А).

Структурно и функционально охарактеризованы три элемента элонгационного комплекса: участки связывания «переднего» дуп-

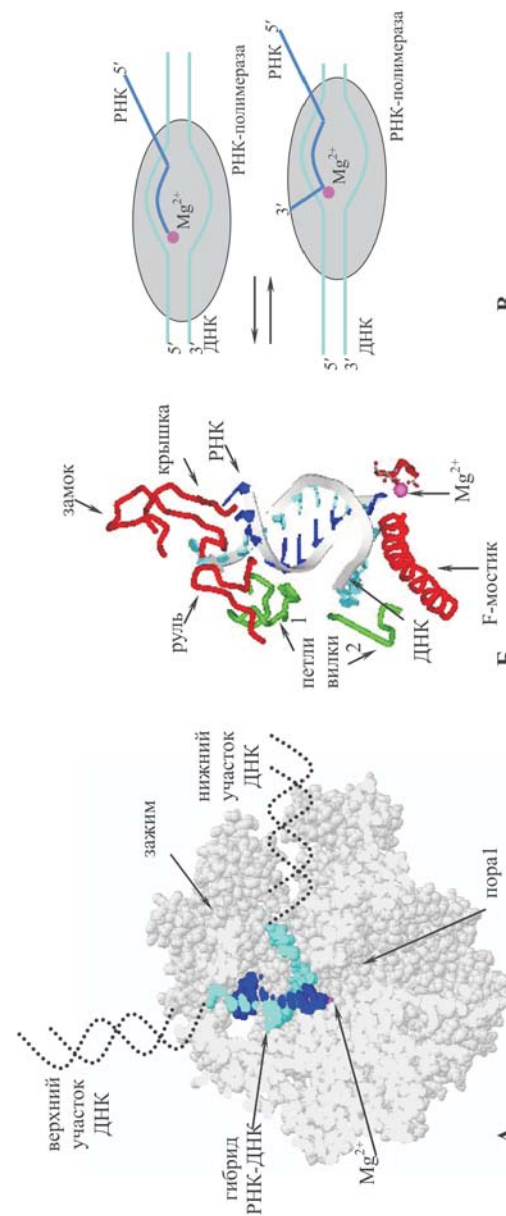


Рис. 3. (А) Структура элонгационного комплекса РНК-полимеразы II. Представлено сечение атомной модели РНК-полимеразы II вдоль главного канала (для визуализации нуклеиновых кислот). Пунктиром условно показано положение дуплексов ДНК (ниже и выше транскрипционного пузыря). Цепь РНК в составе гибрида изображена синим, матричная цепь ДНК – голубым. (Б) Некоторые детали взаимодействия гибрида РНК-ДНК и РНК-полимеразы II. Выделен ход главных цепей ряда мотивов Rpb1 (красным цветом) и Rpb2 (зеленым), которые могут играть ключевую роль в поддержании транскрипционного пузыря (объяснения в тексте). Показан также мотив NADFDGD, связывающий ион магния (Mg²⁺) (фиолетового цвета). Рисунки (А) и (Б) подготовлены с помощью программы DS ViewerPro 5.0 (www.accelrys.com), используя координаты транскрибирующей РНК-полимеразы II (номер депонирования 1SFO) из Банка белковых структур (Protein Data Bank) (см. также [15]). (В) Схематичное расположение нуклеиновых кислот в элонгационном комплексе РНК-полимеразы при синтезе РНК (вверху) и возвратном движении фермента (внизу).

лекса ДНК, гибрида РНК-ДНК и растущей цепи РНК [52]. Дуплекс ДНК расположен в положительно заряженном канале между двумя большими субъединицами. В РНК-полимеразе II примерно 20 п.о. ДНК легко умещаются между краем канала и активным центром, что соответствует данным по защите ДНК от нуклеазного расщепления [53]. Такая локализация согласуется и с результатами работ по фотоаффинному мечению: Rpb1, Rpb2 и Rpb5 образуют ковалентные сшивки с «нижним дуплексом» ДНК [51, 54, 55]. С одной стороны канал перекрыт доменом «стенка» (wall) субъединицы Rpb2 (аналогичный домен субъединицы β в бактериальной РНК-полимеразе носит название «заслонка» (flap)). ДНК делает изгиб примерно под прямым углом в активном центре фермента, где ее цепи расплетаются и формируется гибридный участок РНК-ДНК длиной 8–9 п.о. с 3'-концом РНК в непосредственной близости от каталитического иона магния. Гибрид РНК-ДНК имеет нестандартную конформацию, промежуточную между каноническими А и В формами двуспиральной ДНК (несколько более раскручен по сравнению со структурой свободного РНК-ДНК гибрида, который ближе к А форме) [14]. В «верхнем» участке «транскрипционного пузыря» цепи ДНК и РНК разделяются и формируется «верхний» дуплекс ДНК. После отделения от ДНК РНК проходит через «седловину» (saddle) между основанием «зажима» (clamp) и «стенкой» (wall) [15]. Далее для РНК можно предположить два гипотетических пути по положительно заряженным бороздкам [10]. В первом случае ее траектория лежит вокруг основания «зажима» к субъединице Rpb7, а во втором — по задней стороне РНК-полимеразы по направлению к субъединице Rpb8 [15]. Пока неясно, какой из этих путей используется в действительности. Биохимические исследования показали, что РНК взаимодействует с ферментом на 10–20 нуклеотидов «выше» активного центра [56].

Установление структуры элонгационного комплекса РНК-полимеразы II позволило сделать некоторые предположения о деталях взаимодействия фермента с ДНК и РНК, играющих ключевую роль в поддержании «транскрипционного пузыря» и постоянной длины гибридного участка РНК-ДНК (8–9 нуклеотидов) (рис. 3Б, [14, 15]). Так, по-видимому, F-мостик Rpb1 и вторая петля вилки Rpb2 (fork loop 2) участвуют в расплетании дуплекса ДНК и поддержании переднего (относительно хода транскрипции) края «транскрипционного пузыря». Непосредственно в разделении цепей РНК и ДНК важную роль играет петля Rpb1, названная «крышкой» (lid). Петля «руль» (rudder) Rpb1 участвует во взаимодействиях с ДНК и РНК выше гибрида, стабилизируя элонгационный комплекс. Стабилизирующую роль «руля» подтверждают недавние исследования *in vitro* рекомбинантной РНК-полимеразы бактерий, в которой этот домен делегирован [57].

Первая петля вилки Rpb2 (fork loop 1) взаимодействует с РНК в составе гибрида, вероятно, ограничивая его расплетание. Возможно, что петля Rpb1, названная «застежкой» (zipper), поддерживает верхний (задний) край «транскрипционного пузыря». Впрочем, эти предположения еще нуждаются в проверке с помощью биохимических подходов.

Мобильный домен «зажим», формируемый N- и C-концевыми частями Rpb1 и C-концевой частью Rpb2, соединяется с телом РНК-полимеразы II посредством пяти подвижных шарнирных петель (switches), допускающих значительное ($\sim 30^\circ$) вращение этого домена над каналом [11]. «Зажим» находится в «открытом» состоянии в структуре 10-субъединичной РНК-полимеразы II, позволяя свободный доступ двухцепочечной ДНК в канал к активному центру [11], и в «закрытом» состоянии в структуре элонгационного комплекса, фиксируя нуклеиновые кислоты в канале [14]. Однако в полной, 12-субъединичной РНК-полимеразе II гетеродимер Rpb4-Rpb7 ограничивает подвижность «зажима», оставляя его в «закрытой» конформации [12, 13, 58]. Учитывая необходимость гетеродимера Rpb4-Rpb7 для инициации транскрипции, было предположено, что связывание с промотором и инициация происходят при «закрытом зажиме», свойственном элонгационному комплексу. Аналогичная ситуация прослеживается и в случае бактериальной РНК-полимеразы: в установленной структуре кора ($\alpha_2\beta'\beta$) «зажим» открыт [6], а в голоферменте ($\alpha_2\beta'\beta\beta\sigma$), осуществляющем инициацию транскрипции, — закрыт [7, 8]. Таким образом, проникновение матричной цепи ДНК к активному центру возможно только после плавления дуплекса ДНК в промоторной области [58]. Это подтверждается структурой комплекса бактериального голофермента РНК-полимеразы с ДНК. Участок промоторной области ДНК в таком комплексе связывается с РНК-полимеразой поверх доменов «зажим» и «стенка» [9].

Мультифункциональный «зажим», по-видимому, «запирает» нуклеиновые кислоты в активном центре, обеспечивая процессивность транскрипции: подвижные шарнирные петли (switches) в основании «зажима» закрывают его, когда гибрид РНК-ДНК находится в активном центре; ряд элементов структуры обеспечивает плавление гибридного участка и поддержание «транскрипционного пузыря» [11, 14].

Элонгационный комплекс, включающий РНК-полимеразу, матрицу ДНК и синтезируемую цепь РНК, — центральный интермедиат в транскрипционном цикле. Такой комплекс обладает двумя особенностями, на первый взгляд противоречащими друг другу. С одной стороны, он чрезвычайно стабилен и устойчив к диссоциации. С другой, РНК-полимераза перемещается по матрице, синтезируя цепь РНК. Стабильность и мобильность элонгационного комплекса может достигаться, в частности, следующими способами: 1) почти все белко-

вые контакты с ДНК и РНК приходятся на сахарофосфатный остов нуклеиновых кислот (без специфичности к основаниям); 2) некоторые а.о. взаимодействуют сразу с двумя фосфатными группами, понижая активационный барьер при транслокации; 3) около 20 положительно заряженных а.о. во «вторичной шубе» (4–8 Å) окружают гибридный участок РНК-ДНК [14]. По-видимому, взаимодействие белка с «нижним» дуплексом ДНК и гибридом РНК-ДНК из 8–9 нуклеотидов — основные детерминанты стабильности элонгационного комплекса [59–63].

Как бактериальная, так и эукариотическая РНК-полимераза в процессе транскрипции могут осциллировать между поступательным движением вперед по ходу транскрипции и возвратным движением (backtracking) (рис. 3В, [52]). В ходе возвратного движения РНК-полимеразы 3'-концевые нуклеотиды синтезированной РНК отделяются от матричной цепи ДНК. При этом на столько же нуклеотидов сдвигаются назад транскрипционный пузырь и гибрид РНК-ДНК (т.е. длина гибридного участка остается постоянной). При возвратном движении РНК-полимеразы ее активный центр теряет связь с 3'-концом РНК. В таком положении дальнейшего наращивания цепи РНК не происходит, однако возможно расщепление фосфодиэфирной связи, рядом с которой в данный момент оказался активный центр. При этом 3'-концевой фрагмент РНК высвобождается и 3'-конец РНК снова оказывается в активном центре. Небольшое смещение назад на несколько нуклеотидов, вероятно, приводит к паузе в процессе транскрипции (временная задержка), из которой РНК-полимераза может выйти самостоятельно. Однако более дальние смещения фермента назад (до 10–15 нуклеотидов) приводят к прекращению синтеза РНК (состояние ареста). Из этого состояния РНК-полимераза II может выйти с помощью элонгационного фактора TFIIIS (или белков GreA/GreB в случае РНК-полимеразы бактерий), стимулирующего эндонуклеазную активность фермента [64]. Такое поведение РНК-полимеразы, по-видимому, играет важную роль в регуляции скорости элонгации и контроле точности транскрипции [52]. Обнаружены также более специфические факторы, которые могут либо супрессировать возвратные смещения РНК-полимеразы (например, элонгин (Elongin) в случае РНК-полимеразы II [65]) или реактивировать смещенные назад элонгационные комплексы с использованием гидролиза АТР, способствуя тем самым процессу транслокации РНК-полимеразы вперед по ходу синтеза (например, Mfd у бактерий [66]). Заметим, что *in vivo*, возможно, существуют более общие механизмы, ответственные за эффективную элонгацию. В качестве примера может служить недавно обнаруженный эффект кооперативности, когда

следующие друг за другом бактериальные РНК-полимеразы в активно транскрибирующихся генах могут подавлять возвратные движения впереди идущих молекул [67, 68].

Нуклеотиды, очевидно, могут поступать к активному центру через пору 1 ~ 12 Å (вторичный канал), которая располагается на дне основного канала. С нижней стороны РНК-полимеразы, под порой 1, открывается впадина в форме воронки (funnel), которая расширяется книзу до 30 Å в диаметре. Пора может служить и местом выхода 3'-конца РНК во время возвратного движения РНК-полимеразы. Поскольку в элонгационном комплексе канал занят дуплексом ДНК и гибридом РНК-ДНК, то пора, вероятно, является единственно возможным путем для поступления нуклеотидов и выхода 3'-конца РНК [10].

Молекулярные детали механизма транслокации пока не выяснены. При сравнении структур РНК-полимеразы II и РНК-полимеразы бактерий было найдено, что высококонсервативная α -спираль F-мостика расположена прямо в случае РНК-полимеразы II, но согнута и частично развернута в бактериальном ферменте [6, 11, 14]. Эта α -спираль контактирует с концом гибрида РНК-ДНК в транскрибирующем комплексе РНК-полимеразы II в претранслокационном состоянии. Возможно, изменение конформации F-мостика связано с транслокацией [14]. Однако прямых доказательств того, что в данной молекуле РНК-полимеразы такие конформационные изменения F-мостика существуют, пока не получено. В этом отношении интересна недавно установленная структура РНК-полимеразы II с ингибитором α -аманитином [69]. Оказалось, что ингибитор связывается с ферментным комплексом непосредственно под F-мостиком, в районе поры, через которую поступают нуклеотиды. Большинство аминокислотных остатков, взаимодействующих с α -аманитином, локализованы в F-мостике и прилегающих районах субъединиц Rpb1 и Rpb2. Возможно, механизм действия α -аманитина заключается в ограничении движения F-мостика, что и препятствует транслокации [69].

Активный центр фермента

В ходе матричного синтеза РНК РНК-полимераза катализирует нуклеофильную атаку 3'-гидроксила растущей цепи РНК на α -фосфат поступающего нуклеозидтрифосфата (НТР), в результате чего происходит включение очередного нуклеотида в цепь РНК и высвобождение пирофосфата. По существующей современной модели перед образованием фосфодиэфирной связи 3'-конец растущей цепи РНК занимает так называемый (i)-центр РНК-полимеразы, а входящий НТР — (i+1)-центр. После присоединения очередного нуклеотида 3'-конец РНК занимает (i+1)-центр. В результате транслокации

происходит перемещение 3'-конца РНК в (i)-центр. Сопряженно с этим осуществляется сдвиг ДНК-матрицы на один нуклеотид, при этом разъединяется очередная пара нуклеотидов в нижнем дуплексе ДНК, соединяется одна нуклеотидная пара в верхнем дуплексе ДНК и разъединяется последняя пара в гибриде ДНК-РНК. В посттранслокационном состоянии может происходить присоединение очередного нуклеотида. Реакция полимеризации и движение РНК-полимеразы по матрице обратимы: пиродифосфат может стимулировать реакцию деградации РНК (пиродифосфоролиз) с высвобождением 3'-концевых НТР. Кроме того, в активном центре может проходить гидролиз фосфодиэфирной связи с удалением 3'-концевых фрагментов РНК длиной 2–10 нуклеотидов. Такой гидролиз стимулируется элонгационными факторами GreA и GreB (у бактерий) и TFIIS (у РНК-полимеразы II). Нуклеазная активность многокомпонентных РНК-полимераз происходит в случае их возвратного движения (backtracking) по матрице ДНК относительно хода транскрипции. Реакции полимеризации и расщепления РНК осуществляются в единственном активном центре фермента (см. ниже) [70].

Все известные ДНК- и РНК-полимеразы содержат в активном центре ионы магния, координированные высококонсервативными хелатирующими мотивами соответствующих белковых субъединиц. Для объяснения механизма катализа всех ДНК- и РНК-полимераз на основе рентгеноструктурных данных, полученных для односубъединичных ферментов, была предложена гипотеза «двух металлов» [71]. Металл «А» образует координационную связь с 3'-ОН группой растущего конца РНК и α -фосфатом присоединяемого нуклеозидтрифосфата, в то время как металл «В» координирует все три фосфатные группы трифосфата. Оба иона магния стабилизируют переходное состояние во время образования фосфодиэфирной связи.

Эволюционно консервативные участки двух больших субъединиц пространственно сближены, образуя сердцевину РНК-полимеразы в виде сферы радиусом ~40 Å с центром в районе каталитического иона магния [6, 10]. Такая структура полностью согласуется с данными по расщеплению бактериальной РНК-полимеразы свободными радикалами при замене иона магния на ион железа [72]. Три остатка аспарагиновой кислоты в абсолютно консервативном мотиве **NADFDGD** β' -подобных субъединиц многосубъединичных РНК-полимераз хелатируют ион магния «А» (Mg-I) (рис. 3) [6, 11]. Замены каждого из этих остатков приводят к летальному фенотипу, что получило объяснение в опытах *in vitro*: мутантная РНК-полимераза бактерий способна занимать промотор и формировать открытый комплекс, но полностью лишена каталитической активности [73]. Мутагенез района D самой

большой субъединицы РНК-полимеразы III дрожжей показал решающую роль этого домена, поскольку любая замена в нем аминокислотных остатков приводит к летальному или условно-дефектному фенотипу. Даже близкие замены D → E в составе мотива **NADFDGD** приводят к гибели клеток. В случае одного из условных мутантов было показано, что дефект в транскрипции обусловлен дефектом в элонгации [74].

Положение второго иона магния «В» (Mg-II) в многосубъединичных РНК-полимеразах установлено менее определенно. В опубликованных структурах РНК-полимераз бактерий и эукариот на этот счет приводятся несколько противоречивые данные. Так, в структуре коры РНК-полимеразы бактерий Mg-II вообще отсутствует [6], а в структурах РНК-полимеразы II [11] и голофермента бактериальной РНК-полимеразы он занимает разные положения [7]. Кроме того, в двух последних случаях Mg-II размещен либо слишком далеко (~6 Å), либо слишком близко (~3 Å) от Mg-I для участия в акте катализа и его позиции не отвечают геометрии бимолекулярной реакции нуклеофильного замещения. Возможно, что в этих структурах электронные плотности, приписываемые Mg-II, скорее соответствуют молекуле воды или положению Mg^{2+} , непосредственно не связанного с катализом. Недавно по результатам анализа нуклеазной активности бактериальной РНК-полимеразы была предложена универсальная (обобщенная) модель, описывающая механизм синтеза и деградации РНК многосубъединичными РНК-полимеразами [75]. По-видимому, Mg-II координируется двумя остатками аспарагиновой кислоты мотива **NADFDGD** и не связан постоянно в активном центре (как Mg-I). Предполагают, что Mg-II поступает туда вместе с НТР-субстратом в ходе синтеза РНК или с другими лигандами, такими как некомплементарные НТР или пиродифосфат, соответственно, в ходе экзонуклеазного гидролиза или пиродифосфоролиза. В случае эндонуклеазного гидролиза РНК, стимулируемого фактором TFIIS (GreA и GreB у бактерий), два инвариантных кислых аминокислотных остатка фактора могут участвовать в размещении Mg-II и молекулы воды в активном центре РНК-полимеразы [17, 76, 77]. Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии между TFIIS и GreA/GreB и значительную разницу в пространственном строении этих белковых факторов, бактериальная и эукариотическая РНК-полимеразы используют одинаковую стратегию для расщепления РНК. β -Шпилька Zn-связывающего домена TFIIS или две скрученные α -спирали (coiled-coil) GreB заходят снизу глубоко в пору (вторичный канал) РНК-полимеразы, служащую для поступления НТР к активному центру или выхода 3'-конца РНК в случае возвратного движения фермента [17, 78]. В

модели тройного комплекса остатка аспарагиновой и глутаминовой кислот на кончике β -шпильки TFIS или вершине домена из двух α -спиралей GreB оказываются в непосредственной близости от Mg-I и расщепляемой фосфодиэфирной связи РНК и, таким образом, могут участвовать в стабилизации Mg-II. Связывание TFIS вызывает также ряд конформационных изменений в РНК-полимеразе II [17].

Высокоселективное мечение РНК-полимеразы с помощью аналогов субстратов и идентификация сегментов субъединиц, к которым произошла пришивка, позволило локализовать район, располагающийся на расстоянии в несколько ангстрем от иницирующего нуклеотида, на β -подобных субъединицах (консервативные районы Н и I) [79–82]. Это место на пространственной структуре РНК-полимеразы II соответствует гибридысвязывающему (hybrid binding) домену и домену «стенка» [11].

Локализация 3'-концевого нуклеотида РНК в претранслокационном комплексе РНК-полимеразы II может отражать примерное положение входящего нуклеотида в активном центре. Однако поступающий нуклеотид может связываться несколько иначе из-за присутствия двух дополнительных фосфатных групп. В избирательном использовании РНК-полимеразой в качестве субстрата рибонуклеотидов (а не dNTP) может быть вовлечен высококонсервативный аспарагиновый остаток мотива NADFDGD (см. выше) самой большой субъединицы [14]. Боковая цепь этого аминокислотного остатка расположена на расстоянии всего нескольких ангстрем от 2'-ОН группы остатка рибозы поступающего NTP. Результаты опыта по замене аналогичного остатка аспарагина в β' -субъединице РНК-полимеразы *E. coli* подтверждают данную гипотезу [83]. Структурные детали взаимодействия входящего нуклеотида и РНК-полимеразы еще предстоит выяснить. Важную роль в распознавании субстрата также, вероятно, играет определение РНК-полимеразой конформации гибрида РНК-ДНК, поскольку гибридысвязывающий район фермента «комплементарен» участку спирали РНК-ДНК [14]. Отклонения в структуре гибрида РНК-ДНК из-за ошибочного включения NTP или dNTP, по-видимому, приводят к дестабилизации элонгационного комплекса и, возможно, его возвратному смещению по матрице ДНК. В этой ситуации возможно проявление нуклеазной активности РНК-полимеразы и удаление 3'-концевого нуклеотида (см. выше) [60, 84, 85].

α -ПОДОБНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ

Два мотива в первичных структурах субъединиц **Rpc40** и **Rpc19** РНК-полимераз I и III, **Rpb3** и **Rpb11** РНК-полимеразы II, а также **D** и **L** РНК-полимеразы архей сходны с N-концевым доменом субъеди-

ницы α бактерий (NTD α) [21, 86]. Субъединица α образует гомодимер и участвует в сборке бактериальной РНК-полимеразы и активации транскрипции. С использованием двухгибридной системы было установлено, что субъединицы Rpc40 и Rpc19, а также Rpb3 и Rpb11, образуют стабильные гетеродимеры *in vivo* [21, 87]. Опыты по супрессорному анализу подтверждают взаимодействие между α -подобными субъединицами РНК-полимераз I–III [21, 88]. В опытах *in vitro* также продемонстрировано, что большая α -подобная субъединица (Rpc40 или Rpb3) образует гетеродимер с малой α -подобной субъединицей (соответственно, Rpc19 или Rpb11), при этом димеризация специфична к классу РНК-полимераз [89].

Образование α_2 -гомомера бактерий – начальный этап в сборке РНК-полимеразы, которая протекает по схеме: $\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$ [90]. Подробности сборки эукариотических РНК-полимераз I–III не установлены, но было показано, что Rpb3 может взаимодействовать с Rpb2 и далее с Rpb1 [91]. Получены также субкомплексы Rpb2-Rpb3-Rpb11 и Rpb2-Rpb3-Rpb11-Rpb10, очевидно, эквивалентные субкомплексу $\alpha_2\beta$ бактерий [92]. Сборка РНК-полимераз I–III, видимо, начинается с образования комплексов Rpc40-Rpc19 и Rpb3-Rpb11 (по аналогии с образованием α_2 гомомера у бактерий).

Мутации в α -мотиве Rpb3 нарушают ее взаимодействие с Rpb2 и Rpb1 [91]. Кроме того, мутации в обоих α -мотивах Rpb3 нарушают ее взаимодействие с Rpb11 *in vitro* [87]. При делеции любого из этих мотивов Rpb3 теряет способность включаться в РНК-полимеразу II *in vivo* [93]. Таким образом, α -мотивы необходимы для сборки ферментного комплекса.

Структурное сходство Rpb3 и Rpb11 с N-концевым доменом α -субъединицы бактерий (α NTD) оказалось еще более выраженным, чем это ожидалось из сравнения аминокислотных последовательностей. Субдомен 1 α NTD может быть совмещен с соответствующими субдоменами Rpb3 и Rpb11 при выравнивании, соответственно, 94 и 92 а.о. и среднеквадратичным отклонением (rmsd) в $\sim 2,8$ Å. Субдомен 2 α NTD совмещается с соответствующим доменом Rpb3 при выравнивании 90 а.о. (rmsd $\sim 2,5$ Å) [94].

Почти все взаимодействия между α -субъединицами обусловлены доменом 1, состоящим из β -листа и двух практически ортогональных α -спиралей. Обширный гидрофобный интерфейс между ортогональными α -спиралями обеспечивает высокую стабильность α -димера. Гидрофобные аминокислотные остатки, входящие в это гидрофобное ядро, являются наиболее консервативными [11, 86].

Большинство аминокислотных остатков, входящих в область контакта между Rpb3 и Rpb11, различны у субъединиц-ортологов, что

определяет специфичность образования гетеродимера. Более того, важная часть района контакта Rpb2-Rpb3 (тяж $\beta 10$ Rpb2 и петля Rpb3) неконсервативна и может отвечать за специфичность взаимодействий Rpc40 с β -подобными субъединицами РНК-полимераз I и III [11].

Локализация гетеродимера Rpb3-Rpb11 РНК-полимеразы II и Rpc40-Rpc19 РНК-полимеразы I аналогична расположению гомодимера α_2 в РНК-полимеразе бактерий: Rpb3 (αNTD_I) взаимодействует преимущественно с Rpb2 (β), а Rpb11 (αNTD_{II}) — с Rpb1 (β') [6, 10].

Гетеродимер Rpb3-Rpb11 играет центральную роль во взаимодействии РНК-полимеразы II с медиаторным комплексом (Медиатор — сложный гетеромультимерный ансамбль из примерно 20–25 белков-коактиваторов транскрипции, являющийся посредником между прединициаторным комплексом РНК-полимеразы II и различными специфическими активаторами и репрессорами) [95–97]. Получены мутации в субъединице Rpb3, которые нарушают активированную транскрипцию *in vivo* и *in vitro*, не влияя однако на базальный уровень экспрессии. Эти мутации локализованы в субдомене Rpb3, соответствующем охарактеризованной «активаторной мишени» αNTD_I бактерий. У *E. coli* указанный мотив αNTD_I вовлечен в белок-белковые взаимодействия с белком-активатором катаболизма (CAP) и играет важную роль в изомеризации закрытого инициаторного комплекса в открытый на многих CAP-зависимых промоторах [98].

V. ОБЩИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ЯДЕРНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I–III

Rpb5. Субъединица Rpb5 состоит из двух независимых доменов: высококонсервативного С-концевого домена и более вариабельного N-концевого домена (по первичной структуре составляющего примерно 2/3 от общей длины полипептидной цепи). В то время как С-концевой домен гомологичен субъединице Н архей, N-концевой домен характерен только для эукариот.

В составе РНК-полимеразы Rpb5 находится в районе «нижней челюсти». Сравнение пространственных структур этой субъединицы в комплексе РНК-полимеразы II и в свободном состоянии обнаруживает мобильность N- и С-концевых доменов относительно друг друга и конформационное изменение в петле С-концевого домена [11, 99]. Данные по фотоаффинным сшивкам белок-ДНК в прединициаторных комплексах РНК-полимеразы II и III, а также в транскрибирующем комплексе РНК-полимеразы II свидетельствуют о контакте Rpb5 с «передним» (относительно активного центра) дуплексом ДНК между +5 и +15 положениями на одной стороне спирали ДНК [51, 54, 55].

Эти результаты согласуются с установленной пространственной структурой элонгационного комплекса [14].

Имеющиеся на сегодняшний день биохимические и генетические данные позволяют говорить о возможной роли Rpb5 в активации транскрипции [100]. Доступный растворителю N-концевой домен субъединицы Rpb5 эукариот взаимодействует с белком-трансактиватором X вируса гепатита В (HBx) [101], TIF-120 (TBP-Interacting Protein 120) [102], TAF_{II}68 [103], TFIIB [104] и субъединицей RAP30 фактора TFIIF [105].

Rpb6. Наиболее консервативным районом субъединицы Rpb6 является С-концевая часть полипептида: при сравнении аминокислотных последовательностей в этом домене субъединицы из четырех эволюционно далеких видов (*H. sapiens*, *D. melanogaster*, *Sch. pombe* и *S. cerevisiae*) обнаруживается 73% идентичных а.о. Данные о пространственной структуре Rpb6 как отдельной субъединицы, так и в составе РНК-полимеразы II, свидетельствуют, что С-концевой район содержит все ключевые элементы вторичной структуры этого белка [11, 106]. Вероятно, именно этой областью представлен наиболее важный функциональный домен субъединицы.

N-концевой домен Rpb6 содержит значительное количество отрицательно заряженных а.о. и различается у гомологов субъединицы из разных организмов как по длине, так и по первичной структуре. Субъединица Rpb6 дрожжей и человека фосфорилирована в составе всех трех ядерных РНК-полимераз. Продемонстрировано, что казеиновая киназа II проводит фосфорилирование по N-концевому остатку серина Ser2 *in vitro* [107]. Однако ген, кодирующий субъединицу с заменой этого остатка на аланин и даже с делецией 42 а.о. с N-конца, у дрожжей *S. cerevisiae* эффективно комплементирует *rpb6*- Δ мутант, указывая на то, что данная посттрансляционная модификация не существенна для жизни дрожжевых клеток, хотя и может играть более тонкую роль в регуляции *in vivo* [108, 109].

Ряд данных указывает на то, что эта субъединица необходима для сборки, по крайней мере, РНК-полимераз I и II, а также для стабильности самых больших субъединиц этих двух ферментов [108, 110]. Добавление рекомбинантной субъединицы RPB6 *in vitro* к неактивной форме РНК-полимеразы I *S. cerevisiae* (без субъединиц Rpb6, Rpa43 и Rpa14) приводит к конформационным изменениям в ферменте и частичному восстановлению его транскрипционной активности на неспецифической ДНК-матрице, что говорит об участии Rpb6 в формировании структурной целостности и функциональной активности РНК-полимеразы I [110].

Субъединица Rpb6 имеет гомолог в РНК-полимеразе архей — субъединицу K, а также проявляет структурное и функциональное

родство с субъединицей ω эубактерий [23]. Это обстоятельство позволяет отнести Rpb6 к субъединицам кора многосубъединичных РНК-полимераз ($\beta'\beta\alpha_1\alpha_{II}\omega$). Наибольшее сходство в структуре между Rpb6 и ω наблюдается в области двух α -спиралей и следующего за ними β -тяжа. Этот район образует компактный структурный домен, который взаимодействует с консервативными районами D и G, а также С-концевым участком, следующим за Н-районом самых больших субъединиц (Rpb1 и β'). Показано, что гены обеих субъединиц, Rpb6 и ω , супрессируют аналогичные мутации по функции самых больших субъединиц многокомпонентных РНК-полимераз и играют важную роль при сборке и/или увеличении стабильности соответствующих ферментов. Возможный механизм работы этих белков заключается в фиксировании определенной конформации больших субъединиц, что облегчает их взаимодействие с $\beta\alpha_1\alpha_{II}$ интермедиатом и стабилизирует комплекс РНК-полимеразы.

Rpb8. Субъединица Rpb8 не проявляет очевидной гомологии с компонентами РНК-полимеразных комплексов архей и эубактерий и, по-видимому, является уникальным компонентом аппарата транскрипции эукариот. Сравнение первичных структур этой субъединицы *S. cerevisiae* с гомологами из других организмов (*Sch. pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* и *H. sapiens*) показало, что высококонсервативные или инвариантные а.о. распределены на всем протяжении полипептидной цепи, за исключением неструктурированной Ω -петли из 20 а.о. в средней части белка. Эта петля не существенна для жизни клеток и отсутствует в соответствующих субъединицах делящихся дрожжей *Sch. pombe*, растений и животных [111, 112].

Пространственная структура субъединицы Rpb8 в растворе позволила отнести этот белок к ОВ-семейству (семейство олигосахарид-олигонуклеотид связывающих белков) и предположить, что Rpb8 связывает одноцепочечные олигонуклеотиды [111].

Основным партнером Rpb8 в РНК-полимеразном комплексе является самая большая субъединица [10]. Контакты с Rpb1 приходятся главным образом на ее Е-район (так называемый домен поры 1). С этими данными хорошо согласуются результаты, полученные с использованием двухгибридной системы, в которых были обнаружены контакты Rpb8 с гомологичными сегментами самых больших субъединиц РНК-полимераз I–III [109]. С помощью генетических подходов выявлен еще один возможный партнер Rpb8 – субъединица Rpb6 [109]. Повышение «дозы» гена *RPB6* *S. cerevisiae* супрессирует термочувствительный фенотип в штамме *S. cerevisiae*, полученном при замене Rpb8 на ее гомолог из фермента человека [113]. Мутация в высококонсервативном мотиве Е-района самой большой субъединицы РНК-полиме-

разы I Rpa190 (Rpa1), входящем в интерфейс Rpb8/Rpa190, приводит к появлению у дрожжей термочувствительного фенотипа. Такой фенотип также супрессируется геном *RPB6*. Все это указывает на то, что триада Rpb6, Rpb8 и модуль «пора 1» образуют функционально целостный домен в РНК-полимеразе II [109].

Rpb10. Субъединица Rpb10 гомологична субъединице N РНК-полимеразы архей. Rpb10 – цинксвязывающий белок, содержащий неканонический инвариантный мотив CX_2CX_NCC , который присутствует у всех гомологов этой субъединицы. Замены любого из остатков цистеина на другие а.о., включая такие близкие, как серин или треонин, приводят к потере жизнеспособности дрожжевых клеток [114]. Пространственная структура Rpb10 представляет собой три амфипатические α -спирали, образующие «узел» вокруг гидрофобного ядра, содержащего высококонсервативные а.о., и С-концевой «хвост», включающий еще одну α -спираль [11]. Атом цинка координационно связан с четырьмя остатками цистеина, соединяя таким образом N-концевой район с началом спирали $\alpha 3$ и стабилизируя трехспиральный «узел» (мотив, получивший название «цинковый узел» (zinc-bundle)). Удаление цинка приводит к разрушению нативной глобулы белка [115].

Отличительной чертой субъединицы Rpb10 эукариот является наличие инвариантного мотива HVDLIEK в ее С-концевой части. Мутация в этом мотиве приводит к специфическому нарушению сборки РНК-полимеразы I [114].

Существование субкомплекса Rpb10 с α -подобным гетеродимером экспериментально показано для эукариот и архей (Rpb10-Rpc40-Rpc19 у РНК-полимераз I и III [21]; Rpb10-Rpb3-Rpb11 для РНК-полимеразы II [92] или N-D-L в РНК-полимеразе архей [116]). Эти результаты соответствуют пространственной структуре РНК-полимеразы II, где Rpb10 взаимодействует с Rpb3 и Rpb2 [10]. По-видимому, субъединица Rpb10 играет важную роль в сборке РНК-полимераз I–III, являясь одним из «якорей» для второй по величине субъединицы при образовании субкомплекса, эквивалентного $\beta\alpha_1\alpha_{II}$ у эубактерий.

Rpb12. Субъединица Rpb12 – самая малая из субъединиц ядерных РНК-полимераз I–III (Rpb12 человека состоит всего из 58 а.о.). Гомологичный белок, субъединица Р (или М [117]), присутствует и в РНК-полимеразе архей [30, 118]. Все гомологи Rpb12 содержат инвариантный цинксвязывающий домен классического типа $YxCx_2Cx_{12}RCx_2CGxR$ и основной С-концевой домен, высококонсервативный для всех эукариот. N-концевой район, напротив, вариабелен по длине и составу аминокислотной последовательности. В установленной пространственной структуре РНК-полимеразы II этот район субъединицы неупо-

рядочен (неструктурирован). В остальной части белка (без N-концевого района) можно выделить два домена: цинксвязывающий модуль (так называемую «цинковую ленту» (zinc ribbon)) из трех β -тяжей, а также хвост из 10 а.о., включающий один β -тяж [11].

В составе комплекса РНК-полимеразы II Rpb12 своим консервативным С-концевым районом взаимодействует с Rpb3 и Rpb2 [10]. Важность этого домена иллюстрирует, например, тот факт, что делеция всего двух а.о. с С-конца Rpb12 приводит к летальному фенотипу у дрожжей [119]. Мутации в С-концевом районе Rpb12 нарушают сборку РНК-полимеразы III, не затрагивая при этом полимеразную активность фермента. Дефект роста клеток, вызванный этими мутациями, супрессируется повышением «дозы» гена второй по величине субъединицы РНК-полимеразы III. С пространственной структурой РНК-полимеразы II хорошо согласуются также данные двухгибридной системы: Rpb12 связывается с С-концевой половиной второй по величине субъединицы РНК-полимеразы I, причем для этого взаимодействия необходима целостность цинксвязывающего домена [119]. Таким образом, Rpb12, по-видимому, необходима для сборки и поддержания целостности РНК-полимераз I–III, связывая вторые по величине субъединицы этих ферментов (аналоги субъединицы β бактерий) с субкомплексом Rpb3-Rpb11-Rpb10 (Rpc40-Rpc19-Rpc10).

Получены данные о взаимодействии Rpb12 с субъединицей τ 131 фактора TFIIIC, участвующего в транскрипции генов класса III [120]. Не исключается также роль Rpb12 в активации транскрипции [121].

VI. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I–III

СУБЪЕДИНИЦЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЛЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I

Rpa49. Субъединица Rpa49 — основной белок с высоким содержанием лизина и аргинина. Делеция гена *RPA49* у *S. cerevisiae* приводит к замедлению роста клеток при оптимальной температуре (30 °C) и к их гибели при понижении температуры до 10 °C. Эксперименты в таком штамме с меченой РНК *in vivo* показали, что скорость синтеза 5.8S рРНК заметно снижена [122]. Таким образом, Rpa49 важна для оптимальной работы РНК-полимеразы I. Установлено, что PAF53, мышинный ортолог Rpa49, специфически взаимодействует с фактором UBF *M. musculus* [123]. Сопоставление пространственной структуры РНК-полимеразы I, полученной с помощью электронной микроскопии (разрешение ~34 Å), с более детальной структурой РНК-полимеразы II (разрешение ~2,8 Å) показывает, что субъединица Rpa49 взаимодействует с доменом «зажим», вовлеченным во взаимодействие с

ДНК и гибридом РНК-ДНК [35]. В соответствии с локализацией субъединицы возникло предположение, что Rpa49, возможно, оказывает влияние на конформацию «зажима» или взаимодействует с ДНК, модулируя процессивность РНК-полимеразы I.

Rpa43 и Rpa14. Ген субъединицы Rpa43 — единственный из генов специфических субъединиц РНК-полимеразы I, который является незаменимым для дрожжей [124]. Инактивация гена *RPA43* нонсенс-мутацией или протяженной делецией его центральной части летальна. Однако гибель клеток можно предотвратить введением в них гибридного гена *GAL7-35SpДНК* (кодирующего высокомолекулярный предшественник рРНК дрожжей под контролем промотора *GAL7*) и его транскрипцией с помощью РНК-полимеразы II в присутствии галактозы. Этот результат демонстрирует невозможность синтеза 35S предшественника рибосомных РНК РНК-полимеразой I без субъединицы Rpa43, что было подтверждено экспериментом с «импульсным» мечением РНК *in vivo*. Таким образом, Rpa43 — необходимый компонент РНК-полимеразы I.

Делеция гена *RPA14* не летальна для дрожжей, однако клетки теряют способность к росту при повышенной температуре (37 °C) [125]. РНК-полимераза I, выделенная из такого штамма, не содержит субъединиц Rpa14, Rpa43 и Rpb6. По-видимому, Rpa14 обеспечивает стабилизацию взаимодействия Rpa43 и Rpb6 с ферментным комплексом.

Rpa43 образует стабильный гетеродимер с Rpa14 и взаимодействует с Rpb6 [126]. Все три субъединицы располагаются рядом в пространственной структуре РНК-полимеразы I [35]. N-концевая часть Rpa43 гомологична субъединицам Rpb7 РНК-полимеразы II и Rpc25 РНК-полимеразы III, а также субъединице E РНК-полимеразы архей [127, 128]. Очевидно, эти полипептиды составляют одно семейство родственных субъединиц РНК-полимераз I–III, что подтверждает гипотезу о сходстве общего плана строения этих ферментов. Кроме того, показано, что гетеродимер Rpa14-Rpa43, так же, как комплексы Rpb4-Rpb7 РНК-полимеразы II и F-E РНК-полимеразы архей, связывает одноцепочечную РНК *in vitro* [128]. Одна из функций такого гетеродимера может состоять в удержании РНК в процессе транскрипции.

Rpa14 не проявляет заметной гомологии с другими субъединицами РНК-полимераз, в частности с Rpb4, Rpc17 или F. Однако обнаружено, что С-концевой домен Rpa14 представляет собой так называемый HRDC-мотив (небольшой домен, найденный в RecQ-геликазе и рибонуклеазе D) [128]. Такой же структурный домен присутствует и в субъединице F. Этот факт может свидетельствовать о структурно-функциональной связи этих субъединиц, несмотря на отсутствие очевидной гомологии в их аминокислотной последовательности.

Таким образом, по-видимому, комплекс Rpa14-Rpa43 является структурно-функциональным аналогом гетеродимеров Rpb4-Rpb7 РНК-полимеразы II, Rps17-Rps25 РНК-полимеразы III и F-E РНК-полимеразы архей.

Получены биохимические и генетические данные по взаимодействию Rpa43 с фактором транскрипции Rrn3 [129]. По-видимому, Rpa43 обеспечивает образование и/или стабилизацию комплекса {РНК-полимераза I — Rrn3}, единственной формы фермента, активной в промотор-специфической транскрипции.

С помощью электронной микроскопии обнаружено, что комплекс Rpa14-Rpa43 входит в состав «выступа» (stalk) РНК-полимеразы I, располагающегося в районе «зажима» [35]. Этот «выступ» отсутствует в структуре 10-субъединичной РНК-полимеразы II [10]. В РНК-полимеразе I, выделенной из штамма с разрушенным геном *RPA14* и лишенной Rpa14, Rpa43 и Rpb6 [110], «выступ» также не обнаружен. Сопоставляя пространственные структуры РНК-полимераз I и II можно обнаружить потенциальные взаимодействия Rpa14-Rpa43 с остовом ферментного комплекса [35]. Так, «выступ», вероятно, взаимодействует с «зажимом» (N- и C-концевые домены Rpa1, C-концевые домены Rpa2 и Rpb6) и прилегает к району, соответствующему сайту выхода C-концевого домена (CTD) субъединицы Rpb1 из РНК-полимеразы II. Самая большая субъединица РНК-полимеразы I Rpa1 не имеет домена, подобного CTD Rpb1, так что Rpa14-Rpa43 может выполнять сходные функции, по крайней мере в связывании специфических факторов транскрипции и коактиваторов.

Rpa34. Разрушение гена субъединицы Rpa34 существенно не сказывается на росте дрожжевых клеток [130]. Вместе с тем, двойной мутант, в котором одновременно инактивированы ген *RPA34* и ген ДНК-топоизомеразы I, характеризуется очень низкой скоростью роста, даже при 30 °C. Возможно, Rpa34 помогает снимать топологические напряжения на рДНК во время транскрипции.

Характерной особенностью Rpa34 является основной C-концевой домен из 44 а.о., содержащий 21 а.о. лизина, 3 а.о. аргинина, 3 а.о. гистидина и 11 а.о. глутаминовой кислоты. По данным компьютерного моделирования последние 23 а.о. могут образовывать α -спираль [130]. C-концевой домен, возможно, участвует в стабилизации взаимодействия матрицы с ферментом. Заключение о локализации Rpa34 в конце «канала» РНК-полимеразы I (в районе «стенки») согласуется с данными о ее контакте с «верхним» участком ДНК [35]. РНК-полимераза I, выделенная из штамма с разрушенным геном *RPA34*, лишена субъединиц Rpa34 и Rpa49 [130]. Такая форма фермента активна в неспецифической транскрипции, следовательно, эти субъединицы непосредственно не участвуют в акте катализа.

Rpa12. Разрушение гена субъединицы Rpa12 *S. cerevisiae* значительно замедляет рост дрожжевых клеток при 30 °C и вызывает их гибель при 37 °C [131]. Первичная структура субъединицы Rpa12 содержит два цинксвязывающих домена: варибельный N-концевой домен и консервативный C-концевой, гомологичный соответствующим доменам субъединиц Rpb9 РНК-полимеразы II и Rps11 РНК-полимеразы III, а также элонгационного фактора TFIIIS. Парадоксально, но именно N-концевой домен важен для функционирования Rpa12, в то время как C-концевой домен несущественен *in vivo* [132]. Наличие N-концевого домена необходимо и достаточно для включения этой субъединицы в состав РНК-полимеразы I: по данным дрожжевой двухгибридной системы соответствующая усеченная форма Rpa12 взаимодействует с Rpa2 и входит в состав даже высокоочищенного фермента. По результатам электронной микроскопии Rpa12 расположена в «верхней челюсти» фермента — также, как и ее гомолог Rpb9 в РНК-полимеразе II [35, 133]. Возможно, N-концевой домен Rpa12 стабилизирует взаимодействие двух самых больших субъединиц в этом районе. Действительно, супрессия дефекта субъединицы Rpa12 повышением дозы гена, кодирующего субъединицу Rpa1, поддерживает идею о роли Rpa12 в индуцировании конформационных изменений в РНК-полимеразе I во время сборки ферментного комплекса. Штамм с нулевым аллелем *rpa12* чувствителен к 6-азаурацилу и микофенолату, препаратам, вызывающим уменьшение пула NTPs, что указывает на дефект РНК-полимеразы I данного штамма в элонгации [132]. Недавно было показано, что Rpa12 участвует в эффективной терминации транскрипции РНК-полимеразой I [134].

За исключением Rpa43, все субъединицы, специфические для РНК-полимеразы I, не являются незаменимыми для жизни дрожжевых клеток в нормальных условиях. Любое двойное разрушение генов *RPA12*, *RPA34* и *RPA49* и даже инактивация сразу трех этих генов не приводят к гибели клеток. Однако двойное разрушение любого из этих генов в паре с геном *RPA14* — летально [130]. По-видимому, инактивация двух независимых, хотя и несущественных функций может дестабилизировать функционирование РНК-полимеразы I, что и приводит к летальному фенотипу.

СУБЪЕДИНИЦЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЛЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II

Субкомплекс Rpb4-Rpb7. Субъединицы Rpb4-Rpb7 образуют гетеродимер, который обратимо связывается с 10-субъединичным кором РНК-полимеразы II [135–137]. Этот гетеродимер содержится примерно в 20% комплексов очищенной РНК-полимеразы II из клеток *S. cerevisiae* на экспоненциальной фазе роста, в то время как в клетках,

находящихся в стационарной фазе, большинство молекул РНК-полимеразы II включают все 12 субъединиц [138]. Ген Rpb4 не является незаменимым для дрожжей при оптимальных условиях роста, однако он необходим при температурных стрессах и голодании [139]. Делеция же гена Rpb7 приводит к летальному фенотипу [140]. В РНК-полимеразе II, выделяемой из штамма с разрушенным геном *RPB4 (RPB4-Δ)*, отсутствуют обе субъединицы, Rpb4 и Rpb7 [136]. Повышенная экспрессия *RPB7* может частично супрессировать некоторые стрессочувствительные фенотипы этого штамма [141]. Было показано, что гетеродимер Rpb4-Rpb7 вовлечен в промотор-специфическую инициацию транскрипции *in vitro* и участвует в активации транскрипции *in vivo* [136, 142].

Гомологами Rpb4-Rpb7 у архей являются субъединицы F и E, которые также образуют между собой устойчивый комплекс [30]. Впервые структура с высоким разрешением (1,75 Å) была определена для гетеродимера F-E [143]. Субъединица E имеет вытянутую двухдоменную структуру, а субъединица F огибает ее с одной стороны, располагаясь между двумя этими доменами. Оба домена субъединицы E содержат потенциальные РНК-связывающие мотивы: усеченный RNP(рибонуклеопротеид)-мотив в N-концевом домене и S1 мотив в C-концевом домене. Действительно, в опытах *in vitro* было продемонстрировано, что гетеродимер F-E связывает РНК [128].

Структура полипептидного остова (только для C^α атомов) комплекса Rpb4-Rpb7 определена в составе дрожжевой 12-субъединичной РНК-полимеразы II (разрешение ~4 Å) [12, 13]. Часть модели, соответствующая Rpb7, практически идентична структуре субъединицы E, что согласуется с консервативностью этих субъединиц (25% идентичных и 34% консервативных а.о.). Гомология между субъединицами Rpb4 и F незначительна и приходится в основном на N- и C-концевые участки белков. Именно эти домены представлены в модели, в то время как центральная часть из ~70 а.о. отсутствует, по-видимому, из-за ее подвижности или неструктурированности. Гетеродимер Rpb4-Rpb7 локализован у основания «зажима» [12, 13]. Связывание с 10-субъединичным кором РНК-полимеразы определяется главным образом контактами N-концевого домена Rpb7 с Rpb1 и Rpb6. Взаимодействие Rpb4-Rpb7 с Rpb6 обнаружено и с помощью генетического подхода: в очищенных препаратах РНК-полимеразы II одного из условных мутантов по субъединице Rpb6 *S. cerevisiae* гетеродимер Rpb4-Rpb7 отсутствует [144]. Кроме того, не исключается и наличие контактов между Rpb4 и Rpb6 на основе данных по двухгибридной системе [144]. Rpb7 образует своего рода клин между «зажимом», линкером CTD Rpb1 и Rpb6, фиксируя «зажим» в закрытом состоянии вокруг ДНК-связывающего канала [12, 13]. Положение Rpb7 у бороздки, через кото-

рую проходит растущий конец РНК, может указывать на возможность связывания РНК в транскрибирующем комплексе РНК-полимеразы II, что, вероятно, приводит к еще большей стабилизации тройного комплекса. В соответствии с этим Rpb4-Rpb7 связывает *in vitro* одноцепочечные нуклеиновые кислоты, а мутации в S1-мотиве Rpb7 нарушают такое связывание [145]. Вероятно, именно Rpb7 играет ключевую роль в функционировании гетеродимера, а Rpb4 облегчает взаимодействие Rpb7 с РНК-полимеразой II, обеспечивая его стабильность и/или поставляя дополнительные контакты. Локализация гетеродимера Rpb4-Rpb7 в составе РНК-полимеразы II предполагает его участие в сборке инициаторного комплекса и последующем переходе РНК-полимеразы II к элонгации. Действительно, Rpb4-Rpb7 стабилизирует минимальный инициаторный комплекс, а район связывания гетеродимера соседствует с участком связывания TFIIB. Близость Rpb4-Rpb7 к CTD согласуется с обнаруженным взаимодействием между Rpb4 и Fcp1, фосфатазой CTD субъединицы Rpb1 [146]. Кроме того, сравнение структур комплекса Медиатор-РНК-полимераза II (разрешение 35 Å) и 12-субъединичной РНК-полимеразы II позволяет предположить взаимодействие гетеродимера и компонентов медиаторного комплекса [12, 13, 97].

Rpb9. Субъединица Rpb9 относится к консервативному семейству цинксвязывающих белков, которое включает также субъединицы из РНК-полимераз I и III (соответственно, Rpa12 и Rpc11). Все три белка имеют два цинксвязывающих домена типа «цинковой ленты» (zinc ribbon). Более того, Rpa12 и Rpb9 сходным образом локализованы в составе РНК-полимераз I и II, находясь в «верхней» челюсти комплекса [10, 35]. В комплексе РНК-полимеразы II Rpb9 взаимодействует с доменами «челюсть» (jaw) и «воронка» (funnel) субъединицы Rpb1, а также с доменом «лопасть» (lobe) субъединицы Rpb2 [11].

Разрушение гена Rpb9 в *S. cerevisiae* приводит к замедлению роста клеток при 30 °C и их гибели при 37 °C [147]. У плодовой мушки *D. melanogaster* ген Rpb9 является незаменимым [148].

При отсутствии субъединицы Rpb9 в составе РНК-полимеразы II происходит сдвиг вверх (upstream) точки начала транскрипции на ряде промоторов *in vivo* и *in vitro* [149–151]. Производное Rpb9, включающее N-концевой цинксвязывающий мотив и линкер, достаточно для восстановления правильных точек начала транскрипции. В то же время мутации, нарушающие целостность этого мотива, приводят к обратному эффекту [152]. Rpb9 также требуется для эффективной элонгации: наряду с TFIIS этот белок необходим для выхода РНК-полимеразы II из состояния ареста [153]. С дефектом штамма *S. cerevisiae* *RPB9-Δ* в элонгации согласуется и чувствительность клеток этого

штамма к 6-азаурацилу [152]. В С-концевом цинксвязывающем мотиве получены мутации, нарушающие нативную элонгационную активность РНК-полимеразы II [154]. Обнаружена функциональная связь Rpb9 с гистон-ацетилтрансферазной активностью элонгатора (Elongator) и SAGA-комплекса, а также физическая связь с большой субъединицей общего фактора транскрипции TFIIE [155]. Все эти факты говорят о роли Rpb9 в инициации и элонгации транскрипции.

СУБЪЕДИНИЦЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЛЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III

Субкомплекс Rpc82-Rpc34-Rpc31. Три субъединицы — Rpc82, Rpc34 и Rpc31 — образуют субкомплекс, который диссоциирует от РНК-полимеразы III дрожжей при проведении электрофореза и в ходе ионообменной хроматографии при повышенной температуре в случае фермента, несущего мутацию в N-концевом цинксвязывающем домене самой большой субъединицы [156, 157]. С помощью дрожжевой двухгибридной системы было продемонстрировано существование белок-белковых взаимодействий *in vivo* между этими тремя субъединицами, а также между Rpc34 и TFIIB70, компонентом фактора инициации TFIIB [158]. Кроме того, сверхпродукция Rpc1 (самой большой субъединицы РНК-полимеразы III) супрессирует мутацию в гене субъединицы Rpc31 [159], а повышенный синтез Rpc31, в свою очередь, супрессирует мутацию в гене *RPC82* [160]. Эти данные указывают на то, что Rpc82, Rpc34 и Rpc31 образуют комплекс, взаимодействующий с Rpc1.

Получены мутации в гене *RPC34*, приводящие к дефекту в промотор-специфической транскрипции и не влияющие на синтез РНК на poly[dA-T] матрице [161]. При этом дефект, вызванный одной из мутаций, может быть компенсирован *in vitro* повышением концентрации РНК-полимеразы III, что указывает на низкую аффинность мутантной формы фермента к прединициаторному комплексу. Другая полученная мутация влияет на образование открытого комплекса на промоторе. Таким образом, роль Rpc34 сводится к участию как в рекрутировании РНК-полимеразы к прединициаторному комплексу, так и в последующей стадии инициации. По данным фотоаффинного мечення Rpc34 в составе инициаторного комплекса локализована дальше других субъединиц РНК-полимеразы III в «верхнем» участке ДНК [54].

Условная мутация в гене, кодирующем Rpc31, приводит к дефекту в промотор-специфической транскрипции, не влияя на каталитические свойства РНК-полимеразы III [159].

Существование аналогичного Rpc82-Rpc34-Rpc31 стабильного комплекса продемонстрировано и в случае РНК-полимеразы III *Homo sapiens* [162]. В мягких денатурирующих условиях, а также при седи-

ментации в градиенте плотности сахарозы происходит диссоциация от этого фермента субкомплекса, включающего белки, гомологичные дрожжевым субъединицам Rpc82, Rpc34 и Rpc31. Субкомплекс не оказывает заметного влияния на элонгацию и терминацию транскрипции, однако без него препарат РНК-полимеразы III неактивен в промотор-специфической транскрипции. Добавление нативного или реконструированного из рекомбинантных субъединиц hRPC82, hRPC34 и hRPC31 комплекса восстанавливает промотор-специфическую инициацию. Также показано, что субъединица РНК-полимеразы III человека, гомологичная Rpc34, взаимодействует с двумя компонентами фактора инициации TFIIB: TBP и TFIIB70.

Таким образом, субкомплекс Rpc82-Rpc34-Rpc31, по-видимому, вовлечен в инициацию транскрипции, определяя связывание РНК-полимеразы III с комплексом TFIIB-ДНК посредством прямых взаимодействий между Rpc34 и TFIIB. Функции двух других субъединиц могут заключаться в стабилизации комплекса в составе фермента, рекрутировании РНК-полимеразы III к прединициаторному комплексу и/или стимулировании функций других субъединиц во время инициации.

Rpc53. Было показано, что для функционирования субъединицы Rpc53 достаточно С-концевого домена из 165 а.о. (при полном размере белка в 424 а.о.) [163]. Однако РНК-полимераза III с субъединицей Rpc53, имеющей только этот домен, термолабильна. Самая большая субъединица РНК-полимеразы III способна супрессировать термочувствительный фенотип клеток, вызванный такой мутацией по Rpc53, что говорит о взаимодействии этих двух белков. Другим партнером Rpc53 является специфическая субъединица РНК-полимеразы III Rpc37. С помощью дрожжевой двухгибридной системы продемонстрировано взаимодействие *in vivo* Rpc53 с τ_{131} , компонентом фактора TFIIC [36]. Эти данные могут свидетельствовать о возможной роли Rpc53 в инициации и элонгации транскрипции. Действительно, антитела к Rpc53 блокируют специфическую транскрипцию генов тРНК [164].

Rpc37. По данным дрожжевой двухгибридной системы Rpc37 взаимодействует с Rpc53 [36]. Такой результат согласуется с результатом опыта по коиммунопреципитации, в котором показано взаимодействие между собой субъединиц РНК-полимеразы III *H. sapiens*, гомологичных Rpc37 и Rpc53 [165].

Rpc25 и Rpc17. Субъединица Rpc25 родственна субъединице Rpb7 РНК-полимеразы II (25% идентичных и 50% консервативных а.о.), а также субъединице E РНК-полимеразы архей [30, 166]. Так же, как и Rpb7, Rpc25 присутствует в РНК-полимеразе в субмолярном отношении и легко диссоциирует от фермента.

Гомолог Rpc17, первоначально описанный как компонент рецептора CGRP (calcitonin gene-related peptide) [167], впоследствии был обнаружен в высокоочищенном препарате РНК-полимеразы III человека [165]. Поиск гомологов субъединицы Rpc17 выявил некоторое сходство ее консервативного домена с доменом субъединицы РНК-полимеразы II Rpb4. Более того, с использованием супрессорного анализа, двухгибридной системы и коиммунопреципитации, взаимодействия, подобное Rpb7 и Rpb4, показано и для Rpc25 с Rpc17 [165, 168]. Это позволяет отнести Rpc17 и Rpc25 к субъединицам, родственным Rpb4 и Rpb7.

В экспериментах с использованием дрожжевой двухгибридной системы и коиммунопреципитации показано, что Rpc17 взаимодействует с Rpc11, Rpc31 и TFII70 (компонентом фактора TFIIIB, родственным TFIIIB) [36, 169]. Таким образом, вероятно, Rpc17 наряду с Rpc34 участвует в рекрутировании РНК-полимеразы III к прединициаторному комплексу.

Rpc11. Субъединица Rpc11 родственна субъединицам Rpa12 и Rpb9, соответственно, РНК-полимераз I и II [133]. Rpc11 содержит два цинксвязывающих домена, гомологичных доменам Rpa12 и Rpb9, которые соединены варибельным линкером. С-концевые участки этих белков проявляют также высокую степень гомологии с цинксвязывающим доменом фактора элонгации TFIIIS [170, 171].

В опытах *in vitro* показано, что в отсутствие Rpc11 у РНК-полимеразы III проявляются значительные дефекты в элонгации и терминеции транскрипции. Выяснилось также, что Rpc11 необходима для расщепления РНК в тройном элонгационном комплексе, которое в случае РНК-полимеразы III происходит без дополнительного участия элонгационных факторов [133].

По данным дрожжевой двухгибридной системы Rpc11 взаимодействует с N-концевым районом Rpc2, второй по величине субъединицы РНК-полимеразы III. С эквивалентными доменами Rpa2 и Rpb2 РНК-полимераз I и II взаимодействуют, соответственно, субъединицы Rpa12 и Rpb9 [36].

Опыты по разрушению генов в дрожжах показали, что все субъединицы РНК-полимеразы III *S. cerevisiae* являются незаменимыми [18, 133, 169, 172].

VII. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КОНСЕРВАТИВНОСТЬ РНК-ПОЛИМЕРАЗ I—III

Сравнение структур бактериальной РНК-полимеразы и ядерной РНК-полимеразы II позволяет сделать вывод о значительном сходстве между ними, заключающемся в общем плане строения, относительном расположении гомологичных субъединиц и функциональных детерминант в ферментных комплексах, а также в фолдинге отдельных белковых доменов (рис. 4) [6, 10, 94]. Консервативные элементы локализованы в районе активного центра, сайтов связывания гибридного участка РНК-ДНК и «нижнего» дуплекса ДНК, а также вторичного канала. По-видимому, все многосубъединичные РНК-полимеразы имеют сходную структуру центрального ядра (кора), что соответствует консервативному в эволюции механизму катализа. Однако разные ферменты различаются в периферийной части и на поверхности, где происходят взаимодействия с другими специфическими регуляторными белками.

Практически все субъединицы РНК-полимеразы II имеют гомологичные или идентичные (в случае общих) субъединицы в составе РНК-полимераз I и III. О высокой степени консервативности ядерных РНК-полимераз I—III даже эволюционно далеких видов говорит способность ряда субъединиц этих ферментов из разных организмов быть взаимозаменяемыми в клетках *S. cerevisiae* [88, 113, 173—176]. Одной из самых эволюционно консервативных субъединиц можно считать

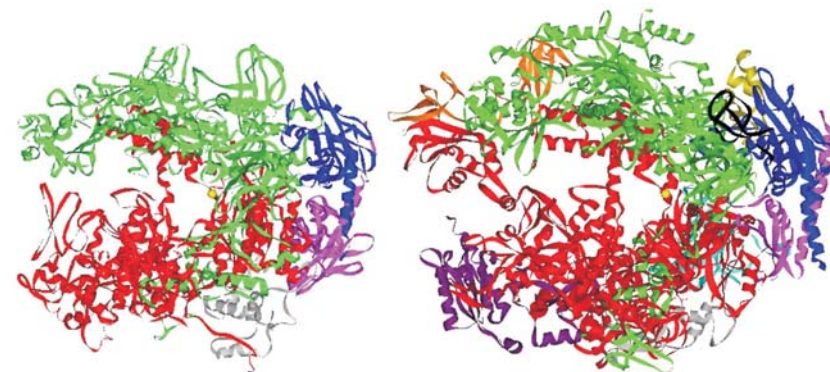


Рис. 4. Структуры (А) бактериальной (из *Thermus aquaticus*) РНК-полимеразы и (Б) эукариотической РНК-полимеразы II (из *S. cerevisiae*). Родственные субъединицы показаны одинаковым цветом (цветовое обозначение — как на рис. 1). Рисунок подготовлен с помощью программы DS ViewerPro 5.0, используя координаты соответствующих РНК-полимераз из банка белковых структур PDB (номера депонирования 1HQM и 1I3Q) (см. также [6, 11]).

общую субъединицу РНК-полимераз I–III Rpb6. Ген *RPB6 S. cerevisiae* может быть заменен *in vivo* на его ортологи из *Schizosaccharomyces pombe* [173], *Cricetulus griseus* [174], *Homo sapiens* [113] и *Drosophila melanogaster* [113]. Некоторые субъединицы (например, hRPB8 *H. sapiens* [113]) могут выполнять функцию соответствующего белка из *S. cerevisiae* лишь частично (например, только при оптимальной температуре), приводя к образованию условных (термочувствительных) мутантов. Анализ супрессоров такого рода мутантов позволяет получить ценную информацию о взаимодействии субъединиц в составе соответствующих ферментных комплексов.

Недавно мы завершили клонирование кДНК всех субъединиц ядерных РНК-полимераз I–III *Sch. pombe* и изучили их способность функционально заменять *in vivo* соответствующие компоненты базового аппарата транскрипции *S. cerevisiae*. Такое попарное сравнение различных экспрессирующихся кДНК, поставляемых в составе высоко- и/или низкокопийных векторов, показало, что 16 из 30 протестированных субъединиц взаимозаменяемы между двумя эволюционно далекими видами дрожжей [176]. Многие из полученных нами в ходе опытов по межвидовой комплементации штаммов с четким условным фенотипом были подвергнуты супрессорному анализу, что позволило выявить важные функциональные домены ряда субъединиц [109, 114, 177].

При столь значительном структурном сходстве между РНК-полимеразами наибольший интерес представляют те специфические особенности, которые можно выявить при сравнении, в частности, компонентов ядерных РНК-полимераз II человека и дрожжей. Работа в этом направлении уже начата [177, 178, 179].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накоплен большой объем информации о структуре и функциях транскрипционного аппарата эукариотических организмов, что открывает новые области для исследований. Вместе с тем, до сих пор нет четкого понимания на молекулярном уровне того, как происходит транскрипция на хроматиновой матрице, каковы функции ряда специфических субъединиц РНК-полимераз I–III, все еще не выяснены многие детали работы РНК-полимеразы. Предстоит еще экспериментально проверить ряд гипотез, сделанных на основе анализа пространственных структур многосубъединичных РНК-полимераз. Несомненно, что ответы на многие из этих вопросов будут получены уже в ближайшем будущем.

ЛИТЕРАТУРА

- Hedtko, B., Borner, T., Weihe, A. (1997) Science, **277**, 809–811.
- Katsafanas, G.C., Moss, B. (1999) Virology, **258**, 469–479.
- Yanez, R.J., Rodriguez, J.M., Nogal, M.L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J.F., Vinuela, E. (1995) Virology, **208**, 249–278.
- Jakob, N.J., Muller, K., Bahr, U., Darai, G. (2001) Virology, **286**, 182–196.
- Thuriaux, P., Sentenac, A. (1992) In Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression. Eds. Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, J.R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Vol. **2**, 1–48.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A. (1999) Cell, **98**, 811–824.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., Yokoyama, S. (2002) Nature, **417**, 712–719.
- Murakami, K.S., Masuda, S., Darst, S.A. (2002) Science, **296**, 1280–1284.
- Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O., Darst, S.A. (2002) Science, **296**, 1285–1290.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R., Kornberg, R.D. (2000) Science, **288**, 640–649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2001) Science, **292**, 1863–1876.
- Armache, K.J., Kettenberger, H., Cramer, P. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 6964–6968.
- Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 6969–6973.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2001) Science, **292**, 1876–1882.
- Westover, K.D., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2004) Science, **303**, 1014–1016.
- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., Kornberg, R.D. (2004) Science, **303**, 983–988.
- Kettenberger, H., Armache, K.J., Cramer, P. (2003) Cell, **114**, 347–357.
- Sentenac, A., Riva, M., Thuriaux, P., Buhler, J.-M., Treich, I., Carles, C., Werner, M., Ruet, A., Huet, J., Mann, C., Chiannilkulchai, N., Stettler, S., Mariotte, S. (1992) Yeast RNA polymerase subunits and genes. In Transcriptional Regulation. Eds. McKnight, S.L., Yamamoto, K.R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 27–54.
- Puhler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H.P., Lottspeich, F., Garrett, R.A., Zillig, W. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 4569–4573.
- Sweetser, D., Nonet, M., Young, R.A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 1192–1196.
- Lalo, D., Carles, C., Sentenac, A., Thuriaux, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 5524–5528.
- Woychik, N.A., McKune, K., Lane, W.S., Young, R.A. (1993) Gene Expr., **3**, 77–82.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, R.H., Severinov, K. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 892–897.
- Buhler, J.M., Iborra, F., Sentenac, A., Fromageot, P. (1976) J. Biol. Chem., **251**, 1712–1717.
- Woychik, N.A., Liao, S.-M., Kolodziej, P.A., Young, R.A. (1990) Genes Dev., **4**, 313–323.
- Woychik, N.A., Young, R.A. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 17816–17819.
- Carles, C., Treich, I., Bouet, F., Riva, M., Sentenac, A. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 24092–24096.
- Treich, I., Carles, C., Riva, M., Sentenac, A. (1992) Gene Expr., **2**, 31–37.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., Zillig, W. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 5768–5772.

30. Werner, F., Eloranta, J.J., Weinzierl, R.O. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4299–4305.
31. Шематорова Е.К., Шпаковский Г.В. (2002) *Мол. биология*, **36**, 1–24.
32. Прошкина Г.М., Шпаковский Г.В. (2003) *Успехи биол. химии*, **43**, 139–162.
33. Darst, S., Edwards, A.M., Kubalek, E.W., Kornberg, R.D. (1991) *Cell*, **66**, 121–128.
34. Poglitsch, C.L., Meredith, G.D., Gnatt, A.L., Jensen, G.J., Chang, W.H., Fu, J., Kornberg, R.D. (1999) *Cell*, **98**, 791–798.
35. Bischler, N., Brino, L., Carles, C., Riva, M., Tschochner, H., Mallouh, V., Schultz, P. (2002) *EMBO J.*, **21**, 4136–4144.
36. Flores, A., Briand, J.F., Gadal, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Gousso, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A., Werner, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7815–7820.
37. Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M., Ingles, C.J. (1985) *Cell*, **42**, 599–610.
38. Corden, J.L., Cadena, D.L., Ahearn, J.M., Jr., Dahmus, M.E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7934–7938.
39. Nonet, M., Sweetser, D., Young, R.A. (1987) *Cell*, **50**, 909–915.
40. Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S., Greenleaf, A.L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3698–3702.
41. Liao, S.-M., Taylor, I.C.A., Kingston, R.E., Young, R.A. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 2431–2440.
42. Hirose, Y., Manley, J.L. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1415–1429.
43. Proudfoot, N.J., Furger, A., Dye, M.J. (2002) *Cell*, **108**, 501–512.
44. Buratowski, S. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 679–680.
45. Cagas, P.M., Corden, J.L. (1995) *Proteins*, **21**, 149–160.
46. Verdecia, M.A., Bowman, M.E., Lu, K.P., Hunter, T., Noel, J.P. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 639–643.
47. Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S., Lima, C.D. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 1549–1561.
48. Meinhart, A., Cramer, P. (2004) *Nature*, **430**, 223–226.
49. Nudler, E., Gusarov, I., Avetisova, E., Kozlov, M., Goldfarb, A. (1998) *Science*, **281**, 424–428.
50. Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S.A. (2000) *Science*, **289**, 619–625.
51. Wooddell, C.I., Burgess, R.R. (2000) *Biochemistry*, **39**, 13405–13421.
52. Nudler, E. (1999) *J. Mol. Biol.*, **288**, 1–12.
53. Rice, G.A., Chamberlin, M.J., Kane, C.M. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 113–118.
54. Bartholomew, B., Durkovich, D., Kasavetis, G.A., Geiduschek, E.P. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 942–952.
55. Kim, T.K., Lagrange, T., Wang, Y.H., Griffith, J.D., Reinberg, D., Ebricht, R.H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12268–12273.
56. Rice, G.A., Kane, C.M., Chamberlin, M.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4245–4249.
57. Kuznedelov, K., Korzheva, N., Mustaev, A., Severinov, K. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1369–1378.
58. Craighead, J., Chang, W.-h., Asturias, F.J. (2002) *Structure*, **10**, 1117–1125.
59. Nudler, E., Avetisova, E., Markovtsov, V., Goldfarb, A. (1996) *Science*, **273**, 211–217.
60. Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., Goldfarb, A. (1997) *Cell*, **89**, 33–41.
61. Sidorenkov, I., Komissarova, N., Kashlev, M. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 55–64.
62. Kireeva, M.L., Komissarova, N., Kashlev, M. (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 325–335.
63. Kireeva, M.L., Komissarova, N., Waugh, D.S., Kashlev, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 6530–6536.
64. Fish, R.N., Kane, C.M. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 287–307.

65. Aso, T., Lane, W.S., Conaway, J.W., Conaway, R.C. (1995) *Science*, **269**, 1439–1443.
66. Park, J.S., Marr, M.T., Roberts, J.W. (2002) *Cell*, **109**, 757–767.
67. Epshtein, V., Nudler, E. (2003) *Science*, **300**, 801–805.
68. Epshtein, V., Toulme, F., Rahmouni, A.R., Borukhov, S., Nudler, E. (2003) *EMBO J.*, **22**, 4719–4727.
69. Bushnell, D.A., Cramer, P., Kornberg, R.D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1218–1222.
70. Никуфоров В.Г. (2002) *Мол. биология*, **36**, 197–207.
71. Steitz, T. (1998) *Nature*, **391**, 231–232.
72. Mustaev, A., Kozlov, M., Markovtsov, V., Zaychikov, E., Denissova, L., Goldfarb, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6641–6645.
73. Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Mustaev, A. (1996) *Science*, **273**, 107–109.
74. Dieci, G., Hermann-Le Denmat, S., Lukhtanov, E., Thuriaux, P., Werner, M., Sentenac, A. (1995) *EMBO J.*, **14**, 3766–3776.
75. Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., Goldfarb, A. (2003) *EMBO J.*, **22**, 2234–2244.
76. Laptenko, O., Lee, J., Lomakin, I., Borukhov, S. (2003) *EMBO J.*, **22**, 6322–6334.
77. Sosunova, E., Sosunov, V., Kozlov, M., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Mustaev, A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15469–15474.
78. Opalka, N., Chlenov, M., Chacon, P., Rice, W.J., Wriggers, W., Darst, S.A. (2003) *Cell*, **114**, 335–345.
79. Grachev, M.A., Lukhtanov, E.A., Mustaev, A.A., Zaychikov, E.F., Abdukayumov, M.N., Rabinov, I.V., Richter, V.I., Skoblov, Y.S., Chistyakov, P.G. (1989) *Eur. J. Biochem.*, **180**, 577–585.
80. Riva, M., Schaffner, A.R., Sentenac, A., Hartmann, G.R., Mustaev, A.A., Zaychikov, E.F., Grachev, M.A. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 14377–14380.
81. Riva, M., Carles, C., Sentenac, A., Grachev, M.A., Mustaev, A.A., Zaychikov, E.F. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 16498–16503.
82. Mustaev, A., Kashlev, M., Lee, J.Y., Polyakov, A., Lebedev, A., Zalenskaya, K., Grachev, M., Goldfarb, A., Nikiforov, V. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 23927–23931.
83. Svetlov, V., Vassilyev, D.G., Artsimovitch, I. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 38087–38090.
84. Erie, D.A., Hajiseyidjavad, O., Young, M.C., von Hippel, P.H. (1993) *Science*, **262**, 867–873.
85. Thomas, M.J., Platas, A.A., Hawley, D.K. (1998) *Cell*, **93**, 627–637.
86. Zhang, G., Darst, S.A. (1998) *Science*, **281**, 262–266.
87. Ulmasov, T., Larkin, R.M., Guilfoyle, T.J. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 5085–5094.
88. Shpakovski, G.V., Gadal, O., Labarre-Mariotte, S., Lebedenko, E.N., Miklos, I., Sakurai, H., Proshkin, S.A., Van Mullem, V., Ishihama, A., Thuriaux, P. (2000) *J. Mol. Biol.*, **295**, 1119–1127.
89. Larkin, R.M., Guilfoyle, T.J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12824–12830.
90. Ishihama, A. (1981) *Adv. Biophys.*, **14**, 1–35.
91. Kolodziej, P.A., Young, R.A. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4669–4678.
92. Kimura, M., Ishiguro, A., Ishihama, A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25851–25855.
93. Svetlov, V., Nolan, K., Burgess, R.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 10827–10830.
94. Ebricht, R.H. (2000) *J. Mol. Biol.*, **304**, 687–698.
95. Lee, T.I., Young, R.A. (2000) *Annu. Rev. Genet.*, **34**, 77–137.
96. Myers, L.C., Kornberg, R.D. (2000) *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 729–749.
97. Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., Asturias, F.A. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 409–415.

98. Tan, Q., Linask, K.L., Ebright, R.H., Woychik, N.A. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 339–348.
99. Todone, F., Weinzierl, R.O., Brick, P., Onesti, S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6306–6310.
100. Miyao, T., Woychik, N.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15281–15286.
101. Cheong, J.H., Yi, M., Lin, Y., Murakami, S. (1995) *EMBO J.*, **14**, 143–150.
102. Makino, Y., Yogosawa, S., Kayukawa, K., Coin, F., Egly, J.M., Wang, Z., Roeder, R.G., Yamamoto, K., Muramatsu, M., Tamura, T. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7951–7960.
103. Bertolotti, A., Melot, T., Acker, J., Vigneron, M., Delattre, O., Tora, L. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1489–1497.
104. Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K., Murakami, S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 7132–7139.
105. Wei, W., Dorjsuren, D., Lin, Y., Qin, W., Nomura, T., Hayashi, N., Murakami, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 12266–12273.
106. del Rio-Portilla, F., Gaskell, A., Gilbert, D., Ladias, J.A., Wagner, G. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1039–1042.
107. Kayukawa, K., Makino, Y., Yogosawa, S., Tamura, T. (1999) *Gene*, **234**, 139–147.
108. Nouraini, S., Archambault, J., Friesen, J.D. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5985–5996.
109. Briand, J.F., Navarro, F., Rematier, P., Boschiero, C., Labarre, S., Werner, M., Shpakovski, G.V., Thuriaux, P. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6056–6065.
110. Lanzendorfer, M., Smid, A., Klinger, C., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., Riva, M. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 1037–1047.
111. Krapp, S., Kelly, G., Reischl, J., Weinzierl, R.O., Matthews, S. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 110–114.
112. Voutsina, A., Riva, M., Carles, C., Alexandraki, D. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1047–1055.
113. Shpakovski, G.V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J.F., Thuriaux, P., Vigneron, M. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4702–4710.
114. Gadal, O., Shpakovski, G.V., Thuriaux, P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 8421–8427.
115. Mackereth, C.D., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., McIntosh, L.P. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6316–6321.
116. Eloranta, J.J., Kato, A., Teng, M.S., Weinzierl, R.O. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5562–5567.
117. Lanzendorfer, M., Langer, D., Hain, J., Klenk, H.P., Holz, I., Arnold-Ammer, I., Zillig, W. (1994) *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, 656–664.
118. Werner, F., Weinzierl, R.O. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 635–646.
119. Rubbi, L., Labarre-Mariotte, S., Chedin, S., Thuriaux, P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 31485–31492.
120. Dumay, H., Rubbi, L., Sentenac, A., Marck, C. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 33462–33468.
121. Schlegel, B.P., Green, V.J., Ladias, J.A., Parvin, J.D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3148–3153.
122. Liljelund, P., Mariotte, S., Buhler, J.M., Sentenac, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9302–9305.
123. Hanada, K., Song, C.Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K., Muramatsu, M. (1996) *EMBO J.*, **15**, 2217–2226.
124. Thuriaux, P., Mariotte, S., Buhler, J.M., Sentenac, A., Vu, L., Lee, B.S., Nomura, M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24252–24257.
125. Smid, A., Riva, M., Bouet, F., Sentenac, A., Carles, C. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 13534–13540.
126. Peyroche, G., Levillain, E., Siaut, M., Callebaut, I., Schultz, P., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14670–14675.
127. Шпаковский Г.В., Шематорова Е.К. (1999) *Биоорганическая химия*, **25**, 791–796.

128. Meka, H., Daoust, G., Arnvig, K.B., Werner, F., Brick, P., Onesti, S. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4391–4400.
129. Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., Riva, M. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5473–5482.
130. Gadal, O., Mariotte-Labarre, S., Chedin, S., Quemeneur, E., Carles, C., Sentenac, A., Thuriaux, P. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1787–1795.
131. Nogi, Y., Yano, R., Dodd, J., Carles, C., and Nomura, M. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 114–122.
132. Van Mullem, V., Landrieux, E., Vandenhaute, J., Thuriaux, P. (2002) *Mol. Microbiol.*, **43**, 1105–1113.
133. Chedin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 3857–3871.
134. Prescott, E.M., Osheim, Y.N., Jones, H.S., Alen, C.M., Roan, J.G., Reeder, R.H., Beyer, A.L., Proudfoot, N.J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6068–6073.
135. Dezelee, S., Wyers, F., Sentenac, A., Fromageot, P. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **65**, 543–552.
136. Edwards, A.M., Kane, C.M., Young, R.A., Kornberg, R.D. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 71–75.
137. Ruet, A., Sentenac, A., Fromageot, P., Winsor, B., Lacroute, F. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 6450–6455.
138. Choder, M., Young, R.A. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6984–6991.
139. Woychik, N.A., Young, R.A. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2854–2859.
140. McKune, K., Richards, K.L., Edwaeds, A.M., Young, R.A., Woychik, N.A. (1993) *Yeast*, **9**, 295–299.
141. Sheffer, A., Varon, M., Choder, M. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2672–2680.
142. Pillai, B., Sampath, V., Sharma, N., Sadhale, P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 30641–30647.
143. Todone, F., Brick, P., Werner, F., Weinzierl, R.O., Onesti, S. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 1137–1143.
144. Tan, Q., Prysak, M.H., Woychik, N.A. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3329–3338.
145. Orlicky, S.M., Tran, P., Sayre, M.H., Edwards, A.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 10097–10102.
146. Kimura, M., Suzuki, H., Ishihama, A. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1577–1588.
147. Woychik, N.A., Lane, W.S., Young, R.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 19053–19055.
148. Harrison, D.A., Mortin, M.A., Corces, V.G. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 928–935.
149. Furter-Graves, E.M., Hall, B.D., Furter, R. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4932–4936.
150. Hull, M.W., McKune, K., Woychik, N.A. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 481–490.
151. Sun, Z.-W., Tessimier, A., Hampsey, M. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2560–2566.
152. Hemming, S.A., Jansma, D.B., Macgregor, P.F., Goryachev, A., Friesen, J.D., Edwards, A.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35506–35511.
153. Awrey, D.E., Weibaecher, R.G., Hemming, S.A., Orlicky, S.M., Kane, C.M., Edwards, A.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 14747–14754.
154. Hemming, S.A., Edwards, A.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 2288–2294.
155. Van Mullem, V., Wery, M., Werner, M., Vandenhaute, J., Thuriaux, P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 10220–10225.
156. Valenzuela, P., Hager, G.L., Weinberg, F., Rutter, W.J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1024–1028.
157. Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A., Thuriaux, P. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1087–1095.
158. Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M., Sentenac, A. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 20721–20724.
159. Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P., Werner, M. (1995) *EMBO J.*, **14**, 351–359.
160. Chiannikulchai, N., Stalder, R., Riva, M., Carles, C., Werner, M., Sentenac,

- A. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 4433–4400.
161. Brun, I., Sentenac, A., Werner, M. (1997) *EMBO J.*, **16**, 5730–5741.
162. Wang, Z., Roeder, R.G. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 1315–1326.
163. Chiannilkulchai, N., Moenne, A., Sentenac, A., Mann, C. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23099–23107.
164. Huet, J., Riva, M., Sentenac, A., Fromageot, P. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 15304–15310.
165. Hu, P., Sun, Y., Yuan, C.-C., Kobayashi, R., Myers, M.P., Hernandez, N. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8044–8055.
166. Sadhale, P.P., Woychik, N.A. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6164–6170.
167. Luebke, A.E., Dahl, G.P., Roos, B.A., Dickerson, I.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3455–3460.
168. Siaux, M., Zaros, C., Levivier, E., Ferri, M.L., Court, M., Werner, M., Callebaut, I., Thuriaux, P., Sentenac, A., Conesa, C. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 195–205.
169. Ferri, M.L., Peyroche, G., Siaux, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., Sentenac, A. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 488–495.
170. Qian, X., Jeon, C., Yoon, H., Agarwal, K., Weiss, M.A. (1993) *Nature*, **365**, 277–279.
171. Wang, B., Jones, D.N., Kaine, B.P., Weiss, M.A. (1998) *Structure*, **6**, 555–569.
172. Chedin, S., Ferri, M.L., Peyroche, G., Andrau, J.C., Jourdain, S., Lefebvre, O., Werner, M., Carles, C., Sentenac, A. (1998) *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **63**, 381–389.
173. Shpakovski, G.V. (1994) *Gene*, **147**, 63–69.
174. McKune, K., Woychik, N.A. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4155–4159.
175. McKune, K., Moore, P.A., Hull, M.W., Woychik, N.A. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6895–6900.
176. Shpakovski, G.V., Proshkina, G.M., Proshkin, S.A., Shematorova, E.K. (2002) Abstracts of papers presented on The Second International Fission Yeast Meeting (Kyoto, Japan), p. 180.
177. Grandemange, S., Schaller, S., Yamano, S., Du Manoir, S., Shpakovski, G.V., Mattei, M.G., Kedinger, C., Vigneron, M. (2001) *BMC Mol. Biol.*, **2**, 14.
178. Durrin, L.K., Krontiris, T.G. (2002) *Genomics*, **79**, 809–817.
179. Шпаковский Г.В. (2002) Структурно-функциональная консервативность и взаимодействие основных компонентов ядерных РНК-полимераз I, II и III эукариот. Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора биологических наук. М.: ИБХ РАН. 50 с.