

61:02-3 / 1200-3

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

БЕЛОУСОВ Евгений Валерьевич

**Некоторые аспекты нерепликативной рекомбинации между
фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита**

03. 00. 06 – вирусология

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
член-корреспондент РАН и РАМН,
доктор биологических наук,
профессор В. И. Агол.

кандидат биологических наук
А. П. Гмыль

Москва - 2002

Содержание.

1. Введение	5
2. Обзор литературы	11
<i>2.1 Механизмы генетической рекомбинации РНК-содержащих вирусов.....</i>	<i>11</i>
<i>2.1.1 Репликативная модель смены матрицы</i>	<i>11</i>
<i>2.1.2 Модель разрыв-лигирование.....</i>	<i>35</i>
<i>2.1.3 Возможные механизмы нерепликативной рекомбинации.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2 Структура 5'-НТО вируса полиомиелита.....</i>	<i>56</i>
3 Материалы и методы	62
<i>3.1 Ферменты и реагенты.....</i>	<i>62</i>
<i>3.2 Плазмиды</i>	<i>62</i>
<i>3.3 Бактериальные штаммы.....</i>	<i>63</i>
<i>3.4 Синтетические олигонуклеотиды</i>	<i>64</i>
<i>3.5 Базовые методы молекулярного клонирования</i>	<i>65</i>
<i>3.6 Направляемый олигонуклеотидами мутагенез</i>	<i>70</i>
<i>3.7 Получение полноразмерных мутантных клонов полiovирусной кДНК.....</i>	<i>72</i>
<i>3.8 Создание рабочих конструкций.....</i>	<i>74</i>
<i>3.9. Получение полноразмерных транскриптов.</i>	<i>82</i>
<i>3.10 Трансфекция монослоя культуры клеток.....</i>	<i>84</i>
<i>3.11 Анализ вирусных клонов.....</i>	<i>85</i>
<i>3.12 Модификация 3'-концевого нуклеотида РНК 5'-фрагмента.....</i>	<i>89</i>
4. Результаты.....	93
<i>4.1 Конструирование 5'- и 3'-фрагментов геномной РНК вируса полиомиелита ..</i>	<i>94</i>
<i>4.2 Неинфекционные фрагменты геномной РНК могут рекомбинировать с образованием инфекционного потомства</i>	<i>101</i>

4.3 Влияние структуры 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента на эффективность рекомбинации и распределение мест перекреста	105
4.4 Изучение возможного участия криптических рибозимов типа hammerhead в рекомбинации между фрагментами РНК	109
5.Обсуждение результатов.....	124
5.1 Рекомбинация между фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита идет по нерепликативному механизму	124
5.2 Механизм нерепликативной рекомбинации между фрагментами РНК.....	132
5.2.1 Образование рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента.....	133
5.2.2 Участие криптических рибозимов типа hammerhead в нерепликативной рекомбинации между фрагментами РНК вируса полиомиелита	138
6. Выводы.....	141
7. Список литературы	142

Список сокращений

(d, dd)ATP - (дезокси, дидезокси) аденоzinтрифосфат;
(d, dd)GTP - (дезокси, дидезокси) гуанозинтрифосфат;
(d, dd)CTP - (дезокси, дидезокси) цитидинтрифосфат;
(d, dd)TTP - (дезокси, дидезокси) тимидинтрифосфат;
(d)NTP - (дезокси) нуклеозидтрифосфаты;
(d)UTP - (дезокси) уридинтрифосфат;
нт – нуклеотид (ы);
HTO - нетранслируемая область;
IRES - от английского “Internal Ribosome Entry Site” - внутренний участок присоединения рибосомы;
ОАТ - олигопиримидин/AUG tandem;
КПЗМ - клетки почек зеленых мартышек;
TMEV - вирус энцефаломиелита мышей Тейлера;
MHV – вирус мышиного гепатита;
BMV - вирус мозаики костра;
BVDV - вирус бычьей диареи;
CMV - вирус мозаики огурца;
CCMV - вирус хлоротической пятнистости коровьего горошка;
TCV – вирус скрученности турнепса;
DTT - дитиотреит;
DMSO - диметилсульфоксид;
EDTA - этилендиаминотетраацетат;
MOPS - морфолинпропансульфоновая кислота;
SDS - додецилсульфат натрия;
TMED - тетраметилэтилендиамин;
ПААГ - полиакриламидный гель;
ПЭГ - полиэтиленгликоль;
OPC - открытая рамка считывания;
RT – обратная транскрипция;
PCR – полимеразная цепная реакция
ts – температурочувствительный фенотип
gr - гуанидин резистентный фенотип.

1. Введение.

РНК-рекомбинация – процесс образования новых (дочерних) последовательностей РНК из двух или нескольких предшествующих (родительских) молекул РНК. Под такое определение рекомбинации попадают известные различные перестройки РНК-геномов, такие как вставки, делеции, образование химерных молекул РНК.

Первые данные в пользу генетической рекомбинации между двумя несегментированными РНК-геномами были получены на примере вируса полиомиелита (Ledinko et al., 1963). Смешанная инфекция двумя штаммами полiovirusа, несущими разные фенотипические маркеры (такие, как устойчивость к небольшим концентрациям гуанидина.HCl или ингибиторам, присутствующим в некоторых пулах лошадиной или бычьей сыворотки), приводила к появлению вариантов вируса, содержащих оба фенотипических маркера. Так как частота появления вируса с «двойным» фенотипом была выше, чем частота спонтанных мутаций, было предположено, что образовавшийся вирус является продуктом рекомбинации между молекулами РНК исходных вирусов. Используя тот же подход, было показано, что вирус ящура также способен рекомбинировать с образованием вирусов с «двойным» фенотипом (Pringle, 1965).

P. D. Cooper с соавторами, используя набор температурочувствительных мутантов полiovirusа, определял частоту рекомбинации между разными парами маркеров. Обнаруженные частоты рекомбинации позволили построить карты сцепления данных маркеров, где расстояние между маркерами было пропорционально частоте рекомбинации между ними (Cooper, 1968). Полученные частоты рекомбинации были аддитивны по отношению к любой

паре маркеров и позволяли расположить их линейно по геному. Несколько позднее подобные карты были получены для вируса ящура (Lake et al., 1975; McCahon et al., 1977). Возможность построения таких карт является сильным аргументом в пользу рекомбинации между РНК-геномами (Lai, 1992). Дальнейшие исследования показали (McCaughan et al., 1885; Kirkegaard and Baltimore, 1986; Agut et al., 1987; King 1988a), что места перекреста у рекомбинантов принципиально могут располагаться на любом участке вирусного генома (см. также обзоры King, 1988b; Lai, 1992; Agol, 1997).

Первые биохимические доказательства в пользу РНК-рекомбинации были получены в результате анализа структурных и неструктурных белков рекомбинантных вирусов полиомиелита (Romanova et al., 1980; Tolskaya et al., 1983) и вируса ящура (King et al., 1982).

Определение первичной структуры мест перекреста рекомбинантных вирусов окончательно доказало, что их последовательности произошли от разных молекул РНК (Romanova et al., 1986; Kirkegaard and Baltimore, 1986).

Вторым семейством РНК-содержащих вирусов, на представителях которого была доказана возможность рекомбинации между РНК геномами, являются коронавирусы (см. обзор Lai, 1992). При смешанной инфекции двумя различными штаммами (A59 и JHM) вируса мышного гепатита (MHV), содержащих в качестве фенотипических маркеров температурочувствительные мутации, при непермиссивной температуре было получено инфекционное потомство (Lai, 1985). Полученный вирус был представлен рекомбинантной РНК, содержащей 5'-концевой участок (приблизительно 3000 нт) от геномной РНК JHM, тогда как остальная часть вирусного генома соответствовала штаму A59 (Lai, 1985).

В дальнейшем рекомбинанты у коронавирусов были получены при использовании в качестве фенотипических маркеров температурочувствительных мутаций (Keck et al., 1987, 1988; Makino et al., 1986), способность вызывать слияние клеток, устойчивость к нейтрализующему действию моноклональных антител (Makino et al., 1987). Характерной особенностью рекомбинации коронавирусов является наличие множественных мест перекреста. Места перекреста располагались не только на участке между селективными маркерами, но и за его пределами (Makino et al., 1987; Keck et al., 1988). Так как эти случаи рекомбинации не требовали какого-либо селективного давления, то подобная структура рекомбинантов говорит о высоком рекомбинационном потенциале геномной РНК коронавирусов (Lai, 1992). И хотя первые данные свидетельствовали, что места перекреста концентрируются в 5'-концевой области генома (Lai et al., 1985; Makino et al., 1986; Keck et al., 1987), в последующих работах были описаны рекомбинанты, места перекреста которых были распределены по всему геному соответствующих вирусов (Makino et al., 1987; Keck et al., 1988).

Полученные частоты рекомбинации при скрещивании вирусов мышного гепатита [A59], содержащих различные температурочувствительные мутации, так же позволили построить линейную аддитивную карту сцепления данных фенотипических маркеров на 5'-участке генома длиной 23000 нуклеотидов. (Baric et al., 1990).

Впервые РНК-рекомбинация у вирусов растений была продемонстрирована у представителей семейств: бромовирусов (вирус мозаики костра; Bujarski and Kaesberg, 1986), кармовирусов (вирус скрученностии турнепса; Cascone et al., 1990). Первые данные по РНК-рекомбинации у

бактериофагов были получены на примере фага Q β (Munishkin et al., 1988).

За последнее время РНК-рекомбинация была описана для многих РНК-содержащих вирусов животных, растений и бактерий (см. обзоры Lai, 1992; Agol, 1997; Nagy and Simon, 1997; Aaziz and Tepfler, 1999). При этом частота рекомбинации у некоторых вирусов (пикорна – и коронавирусов) сравнима с частотой ДНК-рекомбинации (King 1988b; Lai, 1992). Таким образом, становится ясно, что РНК-рекомбинация у РНК-содержащих вирусов выполняет определенные общебиологические функции. Во-первых, она может выполнять репаративную функцию. Как известно, ни одна из РНК-зависимых РНК-полимераз и обратных транскриптаз не обладают корректирующей активностью, что обуславливает относительно высокий уровень частоты спонтанных мутаций при репликации геномной РНК (см. обзоры Lai, 1992; Domingo et al., 1996; Domingo and Holland, 1997). Частота ошибочного встраивания у различных РНК-полимераз от 10^{-3} до 10^{-5} говорит о том, что каждая реплицированная молекула РНК будет содержать 0.1-10 мутаций (если геномная РНК вируса состоит из 10000 нуклеотидов) (Domingo and Holland, 1997; Sierra et al., 2000; Crotty et al., 2001). Следовательно, вирусы должны иметь в распоряжении определенные механизмы, которые могут устранять спонтанные мутации или компенсировать их негативное фенотипическое проявление. РНК-рекомбинация может быть таким механизмом, который за счет замены участков генома на гомологичные последовательности устраняет функционально значимые ошибки (King 1988b; Lai, 1992; Nagy and Simon, 1997).

Во-вторых, РНК-рекомбинация – один из механизмов эволюции РНК-содержащих вирусов. При этом предполагается, что образование вирусов с

новыми фенотипическими признаками может идти по блочному способу, за счет передачи друг другу функционально значимых модулей посредством генетической РНК-рекомбинации (Lai, 1992; Simon and Bujarski, 1994).

Итак, РНК-рекомбинация, с одной стороны, выполняя репарационные функции, устраняет различные изменения первичной структуры вирусного генома. С другой – играет важную роль в эволюционном развитии вирусов. Следовательно, изучение механизмов рекомбинации у РНК-содержащих вирусов является одной из важных биологических задач.

Для объяснения механизма РНК-рекомбинации разработаны две принципиально отличающиеся модели: репликативная и нерепликативная.

(1) *Репликативная модель, или модель смены матрицы.* Согласно этой модели, различные перестройки молекул РНК обусловлены способностью РНК-зависимой РНК-полимеразы менять матрицу при репликации родительских геномов.

(2) *Нерепликативная модель, или модель «разрыв-лигирование».* Согласно этой модели, рекомбинация между молекулами РНК осуществляется без участия РНК-зависимой РНК-полимеразы за счет разрывов в предварительно синтезированных родительских молекулах РНК одних межнуклеотидных ковалентных связей и образования новых в дочерней молекуле РНК.

Репликативная модель на данный момент является общепринятой. С ее помощью, с тем или иным успехом, объясняют образование рекомбинантов у подавляющего большинства РНК-содержащих вирусов. Действительно, репликативная модель хорошо объясняет механизм рекомбинации между родственными молекулами РНК с одинаковой или близкой первичной структурой. При этом места перекреста у рекомбинантов располагаются на

одинаковых или очень близких по первичной структуре участках родительских молекул РНК. Иными словами, репликативная модель хорошо объясняет образование гомологичных рекомбинантов.

Однако в рамках репликативной модели, существуют объективные трудности с объяснением механизма рекомбинации между неродственными молекулами РНК с различной первичной структурой (негомологичная рекомбинация). Негомологичные рекомбинанты привлекают к себе внимание с точки зрения эволюции РНК-содержащих вирусов. За последнее время было получено большое количество данных, согласно которым вирусная и клеточная РНК могут рекомбинировать между собой по негомологичному типу (см. обзор Четверин, 1999). При этом отмечены случаи, когда вставки различных клеточных последовательностей вызывали появление штаммов вирусов с новым фенотипом (Collett et al., 1989; Khatchikian et al., 1989; Meers et al., 1991).

Тем временем, существует нерепликативная модель, которая принципиально может объяснить образование негомологичных рекомбинантов любого типа. Не смотря на это, нерепликативная модель рассматривается большинством авторов как маловероятная альтернатива репликативной модели.

Тем не менее, недавно было показано, что негомологичная рекомбинация между фрагментами сателлитных РНК фага Q β идет по нерепликативному механизму, вероятно, за счет химических свойств, присущих самим молекулам РНК (Chetverin et al., 1997; Chetverina et al., 1999).

В связи с этим, в качестве основной, была поставлена задача, выяснить возможность получения инфекционных рекомбинантов вируса полиомиелита по нерепликативному механизму.

2. Обзор литературы

2.1 Механизмы генетической рекомбинации РНК-содержащих вирусов

2.1.1 Репликативная модель смены матрицы

Взаимосвязь эффективности рекомбинации и репликации у вируса полиомиелита. Р. Д. Cooper с соавторами впервые предложили репликативный механизм образования рекомбинантов вируса полиомиелита. Авторы предположили, что рекомбинация между геномными РНК вируса полиомиелита идет в процессе репликации, за счет переотжига растущей цепи с одной матрицы на другую. По мнению авторов, образование большинства рекомбинантов полiovirusa с одним местом перекреста на геном и сохранение у всех рекомбинантов точно такого же размера генома, как у родительских молекул РНК, говорит в пользу репликативного механизма рекомбинации (Cooper et al., 1974).

Впервые получить данные, указывающие на взаимосвязь эффективности рекомбинации и репликации, удалось на примере вируса полиомиелита в 1986 году (Kirkegaard and Baltimore, 1986). В данной работе в качестве рекомбинационных партнеров использовали вирус полиомиелита дикого типа и полiovirus, проявляющий температурочувствительный (ts) и гуанидин резистентный (gr) фенотип. В ходе эксперимента клетки инфицировали родительскими вирусами не одновременно, а последовательно. При этом суперинфекцию вторым родительским вирусом осуществляли в условиях, ингибирующих репликацию первого. Рекомбинантов образовалось много, если монослой клеток HeLa заражали мутантным вирусом (ts, gr) при 32°C и суперинфицировали диким типом при температуре 39°C. Рекомбинантов было

мало, если клетки заражали вирусом дикого типа и суперинфицировали мутантом в присутствии 0,5 М гуанидина. При этом Киркегаард и Балтимор утверждают, что гуанидин.HCl (0,5 М) подавляет синтез обеих цепей РНК вируса дикого типа, тогда как непермиссивная температура (39°C) подавляет синтез только минус-цепи мутантного вируса.

Если бы гомологичная рекомбинация в данных экспериментах шла согласно нерепликативной модели (т. е. без участия полимеразы), то ингибирование синтеза РНК у данных вирусов либо вообще не должно оказываться на частоте рекомбинации, либо должно быть одинаковым при подавлении синтеза РНК обоих вирусов, что не согласуется с полученными данными. Следовательно, рекомбинация зависит от эффективности репликации родительских геномов. Так как низкая частота рекомбинации наблюдалась при подавлении синтеза минус цепи мутантного вируса, авторы сделали вывод, что образование большей части рекомбинантов идет в процессе синтеза минус цепи полноразмерной РНК при репликации вирусного генома.

Изменение частоты рекомбинации и характера распределения мест перекреста в экспериментах с использованием мутантного репликативного комплекса вируса мозаики костра (BMV). Во второй половине 90х годов были получены дополнительные экспериментальные доказательства в пользу репликативного механизма рекомбинации у BMV (Nagy et al., 1995; Figlerowicz et al., 1997, 1998). В экспериментах паралельно использовали BMV дикого типа и варианты BMV, у которых белки репликативного комплекса содержали различные аминокислотные замены. При этом наблюдали изменение частоты рекомбинации, характера распределения и структуры мест перекреста. В частности, резко увеличивалось число рекомбинантов, содержащих в месте

перекреста нематричные нуклеотиды (как правило, уридин). Наличие дополнительных нематричных нуклеотидов только в сайтах перекреста говорит о том, что включение данных нуклеотидов произошло непосредственно при образовании рекомбинанта. По мнению авторов, мутантная полимераза на определенных участках начинает «проскальзывать», что и приводит к встраиванию нематричного нуклеотида (или нуклеотидов). При этом пауза в синтезе РНК, в свою очередь, способствует диссоциации полимеразы и смене матрицы.

Таким образом, изменение общей частоты рекомбинации, характера распределения и структуры мест перекреста у рекомбинантов при использовании BMV с мутантным репликативным комплексом говорит о том, что вирусная РНК-полимераза непосредственно участвует в образовании РНК-рекомбинантов.

Синтез гетерогенных по длине РНК-транскриптов гомогенными препаратами вирусных РНК-полимераз in vitro. Arnold and Cameron (1999), исследовали эффективность использования ДНК-праймеров в качестве затравки РНК-полимеразой вируса полиомиелита. Было зарегистрировано образование транскриптов, длина которых превышала длину используемых РНК-матриц. Эффективность синтеза «удлиненных» транскриптов зависела от концентрации РНК-матрицы. Следовательно, по мнению авторов, синтез транскриптов данного типа идет за счет удлиннения 3'-концевого участка растущей цепи после копирования одной молекулы РНК, при этом, в качестве матрицы используется новая молекула. Таким образом, РНК-полимераза вируса полиомиелита способна относительно эффективно осуществлять смену матрицы при синтезе РНК in vitro, что, по мнению авторов, отображает

способность репликативного комплекса эффективно менять матрицу при репликации *in vivo*.

К аналогичным выводам пришли Kim and Kao (2001), которые исследовали *in vitro* эффективность использования РНК-праймеров РНК-полимеразами вириуса бычьей диареи (BVDV) и трех вириусов растений: вириуса мозаики костра (BMV), вириуса мозаики огурца (CMV) и вириуса хлоротической пятнистости коровьего горошка (CCMV). При транскрипции были обнаружены конкатамерные транскрипты, длина которых была кратна длине используемой матрицы (ди-, три- и тетрамеры). Эффективность образования конкатамерных транскриптов зависела от концентрации матрицы и последовательности нуклеотидов на 5'-концевом участке. Образование таких транскриптов наблюдалось и при использовании РНК-матриц, у которых отсутствовали 5'-концевой фосфат, 2'- и 3'-концевые гидроксины. Следовательно, по мнению авторов, образование конкатамерных транскриптов идет за счет смены матрицы при транскрипции. При этом 3'-концевой участок растущей цепи отжигается на 5'-концевом участке другой молекулы РНК после завершения синтеза на предыдущей молекуле.

Итак, приведенные выше экспериментальные данные говорят о том, что РНК-рекомбинация может осуществляться при непосредственном участии вириусной РНК-полимеразы в процессе репликации вириусного генома (см. также обзоры King 1988b; Lai 1992; Agol 1997; Nagy and Simon, 1997).

Сформулирована следующая последовательность событий. Полимераза начинает репликацию РНК с 3'-конца родительской молекулы РНК (донорная матрица), затем, по тем или иным причинам, процессивная элонгация цепи приостанавливается. 3'-концевой участок растущей цепи и полимераза

диссоциирует от донорной матрицы и взаимодействуют с участком другой молекулы РНК (акцепторная матрица). Далее, полимераза возобновляет синтез комплементарной цепи на акцепторной матрице, используя 3'-концевой участок растущей цепи в качестве праймера (участок, где полимераза прекращает синтез растущей цепи называют донорным; участок, где полимераза возобновляет синтез РНК называют акцепторным).

Чтобы подтвердить возможность указанной выше схемы рекомбинации необходимо ответить на три вопроса.

- (1) Почему процессивная элонгация растущей цепи прерывается (механизм выбора донорного сайта)?
- (2) Каким образом осуществляется выбор акцепторного сайта?
- (3) Как непосредственно РНК-зависимая РНК-полимераза осуществляет смену матрицы при рекомбинации?

Возможные причины прекращения процессивной элонгации растущей цепи.

В литературе обсуждаются три возможные причины возникновения пауз в синтезе РНК при репликации. (A) *Наличие относительно стабильной вторичной структуры на определенном участке родительской молекулы РНК.* В работе Romanova et al. (1986), описано образование межтиповых гомологичных рекомбинантов при инфекции клеток почек зеленой мартышки полиовирусом типа 1 и типа 3. Места перекреста у межтиповых рекомбинантов были расположены на участке РНК между нуклеотидами 3943 и 4200. Этот участок может образовать как внутримолекулярную шпилечную структуру, так и участвовать в образовании относительно стабильного межмолекулярного РНК-дуплекса. Образование межмолекулярного РНК-дуплекса, по мнению авторов, может вызывать паузу в движении полимеразы при синтезе

комплементарной цепи, что, вероятно, способствует смене матрицы.

Возобновление синтеза РНК на акцепторной матрице приводит к появлению межтипового рекомбината. Возможность данного механизма рекомбинации подтверждается данными по локализации мест перекреста у вируса мозаики костра. Концентрацию мест перекреста у РНК1/РНК3 рекомбинантов вируса мозаики костра наблюдали в районе участка 3' нетранслируемой области РНК1, который способен образовать межмолекулярный РНК-дуплекс с соответствующим участком в 3'-НТО РНК3 (Bujarski and Dzianott, 1991; Nagy and Bujarski, 1993; Nagy et al., 1995).

Предполагается, что относительно стабильная внутримолекулярная шпилечная структура также может определять выбор донорного сайта при рекомбинации. Так, например, искусственно созданные стабильные шпилечные структуры на определенных участках родительских РНК томбусвирусов стимулировали концентрацию мест перекреста у рекомбинантов именно на этих участках (White and Morris, 1995). Наличие внутримолекулярной шпилечной структуры в 3'-НТО РНК миковирусов стимулировало образование различных делеций или дупликаций на данном участке РНК (Shapira et al., 1991).

Образование межмолекулярного или внутримолекулярного гетеродуплекса может способствовать образованию дефектных интерферирующих геномов (далее ДИ-геномы), в результате делеции части вирусного генома у томбусвирусов (White and Morris, 1995), бромовирусов (Romero et al., 1993; Pogany et al., 1995), нодавирусов (Li and Ball, 1993), вируса полиомиелита (Kuge et al., 1986; Kuge et al., 1989).

(В) *Встраивание нематричного нуклеотида.* Предполагается, что встраивание нематричного нуклеотида может препятствовать дальнейшей

эффективной элонгации растущей цепи РНК вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (Jarvis and Kirkegaard, 1991; Pilipenko et al., 1995; Agol, 1997).

В работе Pilipenko et al. (1995), предполагается, что встраивание нематричного нуклеотида вызывает паузу в синтезе РНК, что способствует геномным перестройкам у вируса полиомиелита и вируса энцефаломиелита мышей Тейлора.

Встраивание нематричного нуклеотида может произойти на любом участке РНК независимо от его первичной структуры. Следовательно, в рамках модели смены матрицы, данный механизм возникновения паузы в синтезе РНК, хорошо объясняет возможность расположения мест перекреста у рекомбинантов на принципиально любом участке генома (Lai 1992; Agol, 1997).

(С) *Наличие на донорной матрице различных сигналов, увеличивающих вероятность возникновения паузы при синтезе РНК.* К таким сигналам можно отнести A/U-богатые участки. Концентрация мест перекреста у рекомбинантов на A/U-обогащенных участках отмечены при различных геномных перестройках у пикорнавирусов (King, 1988a; Pilipenko et al., 1995), образовании гомологичных рекомбинантов вируса мозаики костра (Nagy and Bujarski, 1995, 1996; Bujarski and Nagy, 1996). Предполагается, что A/U-богатые участки могут вызывать «проскальзывание» полимеразы, что, в свою очередь, увеличивает вероятность встраивания нематричных нуклеотидов и, как следствие, способствует возникновению паузы в синтезе комплементарной цепи (Nagy and Bujarski, 1995, 1996; Bujarski and Nagy, 1996; Nagy and Simon, 1997). В пользу данного предположения свидетельствуют данные о структуре мест перекреста рекомбинантов вируса мозаики костра (Nagy and Bujarski, 1996). Увеличение длины A/U-богатой гомологичной последовательности у родительских РНК на

участках концентрации мест перекреста вдвое (или втрое), резко увеличивало образование рекомбинантов (до 86%), содержащих в месте перекреста дополнительные нематричные нуклеотиды (как правило, уридин).

Таким образом, выбор донорного сайта при рекомбинации в рамках модели смены матрицы может определяться особенностями первичной (A/U-обогащенные участки) и/или вторичной структуры родительских РНК. Кроме того, предполагается, что отсутствие 3'-5'-корректирующей активности у вирусных РНК-полимераз может способствовать возникновению паузы в синтезе РНК при копировании принципиально любого участка вирусного генома.

В рамках модели смены матрицы предполагается, что пауза в синтезе РНК может способствовать диссоциации полимеразы с 3'-концевым участком растущей цепи от донорной матрицы (Pilipenko et al., 1995; Lai, 1992; Nagy and Simon, 1997). Однако диссоциация 3'-концевого участка растущей цепи в случае стабильного совершенного гетеродуплекса с донорным сайтом маловероятна. В связи с этим, предполагается, что A/U обогащенные участки могут увеличивать вероятность диссоциации 3'-концевого участка растущей цепи от донорного сайта за счет меньшей термодинамической стабильности A/U-богатого гетеродуплекса. В пользу данного предположения косвенно свидетельствуют данные о концентрации мест перекреста рекомбинантов на A/U богатых участках у пикорнавирусов (King, 1988a) и вируса мозаики костра (Nagy and Bujarski, 1995, 1996).

Вероятность диссоциации полимеразы от матрицы, вероятно, зависит и от свойств самого репликативного комплекса (Lai, 1992). Незаконченные РНК-транскрипты были детектированы в клетках, инфицированных вирусом

мышиного гепатита (Makino et al., 1986). Распределение длин abortивных транскриптов совпадало с расположением относительно стабильных вторичных структур (Baric et al., 1987). Предполагают, что abortивные транскрипты могли образоваться при репликации вирусного генома. Наличие таких abortивных транскриптов в инфицированных клетках говорит о незначительной процессивности полимеразы данного вируса, что, вероятно, и определяет относительно высокую частоту рекомбинации у данной группы вирусов (Lai, 1992).

Таким образом, вероятность диссоциации полимеразы от матрицы и, как следствие, частота рекомбинации может зависеть как от первичной и вторичной структуры родительских РНК, так и от свойств самого репликативного комплекса, например, процессивности (см. обзоры Lai, 1992; Agol, 1997).

Выбор акцепторного участка при рекомбинации в рамках механизма смены матрицы.

Механизм выбора акцепторного сайта при рекомбинации точно не установлен. В литературе обсуждают возможность нескольких механизмов выбора акцепторного сайта у различных РНК-содержащих вирусов.

(A) Чаще всего предполагают, что выбор акцепторного сайта при рекомбинации осуществляется за счет комплементарных взаимодействий 3'-концевого участка растущей цепи и акцепторного сайта (см. обзоры King 1988b; Lai 1992; Agol 1997; Nagy and Simon, 1997). Данный механизм выбора акцепторного сайта объясняет эффективную рекомбинацию на протяженных гомологичных участках родительских молекул РНК за счет образования стабильного совершенного РНК-дуплекса между 3'-концевым участком растущей цепи и акцепторной матрицей.

Расположение мест перекреста на протяженных участках с высокой степенью гомологии было отмечено у пикорнавирусов (Romanova et al., 1986; Kirkegaard and Baltimore, 1986; Tolskaya et al., 1987; Jarvis and Kirkegaard, 1992), у коронавирусов (Makino et al., 1987; Koetzner et al., 1992; van der Most et al., 1992), у альфавирусов (Raju et al., 1995), бактериофага Q β (Palasingam and Shaklee, 1992), артеривирусов (Molenkamp et al., 2000), потивирусов (Varrelmann et al., 2000), бромовирусов (Bruylants et al., 2000).

Зависимость частоты рекомбинации от протяженности и степени гомологии предполагаемых донорного и акцептного сайтов родительских РНК наиболее четко показано для вируса мозаики костра (Nagy and Bujaski, 1995) и вируса полиомиелита (Tolskaya et al., 1983; Kirkegaard and Baltimore, 1986).

При смешанной инфекции культуры клеток вирусами полиомиелита, которые принадлежат разным серотипам, частота гомологичной рекомбинации значительно ниже, чем частота рекомбинации между вирусами одного серотипа. Частота рекомбинации между вирусами полиомиелита типа 1 и типа 3, составляла от 1×10^{-5} до 2×10^{-4} (Tolskaya et al., 1983), что на два порядка ниже, чем частота рекомбинации при внутритиповом скрещивании (King 1988b). Это соответствует данным Kirkegaard and Baltimore (1986), согласно которым частота рекомбинации между мутантным полiovирусом типа I (gr/ts) и полiovирусом типа II (дикий тип) в 170 раз ниже частоты рекомбинации в экспериментах, где родительские молекулы РНК были представлены одним соответствующим серотипом (см. также King 1988b; Jarvis and Kirkegaard, 1991).

Участок гомологии в 60 нуклеотидов, расположенный в 3'-НТО РНК2 и РНК3, обеспечивал эффективное образование гомологичных РНК2/РНК3 рекомбинантов при совместной инфекции листьев *Chenopodium hybridum*

(Nagy and Bujaski, 1995). При этом частота гомологичной рекомбинации прямо пропорционально зависела от длины данного участка. Делеция 37 и 45 нуклеотидов участка гомологии сокращала частоту рекомбинации вдвое. Гомологичный участок длиной 9 нуклеотидов поддерживал образование 5% РНК2/РНК3 рекомбинантов. При длине гомологичного участка в 4 нуклеотида образование гомологичных РНК2/РНК3 рекомбинантов не наблюдалось.

Таким образом, предполагается, что образование протяженного совершенного РНК-дуплекса между 3'-концевым участком растущей цепи и акцепторным сайтом необходимо и достаточно для эффективной посадки полимеразы на акцепторную матрицу.

Предполагается, что и относительно короткие гомологичные участки родительских молекул РНК (4-12 нуклеотида) также определяют выбор акцепторного сайта при рекомбинации у пикорнавирусов (Pilipenko et al., 1995), нодавирусов (Li and Ball, 1993), тобамовирусов (Raffo and Dawson, 1991), томбусвирусов (White and Morris, 1995), бактериофага Q β (Biebricher and Luce, 1992), MS2 (Olsthoorn and van Duin, 1996), ф6 (Onodera et al., 1993), а также при образовании ДИ-геномов у миковирусов (Shapira et al., 1991), бромовирусов (Pogany et al., 1995).

Предполагают, что посадка полимеразы на акцепторную матрицу также может осуществляться за счет образования несовершенного (содержащего различные выпетливания) РНК-дуплекса между 3'-концевым участком растущей цепи и акцепторным сайтом (King 1988a).

Предполагают, что образование такого несовершенного РНК-дуплекса определяет наличие различных делеций или вставок в месте перекреста при геномных перестройках пикорнавирусов (Pilipenko et al., 1995), пестивирусов

(Becher et al., 1999), образовании гомологичных рекомбинантов вируса мозаики костра (Nagy and Bujarski, 1995, 1996; Bujarski and Nagy, 1996).

(B) Концентрация мест перекреста рекомбинантов в районе комплементарных участков родительских молекул РНК предполагает непосредственное участие межмолекулярных вторичных структур в выборе акцепторного сайта при рекомбинации у пикорнавирусов (Romanova et al., 1986; Tolskaya et al., 1987) и бромовирусов (Bujarski and Dzianott, 1991; Nagy and Bujarski, 1993; Nagy et al., 1995; Figlerowicz, 2000). Предполагается, что полимераза, достигнув участка, вовлеченного в образование стабильной межмолекулярной вторичной структуры, в некоторых случаях не может ее расплавить и прекращает синтез комплементарной цепи. После этого полимераза с помощью процессивного или непроцессивного механизма осуществляет смену матрицы. При этом 3'-концевой участок растущей цепи взаимодействует с акцепторным участком родительской РНК, который расположен в непосредственной близости от межмолекулярной вторичной структуры. Таким образом, выбор акцепторного сайта может определяться сближением донорной и акцепторной матриц за счет образования относительно стабильного межмолекулярного РНК-дуплекса.

(C) При изучении рекомбинации между геномной и сателлитными РНК вируса скрученности турнепса [TCV] (Cascone et al., 1990, 1993; Simmon and Nagy, 1996; Nagy et al., 1998) были выделены особые участки, мотивы I и IIIA/IIIB. Изменение первичной и вторичной структуры данных мотивов влияло как на частоту рекомбинации и расположение мест перекреста, так и на эффективность репликации родительских РНК (Carpenter et al., 1995; Nagy et al., 1999, 2001).

Предполагается, что выбор акцепторного сайта, в данном случае, осуществляется за счет эффективного взаимодействия полимеразы с промотор-подобными элементами мотивов I и IIIA/IIIB. При этом данное взаимодействие способствует относительно точной посадке полимеразы на акцепторный сайт. Мотивы I и IIIA/IIIB функционально можно разделить на два «домена». Один «домен» - это неструктурированный участок, расположенный у основания шпилечной структуры мотивов I и IIIA/IIIB, который участвует в комплементарных взаимодействиях с 3'-концевым участком растущей цепи. Другой «домен» представлен шпилечной структурой, к которой полимераза обладает повышенным сродством.

Таким образом, предполагается, что при рекомбинации между геномной и сателлитными РНК вируса скрученности турнепса выбор акцепторного сайта осуществляется за счет эффективного взаимодействия полимеразы с репликативными энхансерами акцепторной матрицы (Simon and Nagy, 1996; Nagy et al., 1998, 1999, 2001). При этом комплементарные взаимодействия 3'-концевого участка растущей цепи с акцепторным сайтом необходимы, но не достаточны для эффективного взаимодействия РНК-полимеразы с акцепторной матрицей (Simon and Nagy, 1996). Данный механизм выбора акцепторного сайта подтверждают экспериментальные данные, полученные на модельных системах *in vitro* (Nagy et al., 1998) и *in vivo* (Nagy et al., 1999).

Однако, по мнению Nagy et al. (1998), участие промоторных элементов в РНК-рекомбинации не является уникальной особенностью вируса скрученности турнепса. Наличие мест перекреста в районе субгеномных промоторов вируса мозаики костра (Allison et al., 1990), вируса Синдбис (Weiss and Schlesinger, 1991), вируса табачной мозаики (Beck and Dawson, 1990) говорит о том, что

данные структуры могут принимать непосредственное участие в выборе акцепторного сайта при рекомбинации. Кроме того, наличие мест перекреста в районе промоторов, расположенных в 3'- и 5'-нетранслируемых областях вируса мозаики костра (Nagy and Bujarski, 1992; Rao and Hall, 1993), вируса Синдбис (Hajjou et al., 1996), вируса погремковости табака (Goulden et al., 1991), вируса мозаики огурца, вируса аспермии томатов (Fernandez-Cuartero et al., 1994), вируса штриховатой мозаики ячменя (Edwards et al., 1992), говорит о возможном участии данных структур в механизме рекомбинации. Таким образом, по мнению Nagy et al. (1998), промоторные элементы геномной РНК могут принимать участие в рекомбинации, осуществляя эффективную посадку полимеразы на акцепторный сайт.

Итак, предполагается, что выбор акцепторного сайта определяется наличием на родительских молекулах РНК: (1) протяженных гомологичных последовательностей; (2) комплементарных участков, формирующих межмолекулярные вторичные структуры; (3) промотор-подобных вторичных структур, обладающих повышенным сродством к полимеразному комплексу.

Необходимо отметить, что для эффективного взаимодействия полимеразы с акцепторной матрицей предполагаемый акцепторный сайт должен быть доступен, т. е. не входить в состав стабильной вторичной структуры. Так, например, места перекреста рекомбинантов вируса полиомиелита в районе стабильной вторичной структуры всегда находились на петлевых одноцепочечных участках (Romanova et al., 1986; Tolskaya et al., 1987). При введении последовательностей, формирующих стабильные шпилечные структуры, в район концентрации мест перекреста рекомбинантов у томбусвирусов, места перекреста «сдвигались» на участки, потенциально не

образующие стабильной вторичной структуры (White and Morris, 1995).

Таким образом, предполагается, что полимераза не может возобновить синтез РНК на участке, формирующим стабильную вторичную структуру (Romanova *et al.*, 1986; Tolskaya *et al.*, 1987; White and Morris, 1995).

Возможные механизмы смены матрицы. Как непосредственно РНК-зависимая РНК-полимераза осуществляет смену матрицы при рекомбинации, достоверно не известно. По мнению Nagy and Simon (1997), предполагаемые варианты механизма смены матрицы можно разделить на процессивный и непроцессивный.

Непроцессивный механизм предполагает, что после возникновения паузы в синтезе РНК, репликативный комплекс с 3'-концевым участком растущей цепи диссоциируют от донорной матрицы. В рамках процессивного механизма смены матрицы предварительная диссоциация полимеразы от донорного сайта при рекомбинации не происходит.

Непроцессивный механизм. В рамках непроцессивного механизма необходимо объяснить, как полимераза будет осуществлять промотор-независимую посадку на внутренний участок вирусного генома. В связи с этим представляется, что наиболее обосновано непроцессивный механизм сформулирован для коронавирусов (Makino *et al.*, 1986) и вируса скрученностя турнепса (Carpenter *et al.*, 1995; Simon and Nagy, 1996; Nagy *et al.*, 1998, 1999).

Предполагается, что возможность данного механизма у коронавирусов определяется характерными свойствами репликативного комплекса. Особенностью транскрипции коронавирусов является непроцессивный синтез шести мРНК. В составе мРНК лидерная последовательность 5'-концевой части генома соединяется с разными по длине фрагментами 3'-концевой части генома

(Makino et al., 1986, 1988; Lai, 1990; Zhang and Lai, 1994). Непроцессивный синтез мРНК предполагает диссоциацию РНК-полимеразы от матрицы с последующей посадкой на внутренний участок РНК (Lai, 1990; Sawicki and Sawicki, 1990; Zhang and Lai, 1994). Таким образом, определенные свойства репликативного комплекса (невысокая процессивность и возможность эффективного взаимодействия с внутренними участками геномной РНК), необходимые для эффективной транскрипции вирусного генома, могут определять непроцессивный механизм РНК-рекомбинации у коронавирусов (Makino et al., 1986).

Эффективность рекомбинации у вируса скрученности турнепса зависит от наличия на акцепторной матрице промотор-подобных вторичных структур. Следовательно, посадка полимеразы на внутренний участок РНК при смене матрицы определяется повышенным сродством репликативного комплекса к определенным вторичным структурам (Carpenter et al., 1995; Simon and Nagy, 1996; Nagy et al., 1998, 1999, 2001).

Непроцессивный механизм рекомбинации не требует диссоциации репликативного комплекса от 3'-концевого участка растущей цепи. Следовательно, по мнению Nagy and Simon (1997), посадка полимеразы на акцепторную матрицу может осуществляться за счет комплементарных взаимодействий 3'-концевого участка растущей цепи с акцепторным сайтом. Таким образом, непроцессивный механизм принципиально можно использовать для объяснения рекомбинации у большинства РНК-содержащих вирусов.

Процессивный механизм. Предполагается, что смена матрицы осуществляется без предварительной диссоциации РНК-полимеразы от донорной матрицы.

Согласно одной модели, смена матрицы в рамках процессивного механизма идет за счет вытеснения донорной матрицы из каталитического центра РНК-полимеразы (Jarvis and Kirkegaard, 1991). Данная модель построена по аналогии с механизмом удаления нематричного нуклеотида с 3'-конца растущей цепи ДНК 3'→5' экзонуклеазным доменом ДНК-зависимой ДНК-полимеразой I E. coli. При встраивании нематричного нуклеотида в растущую цепь, дальнейший синтез ДНК приостанавливается, и ДНК-полимераза проскальзывает назад относительно ДНК-матрицы на восемь нуклеотидов (Freemont et al., 1988). 3'-концевой участок растущей цепи ДНК диссоциирует от матрицы и перемещается в экзонуклеазный домен. После удаления нематричного нуклеотида синтез комплементарной цепи возобновляется (Freemont et al., 1988; Catalano et al., 1990).

Авторы предположили, что встраивание нематричного нуклеотида в растущую цепь РНК также может вызвать паузу в синтезе РНК и возвратное движение РНК-полимеразы относительно матрицы (Jarvis and Kirkegaard, 1991). Получив относительную свободу, 3' концевой участок растущей цепи диссоциирует от донорной матрицы и за счет комплементарных взаимодействий отжигается на гомологичный участок акцепторной матрицы. Затем, полимераза проскальзывает вперед, при этом, акцепторная матрица замещает в каталитическом центре донорную матрицу. После этого синтез растущей цепи возобновляется уже по акцепторной матрице.

В рамках другой модели процессивного механизма, предполагается, что смена матрицы может осуществляться за счет проскока, «шунтирования» РНК-полимеразой основания стабильной вторичной структуры при синтезе РНК.

Впервые модель «шунтирования» была использована для объяснения

образования делеций в кодирующей области и 5'-НТО вируса полиомиелита (Kuge et al., 1986; Kuge et al., 1989). Авторы предполагают, что образование стабильной структуры происходит за счет комплементарных взаимодействий донорного и акцепторного сайтов с участком "поддерживающей" последовательности (рис. 1). В качестве поддерживающей последовательности может выступать геномная РНК обратной полярности.

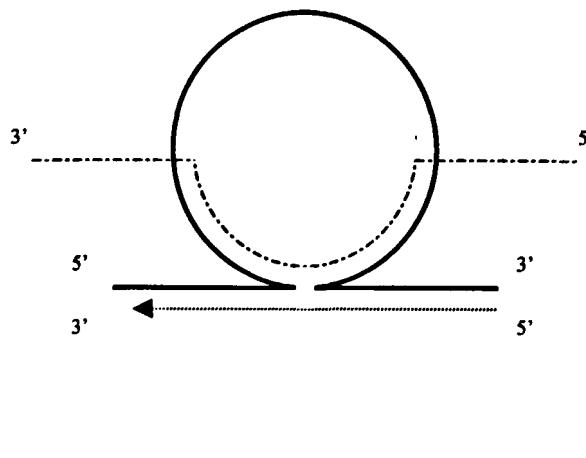


Рис. 1. Гипотетическая модель образования рекомбинантов вируса полиомиелита (Kuge et al., 1986). Непрерывной и штрих-пунктирной линиями обозначены матричная РНК и поддерживающая последовательность, соответственно. Пунктирной стрелкой обозначена растущая цепь и указано направление синтеза РНК вирусной РНК-полимеразой. Смена матрицы происходит за счет «шунтирования» РНК-полимеразой основания вторичной структуры, образованной матричной и поддерживающей молекулами РНК.

В результате, полимераза, при синтезе комплементарной цепи может осуществить проскок ("шунтирование") основания данной структуры, что приведет к отсутствию в составе синтезируемой молекулы РНК выплетленного участка. При этом полимераза проскаивает основание вторичной структуры без паузы в синтезе РНК и предварительной диссоциации от донорного сайта.

С помощью механизма «шунтирования» также объясняют образование рекомбинантов вируса мозаики костра (Bujarski and Dzianott, 1991; Nagy and Bujarski, 1993; Nagy et al., 1995; Figlerowicz et al., 1997, 1998). При этом предполагают, что образование РНК1/РНК3 рекомбинантов у данного вируса идет за счет «шунтирования» основания стабильного РНК-дуплекса между

геномными РНК1 и РНК3.

Классификация РНК-рекомбинации. Итак, классические исследования РНК-рекомбинации у представителей семейств пикорнавирусов и коронавирусов показали, что место перекреста у большинства рекомбинантов располагалось на соответствующих участках родительских молекул РНК, гомологичных по первичной структуре (Romanova et al., 1986; Tolskaya et al., 1987; King 1988a, 1988b; Lai, 1992). Накопление экспериментальных данных показало, что РНК-рекомбинация у других вирусов может приводить к образованию рекомбинантов другого типа (см. обзоры Lai, 1992; Agol, 1997; Nagy and Simon, 1997; Aaziz and Tepfler, 1999). Возникает необходимость классификации всего многообразия рекомбинантов и установление соответствия между предполагаемыми механизмами рекомбинации и типами РНК-рекомбинантов. В литературе были предложены две классификации РНК-рекомбинации (Lai, 1992; Nagy and Simon, 1997). Ниже предложена собственная классификация.

Взяв за основу характер молекул РНК, участвующих в рекомбинации, и структуру рекомбинантов в месте перекреста, предлагается разделить рекомбинацию на три типа.

(1) *Точная гомологичная рекомбинация.* Происходит между родственными молекулами РНК с одинаковой или близкой первичной структурой. Места перекреста располагаются на абсолютно одинаковых или очень близких по первичной структуре последовательностях, расположенных на точно соответствующих участках родительских молекул РНК. При этом рекомбинантная молекула имеет ту же последовательность и структурную организацию генома, что и родительские молекулы РНК. Иными словами,

происходит точная (до нуклеотида) гомологичная рекомбинация.

(2) *Неточная гомологичная рекомбинация.* Описывает случаи рекомбинации между принципиально любыми молекулами РНК. Места перекреста на каждой из родительских молекул РНК лежат на произвольных участках с относительно высокой степенью гомологии. При этом рекомбинантная молекула РНК может содержать область гомологии с родительскими РНК только в районе места перекреста. Следовательно, рекомбинантная молекула РНК имеет уже другую последовательность и структурную организацию генома по сравнению с родительскими молекулами РНК. Иными словами, происходит неточная гомологичная рекомбинация. Поскольку предполагается, что участки гомологии длиной 4-12 нуклеотидов влияют на выбор акцепторного сайта при рекомбинации, в данный класс попадают все рекомбинанты, содержащие в сайте перекреста относительно короткие участки гомологии.

(3) *Негомологичная рекомбинация.* Описывает случаи рекомбинации между принципиально любыми молекулами РНК. Места перекреста на каждой из родительских молекул РНК могут располагаться на произвольных участках с различной первичной структурой. Следовательно, места перекреста у рекомбинантов не содержат гомологичных нуклеотидов с родительскими молекулами РНК.

Итак, предложено три класса РНК-рекомбинации. В связи с этим возникает вопрос - насколько адекватно предполагаемые механизмы выбора акцепторного сайта объясняют образование рекомбинантов всех трех типов?

Выбор акцепторного сайта за счет образования гетеродуплекса между 3'-концевым участком растущей цепи и акцепторной матрицей относительно

неплохо объясняют преимущественное образование рекомбинантов с областью гомологии в сайте перекреста (гомологичные и неточные гомологичные рекомбинанты).

Определенные сложности возникают при объяснении образования негомологичных рекомбинантов. Для возобновления синтеза растущей цепи на акцепторной матрице необходимы комплементарные взаимодействия 3'-концевых нуклеотидов растущей цепи и акцепторного сайта (King 1988a, 1988b; Lai, 1992; Pilipenko et al., 1995). Однако, структура мест перекреста у негомологичных рекомбинантов (отсутствие гомологии) отрицает возможность такого рода взаимодействий.

Может показаться, что проблема с объяснением образования негомологичных рекомбинантов является надуманной, поскольку гомологичная рекомбинация принципиально происходит гораздо чаще, чем негомологичная. При этом гомологичные рекомбинанты составляют подавляющее большинство рекомбинантов, образующихся как *in vivo*, так и *in vitro*.

Однако за последнее время было получено большое количество данных по негомологичной РНК-рекомбинации. Образование негомологичных рекомбинантов с относительно высокой частотой описано для бактериофага Q β (Chetverin et al., 1997; Chetverina et al., 1999), вируса Синдбис (Raju et al., 1995; Hajjou et al., 1996), вируса мозаики огурца (Roossinck et al., 1999), вируса мозаики костра (Bujarski and Dzianott, 1991; Nagy and Bujarski, 1993; Nagy et al., 1995), миковирусов (Shapira et al., 1991). Отсутствие гомологичных нуклеотидов в сайтах делеции было описано для ДИ-геномов вируса полиомиелита (Kuge et al., 1986), вируса табачной мозаики (Raffo and Dawson, 1991), миковирусов (Shapira et al., 1991).

• Во-вторых, преимущественное образование гомологичных рекомбинантов

in vivo и in vitro характерно только для представителей двух семейств: пикорнавирусов и коронавирусов. У остальных вирусов частота гомологичной рекомбинации значительно ниже (см. обзор Lai, 1992). Согласно литературным данным, частота гомологичной рекомбинации в 1% наблюдается между маркерами, расположенными на расстоянии в 1300 и 1700 у пикорнавирусов (вируса полиомиелита и вируса ящура) и коронавирусов, соответственно. Что в пересчете на один нуклеотид составляет $7,6 \times 10^{-6}$ и $5,8 \times 10^{-6}$, соответственно (Jarvis and Kirkegaard, 1992; Lai 1992; Tang et al., 1997; Duggal et al., 1997).

Частота же гомологичной рекомбинации у бактериофага Q β , в пересчете на один нуклеотид, составляет $2,5 \times 10^{-12}$, что, как минимум, на шесть порядков ниже частоты гомологичной рекомбинации у пикорнавирусов и коронавирусов (Palasingam and Shaklee, 1992).

У альфавирусов (вирус Синдбис) при использовании стандартных генетических подходов (скрещивание вирусов с различными фенотипическими маркерами) обнаружить РНК-рекомбинацию, вообще, не удалось (Weiss and Schlesinger, 1991). Только в 1995 году Rajy et al. (1995), было показано образование рекомбинантов, места перекреста которых располагались на участках гомологии родительских РНК. При этом данные гомологичные рекомбинанты удалось получить только при использовании модифицированных геномных РНК вируса Синдбис.

В-третьих, за последнее время получено большое количество данных, согласно которым вирусная и клеточная РНК, а также различные молекулы клеточных РНК могут рекомбинировать между собой по негомологичному типу.

Анализ первичной последовательности РНК вируса скрученностии листьев картофеля (Mayo et al., 1991), ДИ-геномов вируса Синдбис (Monroe and Schlesinger, 1983), сателлитных РНК фага Q β (Munishkin et al., 1988), вируса мозаики огурца (Masuta et al., 1992) показал, что данные РНК содержат последовательности различных клеточных мРНК (Mayo et al., 1991) и тРНК (Monroe and Schlesinger, 1983; Munishkin et al., 1988; Masuta et al., 1992).

Кроме того, различные клеточные последовательности (участки клеточных генов, например, убиквитина) в области неструктурных генов вируса диареи крупного рогатого скота вызывали появление штамма данного вируса с патогенным фенотипом (Collett et al., 1989; Meers et al., 1991). Подобный пример был так же описан для вируса гриппа «С». Сегмент 28S РНК был найден в области гена гемагглютинина, что так же привело к увеличению патогенности данного вируса (Khatchikian et al., 1989).

Хотя экспериментально возможность рекомбинации между клеточными РНК показать пока не удалось (отсутствие подходящих экспериментальных подходов), анализ первичной структуры некоторых сателлитных RQ РНК фага Q β показал, что они состоят только из фрагментов клеточных РНК (Muniskin et al., 1991; Moody et al., 1994).

Таким образом, за последнее время было описано большое количество примеров образования негомологичных рекомбинантов при участии различных вирусных и клеточных РНК. При этом существуют объективные сложности с объяснением механизма образования данных негомологичных рекомбинантов в рамках репликативной модели.

Данные трудности, по мнению А. Б. Четверина с соавторами, говорят о том, что логичнее описывать гомологичную и негомологичную рекомбинацию

не разными вариантами смены матрицы, а принципиально различными механизмами (Chetverin et al., 1997; Четверин, 1999).

Авторы обращают внимание на то, что одна и та же частота негомологичной рекомбинации наблюдается у вируса полиомиелита, обладающего высокой частотой гомологичной рекомбинации, РНК-содержащих колифагов, частота гомологичной рекомбинации которых в миллион раз ниже, и альфавирусов, у которых гомологичная рекомбинация, вообще, не обнаружена при использовании стандартных генетических подходов (Четверин, 1999).

Таким образом, частота гомологичной рекомбинации является вирус-специфическим параметром (Chetverin et al., 1997; Четверин, 1999), который может определяться эволюционно закрепленными свойствами репликативного комплекса (Lai, 1992). В то время как частота негомологичной рекомбинации не зависит от свойств репликативного комплекса того или иного вируса. При этом возможность рекомбинации между вирусной и клеточной РНК, а также между различными клеточными РНК по негомологичному типу говорит о том, что негомологичная РНК-рекомбинация явление более общее (универсальное), чем гомологичная.

Таким образом, по мнению авторов, логично предположить, что негомологичная рекомбинация осуществляется в рамках принципиально другого нерепликативного механизма (Chetverin et al., 1997; Четверин 1999).

Более того, экспериментальные данные позволяют говорить о том, что образование негомологичных рекомбинантов между фрагментами сателлитных РНК фага Q β идет по нерепликативному механизму, видимо, за счет химических свойств, присущих самим молекулам РНК (Chetverin et al., 1997; Chetverina et al., 1999).

2.1.2 Модель разрыв-лигирование

На данный момент нерепликативный механизм образования РНК-рекомбинантов показан для сателлитных РНК фага Qβ в бесклеточной системе репликации (Chetverin et al., 1997; Chetverina et al., 1999).

В экспериментах были использованы RQ РНК, которые являются естественными сателлитами фага Qβ. Вирусная РНК-полимераза может экспоненциально амплифицировать данные молекулы *in vitro* (Chetverin and Spirin, 1995). Вместо полноразмерных, способных к экспоненциальной репликации молекул, были использованы взаимодополняющие 5'- и 3'-фрагменты RQ РНК. При этом 3'-конец 5'-фрагмента и 5'-конец 3'-фрагмента содержали искусственно созданные чужеродные вставки. Таким образом, экспоненциально амплифицироваться может только молекула RQ РНК, которая возникла в результате рекомбинации между 5'- и 3'-фрагментами внутри чужеродной вставки.

Рекомбинанты детектировались при помощи метода молекулярных колоний (Chetverin et al., 1991; Chetverina and Chetverin, 1993). Согласно этому методу, образец РНК наносился на тонкий агарозный гель, содержащий Qβ репликазу. После этого, гель покрывался нейлоновой мембраной, пропитанной четырьмя рибонуклеозидтрифосфатами. Если на поверхности раздела геля и мембранны возникали способные к экспоненциальной репликации молекулы РНК (рекомбинанты), то через час появлялись колонии, каждая из которых содержала 10^{12} копий одной молекулы РНК (Chetverina and Chetverin, 1993). Таким образом, с помощью данного метода обеспечивался положительный отбор рекомбинантных молекул из большого числа не реплицирующихся молекул РНК.

При раздельной инкубации 5'- и 3'-фрагментов на агарозном слое, содержащем репликазу, образование колоний зафиксировано не было. Это свидетельствовало о том, что сконструированные 5'- и 3'-фрагменты действительно не способны экспоненциально реплицироваться Q β репликазой. С другой стороны, эквимолярное смешивание 5'- и 3'-фрагментов RQ РНК приводило к появлению колоний. Следовательно, в результате рекомбинации между фрагментами образовались способные к экспоненциальному репликации молекулы РНК. Частота рекомбинации (число колоний) была пропорциональна концентрации вносимых фрагментов. Число колоний увеличивалось, если проводилась предварительная совместная инкубация 5'- и 3'-фрагментов в течение двух часов. При этом было доказано, что 3'- и 5'-фрагменты образуют гетеродуплекс в зоне чужеродной вставки.

Определение нуклеотидной последовательности РНК из полученных колоний показало, что данные молекулы РНК являются продуктами межмолекулярной рекомбинации 5'- и 3'-фрагментов, при этом, в большинстве случаев место перекреста лежало внутри чужеродной вставки и его можно точно определить.

В соответствии с моделью смены матрицы преимущественно должны детектироваться рекомбинанты, места перекреста которых находятся внутри области гомологии между 3'- и 5'-фрагментами РНК. Однако рекомбинантов такого типа обнаружено не было. У большинства полученных рекомбинантов места перекреста располагались вне области гомологии фрагментов, т. е. они были негомологичными.

В состав 12 из 17 рекомбинантных молекул РНК последовательность 5'-фрагмента входила полностью. Это, по мнению авторов, говорит о том, что 3'-

концевой нуклеотид РНК 5'-фрагмента принимает непосредственное участие в механизме рекомбинации. Для проверки данной гипотезы 3'-концевой нуклеотид 5'-фрагмента подвергали химической модификации. Рибоза 3'-концевого нуклеотида была окислена раствором периодата (IO_4^-). При этом разрывается $\text{C}^{2'}-\text{C}^{3'}$ связь с образованием концевого диальдегида. Последующая обработка анилином способствует разрыву фосфодиэфирной $3'\text{P}-\text{O}^{5'}$ -связи. В результате, 5'-фрагмент становится на 1 нуклеотид короче, при этом, 3'-концевой нуклеотид (N^1) содержит 3'-ортофосфатную группу.

Использование модифицированного 5'-фрагмента, содержащего 3'-концевой монофосфат (после последовательной обработки растворами периодата калия и анилина), не приводило к образованию колоний. Удаление ортофосфата с 3'-конца модифицированного 5'-фрагмента фосфатазой восстанавливало частоту рекомбинации до начальных значений. На основе этих данных авторы сделали вывод, что для рекомбинации нужен именно 3'-концевой гидроксил 5'-фрагмента.

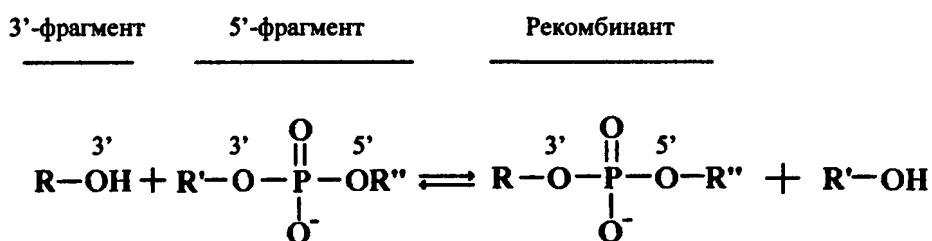


Рис. 2. Схематичное изображение механизма рекомбинации между 3'- и 5'-фрагментами сателлитных РНК фага Qβ. Рекомбинация осуществляется в результате одной реакции трансэтерификации за счет нулеофильной атаки 3'-концевым гидроксилом 5'-фрагмента на атом фосфора фосфодиэфирной связи 3'-фрагмента. В результате один фрагмент (R) замещает другой (R') с образованием рекомбинантной молекулы РНК.

Суммируя полученные данные, авторы предположили, что образование рекомбинантов идет по нерепликативному механизму за счет одной реакции трансэтерификации (нуклеофильного замещения у атома фосфора). При этом в

качестве нуклеофила используется 3'-концевой гидроксил 5'-фрагмента (рис. 2).

Кроме того, по мнению авторов, полученные данные показывают невозможность рекомбинации в данной системе по классическому механизму смены матрицы. Например, можно предположить, что окисление 3'-концевого гидроксила 5'-фрагмента запрещает следующий репликативный механизм: 5'-фрагмент отжигается на молекуле РНК комплементарной 3'-фрагменту (может быть синтезирована вирусной полимеразой). После этого, полимераза использует концевой участок 5'-фрагмента в качестве праймера для завершения синтеза полноразмерной цепи RQ РНК. При этом комплементарная 3'-фрагменту молекула РНК используется полимеразой в качестве матрицы.

Если рекомбинация в системе идет по данному механизму, то при окислении 5'-фрагмента частота рекомбинации должна уменьшиться максимум вдвое, Поскольку 3'-концевой гидроксил молекулы РНК, комплементарной 3'-фрагменту, не был модифицирован, и рекомбинация могла идти за счет удлинения данной молекулы РНК вирусной полимеразой, используя молекулу 5'-фрагмента в качестве матрицы. Однако, полное отсутствие рекомбинантов при химической модификации 5'-фрагмента говорит о том, что в рекомбинации принимают участие фрагменты с одинаковой полярностью.

Разработанная система *in vitro* прямо показывает, что рекомбинация между молекулами РНК может идти без участия белков клетки-хозяина. Однако остается неясным - могут ли фрагменты сателлитной RQ РНК рекомбинировать в отсутствии РНК-полимеразы фага Qβ.

Ответить на этот вопрос помогли эксперименты, проведенные Chetverina et al., (1999). Для изучения механизма РНК-рекомбинации были так же использованы взаимодополняющие 5'- и 3'-фрагменты RQ РНК.

3'- и 5'-фрагменты RQ РНК смешивали и преинкубировали в буфере с двухвалентным магнием и без него. Перед нанесением на слой агарозы (метод молекулярных колоний), содержащий Q β репликазу, 5'- и 3'-фрагменты прогревали (разрушение гетеродуплекса), при этом, 5'-фрагмент предварительно обрабатывали раствором периодата (окисление 3'-концевого нуклеотида). Разрушение гетеродуплекса и окисление 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента полностью ингибировало рекомбинацию в предыдущих опытах (Chetverin et al., 1997). Следовательно, при такой постановке эксперимента будут детектированы только те рекомбинанты, которые образовались в преинкубационном растворе до окисления и плавления. Таким образом, можно уверенно утверждать, что Q β репликаза не принимала участие в образовании данных рекомбинантов.

В экспериментах были использованы три варианта 5'-фрагмента. Фрагмент «а», содержащий интактный 3'-концевой нуклеотид (содержит 3'-гидроксил). Фрагмент «в», окисленный раствором периодата (содержит 3'-концевой диальдегид). Фрагмент «с», содержащий 3'-концевой ортофосфат.

Частоты рекомбинации при использовании в качестве 5'-фрагмента транскриптов «а», «в» и «с» говорят о следующем: (1) эффективность образования рекомбинантов критически зависит от наличия двухвалентного магния в преинкубационном растворе; (2) эффективность образования рекомбинантов не зависит от химической структуры 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента.

Определение первичной структуры рекомбинантов показало, что все места перекреста располагаются на внутренних участках 3'- и 5'-фрагментов. Рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента,

обнаружено не было (Chetverina et al., 1999).

Эти данные, по мнению авторов, позволяют говорить о двух, видимо, независимых механизмах образования негомологичных рекомбинантов в рамках нерепликативной модели рекомбинации.

(1) *Механизм с участием РНК-полимеразы фага Qβ*. Осуществляется за счет реакции трансэтерификации, с участием 3'-концевого гидроксила 5'-фрагмента в качестве нуклеофила. При этом полимераза способствует нуклеофильному замещению, выполняя либо структурную функцию (помогает функциональным группам принять выгодную взаимную ориентацию), либо катализирует непосредственно реакцию трансэтерификации (Chetverin et al., 1997).

(2) «Спонтанный» механизм рекомбинации. Рекомбинация идет, видимо, за счет свойств, присущих самим молекулам РНК. Для этого необходимо и достаточно наличие РНК и двухвалентных катионов магния (Chetverina et al., 1999).

Итак, нерепликативная рекомбинация между сателлитными РНК фага Qβ может идти по двум механизмам (Chetverin et al., 1997; Chetverina et al., 1999). В присутствии РНК-полимеразы фага Qβ рекомбинация идет за счет прямой нуклеофильной атаки 3'-концевым гидроксилом одной молекулы РНК на фосфодиэфирную связь другой молекулы РНК. Однако необходимость участия РНК-зависимой РНК-полимеразы фага Qβ в рекомбинации существенно ограничивает возможность использования данного механизма в качестве основного, в рамках нерепликативной рекомбинации.

Эксперименты показали, что рекомбинация между фрагментами сателлитной РНК фага Qβ может идти и в отсутствии РНК-полимеразы данного

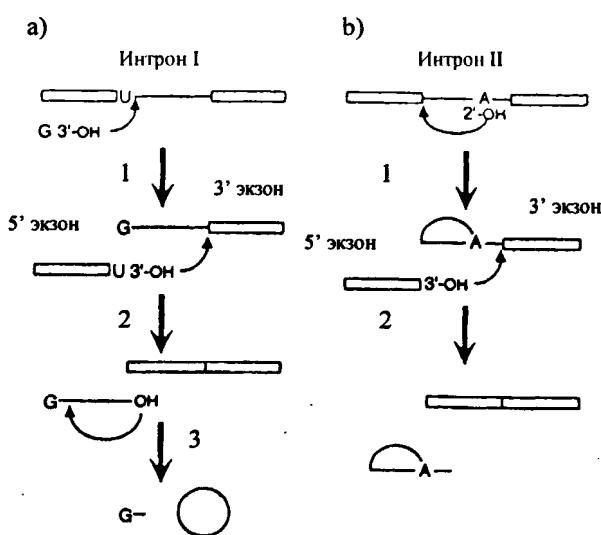
фага (Chetverina et al., 1999). При этом для эффективной «самопроизвольной» рекомбинации требуется наличие только молекул РНК и двухвалентных катионов магния. По мнению авторов, катионы магния катализируют разрывы фосфодиэфирных связей 3'- и 5'-фрагментов сателлитной РНК с образованием концевых 2', 3'-циклофосфата и 5'-гидроксила. Лигирование фрагментов осуществляется при помощи обратной реакции, за счет нуклеофильной атаки 5'-гидроксилом на 2', 3'-циклофосфат (Chetverina et al., 1999). Однако, пока не получено экспериментальных доказательств в пользу данного механизма нерепликативной рекомбинации.

2.1.3 Возможные механизмы нерепликативной рекомбинации

Образование рекомбинантной молекулы РНК в рамках нерепликативной модели рекомбинации принципиально возможно по нескольким схемам. В рамках одной из них, рекомбинация может осуществляться за счет прямой атаки 3'-концевым гидроксилом одной молекулы РНК на фосфодиэфирную связь другой РНК (см. обзор Cheh and Bass, 1986). Таким образом, реакции разрыва и лигирования в рамках данной схемы осуществляются за счет одной химической реакции (сопряжены). Данная реакция трансэтерификации описана при самосплайсинге инtronов первого и второго типов (рис. 3; см. обзоры Cech and Bass, 1986; Tanner 1999).

Удаление интрана из состава сплайсируемой РНК на второй стадии самосплайсинга у обоих типов инtronов происходит одинаково, за счет одной реакции трансэтерификации (нуклеофильного замещения у атома фосфора). При этом в качестве нуклеофила используется 3'-концевой гидроксил 5'-экзоны (Cech and Bass, 1986; Peebles et al., 1986; Van der Veen, 1986; McSwiggen and Cech, 1989; Rajagopal et al., 1989; Cech, 1990; Saldanha et al., 1993; Michel and

Ferat, 1995; Jacquier, 1996).



интрана ($5'$ -сплайсинг-сайт). Эта реакция (1) приводит к высвобождению $5'$ -экзона со свободным гидроксилом на $3'$ -конце, при этом гуанозин становится частью интрана. За счет нуклеофильной атаки $3'$ -концевым гидроксилом $5'$ -экзона (2) на фосфодиэфирную связь между последним нуклеотидом интрана и первым нуклеотидом $3'$ -экзона ($3'$ -сплайсинг-сайт) $5'$ -экзон (в лигируется с $3'$ -экзоном, что приводит к удалению интрана из состава пре-рРНК. Гуанозин, расположенный на $3'$ -конце интрана, за счет нуклеофильной атаки (3) на фосфодиэфирную связь между нуклеотидами 15-16 или 19-20 (нумерация от $5'$ -концевого нуклеотида), образует циклическую форму. (б) Сплайсинг интранов группы II идет за счет двух реакций трансэтерификации. Первая реакция (1) идет за счет нуклеофильной атаки $2'$ ОН аденина, принадлежащего интрану, на фосфодиэфирную связь между последним нуклеотидом $5'$ -экзона и первым нуклеотидом интрана ($5'$ -сплайсинг-сайт). За счет $2'$ - $5'$ -фосфодиэфирной связи образуется лассо-подобная структура, содержащая $3'$ -экзон. Затем, $5'$ -экзон, за счет реакции трансэтерификации (2), лигируется с $3'$ -экзоном. При этом интран высвобождается в виде лассо-подобной структуры.

Рис. 3. Механизм самосплайсинга интранов группы I (а) и II (б) (Tanner, 1999). В обоих случаях удаление интранов и лигирование экзонов осуществляется за счет последовательных реакций трансэтерификации (нуклеофил и направление нуклеофильной атаки показаны тонкой окружной стрелкой). (а) Сплайсинг интранов первого типа осуществляется за счет двух реакций трансэтерификации. На первом этапе $3'$ -гидроксил свободного гуанозина действует как нуклеофил, атакуя фосфодиэфирную связь между последним нуклеотидом $5'$ -экзона и первым нуклеотидом

v

Таким образом, механизм рекомбинации между сателлитными RQ РНК фага Q β с участком вирусной РНК-полимеразы аналогичен второй стадии самосплайсинга интранов первого и второго типов (рис. 3). Теоретически образование рекомбинантной молекулы РНК возможно за счет прямой нуклеофильной атаки $5'$ -концевым гидроксилом одной РНК на фосфодиэфирную связь другой молекулы РНК. Однако, на данный момент, эта реакция у полиривонуклеотидов не описана.

В рамках другой схемы образование рекомбинанта может осуществляться с помощью двух последовательных реакций. На первом этапе

происходит разрыв межнуклеотидной связи у каждой из родительских РНК. Образование рекомбинанта идет за счет перекрестного лигирования образующихся концевых нуклеотидов. Таким образом, механизм рекомбинации в рамках данной схемы состоит из двух последовательных (несопряженных) реакций. Теоретически возможен механизм, когда после разрыва межнуклеотидных связей факторы белковой (ферменты) или небелковой природы изменяют химическую структуру 3'- и/или 5'-концевых нуклеотидов молекул РНК, участвующих в рекомбинации.

Данной схеме соответствуют два механизма, которые различаются химической структурой концевых нуклеотидов, участвующих в формировании стандартной фосфодиэфирной связи.

Согласно одному механизму, фосфодиэфирная связь родительских РНК разрывается с формированием 3'-концевого гидроксила и 5'-концевого фосфата в результате атаки «внешним» нуклеофилом (например, поляризованная молекула воды) (см. обзоры Adams et al., 1986; Pyle, 1993; Tanner, 1999). Данные концевые нуклеотиды могут быть использованы Т4 РНК лигазой для перекрестного лигирования (Sninsky et al., 1976; Ohtsuka et al., 1976; Sugino et al., 1977).

Второй механизм предполагает разрыв межнуклеотидной связи РНК за счет нуклеофильной атаки соседним 2'-гидроксилом рибозы на фосфодиэфирную связь. В результате образуются два фрагмента с концевыми нуклеотидами, несущими 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил. Концевые нуклеотиды с данной химической структурой могут быть лигированы за счет реакции трансэтерификации, где в качестве нуклеофила выступает 5'-концевой

гидроксил. Таким образом, механизм лигирования обратен механизму разрыва межнуклеотидной связи (Symons, 1992, 1997; Tanner, 1999).

В природе данные механизмы разрыва и лигирования осуществляются при репликации кольцевых патогенных РНК (вириоидов, вирусоидов, вируса гепатита дельта (Branch et al., 1990; Symons, 1989, 1990a, 1990b, 1992, 1997; Taylor, 1990; Tanner, 1999).

В качестве схемы репликации данных РНК был предложен механизм по типу катящегося кольца (Branch et al., 1990; Symons, 1990a, 1990b, 1992, 1997). Два типа данного механизма репликации кольцевых РНК схематично изображены на рис. 4.

Сравнительный и мутационный анализ первичной структуры различных кольцевых патогенных РНК показали, что автокатализитический разрыв конкатамерных форм при репликации осуществляют так называемые “малые каталитические РНК” или рибозимы, обладающие характерной консервативной вторичной структурой (Bruening, 1990; Symons, 1990a; 1990b; 1992).

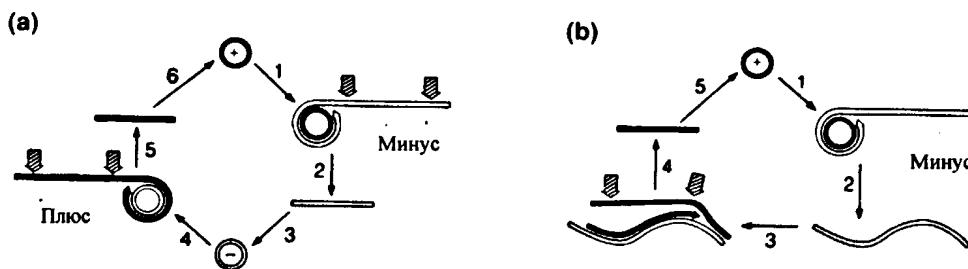


Рис. 4. Механизм репликации кольцевых патогенных РНК по типу катящегося кольца. (а) модель репликации, согласно которой, линейные конкатамеры плюс (сплошная черная линия) и минус (сплошная белая линия) РНК способны автокатализитически нарезаться по определенным сайтам (выделены стрелками). В результате образуются линейные плюс и минус мономеры. (б) Модель репликации, согласно которой минус конкатамер не способен к автокатализитическому процессингу. При этом плюс конкатамер копируется непосредственно с минус конкатамера.

У вироидов и вирусоидов различают структуры типа hammerhead и hairpin. Вирус гепатита дельта содержит, так называемый HDV-рибозим (Symons, 1990a, 1992, 1997; Taylor, 1990).

Рибозимы типа hairpin, hammerhead и HDV-рибозим, используя различные каталитические стратегии, в присутствии катионов двухвалентных металлов, автокатализически разрывают фосфодиэфирную межнуклеотидную связь с образованием 2', 3'-циклофосфата и 5'-концевого гидроксила (Uhlenbeck, 1987; Dahm and Uhlenbeck, 1991; Birikh et al., 1997; Ferre-D'Amare et al., 1998; Kuimelis and McLaughlin, 1998; Perrotta et al., 1999; Nakano et al., 2000; Rupert and Ferre-D'Amare, 2001).

Наиболее изученным является рибозим типа hammerhead. Поэтому рассмотрим структуру и функцию рибозима данного типа несколько подробнее. Консенсусная вторичная структура рибозима типа hammerhead изображена на рис. 5. Рибозим типа hammerhead состоит из трех спиральных доменов [I, II, III], которые соединяются двумя одноцепочечными участками, формирующими каталитический центр. Согласно данным мутационного анализа, качественная и количественная структура одноцепочечных участков консервативна и абсолютно необходима для автокатализической активности рибозима *in vitro* (Ruffner et al., 1990). В природе два из трех спиральных доменов заканчиваются петлевыми участками, т. е. рибозим является внутримолекулярной структурой (*in cis*). Каталитически активная структура (в присутствии катионов двухвалентных металлов) может образоваться *in vitro* из двух (Uhlenbeck 1987; Jeffries and Symons, 1989) или из трех синтетических олигонуклеотидов [структура *in trans*] (Koizumi et al., 1988a, 1988b), при этом, длина спиральных доменов должна быть не менее двух нуклеотидов (Tuschl and Eckstein, 1993).

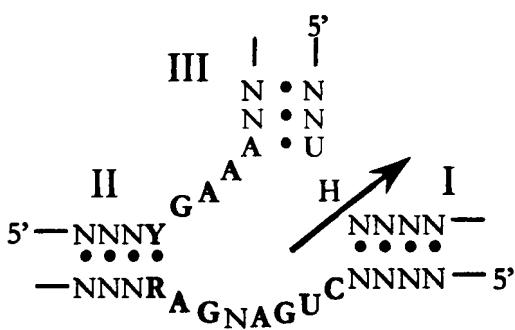


Рис. 5. Консенсусная структура рибозима типа hammerhead образована тремя спиральными участками, доменами I, II и III (N – это любой нуклеотид, а H – любой кроме G), разделенными одноцепочечными участками. Красным цветом выделены консервативные нуклеотиды, образующие каталитический центр рибозима (R - пурин, Y - пиридин). Данная структура в присутствии двухвалентных ионов магния автокатализически разрывает определенную (обозначена синей стрелкой) межнуклеотидную фосфодиэфирную связь.

Структура типа hammerhead является истинным металлоферментом, который способен осуществлять катализ разрыва межнуклеотидной связи как и *in vivo*, так и *in vitro* (Birikh, 1997). Данный вывод так же справедлив как для рибозима типа hairpin, так и для HDV-рибозима.

Лигирование линейных мономеров у некоторых вироидов, вирусоидов и вируса гепатита дельта после автокатализического процессинга может осуществляться с помощью рассмотренных выше рибозимов. При этом 5'-концевой гидроксил (нуклеофил) атакует 2',3'-циклофосфат с образованием стандартной 3',5'-фосфодиэфирной связи (Tanner, 1999). Автокатализическое лигирование эффективно осуществляет рибозим типа hairpin (Buzayan et al., 1986, 1988; Van Tol et al., 1990; Van Tol et al., 1991; Buzayan et al., 1995; Chey et al., 1997) и HDV-рибозим (Wu and Lai, 1989; Taylor, 1990; Tanner, 1999).

Рибозим типа hammerhead не способен эффективно осуществлять обратную реакцию лигирования (Symons, 1990b). В связи с этим предполагается, что лигирование линейных мономеров вироидов и вирусоидов, содержащих рибозим типа hammerhead, осуществляют РНК-лигазы клетки-хозяина (Symons, 1990a, 1992, 1997).

Эффективность и точность автокаталитических реакций разрыва и лигирования у кольцевых патогенных РНК требует сохранения нативными уникальных вторичных структур рибозимов (Wu and Lai, 1989; Bruering, 1990; Taylor, 1990; Symons, 1992; Tanner, 1999). Это обстоятельство затрудняет использование данных реакций в качестве кандидата на механизм нерепликативной рекомбинации. Однако, реакции разрыва и лигирования с участием 2',3'-циклофосфата и 5'-гидроксила относительно эффективно идут и без непосредственного участия рибозимов.

Реакции разрыва фосфодиэфирной связи с образованием 2',3'-циклофосфата и 5'-гидроксила.

(A) Образование 2',3'-циклофосфата и 5'-гидроксила возможно при частичном гидролизе РНК некоторыми неспецифическими эндонуклеазами: РНКазами A, HP, T1, T2, N1, I (*E. coli*), M1 и другими (Збарский и Дебов, 1968; Шапот, 1968).

Все перечисленные РНКазы гидролизуют фосфодиэфирную связь с образованием 3'-монофосфата и 5'-гидроксила и по механизму реакции являются трансферазами. Реакция гидролиза фосфодиэфирной связи состоит из двух этапов. На первом этапе в результате разрыва фосфодиэфирной связи образуются 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил. На втором этапе гидролизу подвергаются 2',3'-циклофосфаты. Однако вторая реакция протекает гораздо медленнее, чем первая, фосфотрансферазная стадия. Для РНКазы A скорость дегидратации на два порядка ниже, чем скорость первого этапа. У РНКазы N1 скорость реакции гидролиза циклофосфата в девять раз ниже, чем трансферазная реакция. Более того, РНКазы T1 и T2 процесс дегидратации 2',3'-циклофосфата не доводят до конца. РНКаза листьев табака, вообще, не

гидролизует 2',3'-циклофосфаты пуриновых нуклеотидов, что напоминает РНКазу M1, которая не гидролизует 2',3'-циклофосфат пиримидиновых нуклеотидов (Збарский и Дебов, 1968; Шапот, 1968).

Таким образом, в процессе частичного гидролиза под действием некоторых РНКаз могут образоваться молекулы РНК, содержащие концевые 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил.

(B) *Деградация РНК*. В сравнимых условиях стабильность межнуклеотидной связи РНК в 100000 раз меньше, чем ДНК (Li and Breaker, 1999). Подобная нестабильность обусловлена наличием гидроксила у второго атома углерода рибозного кольца. За счет относительно эффективной спонтанной нуклеофильной атаки 2'-гидроксила на атом фосфора, фосфодиэфирная межнуклеотидная связь разрывается с образованием 5'-гидроксила и 2',3'-циклофосфата (Usher and McHale, 1976; Soukup and Breaker, 1999; Li and Breaker, 1999). При этом интенсивность неспецифичной деградации РНК принципиально не зависит от качественного состава оснований нуклеотидов (Li and Breaker, 1999).

Деградация может быть усиlena с помощью катионов двухвалентных металлов. При этом катионы металлов могут катализировать разрыв фосфодиэфирной связи независимо от состава оснований полирибонуклеотидной цепи (Brown et al., 1985; Ciesiolka et al., 1992; Pyle, 1993; Zagorovska et al., 1998; Soukup and Breaker, 1999; Li and Breaker, 1999).

Лигирование нуклеотидов, содержащих 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил, с образованием стандартной фосфодиэфирной связи.

Лигирование молекул РНК (с образованием стандартной 3',5'-фосфодиэфирной связи) может идти за счет нуклеофильной атаки 5'-концевого

гидроксила (нуклеофил) на 2',3'-циклофосфат (Symons, 1992, 1997; Tanner, 1999). Данная реакция лигирования может идти либо самопроизвольно, либо при участии определенных факторов.

Возможность самопроизвольного механизма данной реакции трансэтерификации косвенно подтверждается повышенной реакционной способностью 2',3'-циклофосфата. Повышенная реакционная способность является характерным свойством фосфодиэфиров, существующих в виде пятичленного цикла. В сравнимых условиях данные пятичленные циклы гидролизуются в 10^7 - 10^8 раз эффективнее, чем фосфодиэфиры с открытой цепью. Такая реакционная способность обусловлена напряжением цикла, которое может быть снято за счет образования в ходе реакции нуклеофильного замещения переходного пентокоординированного состояния с последующим расщеплением до 2'- или 3'-монофосфатов (Кочетков, 1986).

Однако, согласно литературным данным, лигирование молекул РНК, содержащих 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил, *in vitro* самопроизвольно не идет (Usher and McHeil, 1976; Sharmin et al., 1989; Reid and Lazinski, 2000). Эффективность данной реакции *in vitro* повышается участием в лигировании третьей (поддерживающей) молекулы, которая за счет межмолекулярных РНК-дуплексов фиксирует 3'- и 5'-концевые нуклеотиды в непосредственной близости друг от друга (Usher and McHeil, 1976; Sharmin et al., 1989; Baumstark et al., 1997).

Согласно данным Usher and McHeil (1976), эффективность лигирования двух молекул РНК (олиго A₆) *in vitro* в присутствии поддерживающей молекулы ДНК (олиго T₁₅), составляла 25%. Однако анализ продуктов выявил преимущественное образование 2',5'-фосфодиэфирной связи в сайте

лигирования. Увеличить эффективность образования 3',5'-fosфодиэфирной связи до 50% удалось при лигировании фрагментов геномной РНК вируса гепатита дельта (Sharmeen et al., 1989). При этом в качестве поддерживающей последовательности был использован соответствующий фрагмент антигеномной РНК данного вируса. Однако в обоих случаях лигирование шло с достаточно низкой скоростью (Usher and McHale, 1976; Sharmeen et al., 1989). При этом эффективность данной реакции изучали при нефизиологических условиях (в 1M растворе этилендиамина), что существенно затрудняет интерпретацию этих данных для биологических систем. Некоторую ясность в этом вопросе вносят данные по механизму процессинга вироидов PSTV группы (Baumshtark et al., 1997).

Вироиды PSTV группы (от сокращения английского названия вироида веретеновидности клубней картофеля [potato spindle tuber viroid; Symons, 1990a]) реплицируются по второму варианту механизма катящегося кольца (рис. 4), при этом, кольцевая РНК данных вироидов не содержит вторичных структур, обладающих автокатализической эндонуклеазной активностью (Baumshtark et al., 1997; Symons, 1997). Предполагается, что процессинг плюс конкатамера осуществляется при помощи клеточных эндонуклеаз (Baumshtark et al., 1997). У подавляющего большинства вироидов данной группы консервируется первичная структура центрального участка (далее CCR-сайт). Последовательные разрывы клеточными эндонуклеазами определенных межнуклеотидных связей в соседних CCR-сайтах конкатамера приводят к образованию линейного мономера, при этом, концевые нуклеотиды фиксируются в оптимальном положении относительно друг друга, за счет образования РНК-дуплексов с определенным участком этого же мономера

(поддерживающая последовательность). Реакция лигирования (циркуляризация) может происходить самопроизвольно в солевом растворе ядерного экстракта клеток картофеля, не содержащего белков. Однако, добавление в буфер фракции экстракта, содержащего ядерные белки, увеличивало выход кольцевых мономеров на порядок (Baumshark et al., 1997).

Таким образом, на основе литературных данных пока нельзя однозначно говорить о возможности эффективного образования стандартной 3',5'-fosfodiэфирной связи у полирибонуклеотидов за счет самопроизвольного механизма лигирования с участием 2',3'-циклофосфата и 5'-концевого гидроксила *in vivo*.

Однако существуют клеточные РНК-лигазы, которые эффективно лигируют молекулы РНК, содержащие 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил, с образованием стандартной fosfodiэфирной связи (см. обзор Filipowicz and Groos, 1984).

Согласно литературным данным, экстракт клеток зародышей пшеницы содержит РНК-лигазу, которая осуществляет эффективное лигирование молекул РНК, содержащих 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил (Konarska et al., 1981; Schwartz et al., 1983; Pick et al., 1986; Pick and Hurwitz, 1986). При этом данная РНК-лигaza обладает широкой субстрат специфичностью и в качестве субстрата может использовать: геномную РНК вируса мозаики табака (Konarska et al., 1981, 1982), линейные молекулы РНК различных виридов и вирусоидов (Branch et al., 1982; Kikuchi et al., 1982; Kiberstis et al., 1985), несплайсированные тРНК (Gedenheimer et al., 1983), различные синтетические олигонуклеотиды (Ap)_npA>p, (Cp)₁₁pG>p (Furneauh et al., 1983; Schwartz et al., 1983).

Экстракт клеток HeLa и ядерный экстракт ооцитов шпорцевой лягушки

также содержат РНК-лигазу, которая осуществляет эффективное внутримолекулярное (циркуляризация) и межмолекулярное лигирование различных высокомолекулярных РНК, содержащих 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил (Nishikura and De Robertis, 1981; Standring et al., 1981; Filipowicz and Shatkin, 1983; Laski et al., 1983; Perkins et al., 1985; Reid and Lazinski, 2000). При этом данная РНК-лигаза также обладает широкой субстратной специфичностью (Nishikura and De Robertis, 1981; Laski et al., 1983; Filipowicz et al., 1983; Filipowicz and Shatkin, 1983; Perkins et al., 1985).

Исследования показали, что гомогенный препарат РНК-лигазы клеток HeLa и ядер ооцитов шпорцевой лягушки не может использовать в качестве субстрата молекулы РНК, содержащие концевые 2'-фосфат, 2'-дезокси или 3'-фосфат. Однако, согласно данным Filipowicz et al. (1983), данные экстракты содержат активность, которая позволяет РНК-лигазе использовать в качестве субстрата клеточные РНК и синтетические олигонуклеотиды, содержащие 3'-концевой монофосфат.

Циклаза концевого 3'-фосфата. В экспериментах Filipowicz et al. (1983), РНК-лигазная активность экстрактов клеток HeLa и ядер ооцитов шпорцевой лягушки в качестве субстрата использовала молекулы РНК, содержащие как 2',3'-циклофосфат, так и 3'-монофосфат. Лигирование молекул РНК с 3'-концевым монофосфатом замедляло общую скорость реакции. Снижение скорости вызвала предварительная АТФ-зависимая циклизация 3'-концевого монофосфата до 2',3'-циклофосфата (Filipowicz et al., 1983). При этом молекулы РНК, содержащие концевые 2'-фосфат или 2'-дезокси-3'-фосфат, в качестве субстрата циклазной активностью не использовались (Filipowicz et al., 1983). ✓

Пептид, обладающий способностью циклизовать 3'-концевой монофосфат,

был выделен из экстракта клеток HeLa (Filipowicz et al., 1985; Reinberg et al., 1985; Vincente and Filipowicz, 1988).

При помощи иммунофлуорисцентных методов было установлено, что в клетках линий HeLa и C6 (glioma крыс) 98% циклазы концевого 3'-фосфата содержится в ядре и лишь 2% в цитоплазме. Клетки Р19 (мышиная эмбриональная карцинома) содержит циклазу концевого 3'-фосфата только в ядре (Genschik et al., 1997). При этом относительно низкое (по сравнению с ядерной фракцией) содержание фермента в цитоплазме клеток HeLa не является препятствием для эффективного участия циклазы концевого 3'-фосфата в лигировании различных РНК при использовании цитоплазматического экстракта данных клеток (Filipowicz et al., 1983).

Точная функция циклазы концевого 3'-фосфата в клетке не известна. 2',3'-циклофосфат является субстратом для различных РНК-лигаз, в связи с этим, предполагают участие циклазы концевого 3'-фосфата в некоторых реакциях РНК-процессинга (Filipowicz and Gross, 1984; Genschik et al., 1997).

Циклаза концевого 3'-фосфата обладает широкой субстратной специфичностью и в качестве субстрата может использовать: различные тРНК-pNr (Filipowicz and Shatkin, 1983), 5S pРНК-pCp, синтетические олигонуклеотиды с концевыми pAp pCp pGp, (Filipowicz et al., 1983; Filipowicz et al., 1985; Vincente and Filipowicz, 1988; Genschik et al., 1997).

Таким образом, широкая субстратная специфичность циклазы концевого 3'-фосфата и рассмотренных выше РНК-лигаз говорит о том, что данные ферменты теоретически могут участвовать в нерепликативной рекомбинации на стадии лигирования.

Итак, в рамках нерепликативной модели существуют несколько схем

реакций, которые принципиально могут обеспечить рекомбинацию между двумя различными РНК с образованием стандартной межнуклеотидной связи в сайте перекреста. Образование рекомбинанта может идти сплайсинг-подобному механизму за счет прямой атаки 3'-концевым гидроксилом одной родительской РНК на межнуклеотидную связь другой родительской РНК. Кроме того, рекомбинация может идти за счет перекрестного лигирования молекул РНК, содержащих концевые 2', 3'-циклофосфат и 5'-гидроксил или 3'-гидроксил и 5'-монофосфат. Существование циклазы 3'-концевого фосфата позволяет участвовать в рекомбинации молекулам РНК, содержащим 3'-концевой монофосфат.

Итак, подводя итог, можно сказать, что для объяснения механизма РНК-рекомбинации можно использовать две принципиально отличающиеся модели.

Репликативная модель на данный момент является общепринятой. С ее помощью, с тем или иным успехом, объясняют образование рекомбинантов у подавляющего большинства РНК-содержащих вирусов. Однако в рамках репликативной модели рекомбинации, существуют объективные трудности с объяснением образования большей части негомологичных рекомбинантов.

Тем временем, существует нерепликативная модель. С помощью данной модели теоретически можно объяснить образование негомологичных рекомбинантов любого типа. Более того, данная модель позволяет объяснить механизм рекомбинации, когда в качестве родительских РНК выступают вирусная и клеточная РНК, что особенно важно с точки зрения эволюции РНК-содержащих вирусов. Не смотря на это, нерепликативная модель рассматривается большинством авторов как маловероятная альтернатива модели смены матрицы.

• Тем не менее, в работе Chetverin et al., (1997), было показано, что негомологичная рекомбинация между фрагментами сателлитных РНК фага Q β идет по нерепликативному механизму, вероятно, за счет химических свойств, присущих самим молекулам РНК (Chetverina et al., 1999).

В связи с этим была поставлена задача, выяснить возможность получения инфекционных рекомбинантов вируса полиомиелита по нерепликативному механизму.

Для решения поставленной задачи в качестве рекомбинационных партнеров было решено использовать взаимодополняющие 3'- и 5'-фрагменты геномной РНК вируса полиомиелита. Данные фрагменты должны удовлетворять двум основным требованиям:

- (1) Молекулы РНК 3'- и 5'-фрагментов не должны самостоятельно реплицироваться, но рекомбинация между ними должна приводить к образованию жизнеспособного вируса.
- (2) Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза должна появиться только после образования рекомбинантной молекулы.

Предполагается, что большинство рекомбинантов, образовавшихся по нерепликативному механизму, будут негомологичными. Следовательно, 3'- и 5'-фрагменты должны быть сконструированы так, чтобы места перекреста рекомбинантов концентрировались на участке вирусного генома, где разрешены различные перестройки первичной структуры без существенного снижения инфекционности вируса.

По причинам, изложенным ниже, было принято решение использовать 3'- и 5'-фрагменты геномной РНК вируса полиомиелита, последовательности которых перекрываются в 5'-НТО.

2.2 Структура 5'-НТО вируса полиомиелита

Геном полiovируса представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, длина которой составляет 7500 нт. Геномная РНК содержит на 5'-конце ковалентно-пришитый низкомолекулярный вирусный белок VPg. 3'-конец вирионной РНК полиаденилирован (см. обзор Wimmer et al., 1993).

Вирусные белки закодированы в одной непрерывной рамке считывания и транслируются в виде полипротеина, из которого путем ограниченного протеолиза вирус-специфическими протеазами образуются все известные вирусные белки (Kitamura, 1981). Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза, обеспечивает синтез дочерних молекул РНК (Wimmer et al., 1993). При этом в качестве праймера РНК-полимераза использует уридилированную форму VPgpU(pU) (см. обзор Agol et al., 1999).

Первым шагом в репликации является синтез комплементарной минус-цепи на плюс-РНК матрице. Синтез минус-РНК начинается на 3'-конце матрицы. Сигнал (oriR) для сборки инициаторного комплекса находится в 3'-НТО (70 нуклеотидов) поблизости от 3'-конца (Pilipenko et al., 1992b; Pilipenko et al., 1996). Минус цепь служит матрицей для синтеза дочерних плюс цепей РНК. При этом второй сигнал (oriL) направляет сборку инициаторного комплекса возле 3'-конца минус-цепи РНК и локализуется в 5'-концевом участке плюс РНК (Andino et al., 1990, 1993). Этот сигнал содержит первые 88 нуклеотидов 5'-НТО полiovируса (Rivera et al., 1988; Andino et al., 1990).

В репликации полiovируса также принимает участие CRE-элемент, который расположен в кодирующей части вирусного генома (Goodfellow et al., 2000). Данный cis-элемент контролирует уридилирование VPg (Paul et al., 2000; Rieder et al., 2000).

Инициация синтеза плюс (Andino et al., 1990, 1993) и минус цепи (Barton et al., 2001; Herold and Andino, 2001; Lyons et al., 2001), а так же уридилирование VPg (Lyons et al., 2001) требует сохранение нативной структуры элемента oriL. Кроме того, данный элемент при помощи 3CD(pro) угнетает инициацию трансляции, что способствует началу эффективной репликации вирусного генома (Gamarnic and Andino, 1988). Таким образом, предполагается, что данный элемент выполняет функцию регулятора процессов инициации трансляции и репликации в процессе вирусной инфекции (Gamarnic and Andino, 1988; Herold and Andino, 2001).

Инициация трансляции на полiovирусной РНК существенно отличается от инициации трансляции, происходящей на клеточных мРНК. 40S субъединица садится на внутренний участок вирусной РНК при помощи cis-элемента, названного IRES (от английского “Internal Ribosome Entry Site”) (Pelleter and Sonenberg, 1988; Pelleter et al., 1988a). IRES располагается на внутреннем участке 5'-НТО, которая заканчивается стартовым AUG₇₄₃ кодоном (Kitamura, 1981).

В различных лабораториях были проведены эксперименты, направленные на определение границ IRESa. Для этого широко применялся метод делеционного картирования с использованием конструкций, у которых репортерный ген помещали под трансляционный контроль 5'-НТО вируса полиомиелита.

Согласно данным Nicholson et al. (1991), удаление 80 или 105 5'-концевых нуклеотидов 5'-НТО полiovируса типа 2 уменьшало эффективность экспрессии репортерного гена *in vivo* в 2 раза, делеция до 134 нуклеотида – в 4 раза, а до 155 – полностью ее подавляла. Ингибирование трансляции *in vivo*

вызывало удаление нуклеотидов 125-164 (полиовирус тип 3; Percy et al., 1992) и 127-165 (полиовирус тип 2; Nicholson et al., 1991). Следовательно, 5'-границу IRESa можно расположить между 134-м и 155-м нуклеотидами, исходя из экспериментов по трансляции репортерных конструкций *in vivo*.

Логично было предположить, что 3'-граница IRESa расположена вблизи инициаторного AUG₇₄₃ кодона. Однако для вируса полиомиелита было обнаружено, что протяженные делеции участков 630-726, 622-726, 600-726 (полиовирус тип 1, штамм Сэбин) не влияют на жизнеспособность вируса (Kuge and Nomoto, 1987). Удаление нуклеотидов 632-732 (полиовирус тип 2) не влияет на трансляцию репортерных конструкций (Pelletier and Sonenberg, 1988) в экстрактах из клеток HeLa, предварительно инфицированных полиовирусом. Аналогичный эффект был получен при делеции участка 630-723 у полиовируса типа 1 штамма Mahoney (Trono et al., 1988). Более того, удаление нуклеотидов с 612 вплоть до инициаторного AUG₇₄₃ в 5'-НТО РНК полиовируса типа 2 привело даже к 30% увеличению эффективности трансляции *in vivo* и *in vitro* (Nicholson et al., 1991, Meerovitch et al., 1991). Следовательно, участок 611-742 не входит в состав IRESa. При этом делеция участка 585-736 полиовируса типа 2 уменьшает трансляционную активность матрицы в 3-5 раз *in vivo* и *in vitro* (Nicholson et al., 1991, Meerovitch et al., 1991).

Кроме того, геном вируса полиомиелита содержит консервативный для пикорнавирусов элемент (названный ОАТ) – tandem, состоящий из олигопиримидинового блока [559UUUCC₅₆₄] и AUG₅₈₆-триплета (молчащего для энтеро- и риновирусной группы, и инициаторного для кардио- и автоворусной группы). Отсутствие данного *cis*-элемента, а также различные нарушения его структуры приводят к ингибиованию матричной активности полиовирусной

РНК как *in vivo*, так и *in vitro* (Nicholson et al., 1991; Meerovitch et al., 1991; Pestova et al., 1991; Pilipenko et al., 1992a; Gmyl et al., 1993). Предполагается, что ОАТ принимает непосредственное участие в посадке рибосомы на внутренний участок РНК при инициации трансляции (Nicholson et al., 1991; Pestova et al., 1991; Pilipenko et al., 1992a). Следовательно, 3'-границу IRESa можно расположить между нуклеотидами 588-611.

Суммируя, можно сказать, что IRES находится в сегменте 5'-HTO вируса полиомиелита с 5'-концевой границей между нуклеотидами 134-155 и 3'-концевой границей между нуклеотидами 588-610. Этот сегмент включает в себя три интактных домена (B-D), часть домена A, пиримидин богатый спейсер между доменами D и E, а также часть восходящей ветви домена E (до триплета AUG₅₈₆, включительно) (рис. 6) (более подробно см. обзор Agol, 1991).

Таким образом, 5'-HTO вируса полиомиелита содержит: репликативный cis-элемент (oriL), который включает первые 88 нуклеотидов; трансляционный cis-элемент (IRES), который располагается на участке от 134-155 до 588-611. При этом существует участок между IRESом (точнее, олигопирамидин-AUG₅₈₆ tandemом) и стартовым кодоном AUG₇₄₃. Здесь разрешены различные перестройки первичной структуры без существенного ущерба для инфекционности вируса (Kuge and Nomoto, 1987; Pilipenko et al., 1992a; Gmyl et al., 1993; Slobodskaya et al., 1996).

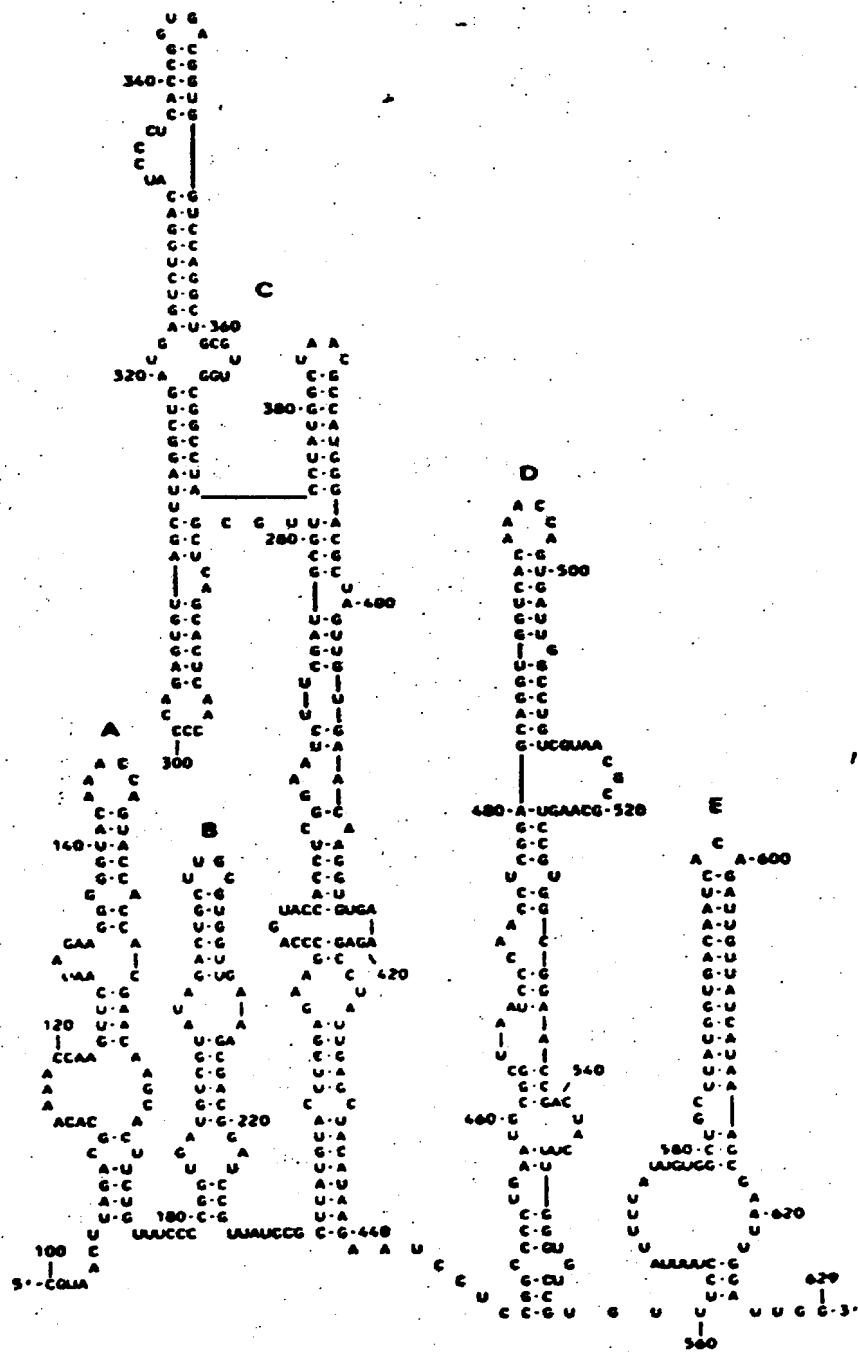


Рис. 6. Вторичная структура центральной части 5'-НТО РНК вируса полиомиелита типа 1 штамм Mahoney (Agol, 1991).

Итак, для решения поставленной задачи в качестве рекомбинационных партнеров было решено использовать неспособные к самостоятельной репликации взаимодополняющие 3'- и 5'-фрагменты геномной РНК вируса полиомиелита. При этом данные фрагменты необходимо конструировать с

таким расчетом, чтобы предполагаемые места перекреста концентрировались на участке между IRESом и стартовым AUG-кодоном, поскольку здесь разрешены различные перестройки первичной структуры без существенного ущерба для инфекционности вируса. При этом отсутствие явного селективного давления на структуру рекомбинанта на данном участке позволит получить наиболее полную информацию о структуре и распределении мест перекреста у рекомбинантов.

3 Материалы и методы

3.1 Ферменты и реактивы

Все использованные в работе рестриктазы и ферменты нуклеинового обмена были произведены фирмами “Fermentas” (Вильнюс) и “Promega”. В работе, как правило, использовали реактивы фирм Fluka, Serva, Merk и др., а также отечественные категории “о.с.ч”. Фенол и этиловый спирт перед использованием дополнительно перегоняли.

3.2 Плазмиды

3.2.1 pSVP. Инфекционная плазмида pSVP, содержащая кДНК полиовируса типа 1 Mahoney (Racaniello and Baltimore, 1981), любезно предоставлена Д. Балтимором. Она состоит из трех функционально важных участков: 1. Фрагмента плазмиды pBR322 между сайтами *PvuII* (2067) и *EcoRI* (4360). Этот участок содержит информацию, необходимую для автономной репликации плазмиды в *E. coli*, а также селективный маркер – ген устойчивости к ампициллину (*Amp^r*). 2. Фрагмента SV-40 между сайтами *PvuII* (290) и *HindIII* (5171), содержащего *ori* SV-40. 3. Полной кДНК вируса полиомиелита типа 1 Mahoney.

3.2.2 pT7PV1. Плазмида pT7PV1 (Van der Werf et al., 1986), любезно предоставлена Е. Виммером. Она состоит из трех функционально важных участков: 1. Фрагмента плазмиды pBR322 между сайтами *BamHI* (375) и *EcoRI* (4360). Этот участок содержит информацию, необходимую для автономной репликации плазмиды в *E. coli*, а также ген *amp^r*. 2. Фрагмента, содержащего

транскрипционный промотор для РНК полимеразы фага T7. 3. Полной кДНК вируса полиомиелита типа 1 Mahoney.

3.2.3 pBSM13(-). Эта плазмида (Vector Cloning Systems) сконструирована на основе pUC19 путем введения транскрипционных промоторов фагов T7 и T3 в кодирующий участок гена *lacZ*, а также, встроенного по *NarI* сайту, 454-нуклеотидного фрагмента фага M13, содержащего *ori*, который активируется при суперинфекции клеток фагом M13. При этом происходит накопление одноцепочечной плазмидной ДНК, которая упаковывается и секretируется в среду в виде вирионподобной частицы.

3.2.4 pBMI. Эта плазмида была создана на основе вектора pBM13(-), который содержит сигналы репликации фага M13 и плазмиды pBR322. Селективный маркер – ген устойчивости к ампициллину (Amp^r). В полилинкер вектора по сайтам Kpn1 и Sph1 встроен Kpn1/Sph1, соответствующий 70-1131 нуклеотидам полiovirusной РНК. Данная плазмида получена в нашей лаборатории (Pilipenko et al., 1992a).

3.3 Бактериальные штаммы

3.3.1 *E. coli* HB101: *F*⁻, *leuB6*, *proA2*, *recA13*, *thi1*, *ara-14*, *lacY1*, *galK2*, *xyl-5*, *mtl-1*, *rpsL20*, *t*, *supE44*, *hsdS20(r^r_B, m^r_B)* - хорошо растет и эффективно трансформируется описанным ниже методом. Наличие мутации *recA* снижает частоту рекомбинации. Фенотип F⁻ исключает возможность конъюгации. Этот штамм использовали для большинства манипуляций с плазмидной ДНК, кроме случаев, оговоренных ниже.

3.3.2 *E. coli* RZ1032: *HfrKL10*, *PO/45[lysA(61-62)]*, *dut1*, *ung1*, *thi1*, *relA1*, *zbd-279:Tn10*, *supE44* - дефектен по dUTPase. Эта мутация приводит к увеличению внутриклеточного пула dUTP, который конкурирует с TTP за

встраивание в синтезируемую ДНК. Нематричный урацил не удаляется из синтезированной цепи, поскольку этот штамм также дефектен и по продукту гена ung, урацилгликозилазе. Клетки этого штамма инфицируются фагом M13 и его производными. Штамм *E. coli* RZ1032 использовали для приготовления одноцепочечной урацил-замещенной ДНК.

3.3.3 *E. coli* NM522: *hsdA5*, *Δ(lac-pro)*, [*F'*, *pro⁺*, *lacI^qZΔM15*] - был использован для накопления фага-помощника M13KO7 (Pharmacia) и селекции мутантных плазмид после олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

3.4 Синтетические олигонуклеотиды

3.4.1 Праймеры для секвенирования и PCR

название	последовательность (5'p3')	комплémentарный участок РНК
#P10:	GAAGGGTCTTGAGAGAAAG	877-894
#P11:	CTCAGATATTCAAGGCCAACGC	1058-1078
#GUL:	TGAAGAGCCTATTGAGCTAC	416-435 ^a
#NS1:	GTATTGCGGTACCCTTGTACG	59-79 ^a
#BN	TGAGATCTCACTTCACCGG	651-671
#BG	GGAGCAGATCTAGCAAACAG	661-680
#T7552	TAATACGACTCACTATAGGTAACTTAGACGC	102-113
#HhT7	TCAGGAT <u>CCTAATACGACTCACTATAGGGAG</u> TCTGGACATCCC	322-336 ^d
#BA1	CCTGACACA <u>ACACTTTTTTACACGG</u>	554-566 ^c
#SP2S	AGTGTGTCAGGTATA <u>CACAAAC</u>	641-662 ^b
#SAL2S	TTTGTGACGTATTGTTTGATT	710-733 ^b
#SAL1M	TATGTCGACCAGACAATTGTATC	726-739

^a Последовательность праймера соответствует указанному (а не комплементарному) участку РНК.

^b Последовательность праймера соответствует участку РНК вируса полиомиелита штамм Sabin 2.

^c Чертой выделена последовательность праймера, которая соответствует участку РНК вируса полиомиелита (конструкция ΔL).

^d Чертой выделена последовательность T7-промотора.

3.4.2 Праймеры для олигонуклеотид-направленного мутагенеза

название	последовательность (5'р3')	комплémentарный участок РНК
#"53"	GATCAAACCC <u>A</u> TGAGGCACAA	541-560
#"55"	AGGAGGC <u>C</u> CGGGACTTAC	443-461
#PA2	ACCCACAUUUUUUUUAAAAUA	553-574
#M4	CCAGACT <u>C</u> AACAGCCTAAG	311-329

Черты выделены нуклеотиды, соответствующие вносимым мутациям.

3.5 Базовые методы молекулярного клонирования

3.5.1 Приготовление компетентных клеток *E. coli* HB101. Клетки

HB101 высевали штихом на чашку с агаризованной средой LM (1% Bacto триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 10 mM NaCl, pH 7,5). На следующий день отдельную колонию высевали в 3мл среды SOB (2% Bacto триптона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,5) и растили ночь при 37°C, непрерывно встряхивая в ротационной качалке. 250 мклочной культуры пересевали в 5 мл среды SOB и инкубировали на качалке при 37°C до тех пор, пока титр клеток не достигал $4\text{-}7 \times 10^7$ на 1 мл. Для этого определяли оптическую плотность при $\lambda=550$ нм. Нужному титру соответствует оптическая плотность (D_{550}), равная 0,5. Клетки осаждали центрифугированием в стерильных пробирках при 3500 g в течение 15 мин. Осадок тщательно суспендировали стерильной пипеткой в 22,5 мл буфера RF1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM ацетата калия, 10 mM CaCl₂, 15% глицерина, pH 5,8) и выдерживали 120 мин в ледянной бане. После этого клетки снова собирали центрифугированием в том же режиме, суспендировали в 4 мл буфера RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% глицерина, pH 6,8) и инкубировали 30 мин в ледянной бане. Суспензию клеток расфасовывали по 100 мкл в стерильные пробирки и хранили при —80°C.

3.5.2 Приготовление компетентных клеток *E. coli* RZ1032 и NM522.

Использовали метод, описанный для клеток HB101 со следующими модификациями:

- (i) вместо сред LM и SOB использовали среды YT (0.8% Bacto триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 8 mM NaCl, pH 7,5) и 2xYT (1.6% Bacto триптона, 1% дрожжевого экстракта, 170 mM NaCl, pH 7,5) соответственно.
- (ii) Клетки этих штаммов растили до $D_{550}=0.4$.
- (iii) После суспенсирования в буфере RF1 инкубировали во льду 30 мин вместо 120 мин.

3.5.3 Трансформация компетентной культуры клеток плазмидной ДНК. К 100 мкл компетентных клеток добавляли раствор ДНК (до 1 мкг в объеме до 25 мкл), тщательно перемешивали стерильным наконечником и оставляли в ледяной бане на 30 мин. Затем пробирку переносили в водянную баню с температурой 42°C на 2 мин, после чего охлаждали в ледяной бане в течение 3 мин. После добавления 400 мкл среды SOB (для компетентных клеток штамма HB101) или 2x YT (для RZ1032 и NM522) клетки инкубировали в термостате при 37°C 1 ч. После этого бактерии высевали на чашки с агаризованной средой LM, содержащей 10 mM MgSO₄ (для HB101) или YT (для RZ1032 и NM522) и 100 мкг/мл ампициллина.

3.5.4 Выделение плазмидной ДНК. Для выделения плазмид, содержавшихся в выросших на чашках колониях, применяли метод щелочного лизиса. Отдельные колонии высевали в 3 мл среды SOB, содержащей 10mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ (если это штамм HB101) или 2xYT (для NM522) и 100 мкг/мл ампициллина и растили ночь при 37°C в ротационной качалке. Выросшую культуру переносили в пробирки типа Eppendorf, и осаждали при

12000 об/мин в течение 3 мин. Осадок промывали 500 мкл буфера TNE (10 mM Tris.HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), супензировали в 100 мкл раствора I (50 mM глюкоза, 25 mM Tris.HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) с 5 мг/мл лизоцима (лизоцим растворяли в растворе I непосредственно перед использованием). Инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Затем в каждую пробу добавляли по 200 мкл свежеприготовленного раствора II (0,2 M NaOH, 1%—ный SDS) и аккуратно перемешивали. После инкубации 10 минут в ледяной бане добавляли по 150 мкл раствора, содержавшего 3 M K⁺ и 5 M CH₃COO⁻, энергично встряхивали и выдерживали 50 мин при 4°C. После этого пробы центрифугировали в течение 15 мин на микроцентрифуге и отбирали супернатант. Нуклеиновые кислоты экстрагировали один раз 500 мкл смеси фенола, насыщенного TNE, с хлороформом (1:1) и осаждали добавлением 1 мл этанола в течение 30 мин при -70°C. Осадок собирали центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 мин, промывали 80%—ным этанолом и высушивали в вакуумном эксикаторе. Сухой осадок растворяли в 100 мкл H₂O, добавляли 3 мкл РНКазы A (20мг/мл) и инкубировали 1 ч при 37°C. ДНК осаждали добавлением 90 мкл раствора, содержащего 20% полиэтиленгликоля (вес/объем) и 2,5 M NaCl, в течение 1 ч при 4°C. Осадок собирали центрифугированием в течение 15 мин, растворяли в 100 мкл H₂O, дважды экстрагировали 100 мкл смеси фенола, насыщенного TNE, с хлороформом (1:1) и переосаждали путем добавления 80 мкл 5 M ацетата аммония и 600 мкл этанола в течение 60 мин при -70°C или ночи при -20°C. Для дальнейшей работы плазмиду осаждали на микроцентрифуге (15 мин), промывали 80%-ным этанолом, высушивали в вакуумном эксикаторе и растворяли в требуемом объеме H₂O.

3.5.5 Обработка плазмидной ДНК рестриктазами. К 9-150 мкл водного раствора, содержащего 0,05-30 мкг ДНК (в зависимости от цели рестрикции - анализ клонов, получение фрагментов, подготовка матриц для транскрипции и т. д.) добавляли 1/10 объема соответствующего 10х рестриктазного буфера, 1-100 ед. рестриктазы (в зависимости от количества ДНК и степени ее чистоты) и инкубировали от 1 до 2 часов при температуре 37°C.

3.5.6 Обработка щелочной фосфатазой. ДНК растворяли в 40мкл H₂O, добавляли 5 мкл 10x СІР буфера (500 mM Tris.HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 10 mM спермидин) и 5 мкл (3.5 ед.) фермента. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, добавляли еще такое же количество фермента и продолжали инкубацию в течение 30 мин. Фермент инактивировали добавлением 5 мкл 10%—ного SDS и прогреванием при 65°C в течение 10 мин. ДНК экстрагировали смесью фенол/хлороформ (1:1) и осаждали этанолом в присутствии 2 М ацетата аммония. Осадок промывали 70%—ным этанолом, сушили и растворяли в необходимом объеме H₂O.

3.5.7 Лигирование. Для сборки кольцевых плазмид из линейных молекул ДНК нужные фрагменты смешивали в определенных соотношениях, объем смеси доводили до 30-50 мкл, добавляя 3-5 мкл 10x лигазного буфера (0,66 M Tris.HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂), 5 мкл раствора, содержащего 50 mM DTT и 10 mM АТР, и 5 ед. ДНК-лигазы фага T4. Смесь инкубировали в течение ночи при 12-14°C. На следующий день в смесь добавляли еще столько же ДНК-лигазы и инкубировали 3-5 часов при комнатной температуре.

3.5.8 Обработка фрагментом Klenow ДНК-полимеразы I *E. coli*. Фрагмент Klenow ДНК-полимеразы I *E. coli* использовали для застройки

выступающих 5'-концов, образующихся при гидролизе ДНК рестриктазами. 1 мкг ДНК растворяли в 35 мкл H₂O, добавляли 10 мкл смеси 2,5 mM dNTP, 5 мкл 10x Klenow буфера (200 mM Tris.HCl pH 7,6; 20 mM DTT; 100 mM MgCl₂) и 5 ед. фермента. Инкубацию проводили 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 15 mM. ДНК экстрагировали смесью фенол/хлороформ (1:1) и осаждали этанолом в присутствии 5M ацетата аммония. Осадок отмывали 80%—ным этанолом, сушили и растворяли в необходимом объеме H₂O.

3.5.9 Аналитический электрофорез в агарозном геле. В зависимости от величины разделяемых молекул, использовали 2%—ный, 1%—ный или 0,8%—ный гели. К рассчитанному количеству порошка агарозы (Sigma type I) добавляли 10 мл 10x буфера TBE (0,9 M Tris, 0,9 M H₃BO₃, 200 mM EDTA) и доводили объем водой до 100 мл. Агарозу расплавляли на кипящей водяной бане и добавляли 10 мкл насыщенного раствора бромистого этидия. Гель заливали в плашку и оставляли застывать при комнатной температуре, вставив гребенку для образования лунок для нанесения образцов. Раствор ДНК перед нанесением на гель смешивали с 1/4 объема буфера для нанесения (5x TBE, 30% глицерина, 0.25% бромфенолового синего). Электрофорез проводили в 1x TBE при напряженности 5-7,5 В/см. Для электрофореза РНК в TBE добавляли SDS до 0,01%.

3.5.10 Препаративный электрофорез и выделение фрагментов ДНК. Препаративный электрофорез проводили в геле из легкоплавкой агарозы (Sigma type VII). Гель готовили так же, как описано в предыдущем разделе. Электрофорез проводили при напряженности 3 В/см, чтобы избежать излишнего выделения тепла. После окончания фореза полосу геля, содержащую

нужный фрагмент, вырезали, помещали в стеклянную пробирку, добавлял 0,7-0,9 мл воды и расплавляли в водяной бане при 65°C в течение 40 мин. Затем ДНК трижды экстрагировали равным объемом фенола, насыщенного ТНЕ. Водную фазу концентрировали бутанолом-1 или бутанолом-2 до 100 мкл. ДНК осаждали при -20°C в течение ночи, добавлением 90 мкл 5 М ацетата аммония и 700 мкл этанола.

3.6 Направляемый олигонуклеотидами мутагенез

Основой метода послужила работа Kunkel (1985).

3.6.1 Получение одноцепочечной урацил-замещенной ДНК.

Отдельную колонию клеток RZ1032, трансформированных плазмидой pBM1, переносили в 3 мл среды YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл тетрациклина (клетки RZ1032 имеют ген устойчивости к этому антибиотику).

Растили ночь на качалке при 37°C. Культуру (20 мкл) пересевали в 2 мл свежей среды YT с таким же количеством антибиотиков. Растили до $D_{550}=0.8$, что соответствует титру 10^8 клеток на мл. Добавляли 20 мкл хелперного фага M13K07 (Pharmacia, 2.35×10^{11} БОЕ/мл) и инкубировали 120 мин при 37°C без качания. После окончания инкубации 200 мкл культуры переносили в 50 мл YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл тетрациклина, 50 мкг/мл канамицина (ген устойчивости к этому антибиотику имеется в хелперном фаге), 10 мкг/мл тиамина.HCl, 0.5 мкг/мл уридина. Растили 18 часов при 37°C в ротационной качалке. Культуру центрифугировали в течение 15 мин при 3000g и осторожно (чтобы не взболтать осадок) отбирали 40 мл надосадочной жидкости. К надосадку добавляли 10 мл раствора, содержащего 2.5 M NaCl и 20% полиэтиленгликоля (ПЭГ), инкубировали 120 мин при 4°C. Фаговые частицы осаждали центрифугированием в течение 60 мин при 3000g. Тщательно

отбирали супернатант, осадок суспендировали в 500 мкл буфера TNE. Нуклеиновые кислоты трижды экстрагировали равным объемом фенола, насыщенного TNE, и один раз равным объемом смеси фенол/хлороформ (1:1). После добавления 200 мкл 5 М ацетата аммония и 700 мкл изопропанола препарат инкубировали 15 мин при комнатной температуре, и нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием. Осадок отмывали 80%—ным этианолом, высушивали и растворяли в 100 мкл H₂O. Для переосаждения ДНК добавляли 90 мкл ацетата аммония и 750 мкл этианола, выдерживали в течение 40 мин при -70°C и центрифугировали. Осадок отмывали 80%—ным этианолом, высушивали, растворяли в 100 мкл H₂O. ДНК анализировали при помощи электрофореза в 1%—ном агарозном геле, концентрацию определяли по флюоресценции бромистого этидия. Выход одноцепочечной ДНК pBM1 составлял ~10 мкг.

3.6.2 Фосфорилирование олигонуклеотида. К 1 мкг олигонуклеотида в 17 мкл H₂O добавляли 2 мкл 10x буфера для полинуклеотидкиназы (700 mM Tris.HCl (pH8.0), 100 mM MgCl₂, 150 mM DTT, 10 mM спермидин, 10 mM ATP), 1 мкл полинуклеотидкиназы фага T4 (5 ед) и инкубировали 60 мин при 37°C. Затем пробу прогревали при 65°C в течение 10 мин и хранили при -20°C.

3.6.3 Отжиг олигонуклеотида с одноцепочечной урацил-обогащенной ДНК. 400 нг урацил-обогащенной одноцепочечной ДНК и 40 нг фосфорилированного олигонуклеотида в 18 мкл H₂O смешивали с 2 мкл 10x TM буфера (200 mM Tris.HCl (pH7.8), 2 mM MgCl₂, 500 mM NaCl). Пробу прогревали при 70°C в течение 10 мин и охлаждали до 20°C в водяной бане со скоростью 0.5°C/мин.

3.6.4 Достройка комплементарной цепи. К 20 мкл смеси ДНК с отожженным олигонуклеотидом добавляли 10 мкл 200 mM HEPES (pH 7.8), 2 мкл 100 mM DTT, 1 мкл 1 M MgCl₂, 1 мкл 50 mM ATP, 20 мкл смеси четырех dNTP (по 2.5 mM каждого), 43 мкл H₂O, 1 мкл фрагмента Klenow ДНК-полимеразы I *E. coli* (5 ед.) и 1 мкл ДНК лигазы фага T4 (4 ед). Пробы инкубировали при комнатной температуре 60 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 15 mM.

3.6.5 Анализ рекомбинантных клонов. Для трансформации клеток штамма NM522 (как описано в 3.5.3) использовали 20 мкл реакционной смеси после достройки комплементарной цепи (см. предыдущий раздел). Плазмидную ДНК выделяли по протоколу 3.5.4 и анализировали при помощи расщепления рестриктазой *BamHI* (должно быть два сайта расщепления по положениям 222 и 672 клонированной кДНК полиовируса). Отбор мутированных ДНК производили при помощи секвенирования по методу дидезоксинуклеотидного терминирования цепи с использованием TAQ-полимеразы (см. п. 3.11.3).

3.7 Получение полноразмерных мутантных клонов полиовирусной кДНК

Содержащие мутацию фрагменты генома плазмид серии pBM1 переклонировали в плазмиду pT7PV1. Принципиальная схема реконструкции плазмид серии pT7PV1/M, представлена на рис. 7.

Получение векторного фрагмента. Плазмиду pT7PV1 последовательно расщепляли рестриктазами *KpnI* (по положениям 68, 3063 и 3659 кДНК полиовируса) и *BglII* (по положению 5601). Из полученной смеси четырех фрагментов электрофоретически выделяли фрагмент 68-5601 длиной 4888 нт (фрагмент «А»; рис. 7). После двукратного переосаждения этанолом фрагмент использовали в реакции лигирования.

Получение клонируемых фрагментов. i) Плазмиды серии pBM1/M последовательно обрабатывали рестриктазами *KpnI* (по положению 68 полiovирусной кДНК) и *ScalI* (имеет два сайта, один в положении 985 фрагмента полiovирусной кДНК, а второй в векторном участке), и с помощью препаративного электрофореза выделяли мутированный фрагмент полiovирусного генома 68-985 (фрагмент «K»; рис. 7).

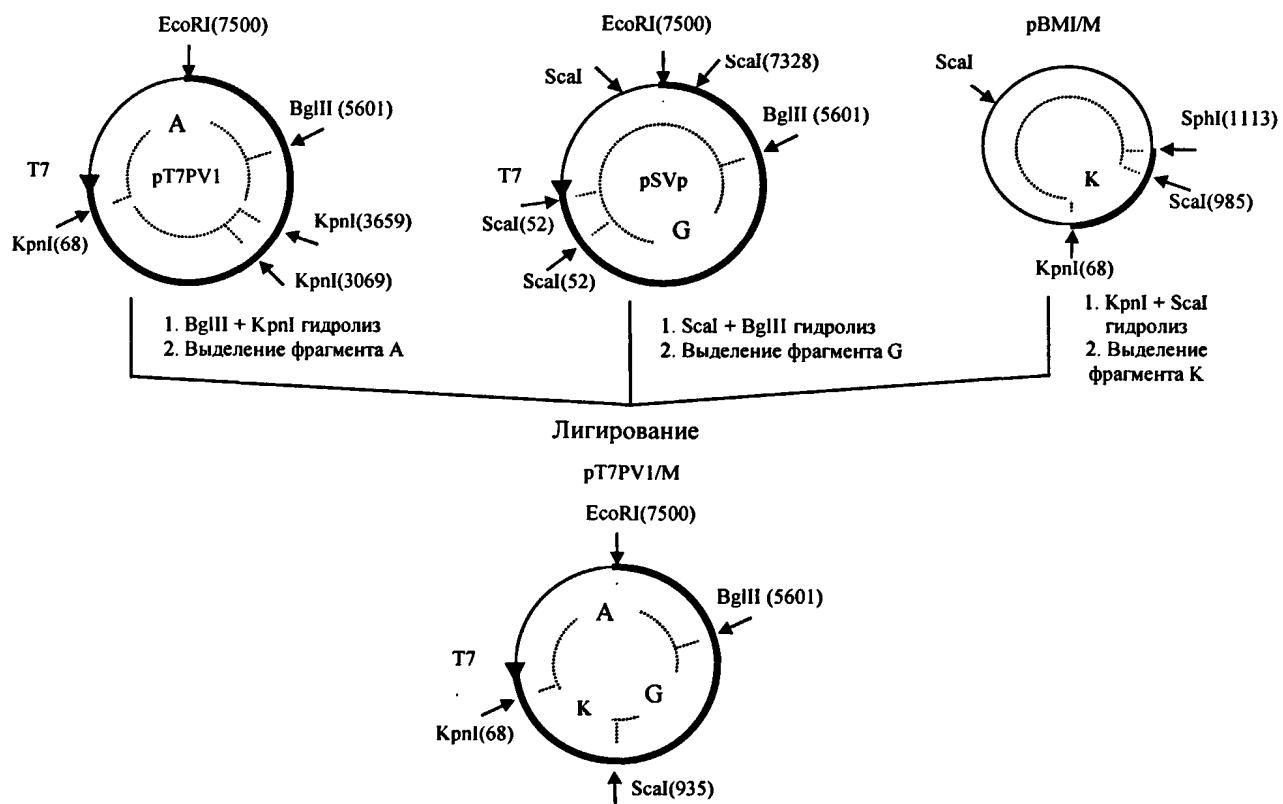


Рис. 7 Получение полноразмерных плазмид типа pT7PV1/M.

ii) Фрагмент полiovирусной кДНК 985-5601 (фрагмент «G»; рис. 7) получали из плазмида pSVP, содержащей полноразмерную кДНК полiovируса, при помощи последовательного расщепления рестриктазами *ScalI* (три сайта в положениях 52, 985 и 7328 полiovирусной кДНК и один - в векторном участке) и *BgIII* (по положительному 5601). Нужный фрагмент длиной 4616 нуклеотидов выделили из агарозного геля, как описано в 3.5.10.

Смешивали по 100 нг векторного и клонируемых фрагментов (0.8:1:5 по концентрации концов) и лигировали, как описано в 3.5.7. Скрининг ДНК после трансформации клеток HB101 проводили при помощи анализа рестриктазами *BamHI*, *KpnI*, *ScalI* и *BglII*.

3.8 Создание рабочих конструкций

3.8.1. Создание конструкций 5'-фрагмента

Схема получения конструкций pT7PV1/55 -BG; -BN; -BY. Для создания конструкций pT7PV1/55 -BG; -BN; -BY использовались: векторный фрагмент KpnI(68)- BglIII(7500) и соответствующие PCR продукты, полученные на основе конструкции PT7PV1/55 (рис. 8).

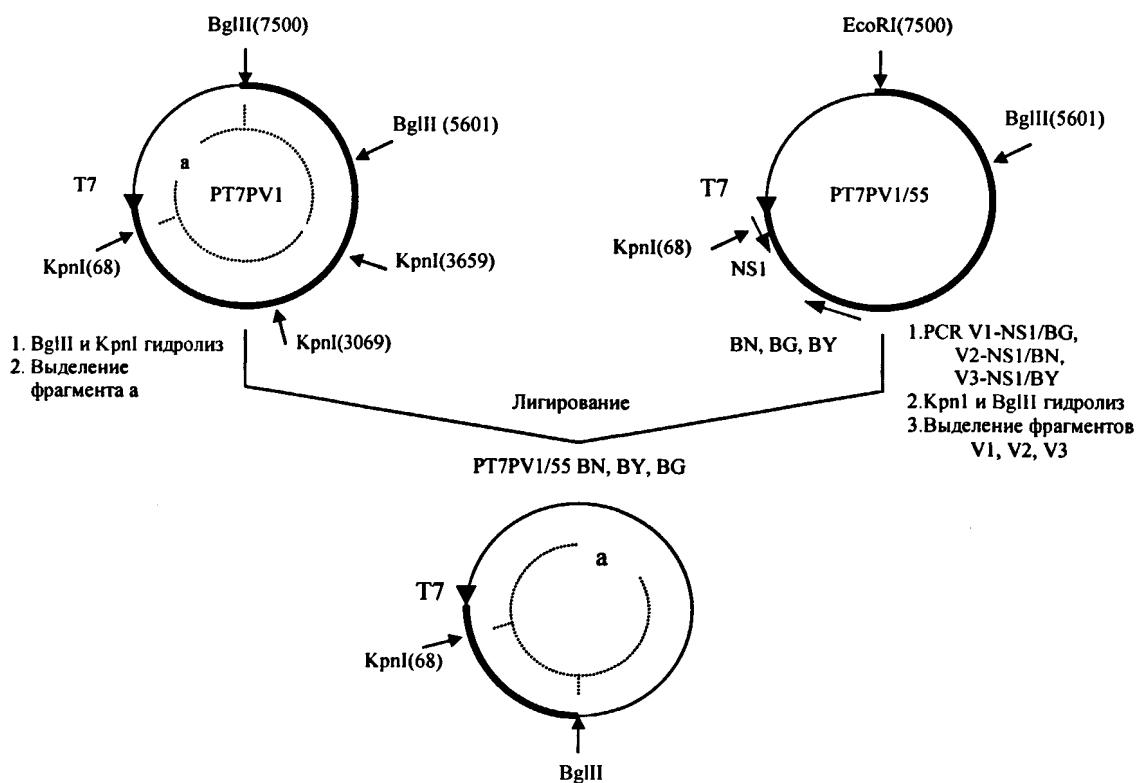


Рис. 8. Схема сборки конструкций 5'-фрагмента (PT7PV1/55-BN, -BY, -BG).

Получение конструкции pT7PV1/55. Данная конструкция была получена в результате стандартной трехфрагментной сборки (рис. 7). При этом фрагмент «К» был получен от плазмида pBMI/55. Плазмида pBMI/55 была получена на основе плазмида pBMI, у которой при помощи олигонуклеотид-направленного мутагенеза [олигонуклеотиды "53", "55"], были внесены замены в положения 451 и 552 ($C_{451} \Rightarrow AG$; $G_{552} \Rightarrow AC$).

Получение векторного фрагмента KpnI (68) - BglII (7500). Плазмиду PT7PV1/55 линеаризовали рестриктазой EcoRI (7500), и достроили одноцепочечные концы при помощи фрагмента Klenow ДНК полимеразы I E.coli (протокол см. раздел 3.5.8). Далее было проведено лигирование с искусственно синтезированным BglII линкером (${}_5^{\text{C}}\text{AGATCTG}_3'$) (протокол см. раздел 3.5.7). При этом был получен дополнительный сайт BglII (7500). Затем плазмиду обработали рестриктазами *KpnI* (по положениям 68, 3063 и 3659 кДНК полиовируса) и *BglII* (по положению 5601 и 7500). Из полученной смеси пяти фрагментов электрофоретически выделяли фрагмент «а» длиной 4053 нт (рис. 8). После двукратного переосаждения этанолом фрагмент использовали в реакции лигирования (протокол см. раздел 3.5.7)

Получение PCR-фрагментов V1-3. С плазмида pT7PV1/55 праймерами NS1/BG (для конструкции pT7PV1/55-BG;), NS1/BN (для конструкции pT7PV1/55-BN) и NS1/BY (для конструкции pT7PV1/55-BY) при помощи PCR наработали три фрагмента, V1, V2, V3, соответственно (протокол см. п. 3.11.2). Олигонуклеотиды NS1 содержат сайт рестриктазы *KpnI*, а олигонуклеотиды BN, BY и BG - рестриктазы *BglII*.

После обработки рестриктазами *KpnI* и *BglII*, фрагменты V1, V2, V3, выделили из агарозного геля, как описано в пункте 3.5.10. После двукратного

переосаждения этианолом фрагменты V1, V2, V3 были лигированы с векторным фрагментом KpnI(68)-BglII(7500), как описано в пункте 3.5.7. В результате были получены конструкции pT7PV1/55-BG; -BN; -BY для каждого из 5'-фрагментов, соответственно (рис. 8).

Схема получения конструкций pT7PV1/55 -BG/M. Для создания конструкции pT7PV1/55 -BG/M использовались: векторный фрагмент «A» KpnI(68) - BglII(7500), полученный из конструкции pT7PV1/55 (схема получения см. предыдущий пункт) и соответствующий PCR-фрагмент V4 (KpnI-BglII).

С плазмида pT7PV1/55-M4 праймерами NS1/Bel4 при помощи PCR наработали необходимый фрагмент V4. После последовательной обработки фрагмента V4 рестриктазами KpnI и BglII и выделения его из препаративного геля получили необходимый фрагмент V4 (KpnI-BglII).

Получение конструкции pT7PV1/55-M4. Данная конструкция была получена в результате стандартной трехфрагментной сборки (рис. 7). При этом фрагмент «К» был получен из плазмида pBMI/55-M4. Конструкция pBMI/55-M4 была получена из плазмида pBMI/55 (замены в положениях C₄₅₁⇒AG; G₅₅₂⇒AC), у которой при помощи олигонуклеотид-направленного мутагенеза [олигонуклеотид "M4"] была внесена дополнительная замена A₃₂₀⇒U.

3.8.2 Создание конструкций 3'-фрагмента

Схема получения конструкций pT7PV1/SNR-PA2; -ΔBV. Для создания конструкций pT7PV1/SNR-PA2; -ΔBV была использована трехфрагментная сборка (рис. 9). Фрагменты «A» и «G» аналогичны тем, что используются при стандартной трехфрагментной сборке плазмид серии pT7PV1/M (рис. 7). Фрагменты полиовирусной кДНК «C» и «C''» были получены из плазмид

• pBMI/SNR-PA2 и pBMI/SNR- Δ BB (соответственно) при помощи последовательной обработки рестриктазами KpnI и ScaI (по положениям 68 и 985 кДНК полиовируса).

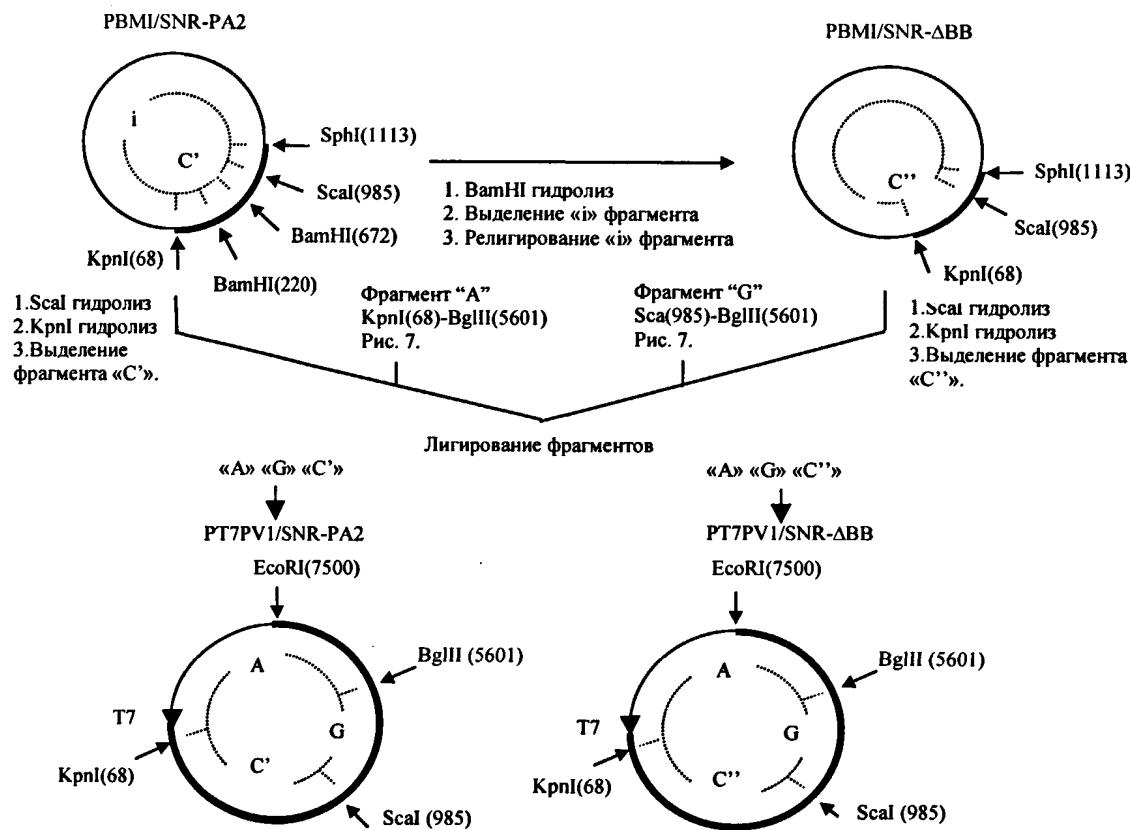


Рис. 9. Схема сборки конструкций 3'-фрагмента (PT7PV1/SNR-PA2; - Δ BB).

Получение плазиды pBMI/SNR-PA2. Плазмида pBMI/SNR-PA2 была сконструирована через промежуточные конструкции: pT7PV1/SN, pBMI/SNR.

Получение плазиды pT7PV1/SN. Плазмида pT7PV1/SN была получена в результате стандартной трехфрагментной сборки (рис. 7). Фрагмент «К» получили после обработка рестриктазами KpnI и ScaI (по положениям 68 и 985 кДНК полиовируса) плазиды pBMI/SN.

Получение плазиды pBMI/SN. В работе Slobodskaja et al., (1996) в плазиду pBMI искусственно был введен дополнительный сайт для рестриктазы

BallI путем замены участка полиовирусной кДНК 730-735 на последовательность 5'-UGGCCA₃'. Эту плазмиду (содержит два сайта BallI(630) и BallI(733)) обработали рестриктазой BallI и религировали с участком BallI(630)-BallI(733) (630CCAUCUGAUU GAAAUAACUG UUGAAAUUGU ACUUAGAGUG AACACACCUA GUGGAGCGGA UCCAGCAAAC AGAUAGAUAA UUAGUCUCAC UUUCACCGGA UGG₇₃₃). Последующим анализом были отобраны конструкции, содержащие инвертированный участок 630-733.

Получение плазмиды pBMI/SNR. Транскрипт с плазмиды pT7PV1/SN был использован для трансфекции монослоя клеток почек зеленой мартышки. При инверсии участка между положениями 630-733 перед стартовым кодоном AUG₇₄₃ возникали три новых кодона AUG₆₈₀, AUG₇₀₉, AUG₇₂₉. Вирус полиомиелита такой инверсией был не стабилен и давал revertантов. Для нашей работы был отобран крупнобляшечный revertант P500, у которого точечными заменами были уничтожены два кодона AUG₆₈₀ и AUG₇₀₉. Клонировав в плазмиду pBM1 фрагмент кДНК полиовируса между сайтами рестриктаз KpnI и SphI (положения 68 и 1132) от revertанта P500, получили плазмиду pBMI/SNR.

Получение плазмиды pBMI/SNR-PA2. При помощи олигонуклеотид направляемого мутагенеза (олигонуклеотид PA2) часть олигопиримидинового блока [560UUCCUUUU₅₆₇] составе плазмиды pBMI/SNR был уничтожен заменой на олиго-А последовательность [560AAAAAAAA₅₆₇]. В результате была получена конструкция pBMI/SNR-PA2.

Получение плазмиды pBMI/SNR-ΔBB. Конструкция pBMI/SNR-ΔBB была получена из конструкции pBMI/SNR-PA2 путем удаления участка между

положениями 225-669 кДНК вируса полиомиелита. Для этого после обработки плазмиды pBMI/SNR-PA2 рестриктазой BamHI (по положениям 221 и 670 кДНК полiovируса) большой фрагмент (i) лигировали сам на себя (рис. 9).

Получение конструкции pT7PV1/SNR- Δ L. Конструкция pT7PV1/SNR- Δ L была получена в результате нестандартной трехфрагментной сборки с векторным фрагментом «а» (BamHI-5601), фрагментом «с» (T7-985) и фрагментом “G” (985-5601) (рис. 10).

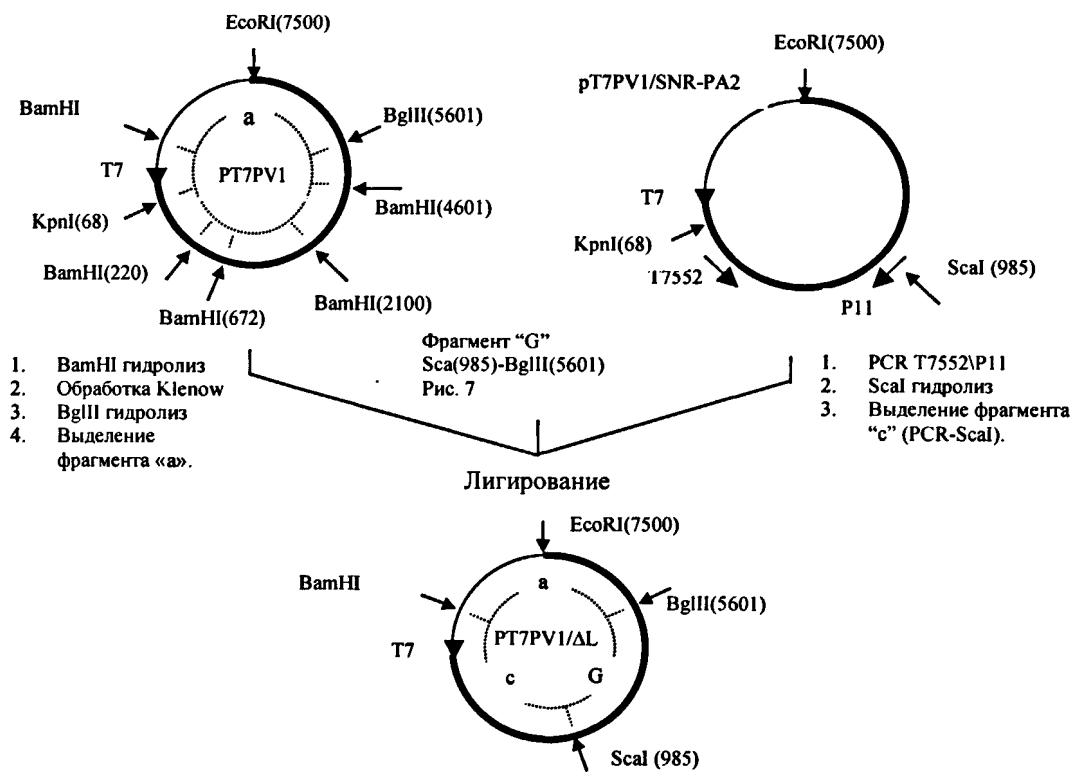


Рис. 10. Схема сборки конструкций для 3'-фрагмента (PT7PV1/ΔL).

Фрагмент «с» (T7-985) был получен с помощью PCR с конструкции pT7PV1/SNR-PA2, с использованием праймеров T7552/P11. Затем провели последовательно обработку ПЦР продукта фрагментом Klenow и рестриктазой ScaI (по положению 985 полиовирусной кДНК). Нужный фрагмент выделили из агарозного геля, как описано в 3.5.10.

Векторный фрагмент «а» (BamHI-5601) был получен последовательной обработкой плазмида pT7PV1: (1) рестриктазой BamHI (четыре сайта в положениях – 224, 671, 2100, 4601 полiovирусной кДНК и один – в векторном участке); (2) фрагментом Klenow; (3) рестриктазой BgIII (по положению 5601 полiovирусной кДНК). Нужный фрагмент «а» выделили из агарозного геля, как описано в 3.5.10.

Получение конструкции pT7PV1/SNR ΔL(4). Конструкция pT7PV1/SNR ΔL(4) (рис. 11) была получена в результате трехфрагментной сборки с фрагментом «с» (T7322-985), фрагментом “G” (985-5601; рис. 7) и векторным фрагментом «а» (BamHI-5601) (см. предыдущий раздел).

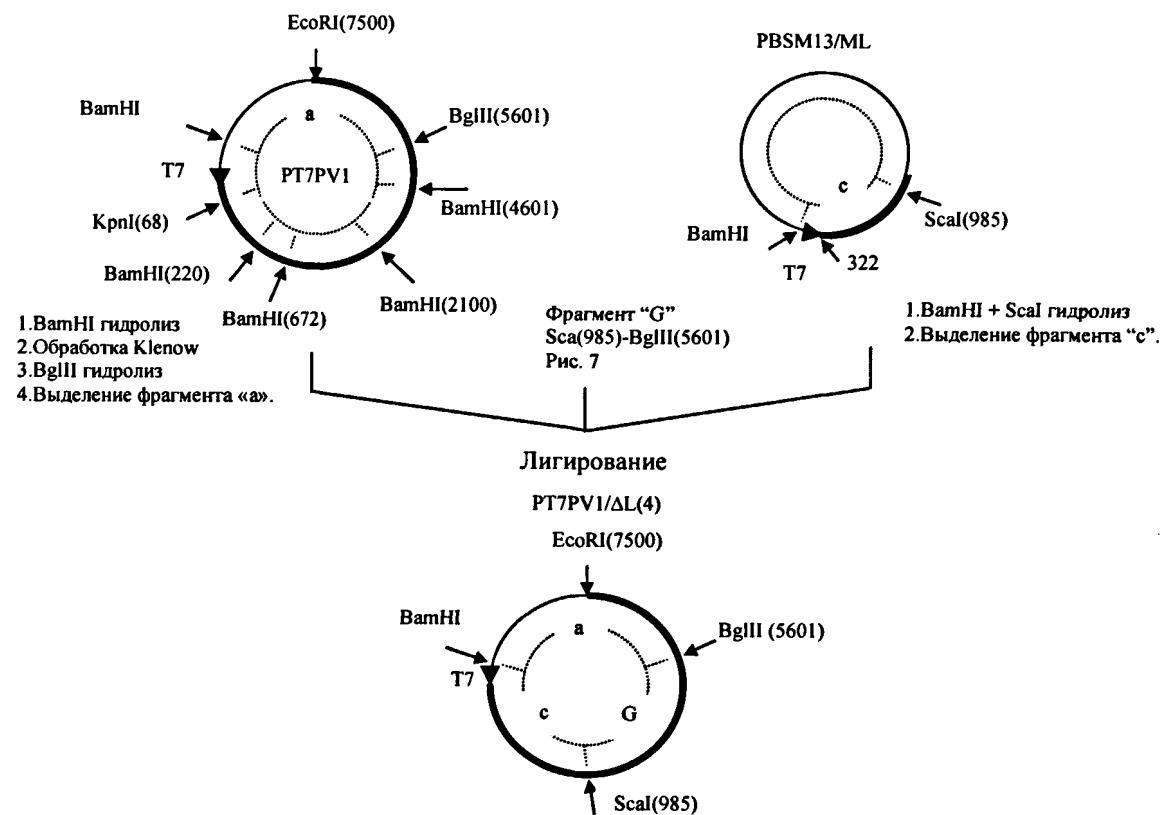


Рис. 11. Схема сборки конструкции 3'-фрагмента (PT7PV1/ΔL(4)).

Фрагмент «с» (T7322-985) получен из плазмида pBSM13(-)/ML последовательной обработкой рестриктазами BamHI и ScaI (по положению 985 кДНК полиовируса). Фрагмент содержит последовательность T7-промотора, которая соединена с кДНК вируса полиомиелита, начиная с положения 322.

Получение плазмиды pBSM13(-)/ML. Плазмиду pBSM13(-)/ML получили в результате трехфрагментной сборки (рис. 12) с векторным фрагментом «1», фрагментом «2» (SalI-P11) и фрагментом «3» (BamHI-SalI).

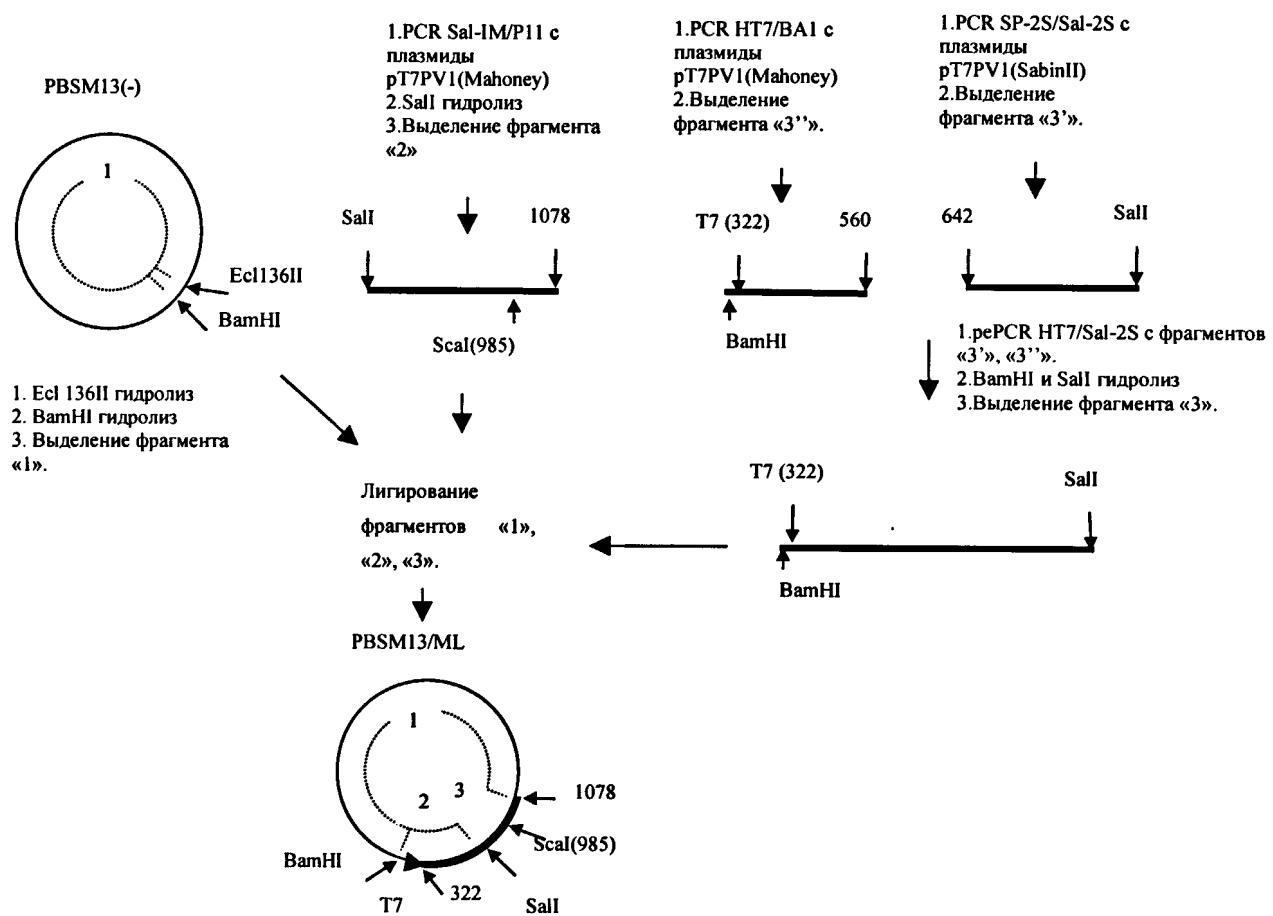


Рис. 12. Схема получения конструкции pBSM13/ML.

• Векторный фрагмент «1» получили последовательной обработкой плазмида pBSM13(-) рестриктазами BamHI и Ecl136II по уникальным сайтам, расположенным в полилинкере.

Фрагмент «2» получен при помощи PCR с плазмида pT7PV1 с праймеров Sal-1M/P11 (праймер Sal-1M содержит 5'-концевой сайт для рестриктазы SalI) и последующей обработки PCR-продукта рестриктазой SalI.

Фрагмент «3» (BamHI-SalI) был получен в результате PCR с праймеров HhT7/Sal-2S (содержат 5'- и 3'-концевые сайты для рестриктаз BamHI и SalI, соответственно) и последующей обработкой рестриктазами BamHI и SalI. В качестве матрицы для праймеров HhT7 и Sal-2S при полимеразной реакции использовались два предварительно синтезированных PCR продукта: фрагменты «3'» и «3''». Фрагмент «3'» получен при помощи PCR с плазмида, содержащей кДНК вириуса полиомиелита штамм Sabin II, с праймеров SP-2S и Sal-2S. Фрагмент «3''» получен при помощи PCR с плазмида, содержащей кДНК вириуса полиомиелита штамм Mahoney, с праймеров HhT7 и BA1. У праймеров BA1 и SP-2S 14 концевых нуклеотидов способны образовать совершенный межмолекулярный РНК-дуплекс.

3.9. Получение полноразмерных транскриптов.

3.9.1 Транскрипция. Плазмиды pT7PV1/SNR PA2; -ΔBB; -ΔL; -ΔL(4), содержащие кДНК соответствующих 3'-фрагментов, и плазмиды pT7/PV1/55 - BN; -BG; -BG/M; -BY, содержащие кДНК 5'-фрагментов линеаризовали рестриктазами EcoRI и BglII, соответственно. Затем ДНК дважды экстрагировали равным объемом смеси фенола (насыщенного TNE) с хлороформом (1:1) и переосаждали, добавляя равный объем 5 М ацетата аммония и 3 объема этанола при -80°C. Осадок собирали центрифугированием,

промывали 80%-ным этианолом, высушивали в вакуумном эксикаторе и растворяли до концентрации 10-12 мкг ДНК в 35 мкл H₂O. Для проведения транскрипции смешивали 173 мкл H₂O, 120мкл 5xT7 буфера (200 mM Tris.HCl pH 7,8, 50 mM MgCl₂, 10 mM спермидина), 60 мкл 100 mM DTT, 60 мкл 20 mM NTP, 35 мкл водного раствора ДНК (10-12 мкг). Затем добавляли 100 ед. ингибитора РНКазы и приблизительно 280 ед. РНК-полимеразы фага T7. Реакцию проводили в течение 3 ч при 37°C. Качество транскрипта проверяли электрофорезом в агарозном геле.

3.9.2 Очистка транскриптов в градиенте плотности сахарозы. В вертикально стоящие нитроцеллюлозные пробирки к ротору Beckman SW-40 (пробирки предварительно вымачивали в течение суток в 1%-ном SDS) приливали 6,2 мл 20 %-ного раствора сахарозы в буфере для градиента (10 mM Tris.HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) и аккуратно насыпали сверху 6,2 мл 5%-ного раствора сахарозы в том же буфере. Пробирки выдерживали 3 ч в горизонтальном положении. После проведения транскрипции в реакционную смесь добавляли 30 мкл 0,4 М ЭДТА и тщательно перемешивали. Затем добавляли 630 мкл буфера для градиента. Пробы насыпали на градиент и центрифугировали в роторе Beckman SW-40 при +16°C в течение 4 ч (40000 об/мин). Градиент "раскалывали" через иглу № 21 на фракции объемом 700 мкл. Фракции, содержащие полноразмерный транскрипт, выявляли путем электрофореза в агарозном геле. Из отобранных фракций РНК осаждали 100 мкл 5 M ацетата аммония и тремя объемами этианола в течение ночи при -80°C. Собранный центрифугированием осадок растворяли в 200 мкл H₂O, повторно осаждали и растворяли в 25-250 мкл H₂O. Спектрофотометрически определяли концентрацию (1 о.е. при λ=260 нм

соответствует 40 мкг РНК в 1 мл), а также отношение D₂₆₀/D₂₈₀, показывающее чистоту транскрипта (отношение должно быть равно 2). РНК разводили до 550-910 нг/мкл и хранили при -80°C. Далее транскрипты использовались для трансфекции первичной культуры КПЗМ и VERO.

3.10 Трансфекция монослоиной культуры клеток

Трансфекцию клеток культуры VERO и первичной культуры КПЗМ и проводили, как было описано ранее (Pilipenko *et al.*, 1992a; Gmyl *et al.*, 1993).

Раствор РНК (после очистки в сахарозном градиенте) смешивали с равным объемом двухкратного буфера, содержащего: 160mM Tris.HCl pH 7.55, 200 mM NaCl. Полученный раствор РНК 5-100 мкл смешивали с 0,2 мл буфера для трансфекции (0,01 M фосфат натрия pH7.1, 0,14 M NaCl, 300 мкг/мл DEAE-dexstran) и инкубировали 30 мин при 4°C. Монослоиную культуру клеток дважды промывали солевым раствором Эрла и тщательно удаляли жидкость. Смесь для трансфекции наносили на клетки и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Культуру покрывали слоем 1%-ного агара, содержащего 10% раствора Эрла, 0.3% бикарбоната натрия, 2% сыворотки крупного рогатого скота, 0.0002% нейтрального красного. Флаконы с культурой инкубировали в темноте при +37°C до появления вирусных бляшек или до полной неспецифической дегенерации культурального монослоя.

Бляшки стерильно отбирали С. В. Маслова и Е. В. Хитрина, пастеровской пипеткой в 1 мл раствора Эрла. Данный раствор трижды замораживали и размораживали и использовали (при необходимости) для накопительного пассажа на суточной культуре клеток RD. Если потомство было гетерогенно по размеру бляшек, либо секвенирование показывало, что вирус гетерогенен, проводили дополнительное бляшечное клонирование.

3.11 Анализ вирусных клонов

3.11.1 Секвенирование вирусной РНК

Выделение вирусной РНК. Вирус полиомиелита размножали в культуре клеток RD. После полной дегенерации культуры, суспензию, содержащую вирус, трижды замораживали и размораживали. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 2000 об/мин и +4°C в течение 15 мин. Надосадочную жидкость переносили в полиаломерные пробирки для ротора SW-27 по 32 мл в каждую. На дно пробирок подслаивали 3 мл 30%-ной (вес/вес) сахарозы, приготовленной на буфере, содержащем 1 М NaCl, 0.02 М Tris.HCl (рН 7.4) и центрифугировали при 25000 об/мин 4 ч при +4°C. Супернатант тщательно удаляли, вирусные бляшки ресуспендировали в 2.7 мл буфера TNE и добавляли 0.3 мл 10%—ного (вес/объем) SDS, приготовленного на буфере TNE, и 3 мл 80%—го фенола, насыщенного этим же буфером, и встряхивали в течение 15 мин. Суспензию разделяли центрифугированием (3000 об/мин, +4°C, 10 мин). Водную фазу еще дважды экстрагировали равным объемом смеси фенола (насыщенного TNE) с хлороформом (1:1). К водной фазе добавляли 5 М ацетат аммония до конечной концентрации 1 М и три объема этанола. Оставляли в холодильнике при -20°C на ночь. РНК собирали центрифугированием, осадок отмывали 70%—ным этанолом, высушивали и растворяли в 54 мкл H₂O и определяли концентрацию спектрофотометрически. РНК хранили при -70°C.

Секвенирование РНК. В пробирке фирмы "Eppendorf" на 1.5 мл смешивали 2.5 мкг РНК и 0.02 мкг праймера (молярное соотношение РНК:праймер 1:5) в 24 мкл буфера, содержащего 0.1 М KCl, 0.05 М Tris.HCl, рН 8.3. Пробирку помещали в водянную баню при температуре 80°C и медленно охлаждали до 36°C.

После отжига пробу переносили в пробирку с предварительно высушенным $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (40 μCi ; ВО «Изотоп» г. Москва), добавляли 4 мкл 10x RT буфера (0.5 M Tris.HCl (pH8.3), 80 mM MgCl₂, 0.5 M KCl, 0.1 M EDTA), 8 мкл H₂O и 4 ед. ревертазы вируса миелобластоза птиц (AMV), перемешивали и переносили аликвоты по 6 мкл в пробирки, содержащие по 2 мкл терминирующих смесей следующего состава:

для "A": 125 mM dATP, 500 mM dTTP, 500 mM dGTP, 25 mM dCTP, 25 mM ddATP;

для "T": 500 mM dATP, 125 mM dTTP, 500 mM dGTP, 25 mM dCTP, 25 mM ddTTP;

для "C": 500 mM dATP, 500 mM dTTP, 500 mM dGTP, 25 mM dCTP, 5 mM ddCTP;

для "G": 500 mM dATP, 500 mM dTTP, 250 mM dGTP, 25 mM dCTP, 125 mM ddGTP.

Пробы инкубировали при +40°C в течение 15 мин, добавляли 1 мкл смеси 2,5 mM dNTP и инкубацию продолжали еще 15 мин, добавляли 7 мкл стоп-раствора (90% формамида, 0.25% бромфенолового синего и 0.25% ксилен-цианола), инкубировали 3 мин при 100°C и охлаждали во льду. Затем пробы наносили на секвенирующий гель и проводили электрофорез как описано ниже.

Приготовление секвенирующего геля и проведение электрофореза.

Смешивали 10 мл раствора 38%-ного акриламида/2%-ного бисакриламида, 5 мл 10xTBE, 35 мл раствора мочевины (240 г на 350 мл H₂O), дегазировали под вакуумом в течение 10 мин, добавляли 300 мкл 10%-ного (вес/объем) свежего раствора персульфата аммония и 18 мкл TEMED. Аккуратно заливали гель между двумя стеклами размером 50×38 см. Предварительно рабочее стекло

было обработано 28 мкл Silane A174, сuspendedированном в 10 мл H₂O, доведенной уксусной кислотой до pH 3,5. Гель оставляли полимеризоваться на 2 часа при комнатной температуре. Стекла с гелем устанавливали в прибор для вертикального электрофореза (“Bio-Rad”), заполняли электродные резервуары 0,5x TBE, подсоединяли термодатчик, и проводили префорез в течение 40 мин до нагревания буфера в кювете до 40°C. После нанесения проб, проводили электрофорез при постоянной температуре 48°C. После окончания электрофореза гель, ковалентно пришитый к рабочему стеклу, отмывали от мочевины 10%—ной уксусной кислотой и сушили при 120°C. На высушенный гель накладывали рентгеновскую пленку и экспонировали нужное время.

3.11.2 Полимеразная цепная реакция (PCR)

Выделение РНК. К 300 мкл суспензии вируса или культуральной жидкости (после трехкратного замораживания-размораживания) добавляли 30 мкл 10%—ного SDS и проводили три последовательные экстракции равным объемом фенола (насыщенного TNE) с хлороформом (1:1). РНК переосаждали равным объемом 5 М ацетата аммония и 3 объемами этанола при -80°C.

Обратная транскрипция. Осадок РНК центрифугировали, промывали 80%—ным этанолом, высушивали под вакуумом и растворяли в 16 мкл H₂O. Затем добавляли 2 мкл раствора праймера P11 (0,5 о.е./мл) и 2 мкл буфера для отжига. Отжиг проводили, медленно охлаждая смесь от +83°C до +37°C. Добавляли 5 мкл 10x ревертазного буфера, 5 мкл смеси состоящей: а) 1 мкл 10x ревертазного буфера; б) 3,5 мкл 2,5 mM dNTP; в) 0,5 мкл (5 ед.) ревертазы AMV. Инкубацию проводили при +41°C в течение 2 ч.

Полимеразная цепная реакция (PCR). К 3 мкл смеси после ревертазной реакции добавляли 9 мкл 10x PCR буфера (Perkin Elmer Cetus), по

150 нг праймеров Р11 (обратного) и NS1 (прямого), объем смеси доводили водой до 90 мкл и сверху насыпали 100 мкл минерального масла. Смесь прогревали 10 мин при +95°C, охлаждали до +50°C и добавляли 10 мкл *Taq*-смеси (1 мкл 10x PCR-буфера, 8 мкл смеси 2.5 mM dNTP и 1 мкл (2.5 ед.) термостабильной ДНК-полимеразы из *Thermus aquaticus*). Реакционный цикл [20с при +95°C (денатурация), 30с при +50°C (отжиг праймеров) и 60с при +72°C (синтез ДНК)] выполняли 40 раз. Амплифицированную ДНК экстрагировали равным объемом хлороформа и переосаждали равным объемом 5 М ацетата аммония и 3 объемами этанола. После чего, участок 340-760 нуклеотидов PCR продуктов был секвенирован (протокол см. ниже). Гетерогенные PCR-продукты были клонированы по сайтам рестриктаз KpnI и ScaI (положения 68 и 928 кДНК полиовируса, соответственно) в плазмиду pBSM13(-). После чего, участок между положениями 340-760 был секвенирован.

3.11.3 Определение нуклеотидной последовательности ДНК по методу дидезоксинуклеотидного терминирования цепи с использованием TAQ-полимеразы. Смешивали 9,5 мкл ДНК (20-200 нг PCR продукта; 0,5-3 мкг плазмидной ДНК [3,2-11 тыс. нуклеотидов]); 5 мкл 5x Таq-буфера; 1 мкл праймера gul или Р14 или Р10 (0,5 о.е./мл); 0,5 мкл ^{33}P -dATP (40 mCi; ВО «Изотоп» г. Москва); 1 мкл Таq-полимеразы (10 ед/мкл). Затем, полученную смесь расфасовали по 6 мкл к 2 мкл термирующих смесей следующего состава:

для "A": 25 μM dATP, 250 μM dTTP, 250 μM dCTP, 350 μM ddATP; 250 μM 7 deaza-dGTP

для "T": 250 μM dATP, 25 μM dTTP, 250 μM 7 deaza-dGTP, 250 μM dCTP, 300 μM ddTTP;

для "С": 250 μ M dATP, 250 μ M dTTP, 250 μ M 7 deaza-dGTP, 160 μ M ddCTP 25 μ M dCTP

для "Г": 250 μ M dATP, 250 μ M dTTP, 2.7 μ M mM dGTP, 25 μ M ddGTP. 250 μ M dCTP.

После этого наслаживал 20 мкл «Bayol F» и помещал в амплификатор.

Смесь прогревали 2-3 мин при +95°C. Реакционный цикл [20с при +95°C (денатурация), 30с при +50°C (отжиг праймеров) и 60с при +72°C (синтез ДНК)] выполняли 30-40 раз. К полученной смеси фрагментов добавлял 3 мкл стоп раствора (90% формамид 0,25% бром феноловый синий и 0,25% ксилен-цианол). Пробы прогревали 3 мин при +95°C и охлаждали во льду. Приготовление секвенирующего геля и проведение электрофореза проводил стандартно (см. п. 3.11.1).

3.12 Модификация 3'-концевого нуклеотида РНК 5'-фрагмента.

Последовательная обработка 5'-фрагмента проводилась согласно методике приведенной в работе Chetverin et al.,(1997). Изменение структуры 3'-концевого участка 5'-фрагмента при данных модификациях изображены на рис. 13. Цис-гликольная группа 3'-концевого нуклеозидного звена РНК легко окисляется солями йодной кислоты (IO_4^-). В результате ковалентная $\text{C}^2\text{-C}^3'$ связь разрывается с образованием диальдегида (реакция «А»). В интервале pH 5-9 и при комнатной температуре реакция полностью специфична и протекание побочных реакций в сколько-нибудь значительной степени не наблюдается (Steinscheider and Fraenkel-Conrat, 1966a).

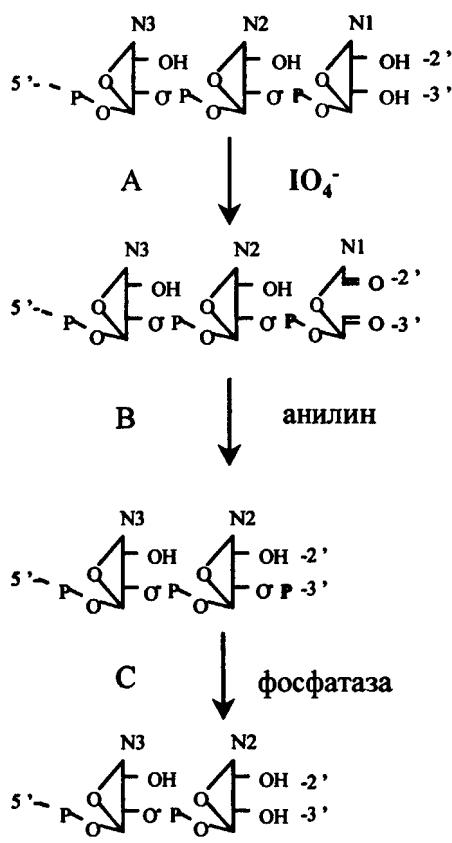


Рис. 13. Схематичное изображение изменения химического строения 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента. 3'-концевой нуклеотид (выделен красным) разрушается в результате последовательных химических модификаций при помощи: (A) периодата натрия, (B) анилина, (C) щелочной фосфатазы. 3'-концевой монофосфат выделен синим. Более подробно смотри текст.

Альдегидная группа в 3'-положении

сильно ослабляет 5'-фосфоэфирную связь. Различные первичные алифатические амины вступают в реакцию конденсации с альдегидной группой и тем самым катализируют реакцию разрыва 5'-фосфоэфирной связи при pH около 8. Однако, только анилин

способен осуществлять реакцию разрыва 5'-фосфоэфирной связи (β -эlimинирование) в условиях, пригодных для работы с высокомолекулярными полирибонуклеотидами, такими как вирусная РНК (Steinscheider and Fraenkel-Conrat, 1966a; Steinscheider and Fraenkel-Conrat, 1966b). В результате, РНК с 3'-конца становится на 1 нуклеотид короче, при этом, 3'-концевой нуклеотид содержит 3'-монофосфат (реакция «В»).

Обработка щелочной фосфатазой удаляет 3'-концевой монофосфат с возобновлением цис-гликольной группы 3'-концевого нуклеозидного звена РНК (реакция «С»).

Дополнительно фосфорилирование 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента осуществлялось при помощи лигирования 3', 5'-цитидилдифосфата.

3.12.1 Окисление раствором периодата натрия (NaIO_4). РНК (40 мкг)

инкубировали 30 минут в темноте при комнатной температуре в буфере (10 mM ЭДТА; 100 mM ацетат натрия [рН 5,3]), содержащем 35 mM периодата натрия. После этого, РНК переосаждали 0,4 M ацетатом натрия и этиловым спиртом. Растворял РНК до 0,5-1 мкг/мкл (стерильно). Полученный раствор РНК использовали для трансфекции монослоя культуры клеток.

3.12.2 Обработка анилином. Раствор РНК (после обработки периодатом натрия) инкубировал 120 мин в темноте при комнатной температуре в 100 мкл буфера, содержащего 250 mM анилина с 10 mM ацетатом натрия. Переосаждал РНК 0,4 M ацетатом натрия и этиловым спиртом. Растворял РНК до 0,5-1 мкг/мкл (стерильно). Полученный раствор РНК использовал для трансфекции монослоя культуры клеток.

3.12.3 Обработка щелочной фосфатазой. Раствор РНК (после обработки периодатом натрия и анилином) добавлял к смеси, содержащей 1x буфер щелочной фосфатазы (“Promega”), 0,8 ед./мкл ингибитора РНКаз (“Amersham Farmacia Biotec Inc”), 0,4 ед./мкл щелочной фосфатазы (“Promega”). Инкубировал 30 мин при 37°C. Затем добавлял раствор SDS (конечная концентрация 1%) и экстрагировал РНК равным объемом смеси фенола (насыщенного TNE) с хлороформом (1:1). Переосаждал РНК 0,4 M ацетатом натрия и этиловым спиртом. Растворял РНК до 0,5-1 мкг/мкл (стерильно). Полученный раствор РНК 5'-фрагмента использовал для трансфекции монослоя культуры клеток.

3.12.4 Лигирование 3', 5'-цитидилдифосфата. Кинирование цитидил 3'-фосфата. К раствору цитидил 3'-фосфата (0,3 mM/мкл), содержащему 1x буфер T4 полинуклеотид киназы, добавлял: раствор АТФ (конечная

концентрация 2,6 mM/мкл) и T4 полинуклеотид киназу (0,6 ед./мкл).

Инкубировал 60 минут при температуре 37°C. Раствор замораживал на -20°C.

Лигирование 3', 5'-цитидилдиfosфата. К раствору РНК 5'-фрагмента (0,1-0,4 мкг/мкл), содержащего 1x буфер T4 РНК-лигазы, добавлял: 3',5'-цитидилдиfosфат (конечная концентрация - 0,5 mM/мкл), ингибитор РНКаз (2 ед./мкл), T4 РНК-лигазы (0,5 ед./мкл). Инкубировал полученный раствор 30 минут при 37°C. Затем экстрагировал РНК равным объемом смеси фенола (насыщенного TNE) с хлороформом (1:1). Водный раствор РНК переосаждал спиртом и 5M раствором ацетата аммония. После чего РНК растворял в воде до концетрации 0,5-1 мкг/мкл (стерильно). Полученный раствор РНК 5'-фрагмента использовали для трансфекции монослоя культуры клеток.

4. Результаты

До недавнего времени для объяснения механизма рекомбинации между молекулами вирусных РНК с тем или иным успехом использовали исключительно репликативную модель. Нерепликативная модель, довольно давно обсуждаемая в литературе, рассматривалась большинством авторов как маловероятная, альтернатива репликативной модели. Однако недавно в работе А. Б. Четверина с соавторами было продемонстрировано, что рекомбинация между фрагментами сателлитных РНК фага Q β может происходить по механизму, отличному от репликативного (Chetverina et al., 1999).

В связи с этим была поставлена задача - выяснить возможность получения инфекционных рекомбинантов между молекулами РНК вируса полиомиелита по нерепликативному механизму.

Для решения поставленной задачи необходимо сконструировать рекомбинационные партнеры, которые должны удовлетворять следующим условиям.

(1) Каждый из партнеров не должен самостоятельно реплицироваться, но рекомбинация между ними должна приводить к образованию жизнеспособного (инфекционного) вируса.

(2) Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза должна появиться только после образования рекомбинантной молекулы.

4.1 Конструирование 5'- и 3'-фрагментов геномной РНК вируса

полиомиелита

Для решения поставленной задачи в качестве рекомбинационных партнеров было решено использовать взаимодополняющие фрагменты геномной РНК вируса полиомиелита.

Ождалось, что большинство рекомбинантов, образовавшихся по нерепликативному механизму, будут негомологичными. По этой причине было решено сконструировать фрагменты с таким расчетом, чтобы предполагаемые места перекреста концентрировались на участке между IRESом (точнее олигопиримидин-AUG₅₈₆ tandemом) и стартовым кодоном AUG₇₄₃, т. е. на участке между положениями 586-743. Здесь разрешены существенные перестройки первичной структуры без ущерба для инфекционности вируса (Kuge and Nomoto, 1987; Pilipenko et al., 1992a; Gmyl et al., 1993; Slobodskaya et al., 1996). При этом отсутствие явного селективного давления на структуру рекомбинанта на данном участке позволит получить относительно полную и объективную информацию о распределении и структуре мест перекреста у рекомбинантов.

Было сконструировано два вида молекул, которые назвали 5'- и 3'-фрагментами (рис. 14). 5'-фрагменты содержали последовательность полiovirusной 5'-НТО (различной длины), которая заканчивалась на участке между IRESом и стартовым кодоном AUG₇₄₃. Следовательно, у всех 5'-фрагментов отсутствует участок генома, кодирующий полипротеин и содержащий 3'-НТО. 3'-фрагменты содержали участки, отсутствующие у 5'-фрагментов (участок генома, кодирующий полипротеин, и содержащий 3'-НТО). При этом все 3'-фрагменты содержат летальные изменения в

трансляционных и репликативных цис-элементах 5'-НТО. Таким образом, образование жизнеспособного вируса возможно только в том случае, если произойдет рекомбинация между 3'- и 5'-фрагментами полiovируса на участке между положениями 586-743.

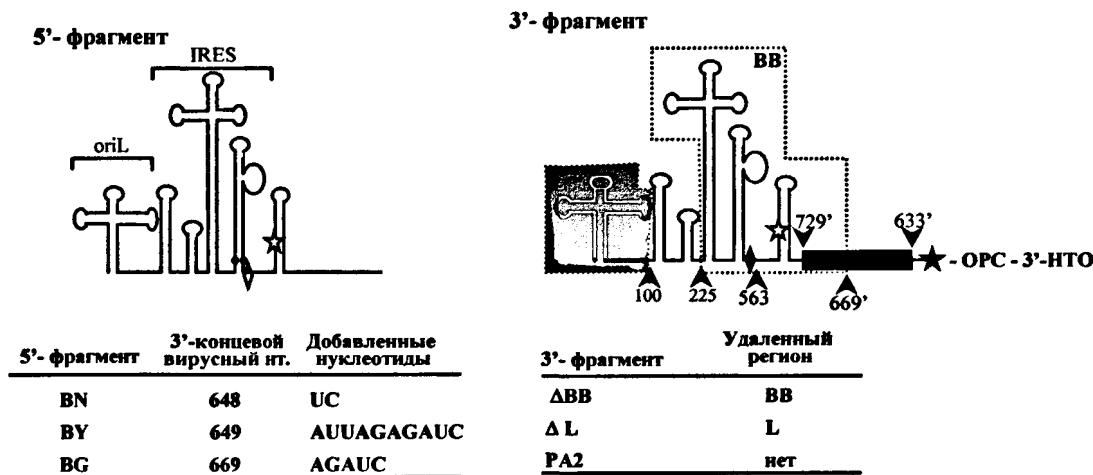


Рис. 14. Схематичное изображение 3'- и 5'-фрагментов геномной РНК вируса полиомиелита, использованных для изучения рекомбинации. Сплошные линии соответствуют сегменту полiovирусного генома; черный прямоугольник обозначает инвертированный участок вирусной РНК (его координаты обозначены как n'). Криптический (положение 586) и инициаторный (положение 743) AUG триплеты обозначены белой и черной звездами, соответственно. Нативный и измененный (замена на олиго- А последовательность) олигопиримидиновый мотив выделены белым и красным ромбом, соответственно. Маркерные мутации 5'-фрагмента в положения 451 и 552, обозначены синими точками. Границы репликативного (oriL) и трансляционного (IRES) элементов показаны на схеме 5'-фрагмента. Координаты 3'-концевых вирусных нуклеотидов и невирусные нуклеотиды, добавленные к 3'-концу 5'-фрагментов, а также сегменты, удаленные у различных 3'-фрагментов, указаны в таблицах. Удаленные участки 5'-НТО 3'-фрагмента у конструкций ΔL и ΔBB обозначены красной и голубой прямоугольными фигурами, соответственно. OPC - открытая рамка считывания. НТО - нетранслируемая область.

Было создано три 3'-фрагмента (рис. 14). У фрагмента ΔBB был удален участок генома 225-669. Такая делеция приводит к удалению всего IRESa – cis-элемента, осуществляющего кеп-независимую инициацию трансляции (Pelletier and Sonenberg, 1988; Pelletier et al., 1988). Таким образом, данный 3'-фрагмент не должен транслироваться с образованием вирусных белков.

У фрагмента, обозначенного РА2, часть олигопиримидинового блока [₅₆₀UUCCUUU₅₆₇] была заменена олиго-А последовательностью [A₈]. Поскольку олигопиримидин-AUG тандем необходим для кеп-независимой инициации трансляции у полiovирусной РНК (Nicholson et al., 1991; Pestova et al., 1991; Pilipenko et al., 1992a), предполагалось, что данная мутация не позволит молекулам РНК 3'-фрагментов транслироваться с образованием вирусных белков.

Если предположить, что по тем или иным причинам блокировка инициации трансляции у фрагментов РА2 и ΔВВ не абсолютна, то рекомбинация между 3'- и 5'- фрагментами теоретически возможна по репликативному механизму. Вирусная РНК-полимераза, в процессе синтеза минус цепи 3'-фрагмента, на участке между IRESом и стартовым AUG-кодоном может осуществить смену матрицы и завершить синтез минус цепи рекомбинанта, используя в качестве матрицы молекулу 5'-фрагмента. Инициация синтеза плюс цепи рекомбинантной молекулы полiovируса возможна при помощи интактного репликативного элемента ori L.

Для того, чтобы исключить данный репликативный механизм рекомбинации между фрагментами полiovирусной РНК была создана конструкция ΔL. У данного фрагмента, наряду с заменой части олигопиримидинового блока [₅₆₀UUCCUUU₅₆₇] на олиго-А последовательность (аналогично конструкции РА2), отсутствуют первые сто нуклеотидов, которые формируют репликативный cis-элемент oriL. Инициация синтеза плюс и минус цепи полiovирусной РНК требует наличие нативной структуры репликативного элемента oriL. Таким образом, наряду с блокировкой трансляции и инициации синтеза плюс цепи, у фрагмента ΔL маловероятна

инициация синтеза минус цепи (Andino et al., 1993; Gamarnik and Andino, 1998; Herold and Andino, 2001; Barton et al., 2001; Lyons et al., 2001).

Так же было создано три варианта 5'-фрагмента (рис. 14). BN-фрагмент, длиной 650 нт., содержит первые 648 нт. РНК вируса полиомиелита и два дополнительных 3'-концевых нематричных нуклеотида UC. BG-фрагмент, длиной 674 нт., содержит первые 669 нт. вирусной РНК и пять 3'-концевых нематричных нуклеотида AGAUC. BY-фрагмент, длиной 659 нт., содержит первые 649 нт. вирусной РНК и десять 3'-концевых нематричных нуклеотидов AUUAGAGAUC.

Чтобы относительно точно (до нескольких нуклеотидов) картировать места перекреста рекомбинантов на участке между олигопиримидин-AUG₅₈₆ tandemом и стартовым кодоном AUG₇₄₃, необходимо обеспечить различие первичной структуры у 3'-и 5'-фрагментов на данном участке. Для этого у 3'-фрагментов были инвертированы участки генома 633-729 (у фрагментов PA2 и ΔL) и 633-669 (у фрагмента ΔBB). При этом участок между положениями 568-634 (67 нуклеотидов) остается идентичным для всех фрагментов. Кроме того, подобная инверсия позволяет молекулам 3'-фрагмента взаимодействовать с 3'-концевым участком 5'-фрагментов с образованием совершенного межмолекулярного гетеродуплекса (рис. 15).

Изначально предполагалось, что рекомбинация между фрагментами полiovirusной РНК может пойти по нерепликативному сплайсинг-подобному механизму, в рамках которого образование рекомбинанта идет за счет прямой атаки 3'-концевого гидроксила одной молекулы РНК на межнуклеотидную связь другой родительской РНК. В связи с этим, конструкции фрагментов создавались с тем расчетом, чтобы увеличить эффективность рекомбинации по

сплассинг-подобному механизму, исходя из известных на тот момент экспериментальных данных. В частности, образование межмолекулярного РНК-дуплекса между 3'- и 5'-концевыми участками фрагментов сателлитных РНК фага Q β повышало частоту негомологичной рекомбинации (Chetverin et al., 1997). Предполагалось, что образование РНК-дуплекса у фрагментов геномной РНК полиовируса на разрешенном для рекомбинации участке повысит эффективность рекомбинации. Поскольку BG-фрагмент способен образовать РНК-дуплекс с 3'-фрагментом в два раза длиннее, чем BN- и BY-фрагменты (рис. 15), предполагалось, что использование данного фрагмента, поможет выяснить, как частота рекомбинации зависит от стабильности межмолекулярного РНК-дуплекса. Использование BN- и BY-фрагментов преследовало цель выяснить, необходимо ли участие 3'-концевого участка 5'-фрагмента в образовании РНК-дуплекса, или 3'-концевой участок 5'-фрагмента должен обладать определенной степенью свободы (рис. 15).

Кроме того, невирусные 3'-концевые нуклеотиды 5'-фрагментов должны были выполнять функцию маркеров, с помощью которых можно будет точно картировать место перекреста на 3'-фрагменте при образовании рекомбинантов, в состав которых последовательность 5'-фрагмента будет входить полностью.

Дополнительно, все конструкции 5'-фрагментов содержат точечные замены в положении 451 и 552 ($C_{451} \Rightarrow AG$, $G_{552} \Rightarrow UC$). Нуклеотиды C_{451} и G_{552} участвуют в образовании основания консервативного домена D (см. обзор литературы; рис. 6), который входит в состав IRESa у всех рино- и энтеровирусов. Понуклеотидное выравнивание первичной структуры 5'-НТО у различных рино- и энтеровирусов показало, что положения 451 и 552 полиовируса соответствуют динуклеотидам AG и UC бычьего энтеровируса.

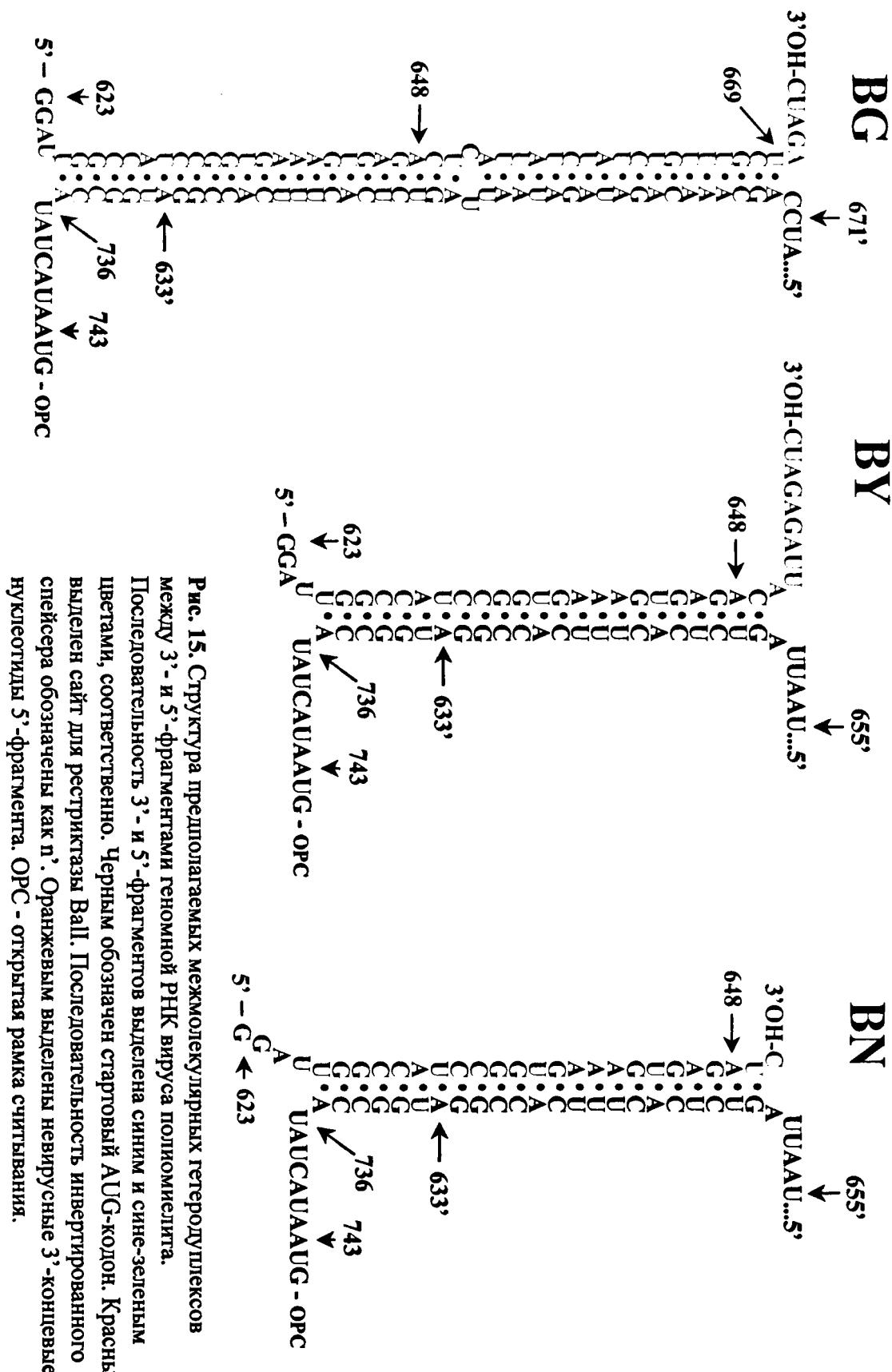


Рис. 15. Структура предполагаемых межмолекулярных гетеродуплексов между 3'- и 5'-фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита. Последовательность 3'- и 5'-фрагментов выделена синим и сине-зеленым цветами, соответственно. Черным обозначен стартовый AUG-кодон. Красным выделен сайт для рестриктазы Ball. Последовательность инвертированного спейсера обозначены как n'. Оранжевым выделены невирусные 3'-концевые нуклеотиды 5'-фрагмента. OPC - открытая рамка считываания.

В связи с этим предполагалось, что данные замены в 5'-НТО полиовируса не окажут существенного влияния на фенотип вируса, и будут служить генетическими маркерами.

Мы проверили это предположение, введя указанные выше точечные замены в геном вируса дикого типа. При трансфекции монослоя культуры клеток (VERO) молекулами РНК вируса полиомиелита дикого типа (конструкция pT7PV1) и полиовируса, содержащего указанные выше точечные мутации (конструкция pT7PV1/55), различий в бляшечном фенотипе и удельной инфекционности РНК данных вирусов обнаружено не было (табл. 1).

Таблица 1. Бляшечный фенотип и удельная инфекционность молекул РНК вируса полиомиелита дикого типа и полиовируса, содержащего точечные мутации в 5'-НТО^a

Транскрипт с плазмиды	Среднее количество бляшек на флакон при трансфекции 0,08 нг РНК	Размер вирусных бляшек (мм)
pT7PV1	3,5 ± 4,94	3,36±1,07
pT7PV1/55	5,5 ± 2,12	2,83±1,02

^a Показано среднее количество бляшек на флакон на 3 день после трансфекции ± стандартное отклонение. Указано среднее значение диаметра вирусных бляшек на 3 день после трансфекции ± стандартное отклонение.

Таким образом, введенные мутации ($C_{451} \Rightarrow AG$, $G_{552} \Rightarrow AC$) не оказывают существенного влияния ни на бляшечный фенотип вируса полиомиелита, ни на удельную инфекционность его РНК, следовательно, их можно рассматривать как маркерные.

Ни один из транскриптов, полученных с плазмид 5'-фрагментов (pT7PV1/54-BN, -BG; -BY) и 3'-фрагментов (pT7PV1/SNR-PA2, -ΔBB; -ΔL), не был инфекционным при трансфекции клеток КПЗМ, хотя трансфекцию повторяли многократно и использовали как длительные периоды инкубации (до

27 дней), так и большие количества транскрипта (до 2 мкг на 10^6 клеток). Таким образом, сконструированы неинфекционные взаимодополняющие фрагменты геномной РНК вируса полиомиелита.

4.2 Неинфекционные фрагменты геномной РНК могут рекомбинировать с образованием инфекционного потомства

Как только для трансфекции использовали смесь 5'- и 3'-фрагментов (1 мкг каждого) в любой комбинации, получали инфекционное потомство. Бляшки появлялись на 3-6 день после трансфекции.

С вирусной РНК, выделенной из индивидуальных бляшек, при помощи RT-PCR синтезировали участок кДНК полiovirusa между положениями 59-1078. Участок между положениями 340-760 или 430-760 был секвенирован. Анализ первичной структуры показал, что РНК содержит маркерные мутации 5'-фрагмента (в положении 451 и 552) и характерную для 3'-фрагмента первичную структуру инвертированного участка перед стартовым AUG-кодоном, то есть, являются рекомбинантами (рис. 16). Данные о эффективности рекомбинации между 3'- и 5'-фрагментами представлены в табл. 2.

Таблица 2. Эффективность рекомбинации между 3'- и 5'-фрагментами геномной РНК полiovirusa

Транскрипт плазмид 5'- фрагментов	Транскрипт плазмид 3'-фрагментов ^a		
	pT7PV1/SNR-PA2	pT7PV1/SNR-ΔBB	pT7PV1/SNR-ΔL
PT7PV1/BG	1.5±0.5	1.5±1.0	1.75±1.25
PT7PV1/BY	0.75±0.35	1.0±0.0	0.5±0.5
PT7PV1/BN	0.75±0.35	0.75±0.35	0.2±0.32

^a Трансфекцию проводили смесью РНК 5'- и 3'-фрагментов (1 мкг каждого). Представлено среднее число бляшек на флакон, полученных в одном опыте на 6 день после трансфекции ± стандартное отклонение.

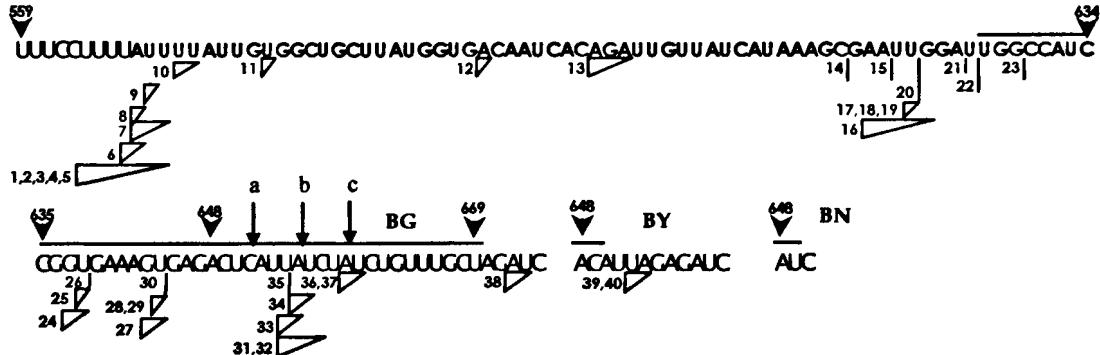
Таким образом, эффективность рекомбинации примерно одинакова при любой комбинации 3'- и 5'-фрагментов.

Планировалось, что BG-фрагмент будет способен образовать РНК-дуплекс с любым 3'-фрагментом в два раза длиннее, чем ВY- и BN-фрагменты. В связи с этим, одинаковую эффективность рекомбинации при использовании любой конструкции 5'-фрагмента можно объяснить тем, что в исследуемых условиях РНК-дуплекс между 3'- и 5'- фрагментами образуется лишь у небольшой части молекул, либо образование РНК-дуплекса между фрагментами не является лимитирующей стадии рекомбинации.

Далее мы попытались выяснить, существует ли взаимосвязь между эффективностью рекомбинации и образованием (или стабильностью) РНК-дуплекса между 3'- и 5'-фрагментами. Для этого, перед трансфекцией смесь 3'- и 5'-фрагментов инкубировали в различных условиях (нагрев и инкубирование при 70°C или 50°C, отжиг фрагментов и т. д.). Однако предварительная совместная инкубация фрагментов в указанных выше условиях, не приводила к образованию рекомбинантов, что, по-видимому, было связано с деградацией большей части транскрипта 3'-фрагмента (данные не приведены). Таким образом, взаимосвязь между эффективностью рекомбинации и образованием (или стабильностью) РНК-дуплекса у 3'- и 5'-фрагментов исследовать не удалось.

Подавляющее большинство мест перекреста картировано на участке между IRESом и стартовым AUG-кодоном. Места перекреста на 3'- и 5'- фрагментах располагаются неравномерно, формируя “горячие точки” (рис. 16).

5' -фрагмент



3' -фрагмент

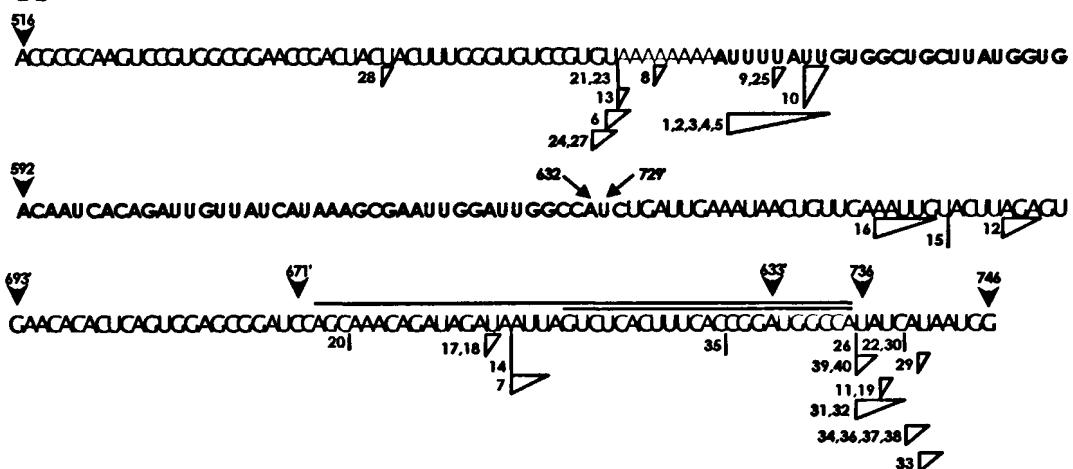


Рис. 16. Локализация мест перекреста на 5'- и 3'-фрагментах. Места перекреста рекомбинантов, которые расположены ближе к 3'-концу от нуклеотида 648, обозначены отдельно для каждого 5'-фрагмента. Места перекреста обозначены или вертикальными линиями (если картирование возможно с точностью до нуклеотида) или треугольником (если место перекреста содержит гомологичные обоим фрагментам нуклеотиды). Гомологичный участок 3'- и 5'-фрагментов выделен сине-зеленым цветом. Нуклеотиды инвертированного участка 3'-фрагментов (позиции 633-669 у ΔBB, 633-729 у PA2 и ΔL) обозначены как n'. Стартовый AUG-кодон выделен синим цветом. Лиловым выделен сайт для рестриктазы Ball. Коричневым выделена олиго-А последовательность. Нуклеотиды 3'- и 5'-фрагментов, участвующие в образовании гетеродуплекса, обозначены черными линиями (длинная линия соответствует BG-, короткая - BN- и BY-фрагментам). Предполагаемый каталитический мотив рибозима типа hammerhead затенен. Черными вертикальными стрелками показаны возможные сайты (a, b, c) автокаталитического разрыва предполагаемыми рибозимами A, B и C, соответственно. Обозначены места перекреста рекомбинантов в экспериментах с: BG×PA2 - 1, 3, 5, 8, 15, 21, 25, 31, 32, 35, 36; BG×ΔBB - 26, 30, 33, 34, 37, 38; BN×PA2 - 2, 4, 6, 10, 11, 17, 22, 23, 27, 28; BN×ΔBB - 7, 14, 18, 19, 29; BN×ΔL - 9, 12, 13; BY×PA2 - 24; BY×ΔBB - 20, 39, 40; BY×ΔL - 16.

При этом, если у нескольких рекомбинантов места перекреста на 5'-фрагменте идентичны (формируют “горячие точки”), то места перекреста на 3'-фрагменте у этих рекомбинантов, как правило, не совпадают. В большинстве случаев места перекреста определены с достаточно высокой степенью точности, так как участки гомологии между фрагментами в месте перекреста составляли от 0 до 7 нуклеотидов. У небольшого количества рекомбинантов (14 %) места перекреста как на 3'-фрагменте, так и 5'-фрагменте располагаются на участке гомологии (67 нт. – между положениями 568-634). В этом случае установить точно место перекреста не представляется возможным.

Информация о структуре и локализации мест перекреста у большинства рекомбинантов была получена при анализе первичной структуры RT-PCR фрагментов. Между тем, известно, что образование рекомбинантных молекул может быть артефактом как обратной транскрипции (Negroni et al., 1995), так и PCR (Frohman and Martin, 1990). Чтобы исключить возможность артефакта, у десяти рекомбинантов, выбранных случайным образом (рекомбинанты: 1, 2, 7, 10, 18, 20, 26, 32, 34, 38), места перекреста были идентифицированы также при помощи секвенирования вирусной РНК. Для накопления достаточного количества вирусного материала, рекомбинантные вирусы были дважды пассированы в монослое клеток КПЗМ. Секвенирование участка 340-760 выделенной РНК показало, что у всех 10 вирусов структура и локализация мест перекреста совпадают с данными, которые были получены при определении первичной структуры RT-PCR фрагментов.

Итак, трансфекция смесью 3'- и 5'-фрагментов геномной РНК вируса полиомиелита, которые не могут эффективно транслироваться, привела к образованию инфекционного рекомбинантного потомства. Таким образом,

образование рекомбинантов в наших экспериментах идет до появления вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, что говорит о нерепликативном механизме рекомбинации.

4.3 Влияние структуры 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента на эффективность рекомбинации и распределение мест перекреста

Образование рекомбинантной молекулы РНК в рамках нерепликативной модели рекомбинации принципиально возможно по нескольким схемам. По одной из них, рекомбинация может осуществляться за счет прямой атаки 3'-концевым гидроксилом одной молекулы РНК на фосфодиэфирную связь другой РНК (см. обзор Cheh and Bass, 1986). По другой схеме, образование рекомбинанта может осуществляться с помощью двух последовательных реакций. На первом этапе происходит разрыв межнуклеотидной связи у каждой из родительских РНК. Образование рекомбинанта идет за счет перекрестного лигирования образующихся концевых нуклеотидов (см. обзор Adams et al., 1986).

Чтобы получить информацию о возможном механизме нерепликативной рекомбинации в наших экспериментах, было решено выяснить, как частота рекомбинации зависит от структуры 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента. Для этого, наряду с исходным 5'-фрагментом, использовали 5'-фрагмент после последовательных обработок: (1) периодатом; (2) анилином; (3) щелочной фосфатазой.

Изменение структуры 3'-концевого участка 5'-фрагмента при данных модификациях изображены на рис. 13 (см. п. 3.12). При обработке молекулы РНК солями йодной кислоты (IO_4^-) ковалентная $\text{C}^2\text{-C}^3'$ связь рибозы 3'-концевого нуклеотида разрывается с образованием диальдегида (реакция «A»).

В результате последующего взаимодействия с анилином связь ${}^3\text{P}-\text{O}^5$, разрывается и РНК 5'-фрагмента становится на 1 нуклеотид короче, при этом, 3'-концевой нуклеотид (N^1) содержит 3'-монофосфат (реакция «В»). Последующая обработка щелочной фосфатазой удаляет 3'-концевой монофосфат с возобновлением цис-гликольной группы 3'-концевого нуклеотида РНК 5'-фрагмента (реакция «С»; более подробно см. п. 3.12).

Были использованы 5'-фрагменты (всех конструкций) после каждой из приведенных выше модификаций. Результаты экспериментов с использованием конструкций BN и ΔL представлены в табл. 3.

Таблица 3. Эффект модификации 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента на эффективность рекомбинации между фрагментами BN и ΔL

Характер модификации 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента	Количество бляшек на мкг РНК ^a	
	3 день	4 день
Без обработки	0	$4,3 \pm 4,7$
NaIO_4	$11,2 \pm 4,1$	слив
$\text{NaIO}_4 +$ анилин	$9,2 \pm 2,8$	слив
$\text{NaIO}_4 +$ анилин + фосфатаза	$0,3 \pm 0,5$	$0,5 \pm 1,0$
Без обработки	0	$2,0 \pm 1,7$
pCr лигирование	$8,5 \pm 2,6$	$10,5 \pm 3,1$

^a Показано среднее число бляшек на флакон на 3 и 4 день после трансфекции \pm стандартное отклонение. Слив – невозможно точно определить количество бляшек из-за отсутствия четких границ между ними.

Окисление 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента периодатом увеличивало в несколько раз количество бляшек на флакон. Последующая обработка анилином не сопровождалась каким-либо дальнейшим изменением выхода рекомбинантов. Однако обработка 5'-фрагмента щелочной фосфатазой вызвала снижение выхода рекомбинантов до значений, характерных для неокисленного 5'-фрагмента.

Определение первичной структуры мест перекреста у рекомбинантов, полученных в экспериментах с модифицированным 5'-фрагментом (окисление, обработка анилином), выявило появление нового класса рекомбинантов. Появились рекомбинанты (~ 40 %), в состав которых последовательность 5'-фрагмента входила полностью (табл. 4; рис. 17). При этом большинство таких рекомбинантов в месте перекреста между последним нуклеотидом 5'-фрагмента и первым нуклеотидом 3'-фрагмента содержали чужеродные вставки различной длины.

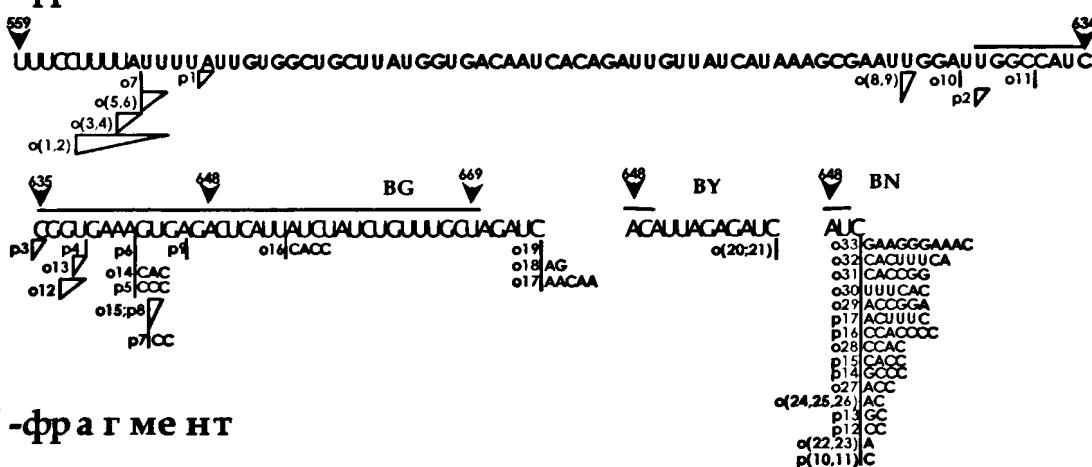
Таблица 4. Эффект модификации 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента на структуру рекомбинантов, при использовании конструкций BN и ΔL^a

Характер модификации 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента	Количество рекомбинантов		
	Общее	С укороченной последовательностью 5'-фрагмента в составе рекомбинанта	С полной последовательностью 5'-фрагмента в составе рекомбинанта
Без обработки	40	40	0
NaIO ₄	25	15	10 (40%)
NaIO ₄ + анилин	18	11	7 (39%)
NaIO ₄ + анилин + фосфатаза	4	4	0
pCr лигирование	18	10	8 (44%)

Было предположено, что увеличение выхода рекомбинантов в несколько раз и появление нового класса рекомбинантов при модификации 5'-фрагмента связано с наличием 3'-концевого монофосфата.

Для проверки данного предположения был использован 5'-фрагмент, у которого 3'-концевой нуклеотид фосфорилирован в результате лигирования с 3', 5'-цитидилдифосфатом. Результаты экспериментов с использованием конструкций BN и ΔL представлены в табл. 3 и 4, и на рис. 17.

5' -фрагмент



3' -фрагмент

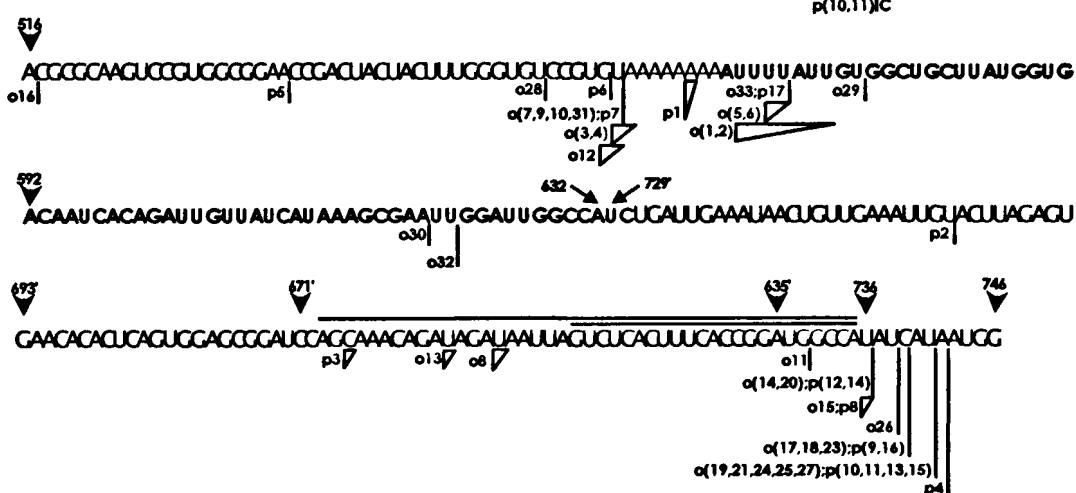


Рис. 17. Локализация мест перекреста на 5'- и 3'-фрагментах. Невирусные (олигонуклеотиды, картированные между последовательностями фрагментов в составе рекомбинанта, показаны вправо от вертикальной линии (последний нуклеотид 5'-фрагмента). Рекомбинанты, полученные в экспериментах с модифицированным 5'-фрагментом: окисление и лигирование рСр - выделены красным цветом с добавлением знаков о и р, соответственно. Обозначены места перекреста рекомбинантов в экспериментах с: BGxPA2 - о3, о4, о17-19; BGxΔL - о16; BNxPA2 - о1, о2, о5, о6, о8, о10, о13, о24, о27; BNx ΔВВ - о22; BNxΔL - о7, о9, о11, о12, о14, о15, о23, о25, о26, о28-33, p1-19; BYxPA2 - о20; BYxΔL - о21. Другие обозначения - см. подписи к рис. 16.

При такой модификации 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента количество бляшек на флакон повышалось до значений, характерных для экспериментов с использованием 5'-фрагментов, окисленных периодатом и обработанных анилином (табл. 3). Определение первичной структуры мест перекреста также показало появление класса рекомбинантов (44 %), в состав которых

последовательность 5'-фрагмента входила полностью (табл. 4; рис. 17). У большинства данных рекомбинантов между последним нуклеотидом 5'-фрагмента и первым нуклеотидом 3'-фрагмента также были обнаружены чужеродные вставки различной длины. При этом у большинства рекомбинантов нуклеотид чужеродной вставки, расположенный перед первым нуклеотидом 3'-фрагмента, был представлен цитидиловым остатком (рис. 17).

Таким образом, увеличение выхода рекомбинантов и появление класса рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента, определяется наличием 3'-концевого монофосфата.

Следует заметить, что сама по себе обработка периодатом 5'-фрагмента (без последующей обработки анилином) не должна приводить к появлению фосфорилированной формы 3'-концевого нуклеотида. Мы предполагаем, что 3'-концевой монофосфат, в данном случае, образуется в результате взаимодействия 3'-концевого диальдегида с первичными аминами клетки (аминокислотами и т. п.).

4.4 Изучение возможного участия криптических рибозимов типа hammerhead в рекомбинации между фрагментами РНК

Места перекреста на 5'- и 3'-фрагментах формируют несколько точек кластеризации (горячие точки). В рамках нерепликативной модели концентрация мест перекреста на отдельных сайтах может быть обусловлена тремя причинами: (1) высокой частотой разрыва определенной ковалентной межнуклеотидной связи; (2) высокой частотой лигирования фрагментов, после разрыва по данным связям; (3) двумя выше указанными причинами одновременно.

Анализируя расположение горячих точек на 5'-фрагменте (BG-конструкция), можно заметить, что на 3'-концевом участке данного фрагмента на некотором расстоянии к 3'-концу от мотива ${}_{638}\text{UGAAA}_{642}$ расположена «горячая область» (рекомбинанты 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37; см. рис. 16)

Согласно литературным данным, мотивы 5'-UGAAA-3' и 5'-GAAA-3' входят в состав каталитических центров многих РНК, обладающих автокаталитической эндонуклеазной активностью, например, рибозима типа hammerhead, Mn²⁺-зависимого рибозима (см. обзоры Pyle 1993; Symons 1997; Tanner 1999), некоторых самоспайсирующихся инtronов первого типа (Kuo and Herrin, 2000).

Компьютерный анализ первичной структуры РНК вируса полиомиелита показал, что в 5'-НТО есть участок между положениями 300-330, который теоретически может взаимодействовать с участком 635-665 той же самой или другой молекулы РНК 5'-фрагмента, с образованием структур (A, B и C), соответствующих консенсусной структуре рибозима типа hammerhead (рис. 18).

При этом сайты разрыва межнуклеотидной связи данными структурами (криптическими рибозимами B и C) совпадают с локализацией мест перекреста рекомбинантов в указанной выше «горячей области». Необходимо отметить, что образование структур A, B и C возможно при взаимодействии участков 300-330 и 635-665, принадлежащих 3'- и 5'-фрагментам, соответственно.

Таким образом, если структуры криптических рибозимов действительно образуются, то наличие данной «горячей области» можно объяснить более частым разрывом соответствующих межнуклеотидных связей (рис. 18 b).

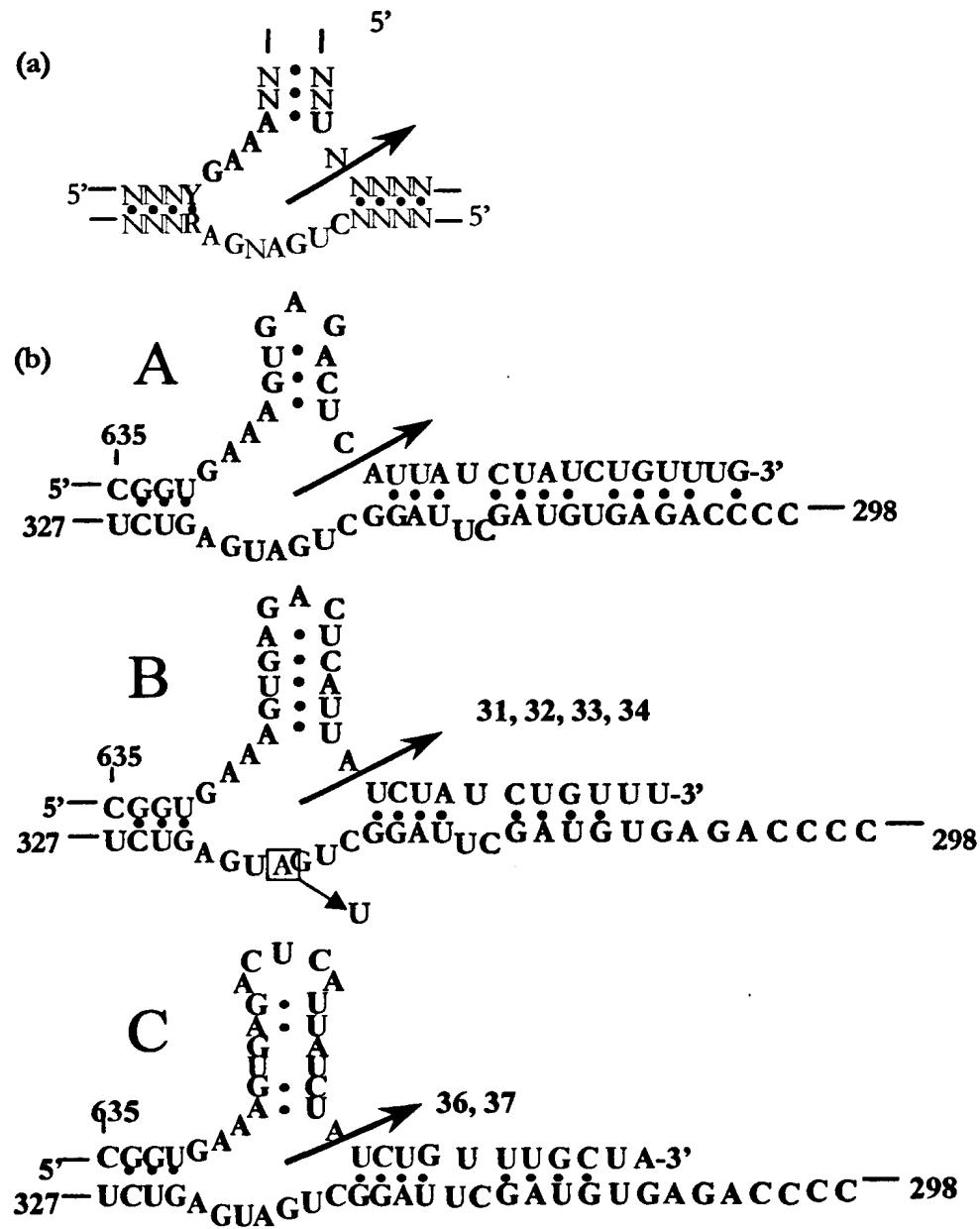


Рис. 18. Гипотетическая модель образования горячих точек на 3'-концевом участке 5'-фрагмента (BG-конструкция) за счет криптической рибозимной активности полiovирусной РНК. (а) Консенсусная структура рибозима hammerhead, где N - это любой нуклеотид, H - любой, кроме G. Красным выделены консервативные нуклеотиды, образующие каталитический центр (R - пурин, а Y - пиримидин). Сайт автокаталитического разрыва обозначен синей стрелкой. (б) Предполагаемые варианты фолдинга 3'-концевого участка 5'-фрагмента (нт. 630-665) с формированием криптических рибозимов типа hammerhead (A, B и C). Сине-зеленым обозначена 3'-концевая последовательность 5'-фрагмента. Бордовым обозначен участок полiovирусной РНК (нт. 298-327), принимающий участие в формировании криптических рибозимов. Синей стрелкой обозначены предполагаемые сайты автокаталитического разрыва, которые совпадают с местами перекреста рекомбинантов (см. также рис. 16). Мутация в положении 320 (A⇒U; показана на структуре B) должна инактивировать каталитическую активность рибозима.

Взаимодействие двух участков 635-665 и 300-330 полiovирусной РНК принципиально возможно, однако вероятность данного взаимодействия должна быть достаточно низкая. Во-первых, образование структур криптических рибозимов требует взаимодействия участков, находящихся на значительном удалении друг от друга, при этом, по крайне мере, один из них (300-330) принимает участие в формировании относительно стабильной локальной вторичной структуры. Во-вторых, эффективное образование у полiovирусной РНК вторичных структур, обладающих эндонуклеазной активностью, противоречит факту существования несегментированного полiovирусного генома.

Тем не менее, низкая вероятность взаимодействия участков между положениями 635-665 и 300-330 не означает, что оно не может быть реализовано, пусть даже с достаточно низкой частотой (например, у одной молекулы из миллиона). При этом даже такая низкая частота принципиально позволит детектировать рекомбинанты с местом перекреста в сайте предполагаемого разрыва.

Для изучения возможного участия криптических рибозимов типа hammerhead в нерепликативной рекомбинации фрагментов полiovирусной РНК в каталитический центр предполагаемого рибозима на участке 300-330 была введена мутация A₃₂₀⇒U (см. рис. 18 b). Такая замена должна полностью ингибировать автокатализическую активность рибозима (Ruffner et al., 1990; Symons, 1991; 1992). При этом данная мутация не должна снижать инфекционность полiovируса. Поскольку аналогичная мутация не влияла на блещечный фенотип и титр полiovируса тип 2 (Lansing) при трансфекции клеток HeLa (Pelletier et al., 1988b), было предположено, что замена в

положении 320 не скажется на бляшечном фенотипе полiovируса типа 1 и удельной инфекционности его РНК.

Для проверки данного предположения была создана конструкция pT7PV1/55-M15. Данная конструкция содержит полноразмерную кДНК вируса полиомиелита. При этом 5'-НТО данного вируса несет как маркерные мутации ($C_{451} \Rightarrow AG$, $G_{552} \Rightarrow AC$), так и замену в положении 320.

Трансфекция монослоя клеток VERO мутантным вирусом (pT7PV1/55-M15) и вирусом, содержащим только маркерные мутации (pT7PV1/55), не выявила достоверных различий в удельной инфекционности РНК и бляшечном фенотипе данных вирусов (табл. 5).

Таблица 5. Бляшечный фенотип и удельная инфекционность молекул РНК вируса полиомиелита от конструкций pT7PV1/55 и pT7PV1/55-M15^a

Транскрипт плазмид	Количество бляшек на флакон при трансфекции 0,08 нг РНК	Размер вирусных бляшек (мм)
pT7PV1/55	$5,5 \pm 2,12$	$2,83 \pm 1,02$
pT7PV1/55-M15	$4,5 \pm 2,12$	$2,41 \pm 0,79$

^a Показано среднее количество бляшек на флакон на 3 день после трансфекции \pm стандартное отклонение. Указано среднее значение диаметра вирусных бляшек в миллиметрах на 3 день после трансфекции \pm стандартное отклонение.

Таким образом, замена в положении 320 не оказывается ни на бляшечном фенотипе полiovируса ни на удельной инфекционности его РНК.

В дальнейших экспериментах мы параллельно использовали два 5'-фрагмента. Один фрагмент содержал только маркерные мутации (далее «исходный» 5'-фрагмент). Второй 5'-фрагмент содержал как маркерные мутации, так и замену в положении 320 (далее «мутантный» 5'-фрагмент).

Наличие достоверной разницы в частоте рекомбинации в сайтах **a**, **b** или **c** у исходного и мутантного 5'-фрагментов было бы веским аргументом в пользу того, что данная «горячая область» образуется за счет эндонуклеазной активности криптических рибозимов типа hammerhead.

Согласно литературным данным, автокаталитическая активность рибозима типа hammerhead *in vitro* зависит от присутствия в среде катионов двухвалентных металлов. При этом каталитически активная конформация данного рибозима поддерживается в присутствии 10 mM Mg²⁺ (Dahm and Uhlenbeck, 1991). Если предположить, что формирование каталитически активной конформации криптического рибозима возможно *in vitro* и для этого необходимо и достаточно определенной концентрации катионов магния, то предварительная инкубация молекул РНК 5'-фрагмента в буфере, содержащем данные катионы, должна увеличить число рекомбинантов с местом перекреста в исследуемом сайте.

Для проверки данного предположения, РНК исходного и мутантного 5'-фрагментов параллельно предварительно инкубировали (от 5 до 120 минут при 37°C) в буфере *A* [80 mM Tris.HCl, pH 7.55, 100 mM NaCl, 10 mM Mg⁺⁺]. В качестве контроля использовали пробы, в которых РНК исходного и мутантного 5'-фрагментов предварительно инкубировали в буфере *B* [80 mM Tris.HCl, pH 7.55, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА].

Трансфекцию проводили на монослое культуры клеток VERO. Количественные данные по частоте рекомбинации представлены в табл. 6.

Наличие катионов магния в буфере для предварительной инкубации не оказывало существенного влияния на выход рекомбинантов при использовании как исходного, так и мутантного 5'-фрагментов.

Таблица 6. Влияние катионов магния на эффективность рекомбинации при предварительной инкубации молекул РНК исходного и мутантного 5'-фрагментов^a

Конструкции 5'-фрагментов	Эффективность рекомбинации после предварительной инкубации молекул РНК 5'-фрагментов	
	С буфером А	С буфером В
PT7PV1/BG54	6.00 ± 4.58	3.13 ± 2.53
PT7PV1/Bg15	2.21 ± 2.42	0.86 ± 0.94

^a Эффективность рекомбинации между BG и ΔL фрагментами (1мкг каждого) показана средним количеством бляшек на флакон, на 6 день после трансфекции ± стандартное отклонение.

Состав буфера также не влиял на структуру и распределения мест перекреста.

Места перекреста на 5'- и 3'-фрагментах показаны на рисунках 19 и 20, соответственно. Количественные данные по частоте рекомбинации на 3'-концевом участке исходного и мутантного 5'-фрагментов представлены в табл. 7.

Таблица 7. Распределение мест перекреста у мутантного и исходного 5'-фрагментов (рекомбинация между BG и ΔL фрагментами)^a

	Исходный 5'-фрагмент	Мутантный 5'-фрагмент	Уровень значимости Р (α)
Общее число рекомбинантов	53	34	
Количество рекомбинантов с местом перекреста в точке a	17,9% (9)	2,9% (1)	0,05
Количество рекомбинантов с местом перекреста в точке b	9,4% (5)	14,7% (5)	0,47
Количество рекомбинантов с местом перекреста в точке c	3,7% (2)	0	0,25

^a Количество рекомбинантов с местом перекреста в соответствующем сайте показано в процентах от общего числа. В скобках указано абсолютное количество секвенированных рекомбинантов.

5'-Фрагмент:

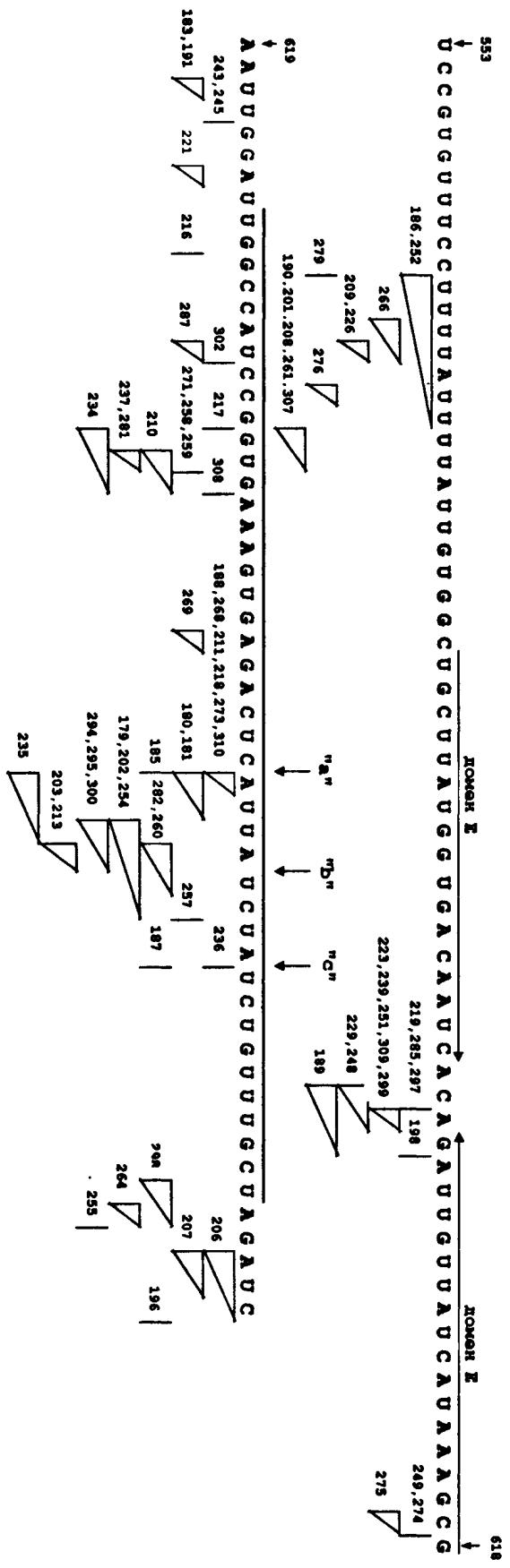
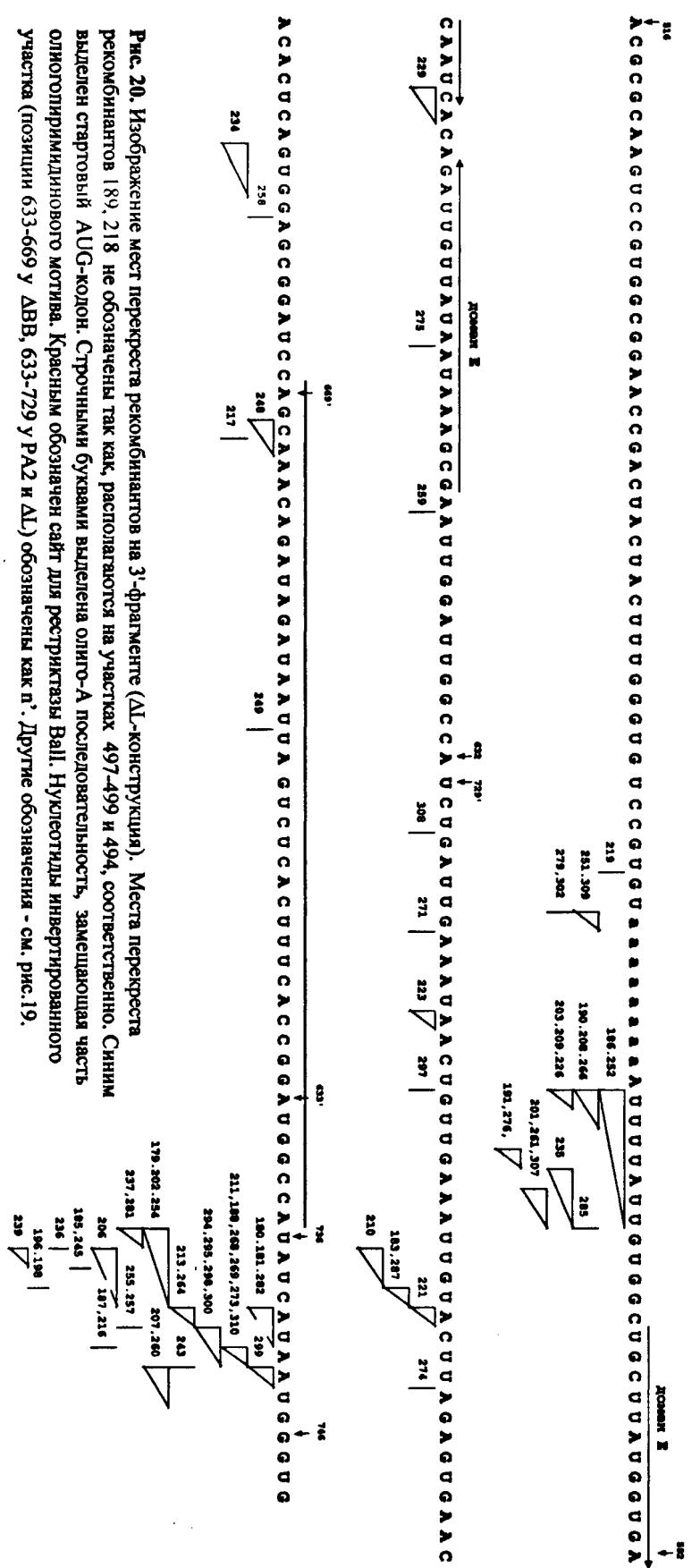


Рис. 19. Изображение мест перекреста рекомбинантов на 3'-концевом участке 5'-фрагмента (BG-конструкция). Рекомбинанты получены в экспериментах с использованием фрагмента ДЛ. Гомологичный участок 3'- и 5'-фрагментами выделен синим цветом. Нанесены места перекреста рекомбинантов, полученных в экспериментах с использованием: нативного (обозначены сине-зеленым цветом) и мутантного 5'-фрагментов (обозначены красным цветом). Участок перекреста гомологичных рекомбинантов 194, 195, 272, 178, 184, 212, 238, 240, 278, 182, 244, 263, 265 на 3'- и 5'-фрагментах соглашает с областью гомологии данных фрагментов (67нг.-выделена синим), поэтому установить точно место перекреста не представляется возможным. Бордовым цветом выделен предполагаемый катализитический мотив рибозима типа hammerhead. Черными вертикальными стрелками показаны сайты ("а", "б", "с") автокаталитического разрыва гипотетическими криптическими рибозимами А, В, С, соответственно. Другие обозначения - см. рис. 16.

3'-фрагмент:



При статистической обработке полученных данных (использовали критерий χ^2), нулевая гипотеза была сформулирована следующим образом: возможные различия по частоте рекомбинации в исследуемом сайте у исходного и мутантного 5'-фрагментов получены случайно. Альтернативная гипотеза предполагает, что возможные различия по частоте рекомбинации в исследуемом сайте у исходного и мутантного 5'-фрагментов не случайны, и могли бы определяться участием криптических рибозимов типа hammerhead в нерепликативной рекомбинации.

Значения уровня значимости 0.47 и 0.25, полученные при обработке данных по частоте рекомбинации в сайтах **b** и **C**, говорят о том, что данных, подтверждающих возможность участия криптических рибозимов В и С в нерепликативной рекомбинации, нами не получено.

Однако значение уровня значимости 0.05, полученное для частоты рекомбинации в сайте **a** (табл. 7), говорит в пользу возможного участия криптического рибозима А в рекомбинации.

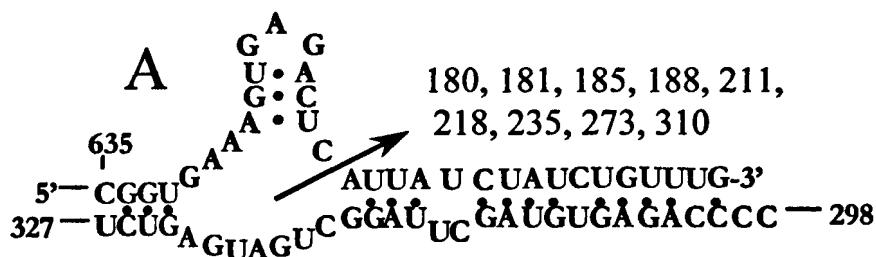


Рис. 21. Гипотетическая модель образования горячих точек на 3'-концевом участке 5'-фрагмента (BG-конструкция) за счет криптической рибозимной активности полiovирусной РНК. Предполагаемые варианты фолдинга 3'-концевого участка 5'-фрагмента (нр. 630-665) с образованием криптического рибозима типа hammerhead (рибозим А). Синей стрелкой обозначен предполагаемый сайт автокатализитического разрыва, который совпадает с местами перекреста рекомбинантов, полученных при использовании нативного (обозначены сине-зеленым) и мутантного (обозначены красным) 5'-фрагментов (см. также рис. 19). Другие обозначения - см. рис.18.

Таким образом, концентрацию мест перекреста рекомбинантов в сайте **a**

у исходного 5'-фрагмента можно объяснить более эффективным разрывом данной межнуклеотидной связи криптическим рибозимом А (рис. 21).

Для проверки данного предположения был сконструирован новый 3'-фрагмент, обозначенный, как $\Delta L[4]$ (рис. 22). Данная конструкция создана на основе фрагмента ΔL , т. е. содержит олиго-А последовательность, которая замещает часть олигопиримидинового блока $[_{560}\text{UUCCUUUU}_{567}]$. Однако структура 5'-НТО фрагмента $\Delta L[4]$ существенно отличается от таковой у ΔL фрагмента. У фрагмента $\Delta L(4)$ удалены первые 322 нуклеотида, формирующих как репликативный элемент *oriL*, так и часть *IRESa*. При этом отсутствие участка 1-322 делает невозможным участие молекулы фрагмента $\Delta L(4)$ в формировании вторичной структуры криптических рибозимов А, В и С.

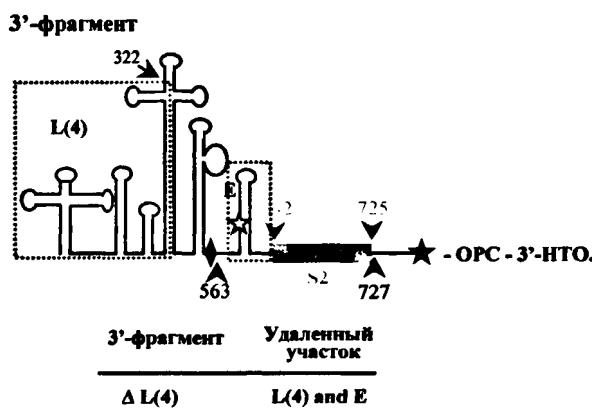


Рис. 22. Схематичное изображение 5'-НТО 3'-фрагмента $\Delta L(4)$ геномной РНК вируса полиомиелита. Сплошные черные линии соответствуют участкам 5'-НТО вируса полиомиелита штамм Mahoney; лиловый прямоугольник обозначает участок РНК вируса полиомиелита штамм Sabin 2 (его координаты обозначены цифрами соответствующего цвета). Удаленные участки вторичной структуры 3'-фрагмента выделены сине-зелеными прямоугольниками. Другие обозначения - см. рис. 14.

Участок 567-727, расположенный между олиго-А последовательностью и стартовым AUG-кодоном, был замещен на последовательность 642-725

полиовируса штамма Sabin 2, которая существенно отличается по первичной структуре от участка 567-727 полиовируса штамм Mahoney. Таким образом, у фрагмента $\Delta L(4)$ отсутствует область гомологии с 5'-фрагментами. Кроме того, при подобной замене невозможно образование протяженного совершенного гетеродуплекса между молекулами 3'- и 5'-фрагментов.

В экспериментах, с использованием фрагмента $\Delta L(4)$, перед трансфекцией молекулы РНК исходного и мутантного 5'-фрагментов также параллельно предварительно инкубировали при 37°C в буферах *A* и *B* (состав см. выше). Трансфекцию проводили на монослое культуры клеток VERO. Количественные данные по частоте рекомбинации у исходного и мутантного 5'-фрагментов представлены в табл. 8.

Таблица 8. Влияние катионов магния на эффективность рекомбинации при предварительной инкубации молекул РНК исходного и мутантного 5'-фрагментов^a

Транскрипт конструкций 5'-фрагментов	Эффективность рекомбинации после предварительной инкубации молекул РНК 5'-фрагментов	
	С буфером А	С буфером В
Нативный	19.6 ± 5.12	11.2 ± 3.76
Мутантный	9.5 ± 1.25	11.8 ± 5.76

^a Эффективность рекомбинации между BG и $\Delta L(4)$ фрагментами (1 мкг каждого) показана средним количеством бляшек на флакон, на 6 день после трансфекции ± стандартное отклонение.

Согласно представленным данным, наличие катионов магния в буфере для предварительной инкубации не оказывает существенного влияния выход рекомбинантов при использовании как исходного, так и мутантного 5'-фрагментов. Состав буфера также не оказывал существенного влияния на структуру и распределения мест перекреста.

Места перекреста на 5'- и 3'-фрагментах изображены на рис. 23 и 24, соответственно.

При статистической обработке полученных данных (использовали критерий χ^2), нулевая и альтернативная гипотезы были сформулированы так же, как при анализе данных экспериментов с использованием конструкций BG и ΔL (см. выше).

Таблица 9. Распределение мест перекреста у исходного и мутантного 5'-фрагментов (рекомбинация между BG и $\Delta L(4)$ фрагментами)^a

	Исходный 5'-фрагмент	Мутантный 5'-фрагмент	Уровень значимости $P(\alpha)$
Общее число рекомбинантов	47	49	
Количество рекомбинантов с местом перекреста в точке а	34% (16)	14,2% (7)	0,02
Количество рекомбинантов с местом перекреста в точке б	12,7% (6)	20,4% (10)	0,32
Количество рекомбинантов с местом перекреста в точке с	6,3% (3)	0	0,07

^a Количество рекомбинантов с местом перекреста в соответствующем сайте показано в процентах от общего числа. В скобках указано абсолютное количество рекомбинантов.

Значения уровня значимости 0,32 и 0,07 (табл. 9), полученные для частот рекомбинации в сайтах **б** и **с** говорят о том, что данных подтверждающих возможность участия криптических рибозимов **В** и **С** в нерепликативной рекомбинации нами не получено. С другой стороны достоверное различие в частоте рекомбинации по сайту **а** у исходного и мутантного 5'-фрагментов ($P = 0,02$; табл. 9), еще раз подтверждает возможность участия криптического рибозима **А** в нерепликативной рекомбинации.

5' фрагмент

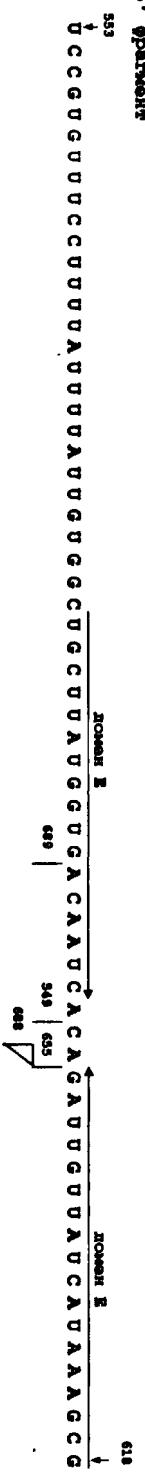


Рис. 23. Локализация мест перекреста рекомбинантов на 3'-концевом участке 5'-фрагмента (ВГ-конструкция).

Рекомбинанты получены в экспериментах с использованием ΔI(4) 3'-фрагмента. Невиргусные нуклеотиды, картированные между последовательностями фрагментов в составе рекомбинанта, показаны вправо от вертикальной линии (последний нуклеотид 5'-фрагмента). Нанесены места перекреста рекомбинантов, полученных в эксперименах с использованием нативного (обозначены малиновым цветом) и мутантного (обозначены сине-зеленым цветом) 5'-фрагментов. Малиновым цветом выделен предполагаемый катализитический мотив рибозима типа hammerhead. Чёрными вертикальными стрелками показаны сайты (а, б и с) возможного автокатализитического разрыва предполагаемыми криптическими рибозимами А, В и С, соответственно. Другие обозначения - см. рис. 16.

3'-фрагмент:

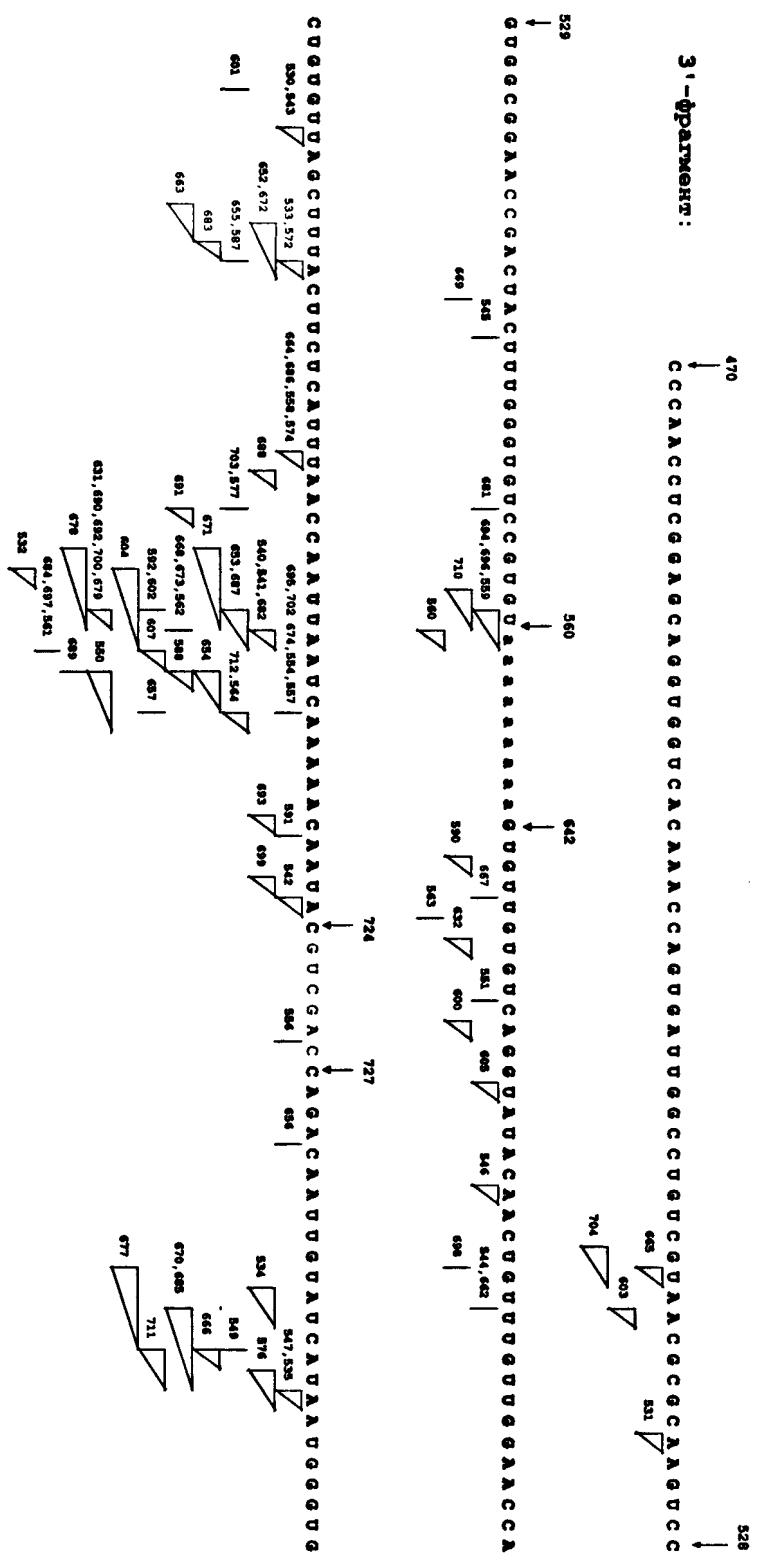


Рис. 24. Локализация мест перекреста рекомбинантов на 3'-фрагменте ($\Delta L[4]$ -конструкция). Коричневым цветом обозначена олиго- A последовательность, замещающая часть олигопirimидинового мотива. Синим цветом выделена последовательность поливируса штаммом Sabin 2. Нуклеотиды, расположенные между обозначенными положениями 724–727, соответствуют сайту для рестриктазы Sall. Другие обозначения – см. рис. 23.

5.Обсуждение результатов

5.1 Рекомбинация между фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита

идет по нерепликативному механизму

В ходе выполнения настоящей работы было получено более 850 рекомбинантов (380 из них были секвенированы) между неинфекционными взаимодополняющими фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита, которые не способны самостоятельно транслироваться. Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза могла появиться только после рекомбинации между фрагментами разного типа. Таким образом, механизм, отличный от репликативного, вовлечен в образование полученных рекомбинантов.

Один из доводов против нашего заключения мог бы состоять в том, что 3'-фрагменты с интактной открытой рамкой считывания все-таки способны, хотя и не эффективно, транслироваться, что может приводить к появлению вирусной РНК-полимеразы. После этого образование инфекционных рекомбинантов могло происходить по репликативному механизму.

Доказать, что блокировка инициации трансляции у сконструированных 3'-фрагментов абсолютна - невозможно. Однако характер повреждений в трансляционных cis-элементах 3'-фрагментов позволяет говорить о том, что данные РНК полностью лишены способности осуществлять синтез вирусных белков. В частности, у фрагмента ΔΒΒ был удален весь IRES – cis-элемент, осуществляющий кеп-независимую инициацию трансляции (Pelletier and Sonenberg, 1988, Pelletier et al., 1988a). Замена части олигопиримидинового блока [₅₆₀UUCCUUUU₅₆₇] на олиго-А последовательность у PA2-фрагмента

нарушает целостность ОАТ – cis-элемента участвующего в инициации трансляции у полiovирусной РНК. Согласно литературным данным, отсутствие данного cis-элемента, а также различные нарушения его структуры приводят к ингибированию матричной активности полiovирусной РНК как *in vivo*, так и *in vitro* (Nicholson et al., 1991; Meerovitch et al., 1991; Pestova et al., 1991; Pilipenko et al., 1992a; Gmyl et al., 1993).

Кроме того, результаты, полученные ранее в нашей лаборатории, подтверждают, что замена части олигопиримидинового блока [₅₆₀UUCCUUUU₅₆₇] на олиго-А последовательность драматически сказывается на матричной активности полiovирусной РНК.

Была создана конструкция, у которой ген люциферазы поместили под трансляционный контроль 5'-НТО вируса полиомиелита с вышеуказанной мутацией в ОАТ (конструкция pPL5). Транскрипт с этой конструкции транслировали в клетках HeLa. Для сравнения использовали транскрипт конструкции pPL1, у которой ген люциферазы был помещен под трансляционный контроль 5'-НТО вируса полиомиелита дикого типа.

Таблица 10. Активность люциферазы при трансляции РНК от конструкций pPL1 и pPL5 в клетках HeLa^a

Конструкции	Активность люциферазы
pPL1	0.670±0.120
pPL5	0.016±0.005
Контроль	0.015±0.005

^a В качестве контроля использовались мок-трансфенированные клетки HeLa. Активность люциферазы регистрировалась на люминометре при комнатной температуре. Активность представлена средним значением относительных единиц ± стандартное отклонение (А. П. Гмыль – данные не опубликованы).

Согласно представленным данным (табл. 10), активность люциферазы при трансляции конструкции pPL5 в клетках HeLa была на уровне контрольных показаний люминометра (А. П. Гмыль - данные не опубликованы).

Отсутствие матричной активности наблюдалось и при трансляции полноразмерной полиовирусной РНК с указанной выше мутацией в экстракте Кребс-2 (А. П. Гмыль - данные не опубликованы).

Более того, на наш взгляд, есть существенный, хотя и косвенный аргумент, подтверждающий отсутствие матричной активности у РА2-фрагмента. Если бы РА2-фрагмент, все-таки, был способен неэффективно транслироваться, то он должен был бы обладать квази-инфекционным фенотипом. Иными словами, трансфекция культуры клеток такой РНК должна приводить к появлению инфекционного потомства, так как восстановление целостности ОАТ возможно, например, за счет делеции участка между положениями 561 и 642' (табл. 11).

Таблица 11. Предполагаемая структура генома инфекционного ревертанта от РА2-фрагмента^a

вirus	нуклеотидная последовательность						
PV1	559 ↓	589 ↓	718 ↓	736 ↓	747 ↓	UUUCCUUUUAUUUUAUUGUGGCUGCUUA <u>AUGGUG</u> ..AUUCAACAGACAAUUGUAUCAUA <u>AUGGG</u>	
PV1/PA2	559 ↓	589 ↓	643' ↓	633' ↓	736 ↓	747 ↓	UaaaaaaaaAUUUUAUUGUGGCUGCUUA <u>AUGGUG</u> ..ACUUUCACCGGAUGGCCAUCAU <u>AUGGG</u>
Возможный Ревертант	U-----	-----	-----	-----	-----	-----	U-----.---UUUCACCGGAUGGCCAUCAU <u>AUGGG</u>

^a PV1-последовательность вируса полиомиелита типа 1 штамм Mahoney. Внутренние AUG₅₈₆ и стартовый кодон подчеркнуты тонкой и двойной линиями, соответственно. Точки использованы для обозначения разрыва в нуклеотидной последовательности. Удаленная последовательность обозначена дефисами.

Подобные делеции (между нуклеотидами 562-717 или 563-723) восстанавливали поврежденную функцию ОАТ у неинфекционного мутанта полиовируса PV1/Δ8 (табл. 12) (Pilipenko et al., 1992a; Gmyl et al., 1993). У данного мутанта были удалены восемь нуклеотидов между AUG₅₈₆ и предшествующим олигопиримидиновым блоком ₅₅₉UUUCC₅₆₄ (табл. 12).

Таблица 12. Структура генома ревертантов, отобранных из потомства мутанта pPV1/Δ8^a

вirus	нуклеотидная последовательность			
PV1	559 ↓	589 ↓	717 ↓	747 ↓
	UUUCCUUUUAUUUUAUUGUGGCUGC <u>CUUAUGGUG</u> ..UAUUUCAUCAGACAAUUGUAUCAUA <u>AUGGG</u>			
PV1/Δ8	UUUCC-----UAUUGUGGCUGC <u>CUUAUGGUG</u> ..UAUUUCAUCAGACAAUUGUAUCAUA <u>AUGGG</u>			
90	UUU-----..-AUUUCAUCAGACAAUUGUAUCAUA <u>AUGGG</u>			
74	UUUC-----..-AAUCAGACAAUUGUAUCAUA <u>AUGGG</u>			

^a PV1-последовательность вириуса полиомиелита типа 1 штамм Mahoney. Внутренние AUG₅₈₆ и стартовый кодон подчеркнуты тонкой и двойной линиями, соответственно. Точки использованы для обозначения разрыва в нуклеотидной последовательности. Удаленная последовательность обозначена дефисами (Pilipenko et al., 1992a; Gmyl et al., 1993).

Транскрипт pPV1/Δ8 при трансфекции стандартными дозами (от 0.1 до 5 нг) не давал вирусных бляшек. При трансфекции культуры клеток более высокими дозами транскрипта [от 100 до 200 нг на флакон], были отобраны 8 вирусных бляшек, появившихся после длительного периода инкубации (от 10 до 17 дней). Материал каждой из отобранных бляшек был использован для инфицирования свежей культуры. Среди гетерогенных по размеру бляшек каждого клона, были отобраны относительно крупнобляшечные представители, у которых была определена первичная структура сегмента РНК между позициями 450 и 720.

Были обнаружены ревертанты (PV1/Δ8-74 и PV1/Δ8-90), у которых наблюдались протяженные делеции (156 и 152 нуклеотидов, соответственно).

Выброшенный участок генома включал AUG₅₈₆, консервативный для всех энтеровирусов домен E, а также практически весь спейсер между этим доменом и инициаторным AUG₇₄₃. В случае этих вирусов вторым элементом тандема олигопиримидин/AUG являлся инициаторный AUG (табл. 12).

Таким образом, если РА2-фрагмент, все-таки, способен неэффективно транслироваться, то восстановление целостности ОАТ, по-нашему мнению, возможно, за счет протяженной делеции участка между положениями 561 и 642' (табл. 11).

Однако РНК РА2-фрагмента не была инфекционной при трансфекции клеток КПЗМ, притом, что трансфекцию повторяли многократно и использовали как длительные периоды инкубации (до 27 дней), так и большие количества транскрипта (до 2 мкг на 10⁶ клеток).

Итак, полное отсутствие инфекционного потомства (псевдоревертантов) при трансфекции культуры клеток КПЗМ и VERO молекулами РНК 3'-фрагментов, по-нашему мнению, свидетельствует, что данные РНК полностью лишены способности осуществлять синтез вирусных белков. Это является сильным аргументом в пользу того, что рекомбинанты в наших экспериментах образовались по механизму, отличному от репликативного.

Кроме того, существует еще ряд косвенных данных против репликативного механизма рекомбинации в наших экспериментах.

(I) Частота рекомбинации при использовании различных конструкций 3'-фрагментов. Если предположить, что рекомбинация в наших экспериментах идет, все-таки, по репликативному механизму, то частота рекомбинации при

использовании фрагмента ΔL должна быть существенно ниже, поскольку наряду с блокировкой инициации трансляции, у данного фрагмента отсутствует возможность для инициации синтеза как плюс, так и минус цепи геномной РНК. Таким образом, одинаковая частота рекомбинации при использовании всех 3'-фрагментов с любыми 5'-фрагментами косвенно свидетельствует против репликативного механизма рекомбинации в наших экспериментах.

(II) Преимущественное образование негомологичных рекомбинантов.

Большинство мест перекреста у рекомбинантов не совпадают с областями гомологии 5'- и 3'-фрагментов. Только у 14% рекомбинантов место перекреста на обоих фрагментах содержит указанную областью гомологии. Таким образом, большинство рекомбинантов (86%) являются негомологичными, что не характерно для репликативной рекомбинации у полiovируса. Согласно литературным данным, скрещивание вирусов, несущих различные фенотипические или генотипические маркеры, приводило к образованию рекомбинантов, места перекреста которых располагались на соответствующих гомологичных участках вирусного генома (Kirkegaard and Baltimore, 1986; Romanova et al., 1986; Tolskaya et al., 1987; King, 1988a, 1988b; Jarvis and Kirkegaard 1991, 1992; Tang et al., 1997; Duggal et al., 1997).

(III) Концентрация мест перекреста у рекомбинантов на участках, формирующих стабильный РНК-дуплекс между 3'- и 5'-фрагментами.
Образование некоторых рекомбинантов в рамках репликативной модели объясняют, используя дуплекс-индукционный механизм смены матрицы. Внешней отличительной чертой таких рекомбинантов является расположение мест перекреста на участке стабильного межмолекулярного РНК-дуплекса. Предполагается, что вирусная РНК-полимераза при репликации геномной РНК,

в некоторых случаях, не может расплавить стабильный межмолекулярный РНК-дуплекс, что приводит к смене матрицы по процессивному (рис. 25 б) (Romanova et al., 1986; Tolskaya et al., 1987) или непроцессивному механизму (рис. 25 а) (Bujarski and Dzianott, 1991; Nagy and Bujarski, 1993; Nagy et al., 1995; Figlerowicz et al., 1997, 1998).

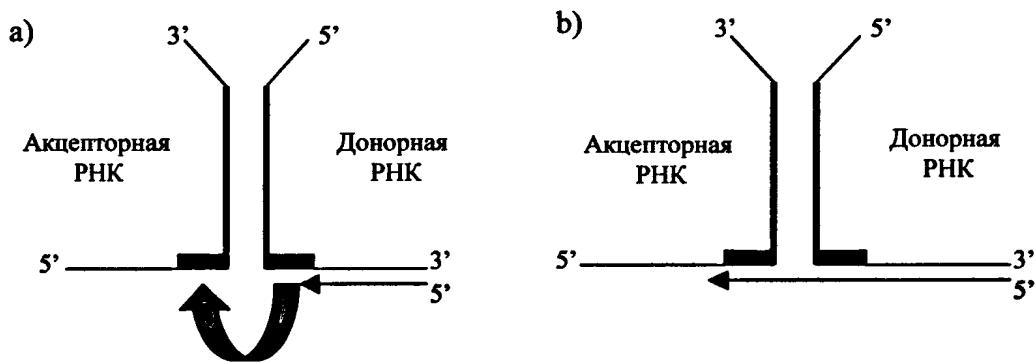


Рис. 25. Схематичное изображение дуплекс-индукированного механизма смены матрицы. Донорная и акцепторная РНК обозначены черными линиями. Участки, образующие межмолекулярный РНК-дуплекс, утолщены. Направление синтеза растущей цепи (рекомбинант) указано синей стрелкой. Большая стрелка указывает направление смены матрицы. Синим и красным прямоугольниками выделены донорный и акцепторный сайты, соответственно. Вирусная РНК-полимераза, в некоторых случаях, не может расплавить межмолекулярный гетеродуплекс, что приводит к смене матрицы по непроцессивному механизму (а) или механизму шунтирования (б).

Концентрация мест перекреста на 3'-фрагменте перед участком, способным формировать РНК-дуплекс с 5'-фрагментом, совпадает с логикой дуплекс-индукционной рекомбинации. Формально расположение мест перекреста у 21 рекомбинантов на 3'-фрагменте можно объяснить предложенными выше механизмами (рекомбинанты 11, 19, 22, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40; рис. 16; о [11, 14, 15], р [4, 8, 9]; рис. 17).

Однако у большинства указанных выше рекомбинантов места перекреста на 5'-фрагменте концентрируются на участках, формирующих данный РНК-дуплекс (рекомбинанты 11, 19, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40;

рис. 16; о [14, 15], р [4, 8, 9]; рис. 17). Такое расположение мест перекреста противоречит общей логике репликативной модели. Предполагается, что полимераза не может возобновить синтез РНК на акцепторном сайте, который формирует стабильную вторичную структуру (Romanova et al., 1986; Tolskaya et al., 1987; White and Morris, 1995).

Теоретически, образование указанных выше рекомбинантов можно объяснить другой схемой. Так как в эксперименте использовали одиннадцатикратный молярный избыток 5'-фрагмента, то логично предположить, что все молекулы 3'-фрагмента вовлечены в образование РНК-дуплекса с 5'-фрагментом. При этом межмолекулярный РНК-дуплекс определяет выбор только *донорного* сайта на 3'-фрагменте (останавливает синтез растущей цепи РНК). Тогда как возобновление синтеза РНК осуществляется на акцепторном сайте свободной молекулы 5'-фрагмента, не вовлеченной в образование РНК-дуплекса с 3'-фрагментом.

Процессивный и непроцессивный механизмы смены матрицы предполагают образование, как минимум, 4-5 нуклеотидного РНК-дуплекса между 3'-концевым участком растущей цепи и акцептоным сайтом (см. обзоры Jarvis and Kirkegaard 1991; Nagy and Simon, 1997). Однако только два рекомбинанта удовлетворяют данному требованию (рекомбинанты 31, 32). Таким образом, для большинства из рассматриваемых рекомбинантов не удается предложить приемлемый механизм выбора акцепторного сайта в рамках репликативной модели РНК-рекомбинации.

(IV) Изменение эффективности рекомбинации и характера распределения мест перекреста рекомбинантов в экспериментах с 5'-фрагментами, содержащими модифицированный 3'-концевой нуклеотид.

Эксперименты с использованием модифицированных 5'-фрагментов (окисление, обработка анилином и фосфорилирование) показали, что наличие 3'-концевого моноfosфата определяло как увеличение эффективности рекомбинации (в несколько раз) (табл. 3), так и появление класса рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента (табл. 4). Данные эффекты достаточно трудно (практически невозможно) объяснить в рамках репликативной модели РНК-рекомбинации.

Итак, отсутствие вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы в среде до рекомбинации, преимущественное образование негомологичных рекомбинантов, а также изменение распределения мест перекреста у рекомбинантов, при использовании модифицированного 5'-фрагмента, позволяют говорить о том, что, по крайней мере, большинство полученных рекомбинантов образовалось по нерепликативному механизму.

5.2 Механизм нерепликативной рекомбинации между фрагментами РНК

Образование рекомбинантной молекулы РНК в рамках нерепликативной модели принципиально возможно по нескольким схемам. По одной из них рекомбинация может осуществляться за счет прямой атаки 3'-концевым гидроксилом одной молекулы РНК на фосфодиэфирную связь другой РНК (см. обзор Cheh and Bass, 1986). Согласно данным Chetverin et al. (1997) и Chetverina et al. (1999), рекомбинация между 5'- и 3'-фрагментами сателлитной RQ РНК фага Q β , в присутствии РНК-полимеразы данного фага может идти по данному механизму (реакция нуклеофильного замещения), при этом, в состав большей части рекомбинантных RQ РНК входит полная последовательность 5'-фрагмента.

В рамках другой схемы, образование рекомбинанта может осуществляться с помощью двух последовательных реакций. На первом этапе происходит разрыв межнуклеотидной связи у каждой из родительских РНК. Образование рекомбинанта идет за счет перекрестного лигирования образующихся концевых нуклеотидов. Данной схеме соответствуют два механизма, которые различаются структурой концевых нуклеотидов, участвующих в образовании фосфодиэфирной связи. Согласно одному механизму, межнуклеотидные связи родительских РНК разрываются с образованием 3'-концевого гидроксила и 5'-концевого фосфата. Данные концевые нуклеотиды могут быть использованы для перекрестного лигирования РНК-лигазами, например, РНК-лигазой фага T4 (см. обзор Adams et al., 1986). Второй механизм предполагает разрыв межнуклеотидных связей родительских РНК с образованием 2',3'-циклофосфата и 5'-гидроксила. Молекулы РНК с данной структурой концевых нуклеотидов также могут быть лигированы РНК-лигазной активностью клетки (см. обзор Filipowicz and Groos, 1984).

5.2.1 Образование рекомбинантов, содержащих полную последовательность

5'-фрагмента

Эффективное образование рекомбинантов (40-45%), содержащих полную последовательность 5'-фрагмента, наблюдали при окислении с последующей обработкой анилином или фосфорилировании (лигирование pCp) 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента (табл. 4; рис. 17). Большинство таких рекомбинантов в месте перекреста между последним нуклеотидом 5'-фрагмента и первым нуклеотидом 3'-фрагмента содержали чужеродные вставки различной длины. В том случае, когда 3'-концевой нуклеотид 5'-фрагмента был предварительно фосфорилирован в результате лигирования с 3',5'-цитидилдифосфатом,

нуклеотид чужеродной вставки, расположенный перед первым нуклеотидом 3'-фрагмента, всегда был представлен цитидиловым остатком (рис. 17). Следовательно, чужеродные вставки входили в состав 5'-фрагмента до модификации его 3'-концевого нуклеотида. Наиболее вероятно, что чужеродные вставки образовывались *in vitro* в процессе транскрипции полимеразой фага T7. Известно, что данный фермент в процессе транскрипции *in vitro*, при отсутствии сигналов терминации на ДНК-матрице способен удлинять 3'-концевой участок синтезированного транскрипта. При этом довесок, как правило, формирует относительно стабильную 3'-концевую шпильку (Triana-Alonso et al., 1995). Действительно, в большинстве случаев у рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента, чужеродные вставки способны образовать шпилечные структуры на 3'-концевом участке 5'-фрагмента (рис. 26).

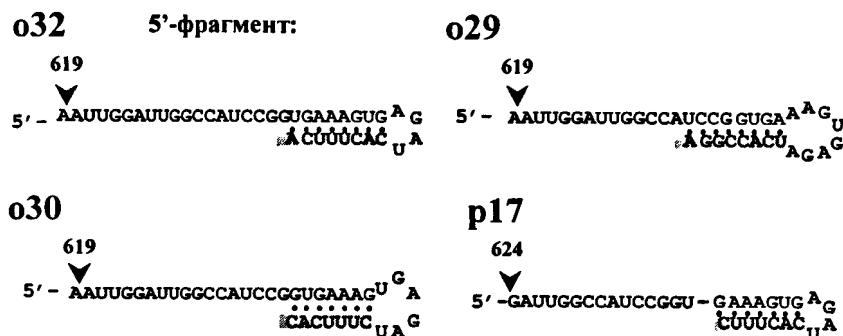


Рис. 26. Предполагаемая структура 3'-концевого участка РНК 5'-фрагмента (BN-конструкция). Чужеродная (невирусная) последовательность (затенена) предположительно образуется за счет вторичного удлинения молекулы РНК 5'-фрагмента T7 РНК-полимеразой при транскрипции *in vitro*.

Итак, фосфорилирование 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента в результате лигирования с 3',5'-цитидилдифосфатом, приводило к образованию рекомбинантов (45%), содержащих полную последовательность 5'-фрагмента.

При этом последний нуклеотид 5'-фрагмента в составе рекомбинанта всегда был представлен цитидиловым остатком (рис. 17).

Таким образом, появление нового класса рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента определяется наличием 3'-концевого монофосфата.

Необходимо отметить, что образование небольшого количества 2,3% - 7,3% рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента, было отмечено при использовании нативного и мутантного 5'-фрагментов (BG-конструкция), 3'-концевой нуклеотид которых не подвергали какой-либо предварительной модификации (рекомбинанты 196, 206 и 556, 558, 561, 562, 563, 698, 602; см. рис. 19, 23). Поскольку молекула РНК 5'-фрагмента может содержать на 3'-конце чужеродную последовательность, то в состав вышеуказанных рекомбинантов может входить как целый 5'-фрагмент, так и 5'-фрагмент после разрыва одной или нескольких межнуклеотидных связей 3'-концевого участка. Следовательно, в данном случае, невозможно сказать, какая структура 3'-концевого нуклеотида 5'-фрагмента определяет образование данных рекомбиантов.

Таким образом, эффективное образование рекомбинантов, содержащих полную последовательность 5'-фрагмента, определяется наличием 3'-концевого монофосфата 5'-фрагмента. При этом присутствие 3'-концевого монофосфата также увеличивало в несколько раз выход рекомбинантов (см. табл. 3).

Достаточно трудно объяснить, как 3'-концевой монофосфат 5'-фрагмента повышает эффективность лигирования между фрагментами РНК полiovируса. Однако существует клеточный фермент - циклаза 3'-концевого фосфата, которая АТФ-зависимо переводит 3'-концевой монофосфат в 2',3'-циклофосфат

(см. обзор литературы). Согласно литературным данным, циклаза 3'-концевого фосфата может использовать в качестве субстрата различные высокомолекулярные РНК и синтетические олигонуклеотиды (Filipowicz et al., 1983, 1985, 1998; Reinberg et al., 1985; Vincente and Filipowicz, 1988; Genschik et al., 1997). При этом даже небольшого количества циклазы концевого 3'-монофосфата в цитоплазме (около 2% от общего количества на клетку) достаточно для эффективной циклизации концевого 3'-фосфата у различных РНК в экстракте клеток HeLa (Filipowicz et al., 1983; Genschik et al., 1997). Таким образом, можно предположить, что циклизация концевого 3'-монофосфата возможна и у 5'-фрагмента геномной РНК полиовируса.

Как известно, клетки животных содержат лигазную активность, которая эффективно лигируют молекулы РНК, содержащие концевые 5'-гидроксил и 2',3'-циклофосфат (Perkins et al., 1985; Reid and Lazinski, 2000). Согласно данным Filipowicz et al. (1983), экстракт клеток HeLa, содержащий как циклазу концевого 3'-фосфата, так и РНК-лигазу, способен лигировать синтетические олигонуклеотиды, содержащие 3'-концевой монофосфат и 5'-концевой гидроксил. Образование 5'-концевого гидроксила у 3'-фрагмента возможно при разрыве межнуклеотидной связи различными неспецифическими эндонуклеазами (РНКазами) (Шапот, 1968) или с помощью неспецифической деградации (Usher and McHale, 1976; Soukup and Breaker, 1999; Li and Breaker, 1999). Таким образом, нерепликативная рекомбинация между фрагментами геномной РНК полиовируса в наших экспериментах предположительно может протекать по двухстадийной схеме (рис. 27).

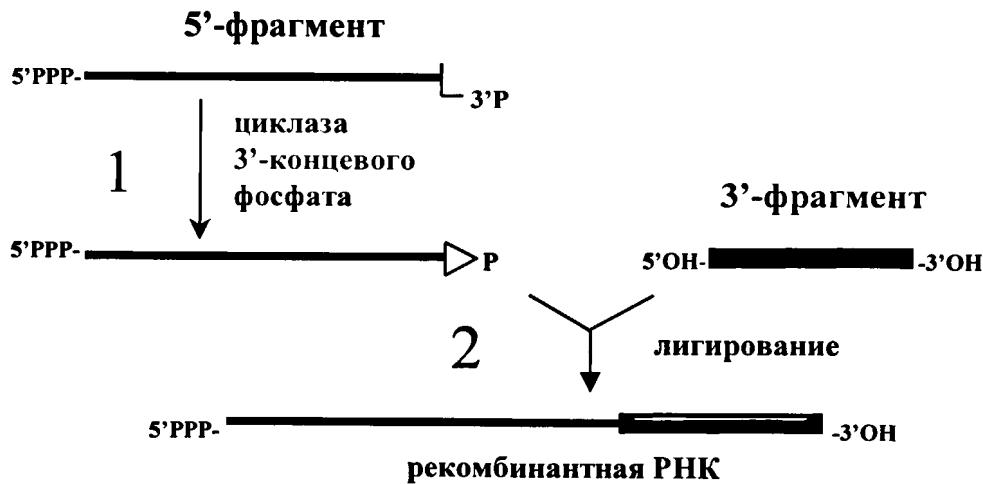


Рис. 27. Гипотетическая модель нерепликативной рекомбинации между 3'- и 5'-фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита. (1) 3'-концевой монофосфат 5'-фрагмента (тонкая линия) переводится в циклическую форму (2',3'-циклофосфат) при помощи циклазы концевого 3'-фосфата. (2) Образование 3',5'-фосфодиэфирной связи между 5'-фрагментом и 3'-фрагментом (толстая линия) идет за счет реакции трансэтерификации, где 5'-концевой гидроксил 3'-фрагмента является нуклеофилом.

В рамках нерепликативной модели родительские молекулы РНК должны расположить нуклеотиды, принимающие участие в рекомбинации, в непосредственной близости друг относительно друга.

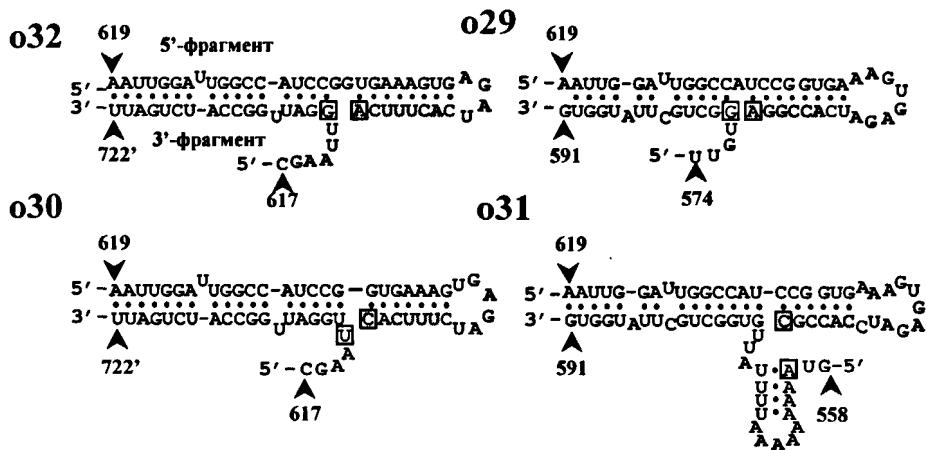


Рис. 28. Предполагаемые вторичные взаимодействия между 3'-концевым участком 5'-фрагмента (BN-конструкция; верхняя последовательность) и определенными участками 3'-фрагмента (ΔL -конструкция; нижняя последовательность). Чужеродная (невирусная) последовательность затенена. Последний нуклеотид 5'-фрагмента и первый нуклеотид 3'-фрагмента в составе рекомбинанта (непосредственно участвуют в рекомбинации) выделены квадратной рамкой.

Концевые нуклеотиды 3'- и 5'-фрагментов могут быть сближены за счет образования межмолекулярного гетеродуплекса, предположительные структуры которого представлены на рис. 28.

5.2.2 Участие криптических рибозимов типа hammerhead в нерепликативной рекомбинации между фрагментами РНК вируса полиомиелита

Места перекреста рекомбинантов на внутренних участках 5'- и 3'-фрагментов располагаются неравномерно, формируя при этом точки кластеризации (горячие точки). При анализе распределения мест перекреста рекомбинантов на 5'-фрагменте (BG-конструкция), привлекла внимание «горячая область», которая расположена на некотором расстоянии к 3'-концу от мотива $_{638}\text{UGAAA}_{642}$ (рекомбинанты 31-37; рис. 16). Было предположено, что образование данной горячей области возможно за счет более частого разрыва межнуклеотидной связи в сайтах **a**, **b** и **c** соответствующими криптическими рибозимами типа hammerhead (A, B и C, соответственно; рис. 18).

Для проверки этого предположения сравнивали частоту рекомбинации по сайтам **a**, **b** и **c** у исходного 5'-фрагмента и 5'-фрагмента, содержащего замену в положении 320 ($\text{A}_{320} \Rightarrow \text{U}$) (рис. 18b).

Чтобы создать условия для образования и работы предполагаемых криптических рибозимов типа hammerhead *in vitro*, РНК исходного и мутантного 5'-фрагментов параллельно преинкубировали (от 5 до 120 минут при 37°C) в буфере A, содержащем катионы магния, и в буфере B, который не содержит катионов двухвалентных металлов. Однако присутствие катионов

магния существенно не влияло на частоту и характер распределения мест перекреста рекомбинантов как у исходного, так и мутантного 5'-фрагментов.

Полученные данные можно объяснить двояко. С одной стороны, возможно, что данные условия не являются оптимальными для эффективного образования криптических рибозимов *in vitro*. С другой стороны, возможно, что участие криптического рибозима в нерепликативной рекомбинации требует присутствия внутриклеточного фактора (или факторов). Например, определенные белки, принимая участие в инициации трансляции, могут осуществлять плавление вторичных структур домена С, в состав которых входит участок 300-320. Таким образом, данные факторы могли бы существенно увеличивать вероятность образования рибозимов.

Данные экспериментов с использованием нативного и мутантного 5'-фрагментов представлены на рис. 19, 20 и 23, 24, а также табл. 8 и 9. При их статистической обработке (использовали критерий χ^2) данных, подтверждающих возможность участия криптических рибозимов В и С в рекомбинации, нами не получено. С другой стороны достоверное различие в частоте рекомбинации по сайту **а** у исходного и мутантного 5'-фрагментов, при использовании различных конструкций 3'-фрагмента говорит о том, что предположение об участии криптического рибозима А в РНК-рекомбинации в наших экспериментах представляется обоснованным.

Однако необходимо отметить, что в экспериментах с использованием конструкции $\Delta L(4)$ и у мутантного 5'-фрагмента обнаруживается существенное количество рекомбинантов с местом перекреста в сайте **а** (14,2%). Кроме того,

нужно обратить внимание на то, что в исходных экспериментах (рис. 16) горячей точки в сайте **а** обнаружено не было.

Данные факты позволяют предполагать, что разрыв межнуклеотидной связи **а** криптическим рибозимом типа hammerhead может являться лишь одним из факторов, определяющих существование данной горячей точки.

Таким образом, полученные данные указывают на возможное участие криптической рибозимной активности полiovирусной РНК в нерепликативной рекомбинации. Однако возникает вопрос о том, какой количественный вклад она вносит в рекомбинацию. Для ответа на этот вопрос требуются дополнительные исследования.

6. Выводы

1. Показана возможность образования инфекционной РНК путем нерепликативной рекомбинации между взаимодополняющими 5'- и 3'- фрагментами геномной РНК вируса полиомиелита, которые не способны самостоятельно транслироваться и реплицироваться.

2. Выявлено два класса рекомбинантов: (1) рекомбинанты, содержащие в своем составе полную последовательность 5'-фрагмента; (2) рекомбинанты, места перекреста у которых располагаются на внутренних участках обоих фрагментов.

3. Для эффективного образования рекомбинантов первого класса требуется наличие 3'-концевого монофосфата у 5'-фрагмента. Предложена гипотетическая модель образования таких рекомбинантов.

4. Места перекреста рекомбинантов второго класса на 3'- и 5'- фрагментах располагаются неравномерно, формируя “горячие точки”. Получены указания на возможное участие криптической рибозимной активности полiovирусной РНК в образовании одной из этих «горячих точек». Однако вопрос о том, какой количественный вклад в рекомбинацию вносит криптический рибозим, требует дополнительных исследований.

7. Список литературы

1. Збарский, И. Б., Дебов, С. С. (1968). Химия и биология нуклеиновых кислот. Л: «Медицина». Стр.: 179-213.
2. Кочетков, Н. К. (1986). Общая органическая химия. М: «Химия». 10: 140-141.
3. Четверин, А. Б. (1999). Новый взгляд на рекомбинацию РНК. Мол. Биол. 33: 985-996.
4. Шапот, В. С. (1968). Нуклеазы. М: «Медицина».
5. Aaziz, R., Tepfer, M. (1999). Recombination in RNA virus and in virus-resistant transgenic plants. J. Gen. Virol. 80: 1339-1346.
6. Adams, R. L. P., Knowler, T. J., Leader, P. D. (1986). The biochemistry of the nucleic acids, 10th ed., Chapman and Hall, London, England.
7. Agol, V. I. (1991). The 5'-untranslated region of picornaviral genomes. Adv. Virus Res. 40: 103-180.
8. Agol, V. I. (1997). Recombination and other genomic rearrangements in picornaviruses. Sem. Vir. 8: 77-84.
9. Agol, V. I., Paul, V. A., Wimmer, E. (1999). Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. Virus Res. 62: 129-147.
10. Agut, H., Kean, K. M., Bellocq, C., Fichot, O., Girard M. (1987). Intratypic recombination of poliovirus: evidence for multiple crossing-over sites on the viral genome. J. Virol. 61: 1722-1725.
11. Allison, R., Thompson, C., Ahlquist, P. (1990). Regeneration of a functional RNA virus genome by recombination between deletion mutants and requirement for cowpea chlorotic mottle virus 3a and coat genes for systemic infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87: 1820-1824.

- 12.Andino, R., Rieckhof, G. E., Trono, D., Baltimore, D. (1990). Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.* 64: 607-612.
- 13.Andino, R., Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L., Baltimore, D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.* 12: 3587-3598.
- 14.Arnold, J. J., Cameron, C., E. (1999). Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) is sufficient for template switching in vitro. *J. Biol. Chem.* 274: 2706-2716.
- 15.Baric, R. S., Shieh, C. K., Stohlman, S. A., and Lai, M. M. S. (1987). Analysis of intracellular small RNA's of mouse hepatitis virus: Evidence for discontinuous transcription. *Virology*. 156: 342-354.
- 16.Baric, R. S., Fu, K., Schaad, M. C., Stohlman, S. A. (1990). Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology*. 177: 646-656.
- 17.Barton, J. D., O'Donnell, J. B., Flanagan, B. J. (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J.* 20: 1439-1448.
- 18.Baumstark, T., Schroder, A. R., Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* 16: 599-610.
- 19.Becher, P., Orlich, M., Konig, M., Thiel, H. J. (1999). Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNA's isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J Virol.* 73: 5646-5653.

20. Beck, D. L., Dawson, W. O. (1990). Deletion of repeated sequences from tobacco mosaic virus mutants with two coat protein genes. *Virology*. 177: 462-469.
21. Biebricher, C. K., Luce, R. (1992). In vitro recombination and terminal elongation of RNA by Q beta replicase. *EMBO J.* 11: 5129-5135.
22. Birikh, K. R., Heaton, P. A., Eckstein, F. (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.* 245: 1-16.
23. Branch, A. D., Levine, B. J., Robertson, H. D. (1990). The brotherhood of circular RNA pathogens: viroids, circular satellites, and the delta agent. *Seminars in Virol.* 1: 143-152.
24. Branch, A., Robertson, H. D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C. L., Abelson, J. (1982). Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from Wheat Germ. *Science*. 217: 1147-1149.
25. Brown, R. S., Dewan, J. C., Klug, A. (1985). Crystallographic and biochemical investigation of the lead(II)-catalyzed hydrolysis of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry*. 24: 4785-801.
26. Bruyere, A., Wantroba, M., Flasinski, S., Dzianott, A., Bujarski, J. J. (2000). Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *J Virol.* 74: 4214-4219.
27. Bruening, G. (1990). Replication of satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Sem. Virol.* 1: 127-134.
28. Bujarski, J. J., Dzianott, A. M. (1991). Generation and analysis of nonhomologous RNA-RNA recombinants in brome mosaic virus: sequence complementarities at crossover sites. *J. Virol.* 65: 4153-4159.
29. Bujarski, J. J., Kaesberg, P. (1986). Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature*. 321: 528-531.

- 30.Bujarski, J. J., and Negy, P. D. (1996). Different mechanisms of homologous and nonhomologous recombination in brome mosaic virus: role of RNA sequences and replicase proteins. *Sem. Virol.* 7: 363-372.
- 31.Buzayan, J. M., Feldstein, P. A., Segrelles, C., Bruening, G. (1988). Autolytic processing of a phosphorothioate diester bond. *Nucleic. Acids. Res.* 16: 4009-4023.
- 32.Buzayan, J. M., Hampel, A., Bruening, G. (1986). Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA. *Nucleic. Acids. Res.* 14: 9729-9743.
- 33.Buzayan, J. M., van Tol, H., Zalloua, P. A., Bruening, G. (1995). Increase of satellite tobacco ringspot virus RNA initiated by inoculating circular RNA. *Virology.* 208: 832-837.
- 34.Catalano, C. E., Allen, D. J., Benkovic, S. J. (1990). Interaction of Escherichia coli DNA polymerase I with azidoDNA and fluorescent DNA probes: identification of protein-DNA contacts. *Biochemistry.* 29: 3612-3621.
- 35.Cascone, P. J., Carpenter, C. D., Li, X. H., and Simon, A. E. (1990). Recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. *EMBO J.* 9: 1709-1715.
- 36.Cascone, P. J., Haydar, T. F., and Simon, A. E. (1993). Sequence and structure required for recombination between virus-associated RNAs. *Science.* 260: 801-805.
- 37.Carpenter, C. D., Oh, J. W., Zhang, C., and Simmon, A. E. (1995). Involvement of a stem-loop structure in the location of junction site in viral RNA recombination. *J. Mol. Biol.* 245: 608-622.

- 38.Cech, T. R. (1990). Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568.
- 39.Cech, T. R., Bass, B. L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 599-629.
- 40.Chay, C. A., Guan, X., Bruening, G. (1997). Formation of circular satellite tobacco ringspot virus RNA in protoplasts transiently expressing the linear RNA. *Virology.* 239: 413-425.
- 41.Chetverina, H. V., and Chetverin, A. B. (1993). Cloning of RNA molecules in vitro. *Nucleic Acids Res.* 21: 2349-2353.
- 42.Chetverin, A. B., Chetverina, H. V., Demidenco, A. A., and Ugarov, V. I. (1997). Nonhomologous RNA recombination in cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell.* 88: 503-513.
- 43.Chetverin, A. B., Chetverina, H. V., and Munishkin, A. V. (1991). On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q β replicase. *J. Mol. Biol.* 222: 3-9.
- 44.Chetverina, H. V., Demidenko, A. A., Ugarov, V. I., Chetverin, A. B. (1999). Spontaneous rearrangements in RNA sequences. *FEBS Lett.* 450: 89-94.
- 45.Chetverin, A. B., and Spirin, A. S. (1995). Replicable RNA vectors: prospects for cell-free gene amplification, expression and cloning. In *Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology*, W. E. Cohn and K. Moldave, eds. (San Diego, California: Academic Press), 51: 225-270.
- 46.Ciesiolka, J., Lorenz, S., Erdmann, V. A. (1992). Structural analysis of three prokaryotic 5S rRNA species and selected 5S rRNA--ribosomal-protein complexes by means of Pb(II)-induced hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* 204: 575-581.
- 47.Collett, M. S., Moennig, V., Horzinek, M. C. (1989). Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70: 253-266.

- 48.Cooper, P. D. (1968). A genetic map of poliovirus temperature-sensitiv mutans. *Virology*. 35: 584-596.
- 49.Cooper, P. D. (1974). On the nature of poliovirus genetic recombination. *J. Gen. Virol.* 23: 41-49.
- 50.Crotty, S., Cameron, C., E., Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 6895-6900.
- 51.Dahm, S. C., Uhlenbeck, O. C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry*. 30: 9464-9469.
- 52.Domingo, E., Escarmis, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S. F., Quer, J., Novella, I., S., Holland, J. J. (1996). Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* 10: 859-864.
- 53.Domingo, E., Holland, J. J. (1997). RNA virus mutation and witness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 151-178.
- 54.Duggal, R., Cuconati, A., Gromeier, M., Wimmer, E. (1997). Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 13786-13791.
- 55.Edwards, M. C., Petty, I. T., Jackson, A. O. (1992). RNA recombination in the genome of barley stripe mosaic virus. *Virology*. 189: 389-392.
- 56.Fernandez-Cuartero, B., Burgyan, J., Aranda, M. A., Salanki, K., Moriones, E., Garcia-Arenal, F. (1994). Increase in the relative fitness of a plant virus RNA associated with its recombinant nature. *Virology*. 203: 373-377.
- 57.Ferre-D'Amare, A. R., Zhou, K., Doudna, J. A. (1998). Crystal structure of a hepatitis deltavirus ribizyme. *Nature*. 395: 567-574.

- 58.Figlerowicz, M. (2000). Role of RNA structure in non-homologous recombination between genomic molecules of brome mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 28: 1714-1723.
- 59.Figlerowicz, M., Nagy, P. D., Bujarski, J. J. (1997). A mutation in the putative RNA polymerase gene inhibits nonhomologous, but not homologous, genetic recombination in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 2073-2078.
- 60.Figlerowicz, M., Nagy, P. D., Tang, N., Kao, C. C., Bujarski, J. J. (1998). Mutations in the N terminus of the brome mosaic virus polymerase affect genetic RNA-RNA recombination. *J. Virol.* 72: 9192-9200.
- 61.Filipowicz, W., Billy, E., Drabikowski, K., Genschik, P. (1998). Cyclases of the 3'-terminal phosphate in RNA: a new family of RNA processing enzymes conserved in eucarya, bacteria and archaea. *Acta Biochim. Pol.* 45: 895-906.
- 62.Filipowicz, W., Gross, H. J. (1984). RNA ligation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 2: 68-71.
- 63.Filipowicz, W., Konarska, M., Gross, H. J., Shatkin, A. J. (1983). RNA 3'-terminal phosphate cyclase activity and RNA ligation in HeLa cell extract. *Nucleic Acids Res.* 11: 1405-1418.
- 64.Filipowicz, W., Shatkin, A. J. (1983). Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cell extract. *Cell.* 32: 547-557.
- 65.Filipowicz, W., Strugala, K., Konarska, M., Shatkin, A. J. (1985). Cyclization of RNA 3'-terminal phosphate by cyclase from HeLa cells proceeds via formation of N(3')pp(5')A activated intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 1316-1320.
- 66.Frohman, M. F., Martin, G. R. (1990). PCR protocols. Ed Innis M. A. N. Y.:Academic press, 228-236.

- 67.Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L. S., Sanderson, M. R., Steitz, T. A. (1988). Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 85: 8924-8928.
- 68.Furneaux, H., Pick, L., Hurwitz, J. (1983). Isolation and characterization of RNA ligase from wheat germ. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 80: 3933-3937.
- 69.Gamarnik, V. A., Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in positive-stranded RNA virus. Genes Dev. 12: 2293-2304.
- 70.Gegenheimer, P., Gabius, H. J., Peebles, C. L., Abelson, J. (1983). An RNA ligase from wheat germ which participates in transfer RNA splicing in vitro. J. Biol. Chem. 258: 8365-8373.
- 71.Genschik, P., Billy, E., Swianiewicz, M., Filipowicz, W. (1997). The human RNA 3'-terminal phosphate cyclase is a member of a new family of proteins conserved in Eucarya, Bacteria and Archaea. EMBO J. 16: 2955-2967.
- 72.Gmyl, A. P., Pilipenco, E. V., Maslova, S. V., Belov, G. A., and Agol, V. I. (1993). Functional and genetic plasticities of the poliovirus genome: quasi-infectious RNAs modified in the 5'-untranslated region yield a variety of pseudorevertants. J. Virol. 67: 6309-6316.
- 73.Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Richardson, A., Meredith, J., Almond, J. W., Barclay, W., Evans D. J. (2000). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. J. Virol. 74: 4590-4600.
- 74.Goulden, M.G., Lomonossoff, G. P., Wood, K. R., Davies, J. W. (1991). A model for the generation of tobacco rattle virus (TRV) anomalous isolates: pea early browning virus RNA-2 acquires TRV sequences from both RNA-1 and RNA-2. J. Gen. Virol. 72: 1751-1754.

- 75.Hajjou, M., Hill, K. R., Subramaniam, S. V., Hu, J. Y., Raju, R. (1996). Nonhomologous RNA-RNA recombination events at the 3' nontranslated region of the Sindbis virus genome: hot spots and utilization of nonviral sequences. *J. Virol.* 70: 5153-5164.
- 76.Herold, J., Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell.* 7: 581-591.
- 77.Jacquier, A. (1996). Group II introns: elaborate ribozymes. *Biochimie.* 78: 474-487.
- 78.Jarvis, G. T., and Kirkegaard, K. (1991). The polymerase in its labyrinth: mechanism and implication of RNA Recombination. *Trends. Genet.* 7: 186-191.
- 79.Jarvis, G. T., and Kirkegaard, K. (1992). Poliovirus RNA recombination mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.* 11: 3135-3145.
- 80.Jeffries, A. C., Symons, R. H. (1989). A catalytic 13-mer ribozyme. *Nucleic Acids Res.* 17: 1371-1377.
- 81.Kaufmann, G., Littauer, U. Z. (1974). Covalent joining of phenylalanine transfer ribonucleic acid half-molecules by T4 RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71: 3741-3745.
- 82.Khatchikian, D., Orlich, M., Rott, R. (1989). Increased viral pathogenicity after insertion a 28S RNA sequence into the hemmagglutinin gene of an influenza virus. *Nature.* 340: 156-157.
- 83.Keck, J. G., Soe, L. H., Makino, S., Stohlman, S. A., Lai, M. M. C. (1988). RNA recombination of murine coronaviruses: recombination between fusion-positive mouse hepatitis virus A59 and fusion-negative mouse hepatitis virus 2. *J. Virol.* 62: 1989-1998.

- 84.Keck, J. G., Stohlman, S. A., Soe, L. H., Makino, S., Lai, M. M. C. (1987).
Multiple recombination site at the 5'-end of murine coronavirus RNA. *Virology*.
156: 331-341.
- 85.Kiberstis, P. A., Haseloff, J., Zimmern, D. (1985). 2' phosphomonoester, 3'-5'
phosphodiester bond at a unique site in a circular viral RNA. *EMBO J.* 4: 817-827.
- 86.Kikuchi, Y., Tyc, K., Filipowicz, W., Sanger, H. L., Gross, H. J. (1982).
Circularization of linear viroid RNA via 2'-phosphomonoester, 3', 5'-
phosphodiester bonds by a novel type of RNA ligase from wheat germ and
Chlamydomonas. *Nucleic Acids Res.* 10: 7521-7529.
- 87.Kim, M. J., Kao, C. (2001). Factors regulating template switch in vitro by viral
RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98: 4972-4977.
- 88.King, A. M. Q. (1988a). Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: an
analysis of 40 intertypic cross-over sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 11705-
11723.
- 89.King, A. M. Q., (1988b). Recombination in positive strand RNA virus, p. 149-165.
In E. Domingo, J. J. Holand, and P. Ahlquist (ed.), *RNA genetics*. CRC Press, Inc.,
Boca Raton.
- 90.King, A. M. Q., McCahon, D., Slade, W. R., and New-man, J. V. I. (1982).
Recombination in RNA. *Cell*. 29: 921-928.
- 91.Kirkergaard, K., Baltimore, D (1986). The mechanism of RNA recombination in
Poliovirus. *Cell*. 47: 433-443.
- 92.Kitamura, N., Semler, B., Rothberg, P., Larsen, G., Adler, C., Dorner, A., Emini,
E., Hanecak, R., Lee, J., S. van der Werf, Anderson, C. and Wimmer, E. (1981).

- Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 291: 547-553.
93. Koetzner, C. A., Parker, M. M., Ricard, C. S., Sturman, L. S., Masters, P. S. (1992). Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J. Virol.* 66: 1841-1848.
94. Koizumi, M., Iwai, S., Ohtsuka, E. (1988a). Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes. *FEBS Lett.* 239: 285-288.
95. Koizumi, M., Iwai, S., Ohtsuka, E. (1988b). Construction of a series of several self-cleaving RNA duplexes using synthetic 21-mers. *FEBS Lett.* 228: 228-230.
96. Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H., Gross, H. J. (1981). Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ. *Nature*. 293: 112-116.
97. Konarska, M., Filipowicz, W., Gross H. J. (1982). RNA ligation via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage: requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 79: 1474-1478.
98. Kuge, S., Kawamyra, N., and Nomoto, A. (1989). Genetic variation occurring on the genome of an in vivo insertion mutant of poliovirus type 1. *J. Virol.* 63: 1069-1075.
99. Kuge, S., Nomoto, A. (1987). Construction of viable deletion and insertion mutants of the Sabin strain of type 1 poliovirus: Function of the 5' noncoding sequence in viral replication. *J. Virol.* 61: 1478-1487.

- 100.Kuge, S., Saito, I., and Nomoto, A. (1986). The Primary structure of poliovirus defective-interfering particle genomes and possible generation mechanism of the particle. *J. Mol. Biol.* 192: 473-487.
- 101.Kuimelis, R. G., McLaughlin, L. W. (1998). Mechanisms of ribozyme mediated RNA cleavage. *Chem. Rev.* 98: 1027-1044.
- 102.Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 488-492.
- 103.Kuo, T., Herrin, L. D. (2000). Quantitative studies of Mn²⁺ - promoted specific and non-specific cleavages of a large RNA: Mn²⁺ - GAAA ribozymes and the evolution of the small ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 28: 4197-4206.
- 104.Lai, M. M. C. (1990). Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 303-333.
- 105.Lai, M. M. C. (1992). RNA recombination in animal and plant viruses *Microbiol. Rev.* 56: 71-89.
- 106.Lai, M. M. C., Baric, R. S., Makino, S., Keck, J. G., Egbert, J., Leibowitz, J. L., Stohman, S. A. (1985). Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J. Virol.* 56: 449-456.
- 107.Lake, J. R., Priston, R, A, J., Slade, W. R. (1975). A genetic recombination map of food-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 27: 355-367.
- 108.Laski, F.A., Fire, A. Z., RajBhandary, U.L., Sharp, P. A. (1983). Characterization of tRNA precursor splicing in mammalian extracts. *J. Biol. Chem.* 258: 11974-11980.
- 109.Ledinko, N. (1963). Genetic recombination with poliovirus type 1: studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidin-resistant mutant of the same strain. *Virology.* 20: 107-119.

- 110.Li, Y., Ball, L. A. (1993). Nongomologous RNA recombination during negative-strand synthesis of flick house virus RNA. *Cell.* 26: 145-154.
- 111.Li, Y., Breaker, R. R. (1999). Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 5364-5372.
- 112.Lyons, T., Murray, E. K., Roberts, W. A., Barton, J. D. (2001). Poliovirus 5'-terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 75: 10696-10708.
- 113.Mackenzie, J. S., Slade, W. R. (1975). Evidence for recombination between two different immunological types of foot-and-mouth disease virus. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 53: 251-256.
- 114.Makino, S., J. Fleming, O., Keck, J. G., Stohman, S. A., Lai, M. M. C. (1987). RNA recombination of coronavirus: localization of neutralizing epitopes and neuropathogenic determinants on the carboxterminus of peplomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6567-6571.
- 115.Makino, S., Keck, J. G., Stohman, S. A., and Lai, M. M. C. (1986). High-frequency RNA recombination of murin coronaviruses. *J. Virol.* 57: 729-737.
- 116.Makino, S., Soe, L. H., Shieh, C. K., Lai, M. M. C. (1988). Discontinuous transcription generates heterogeneity at the leader fusion sites of coronavirus mRNAs. *J. Virol.* 62: 3870-3873.
- 117.Masuta, C., Kuwata, S., Matzuzaki, T., Takanami, Y., Koiwai, A. (1992). A plant virus satellite RNA exhibits a significant sequence complementarity to a chloroplast tRNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 2885.

118. Mayo, M. A., Jolly, C. A. (1991). The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA: evidence of recombination between virus and host RNA. *J. Gen. Virol.* 72: 2591-2595.
119. McCahon, D., King, A. M. Q., Roe, D. S., Slade, W. R., Newman, J. W. I., Cleary, A. M. (1985). Isolation and biochemical characterization of intertypic recombinants of food-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 3: 87-100.
120. McCahon, D., Slade, W. R., Prinston, R. A. J., Lake, J. R. (1977). An extended genetic recombination map of food-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 35: 355-65.
121. McSwiggen, J. A., Cech, T. R. (1998). Stereochemistry of RNA cleavage by the Tetrahymena ribozyme and evidence that the chemical step is not rate-limiting. *Science.* 244: 679-683.
122. Meerovitch, K., Nicholson, R., and Sonenberg, N. (1991). In vitro mutational analysis of cis-acting RNA translational elements in the poliovirus type 2 5'-untranslated region. *J. Virol.* 65: 5895-5901.
123. Meyers, G., Nautz, N., Dubovin, E. J., Thiel, H.-J. (1991). Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin -coding sequences. *Virology.* 180: 602-616.
124. Michel, F., Ferat, J. L. (1995). Structure and activities of group II introns. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 435-461.
125. Molenkamp, R., Greve, S., Spaan, W. J., Snijder, E. J. (2000). Efficient homologous RNA recombination and requirement for an open reading frame during replication of equine arteritis virus defective interfering RNAs. *J. Virol.* 74: 9062-9070.

- 126.Monroe, S. S., Schlesinger, S. (1983). RNAs from two independently isolated defective interfering particles of Sindbis virus contain a cellular tRNA sequence at their 5' ends. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 80: 3279-83.
- 127.Moody, M. D., Burg, J. L., DiFrancesco, R., Lovern, D., Stanick, W., Lin-Goerke, J., Mahdavi, K., Wu, Y., Farrell, M. P. (1994). Evolution of host cell RNA into efficient template RNA by Q beta replicase: the origin of RNA in untemplated reactions. Biochemistry. 33: 13836-13847.
- 128.Munishkin, A. V., Voronin, L. A., and Chetverin, A. B. (1988). An in vivo recombinant RNA capable of autoclasic synthesis by Q β replicase. Nature. 333: 473-475.
- 129.Munishkin, A. V., Voronin, L. A., Ugarov, V. I., Bondareva, L. A., Chetverina, H. V., and Chetverin, A. B. (1991). Efficient templates for Q β replicase are formed by recombination from heterologous sequences. J. Mol. Biol. 221: 463-472.
- 130.Nagy, P. D, Bujarski, J. J. (1992). Genetic recombination in brome mosaic virus: effect of sequence and replication of RNA on accumulation of recombinants. J. Virol. 66: 6824-6828.
- 131.Nagy, P. D., Bujarski J. J. (1993). Targeting the site of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6390-6394.
- 132.Nagy, P. D., and Bujarski J. J. (1995). Efficient system of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: Sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. J. Virol. 69: 131-140.
- 133.Nagy, P. D., and Bujarski, J. J. (1996). Homologous RNA recombination in brome mosaic virus AU-rich sequence decrease the accuracy of crossovers. J. Virol. 70: 415-426.

- 134.Nagy, P. D., and Bujarski, J. J. (1997). Engineering of homologous recombination hotspots with AU sequence in brome mosaic virus. *J. Virol.* 71: 3799-3810.
- 135.Nagy, P. D., Carpenter, C. D., Simon, A. E. (1997). A novel 3'-end repair mechanism in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 1113-1118.
- 136.Nagy, P. D., Dzianott, A., Ahlquist, P. G., and Bujapski J. J. (1995). Mutations in the helicase-like domain of protein 1a alter the sites of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *J. Virol.* 69: 2547-2556.
- 137.Nagy, P. D., Pogany, J., Simon, A. E. (1999). RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers in vitro and in vivo in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* 18: 5653-5665.
- 138.Nagy, P. D., Pogany, J., Simon, A. E. (2001). In vitro and in vivo characterization of an RNA replication enhancer in a satellite RNA associated with Turnip crinkle virus. *Virology.* 288: 315-324.
- 139.Nagy, P. D., and Simon, A. E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology.* 235: 1-9.
- 140.Nagy, P. D., Zhang, C., Simon, A. E. (1998). Dissecting RNA recombination in vitro: role of RNA sequences and the viral replicase. *EMBO J.* 17: 2392-2403.
- 141.Nakano, S. I., Chadalavada, D. M., Bevilacqua, P. C. (2000). General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis deltavirus ribozyme. *Science.* 287: 1493-1497.
- 142.Negrón, M., Ricchetti, M., Nouvel, P., Buc, H. (1995). Homologous recombination promoted by reverse transcriptase during copying of two distinct RNA templates. *Proc. Natl .Acad. Sci. U S A.* 92: 6971-6975.

- 143.Nicholson, R., Pelletier, J., Le, S.-Y., and Sonenberg, N. (1991). Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus type 2: in vivo translational studies. *J. Virol.* 65: 5886-5894.
- 144.Nishikura, K., De Robertis, E. M. (1981). RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes. Sequential addition of base modifications in the spliced transfer RNA. *J. Mol. Biol.* 145: 405-420.
- 145.Ohtsuka, E., Nishikawa, S., Sugiura, M., Ikehara, M. (1976). Joining of ribooligonucleotides with T4 RNA ligase and identification of the oligonucleotide-adenylate intermediate. *Nucleic Acids Res.* 3: 1613-1623.
- 146.Olsthoorn, R.C., van Duin, J. (1996). Random removal of inserts from an RNA genome: selection against single-stranded RNA. *J. Virol.* 70: 729-736.
- 147.Onodera, S., Qiao, X., Gottlieb, P., Strassman, J., Frilander, M., Mindich, L. (1993). RNA structure and heterologous recombination in the double-stranded RNA bacteriophage phi 6. *J. Virol.* 67: 4914-4922.
- 148.Palasingam, K., Shaklee, P. N. (1992). Reversion of Q beta RNA phage mutants by homologous RNA recombination. *J. Virol.* 66: 2435-2442.
- 149.Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H., Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J. Virol.* 74: 10359-10370.
- 150.Peebles, C. L., Mecklenburg, K. L., Peterman, P. S., Tabor, J., Cheng, H. L. (1986). A self-splicing RNA exists on intron lariat. *Cell.* 44: 213-223.
- 151.Pelletier, J., Flynn, M. E., Kaplan, G., Racaniello, V., and Sonenberg, N. (1988b). Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA. *J. Virol.* 62: 4486-4492.

- 152.Pelletier, J., Kaplan, G., Racaniello, V. R., and Sonenbrg, N. (1988a). Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1103-1112.
- 153.Pelletier, J., Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 334: 320-325.
- 154.Percy, N., Belshman, G. J., Belshman, J. K., Sullivan, M., Stone, D. M., and Almond, J. W. (1992). Intracellular modifications induced by poliovirus reduce the requirement for structural motifs in the 5' noncoding region of the genome involved in internal initiation of protein synthesis. *J. Virol.* 66: 1695-1701.
- 155.Perkins, K. K., Furneaux, H., Hurwitz, J. (1985). Isolation and characterization of an RNA ligase from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 684-688.
- 156.Perrotta, A. T., Shih, I., Been, M. D. (1999). Imidazole rescue of a cytozine mutation in a self-cleaving ribozyme. *Science*. 286: 123-126.
- 157.Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., and Wimmer, E. (1991). Translation of poliovirus RNA: role of an essential cis-acting oligopyrimidine element within the 5'-nontranslated region and involvement of a cellular 57-kilodalton protein. *J. Virol.* 65: 6194-6204.
- 158.Pick, L., Furneaux, H., Hurwitz, J. (1986). Purification of wheat germ RNA ligase. II. Mechanism of action of wheat germ RNA ligase. *J. Biol. Chem.* 261: 6694-6704.
- 159.Pick, L., Hurwitz, J. (1986). Purification of wheat germ RNA ligase. I. Characterization of a ligase-associated 5'-hydroxyl polynucleotide kinase activity. *J. Biol. Chem.* 261: 6684-6693.

- 160.Pilipenko, E.V. (1992b). Towards identification of cis-acting elements in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structure. Nucleic Acids Research. 20: 1739-1745.
- 161.Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., and Agol, V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. Nucl. Acids Res. 23: 1870-1875.
- 162.Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Svitkin, Y. V., Sinyakov, A. N., and Agol, V. I.(1992a). Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. Cell. 68: 119-131.
- 163.Pilipenko, E. V., Poperechny, K. V., Maslova, S. V., Melchers, W. J., Slot, H. J., Agol, V. I. (1996). Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. EMBO J. 15: 5428-5436.
- 164.Pogany, J. Romero, J., Huang, Q., Sgro, J.-Y., Shang,H., and Bujarski, J. J. (1995). De novo generation of defective interfering-like RNAs in broad bean mottle virus (BBMV). Virology. 212: 674-586.
- 165.Pringle, C. R. (1965). Evidence of genetic recombination in foot-and-mounth disease virus. Virology. 25: 48-54.
- 166.Pringle, C. R., Slade, W. R. (1968). The origin of hybrid variants derived from subtype strains of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 2: 319-329.
- 167.Pyle, A. M. (1993). Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. Science. 261: 709-714.
- 168.Racaniello, V. G., and Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. Science. 214: 916-919.

- 169.Raffo, A. J., Dawson, W. O. (1991). Construction of tobacco mosaic virus subgenomic replicons that are replicated and spread systemically in tobacco plants. *Virology*. 184: 277-289.
- 170.Rajagopal, J., Doudna, J. A., Szostak, J. W. (1989). Stereochemical course of catalysis by the Tetrahymena ribozyme. *Science*. 244: 692-694.
- 171.Raju, R., Subramaniam, S. V., Hajjou, M. (1995). Genesis of Sindbis virus by in vivo recombination of nonreplicative RNA precursors. *J. Virol.* 69: 7391-7401.
- 172.Rao, A. L., Hall, T. C. (1993). Recombination and polymerase error facilitate restoration of infectivity in brom mosaic virus. *J. Virol.* 67: 969-979.
- 173.Reid, C. E. Lazinski, D. W. (2000). A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 424-429.
- 174.Reinberg, D., Arenas, J., Hurwitz, J. (1985). The enzymatic conversion of 3'-phosphate terminated RNA chains to 2',3'-cyclic phosphate derivatives. *J. Biol. Chem.* 260: 6088-6097.
- 175.Rieder, E., Paul, A. V., Kim, D. W., van Boom, J. H., Wimmer, E. (2000). Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J. Virol.* 74: 10371-10380.
- 176.Rivera, V. M., Welsh, J. D., Maizel, J. V. (1988). Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology*. 165: 42-50.
- 177.Romanova, L. I., Blinov, V. M., Tolskya, E. A., Victorova, E. G., Kolesnikova, M. S., Guseva, E. A., and Agol, V. I. (1986). The Primary structure crossover region poliovirus recombinant: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*. 155: 202-213.

- 178.Romanova, L. I., Tolskaya, E. A., Kolesnikova, M. S., Agol, V. I. (1980). Biochemical evidence for intertypic genetic recombination of polioviruses. FEBS Lett. 118: 109-112.
- 179.Romero, J., Huang, Q., Pogany, J., Bujarski, J. J. (1993). Characterization of defective interfering RNA components that increases symptom severity of broad bean mottle virus infections. Virology. 194: 576-584.
- 180.Roossinck, M. J., Zhang, L., Hellwald, K. H. (1999). Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. J. Virol. 73: 6752-6758.
- 181.Ruffner, D. E., Stormo, G. D., Uhlenbeck, O.C. (1990). Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. Biochemistry. 29: 10695-10702.
- 182.Rupert, P. B., Ferre-D'Amare, A. R. (2001). Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. Nature. 410: 780-786.
- 183.Saldanha, R., Mohr, G., Belfort, M., Lambowitz, A. M. (1993). Group I and group II introns. FASEB J. 7: 15-24.
- 184.Sawicki, S.G., Sawicki, D. L. (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. J. Virol. 64: 1050-1056.
- 185.Schwartz, R. C., Greer, C. L., Gegenheimer, P., Abelson, J. (1983). Enzymatic mechanism of an RNA ligase from wheat germ. J. Biol. Chem. 258: 8374-8383.
- 186.Shapira, R., Choi, G. H., Hillman, B. I., NussD. L. (1991). The contribution of defective RNAs to the complexity of viral-encoded double-stranded RNA population present in hypovirulent strain of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. EMBO J. 10: 741-746.

- 187.Sharmeen, L., Kuo, M. Y., Taylor, J. (1989). Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* 63: 1428-1430.
- 188.Sierra, S., Davila, M., Lowenstein, P., R., Domingo, E. (2000). Responds of foog-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J. Virol.* 74: 8316-8323.
- 189.Simon, A. E., and Bujarski, J. J. (1994). RNA recombination and evolution in virus infected plant. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 337-362.
- 190.Simon, A. E., and Negy, P. D. (1996). RNA recombination in turnip crinkle virus: its role in formation of himeric RNAs, multimers, and in 3'-end repair. *Sem. Vir.* 7: 373-379.
- 191.Slobodskaya, O. R., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Tolskaya, E. A., Victorova, E. G., and Agol, V. I. (1996). Poliovirus neurovirulence correlates with the presence of a cryptic AUG upstream of the initiator codon. *Virology.* 221: 141-150.
- 192.Sninsky, J. J., Last, J. A., Gilham, P. T. (1976). The use of terminal blocking groups for the specific joining of oligonucleotides in RNA ligase reactions containing equimolar concentrations of acceptor and donor molecules. *Nucleic Acids Res.* 3: 3157-3166.
- 193.Soukup, G. A., Breaker, R. R. (1999). Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA. *RNA.* 5: 1308-1325.
- 194.Standring, D. N., Venegas, A., Rutter, W. J. (1981). Yeast tRNA₃ Leu gene transcribed and spliced in a HeLa cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78: 5963-5967.
- 195.Steinschneider, A., Fraenkel-Conra, H. (1966a). Studies of nucleotide sequences in tobacco mosaic virus ribonucleic acid. 3. Periodate oxidation and semicarbazone formation. *Biochemistry.* 5: 2729-2734.

196. Steinschneider, A., Fraenkel-Conrat, H. (1966b). Studies of nucleotide sequences in tobacco mosaic virus ribonucleic acid. IV. Use of aniline in stepwise degradation. *Biochemistry*. 5: 2735-2743.
197. Sugino, A., Snoper, T. J., Cozzarelli, N. R. (1977). Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates. *J. Biol. Chem.* 252: 1732-1738.
198. Symons, R. H. (1989). Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends Biochem. Sci.* 14: 445-450.
199. Symons, R. H. (1990a). The fascination of low molecular weight pathogenic RNAs. *Sem. Virol.* 1: 75-81.
200. Symons, R. H. (1990b). Self-cleavage of RNA in the replication of viroids and virusoids. *Sem. Virol.* 1: 117-126.
201. Symons, R. H. (1992). Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 641-671.
202. Symons, R. H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* 25: 2683-2689.
203. Taylor, J. (1990). Structure and replication of hepatitis delta virus. *Sem. Virol.* 1: 135-141.
204. Tang, R. S., Barton, D. J., Flanegan, J. B., Kirkegaard, K. (1997). Poliovirus RNA recombination in cell-free extracts. *RNA*. 3: 624-633.
205. Tanner, N. K. (1999). Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 257-275.
206. Tolskaya, E. A., Romanova, L. I., Blinov, V. M., Victorova, E. G., Sinyakov, A. N., Kolesnikova, M. S., and Agol, V. I. (1987). Studies on the recombination between RNA genomes poliovirus: the primary structure and nonrandom

- distribution of crossover region in the genomes of poliovirus recombinants.
Virology. 161: 54-61.
- 207.Tolskaya, E. A., Romanova, L. I., Kolesnikova, M. S., and Agol, V. I. (1983).
Intertipic recombination in poliovirus. Genetic and biochemical studies. Virology.
124: 121-132
- 208.Triana-Alonso, F. J., Dabrowski, M., Wadzack, J., Nierhaus, K. H. (1995). Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during in vitro transcription with T7 RNA polymerase. J. Biol. Chem. 270: 6298-62307.
- 209.Trono, D., Pelletier, J., Sonenberg, N., and Baltimore, D. (1988). Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region. Science.
241: 445-448.
- 210.Tuschl, T., Eckstein, F. (1993). Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II for activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90: 6991-6994.
- 211.Uhlenbeck, O.C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. Nature. 328: 596-600.
- 212.Usher, D. A., McHale, A. H. (1976). Nonenzymic joining of oligoadenylates on a polyuridylic acid template. Science. 192: 53-54.
- 213.van der Most, R. G., Heijnen, L., Spaan, W. J., de Groot, R. J. (1992). Homologous RNA recombination allows efficient introduction of site-specific mutations into the genome of coronavirus MHV-A59 via synthetic co-replicating RNAs. Nucleic Acids Res. 20: 3375-3381.
- 214.van Tol, H., Buzayan, J. M., Bruening, G. (1991). Evidence for spontaneous circle formation in the replication of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. Virology. 180: 23-30.

- 215.van Tol, H., Buzayan, J. M., Feldstein, P. A., Eckstein, F., Bruening, G. (1990). Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. Nucleic Acids Res. 18: 1971-1975.
- 216.van der Veen, R., Arnberg, A. C., Van der Horst, G. Bonen, L., Tabak, H. F., Grivel, L. A. (1986). Excised group II introns in east mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing in vitro. Cell. 44: 225-234.
- 217.van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F. W., and Dunn, J. J. (1986). Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2330-2334.
- 218.Varrelmann, M., Palkovics, L., Maiss, E. (2000). Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of Plum Pox Virus. J Virol. 74: 7462-7469.
- 219.Vicente, O., Filipowicz, W. (1988). Purification of RNA 3'-terminal phosphate cyclase from HeLa cells. Covalent modification of the enzyme with different nucleotides. Eur. J. Biochem. 176: 431-439.
- 220.Weiss, B. G., Schlesinger, S. (1991). Recombination between Sindbis virus RNAs. J. Virol. 65: 4017-4025.
- 221.White, K. A., Morris, T. J. (1995). RNA determinants of junction site selection in RNA virus determinants and defective interfering RNAs. RNA. 1: 1029-1040.
- 222.Wimmer, E., Hellen, C. U. T., and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. Annu. Rev. Genet. 27: 353-436.
- 223.Wu, H. N., Lai, M. M. C. (1989). Reversible cleavage and ligation of hepatitis delta virus RNA. Science. 243: 652-654.
- 224.Zagorowska, I., Kuusela, S., Lonnberg, H. (1998). Metal ion-dependent hydrolysis of RNA phosphodiester bonds within hairpin loops. A comparative

kinetic study on chimeric ribo/2'-O-methylribo oligonucleotides. Nucleic Acids Res. 26: 3392-3396.

225.Zhang, X., Lai, M. M. C. (1994). Unusual heterogeneity of leader-mRNA fusion in a murine coronavirus: implications for the mechanism of RNA transcription and recombination. J. Virol. 68: 6626-6633.