

ТРИДЦАТЬ ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ Q β -РЕПЛИКАЗЫ: ЧТО МЫ УЗНАЛИ И ЧТО ПРЕДСТОИТ УЗНАТЬ?

© 2018 г.

А. Б. ЧЕТВЕРИН

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Безматричный синтез РНК Q β -репликазой. III. Приложения молекулярных колоний. IV. Размножение рекомбинантных RQ-мРНК. V. Механизм узнавания матриц Q β -репликазой. VI. Структура кода Q β -репликазы. VII. Роль рибосомного белка S1 в репликации РНК. VIII. Структура комплекса кода Q β -репликазы с N-концевым фрагментом белка S1. IX. Рекомбинация РНК. X. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В 1965 году Спигельман и Харуна опубликовали сенсационную статью о том, что Q β -репликаза (РНК-зависимая РНК-полимераза бактериофага Q β) способна, по их выражению, «автокаталитически» размножать РНК *in vitro* [1]. Такой способ размножения еще называется экспоненциальным, так как в каждом цикле размножения число матриц удваивается и нарастает как 2^n , где n – число совершенных циклов. Это происходит потому, что на исходной матрице синтезируется комплементарная копия, которая также служит матрицей в следующем цикле. При времени дупликации Q β -РНК (геномной РНК бактериофага Q β длиной 4217 нт) около 2 мин при 37°C [2] Q β -репликаза может синтезировать миллиард ее копий или 2,5 нг РНК за 1 ч, а для синтеза 1 кг Q β -РНК ей потребовалось бы чуть больше 2 ч (конечно, если бы все это время репликаза оставалась в молярном избытке над РНК). Этот рекорд скорости размножения генетического материала вне клетки до сих пор не побит.

В конце 1983 года Q β -репликаза подарила еще одну сенсацию. Журнал Science опубликовал редакционную статью, в которой анонсировалось рождение принципиально новой технологии – технологии рекомбинантных РНК – и делалось предсказание, что Q β -репликаза

Адрес для корреспонденции: alexch@vega.protres.ru.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00597) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».

станет «молекулярной рабочей лошадкой большой индустрии» [3]. Статья была посвящена работе, выполненной под руководством ученика Спигельмана Ф.Р. Крамера, только что опубликованной в *Journal of Molecular Biology* [4]. Суть этой работы состояла в следующем.

У Q β -репликазы есть природные матрицы меньшей длины, чем геномная Q β -РНК, но часто более эффективно реплицируемые [5]. Это сателлитные РНК Q β -фага [6]. Авторы взяли одну из таких РНК, названную Спигельманом MDV-1 [7], вставили в ее последовательность [8] A₁₀ (декааденилат) и показали, что полученная рекомбинантная РНК размножается Q β -репликазой не менее эффективно, чем исходная MDV-1 [4]. Этот результат и послужил причиной восторженной статьи в *Science* [3], так как предполагалось, что теперь любые последовательности можно будет размножать с помощью Q β -репликазы, используя молекулу MDV-1 или иной сателлитной РНК Q β -фага в качестве «вектора».

В 1985 году директор Института белка АН СССР А.С. Спирин посетил Соединенные Штаты, где встретился с Ф.Р. Крамером, и тот рассказал ему про свою работу. Александр Сергеевич вернулся в Советский Союз, вдохновленный рассказом Крамера, и предложил мне заняться этой темой. Я в то время оказался не у дел, так как только что закончил работать с Na,K-АТФазой и защитил кандидатскую диссертацию, и принял предложение Александра Сергеевича.

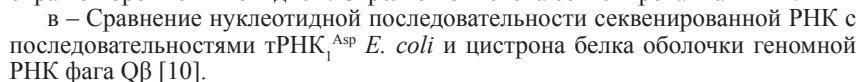
В результате родился проект – вероятно, первый научный проект в нашей стране, – который был защищен мною на Ученом совете Института белка в июне 1986 года. Он назывался «Создание бесклеточной системы репликации РНК», а его целью была «разработка универсального метода для придания любой РНК способности размножаться в Q β -репликазной системе», чтобы, в частности, «получать практически в неограниченном количестве любую РНК». Главным заказчиком и потенциальным потребителем этих РНК был как раз Александр Сергеевич: его сотрудники занимались в то время созданием проточных бесклеточных систем трансляции и им были нужны большие количества разных мРНК. Для выполнения проекта приказом директора Института №72-к от 19 июня 1986 года была создана научная группа, получившая название «Временная межлабораторная группа биохимии вирусных РНК». Со временем группа стала постоянной, а 23 ноября 1998 года получила статус лаборатории. Надо сказать, что проект в полном объеме не выполнен до сих пор; поэтому данный обзор, представленный в виде доклада на юбилейной конференции Института белка 7 июня 2017 года, можно рассматривать как промежуточный отчет по проекту 1986 года.

II. БЕЗМАТРИЧНЫЙ СИНТЕЗ РНК Q β -РЕПЛИКАЗОЙ

Первая проблема, с которой мы столкнулись, был синтез РНК, осуществляемый Q β -репликазой в отсутствие добавленной матрицы. Даже если бы мы сделали любую РНК размножаемой Q β -репликазой, то, в соответствии с опубликованной в 1975 году работой сотрудников Манфреда Айгена из Геттингена, Q β -репликаза может проигнорировать добавленную нами матрицу, а вместо нее размножать свои собственные РНК, которые она генерирует *de novo* [9].

Основная суть работы состояла в следующем. Авторы почистили Q β -репликазу до состояния, когда добавление даже нескольких молекул эффективно реплицирующейся матрицы стимулировало синтез РНК в стандартной инкубационной смеси объемом 200 мкл. Отсюда следовало, что добавленный в смесь препарат репликазы содержал не более, чем несколько молекул реплицирующейся РНК. Тогда они уменьшили объем смеси (и, следовательно, количество репликазы) в 10.000 раз и обнаружили, что в каждой микроскопической аликвоте объемом 0,02 мкл происходил спонтанный синтез РНК. Отсюда они сделали вывод, что Q β -репликазе не нужна никакая матрица. В течение нескольких часов инкубации, а иногда даже в пределах 1 ч, она сама рождает эффективные матрицы, которые могут размножаться даже лучше, чем добавленная РНК. Понятно, что если бы этим результатам не было найдено иного объяснения, то дальнейшая работа по проекту была бы лишена смысла.

Результат первого нашего эксперимента по безматричному синтезу РНК был очень странным. Кривая 1 на рис. 1а показывает временную зависимость включения меченого нуклеотида в пробирке, куда РНК не добавили. Вплоть до 4 ч инкубации никакого синтеза РНК мы не видели, хотя согласно данным сотрудников Айгена [9], РНК должна была появиться, по крайней мере, к концу второго часа. В пробирке же, куда была добавлена суммарная РНК, выделенная из инфицированных клеток, был виден, хоть и не большой, но уверенный синтез РНК (кривая 2 на рис. 1а). На всякий случай оставили пробирки на ночь, и на следующее утро нас ожидал сюрприз: в пробирке, куда РНК не добавили, мы обнаружили большое количество включенной метки (точка «20 ч» на кривой 1а). При анализе с помощью гелеэлектрофореза оказалось, что в этой пробирке было синтезировано много разных РНК. В тот же день мы поставили второй эксперимент (кривая 3 на рис. 1а). На этот раз такого длительного лаг-периода уже не было, а, как и в экспериментах сотрудников Айгена, в отсутствие добавленной матрицы синтез РНК начался быстро (как и во всех последующих экспериментах по безматричному синтезу), причем был синтезирован приблизительно тот же набор РНК.



Тогда мы секвенировали самую мажорную РНК (отмечена стрелкой на рис. 1б). Результатом стала первая публикация группы, вышедшая в журнале Nature [10]. В этой публикации мы ввели для сателлитных РНК обозначение RQ (от *Replicable by Q β replicase*) с числом, указывающим на длину ее последовательности в нуклеотидах. В соответствии с предложенной номенклатурой секвенированная РНК получила название RQ120. Оказалось, что эта РНК, которая была синтезирована в номинально безматричной реакции, является совершенным рекомбинантом двух известных РНК. Одна часть ее последовательности является ≈ 80 -нуклеотидным фрагментом гена белка оболочки Q β -РНК, а другая часть – 33-нуклеотидным фрагментом аспартиловой тРНК *Escherichia coli* (рис. 1в).

Из этого факта следовали сразу два принципиальных вывода: (1) синтез RQ120 РНК не мог быть безматричным, так как столь длинная гомология не могла возникнуть случайно; (2) существует рекомбинация на уровне РНК в бактериальных системах, так как один из субстратов рекомбинации (Q β -РНК) существует в природе только в виде РНК. Первый вывод противоречил концепции синтеза РНК *de novo* [9], а второй – утверждению, что в бактериальных системах не бывает рекомбинации между молекулами РНК, которое было основано на безуспешных попытках обнаружить рекомбинацию между РНК-содержащими фагами [11].

В отчете по проекту за 1987 год был сделан вывод, что синтез РНК, имевший место в наших экспериментах в отсутствие добавленной матрицы, на самом деле направлялся матрицами, и делалось предположение, что «основной причиной неконтролируемого синтеза является воздушное загрязнение реакционной смеси реплицирующимися РНК».

Но как это доказать? В свое время аналогичную задачу решал Луи Пастер, чтобы выяснить, почему протухает мясной бульон [12]. Для этого он прокипятил бульон в колбе, сделанной в форме лебедя: ее горлышко было оттянуто и изогнуто вниз так, что вертикально падающие частицы не могли попасть в бульон, а оседали в изгибе колбы. В такой колбе бульон сохранялся сколь угодно долго. Однако если колбу наклоняли так, чтобы омыть изгиб остывшим бульоном, то он быстро протухал. Отсюда Пастер сделал вывод, что «никакая жизнь не может возникнуть в прокипяченном мясном бульоне, если туда не попадут частицы тяжелее воздуха».

Мы не могли последовать примеру Пастера, так как кипячение реакционной среды убило бы Q β -репликазу. Ситуация казалась безвыходной. Тогда мы сделали следующий эксперимент; это был отчаянный шаг, так как надежды на его успех было крайне мало. Добавили в легкоплавкую агарозу Q β -репликазу и нуклеозидтрифосфаты (субстраты для синтеза РНК) и приготовили из нее гель в чашке Петри. Спустя 1 ч гель смочили бромистым этидием, флуоресценция которого резко увеличивается, если есть полимерная РНК, в результате интеркаляции между ее стекингованными основаниями. И увидели то, на что боялись надеяться: в геле появились флуоресцирующие пятна (рис. 2а). Для нас сразу стало ясно, что это – колонии РНК, образовавшиеся путем размножения реплицирующихся молекул. Благодаря тому, что размножение происходило в геле, а не в жидкости, их потомство не распространялось по всему реакционному объему, а оставалось вблизи исходных матриц. Таким образом, у нас появился

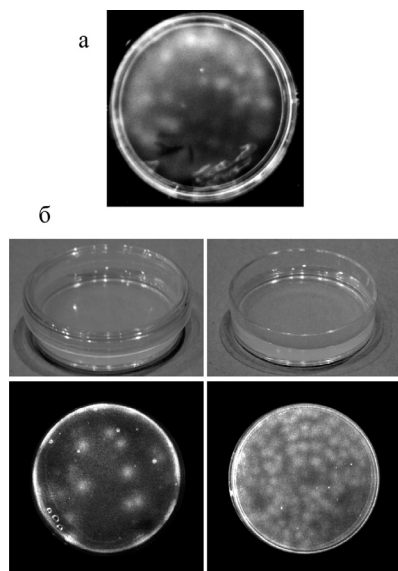


Рис. 2. Обнаружение молекул РНК с помощью метода молекулярных колоний.

а – Первый эксперимент по выращиванию колоний РНК в легкоплавкой агарозе, содержащей Q β -репликазу и НТР, проведенный в январе 1988 года [45].

б – Обнаружение молекул реплицирующихся РНК в воздухе. Колонии РНК, выросшие в чашках Петри, оставленных на 1 ч закрытой (слева) и открытой (справа) перед заливкой второго слоя агарозы (см. текст) [19].

инструмент, позволяющий регистрировать одиночные молекулы реплицирующихся РНК.

Несколько изменив постановку, мы провели другой эксперимент. В две чашки Петри залили два слоя агарозного геля: сначала – слой, содержащий нуклеотиды, а поверх его – слой, содержащий Q β -репликазу. Разнесение фермента и его субстратов в разные слои позволило ограничить размножение РНК к моменту формирования геля. Перед заливкой второго слоя чашки оставили на рабочем столе на 1 ч – одну закрытой, а другую открытой. Спустя 1 ч после заливки второго слоя гель в обеих чашках окрасили бромистым этидием и увидели то, что ожидали: в открытой чашке выросло гораздо больше колоний РНК, чем в закрытой (рис. 2б). Отсюда мы сделали вывод, что причиной так называемого «безматричного» синтеза является попадание молекул РНК в реакционную смесь из воздуха [6].

III. ПРИЛОЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОЛОНИЙ

Проведенный в январе 1988 года эксперимент по выращиванию колоний РНК (рис. 2а) стал первым случаем размножения генетического материала в виде молекулярных клонов [13]: до этого клонального размножения нуклеиновых кислот *in vitro* никто никогда не осуществлял.

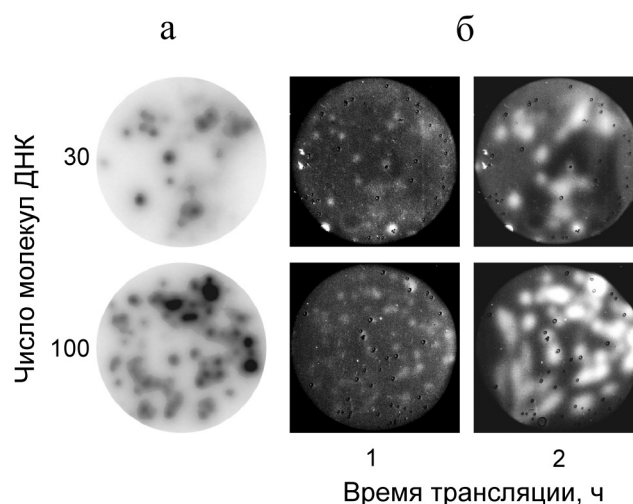


Рис. 3. Клонирование и экспрессия гена в молекулярных колониях [16].

а – Размножение гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) в виде колоний ДНК путем проведения ПЦР в полиакриламидном геле. Колонии обнаруживали путем гибридизации с радиоактивным зондом.

б – Экспрессия гена GFP в молекулярных колониях с помощью сопряженной системы транскрипции и трансляции. Колонии обнаруживали по собственной флуоресценции GFP.

Впоследствии мы научились выращивать колонии ДНК путем проведения ПЦР в полиакриламидном геле [14,15], а также осуществлять их транскрипцию и трансляцию *in situ* [16] (рис. 3). Таким образом было показано, что молекулярные колонии являются, в определенном смысле, аналогами живых клеток, так как в них может происходить репликация генетического материала и его экспрессия, вплоть до синтеза активного белка.

Способность молекулярных колоний компартментализовать биохимические реакции делает их вероятным кандидатом на роль предшественников клеток в процессе происхождения жизни [17,18] (в этом случае, молекулярные колонии могли формироваться не в геле, а в пористых минералах, таких как глина) и удобной экспериментальной моделью для сборки жизнеспособных клеток *de novo* [19].

Молекулярные колонии были использованы нами для разработки методов молекулярной диагностики, обладающих абсолютной чувствительностью. На рис. 4 показан результат эксперимента, где в кровь

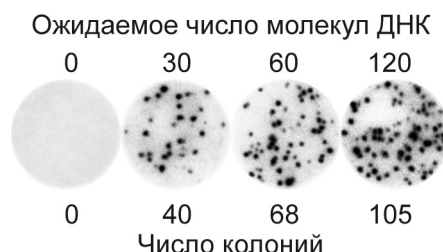


Рис. 4. Обнаружение с помощью молекулярных колоний ДНК вируса гепатита В в крови человека. Из работы [20] с разрешения BioTechniques. © 2002.

Суммарную нуклеиновую кислоту выделяли из 100 мкл крови, куда было добавлено 0, 50, 100 или 200 молекул HBV-ДНК. По 60% полученных препаратов использовали для ПЦР в полиакриламидном геле. Колонии обнаруживали путем гибридизации с радиоактивным зондом.

человека добавляли известное количество вирусной ДНК, а затем суммарную ДНК выделяли и использовали для выращивания вирус-специфичных молекулярных колоний [20]. Видно, что в пределах статистического разброса число колоний совпадает с ожидаемым числом молекул вирусной ДНК в анализируемом образце. Таким образом, метод способен обнаружить даже одну-единственную молекулу ДНК-мишени. Важно, что такой результат получен на фоне триллион-кратного избытка невирусной ДНК, присутствующей в исследуемой крови, без какого-либо предварительного обогащения мишени. Для сравнения, даже в 1000 раз меньшее количество посторонней ДНК подавляет размножение малых количеств мишени при жидкостной ПЦР за счет конкурентного синтеза неспецифических продуктов [21].

Наконец, размножение молекул ДНК в виде молекулярных клонов используют современные методы секвенирования геномов и транскриптомов. В частности, на размножении фрагментов ДНК в виде молекулярных колоний, которые в данном случае именуются «кластерами», основана популярная технология тотального секвенирования фирмы Illumina [22].

IV. РАЗМНОЖЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ RQ-мРНК

После того, как мы разобрались с безматричным синтезом, можно было приступить к основной задаче проекта: приданию любой РНК способности размножаться Q β -репликазой в соответствии со стратегией, предложенной группой Крамера [4]. С помощью генной инженерии мы сконструировали рекомбинантную РНК на основе другой выделенной и секвенированной нами реплицирующейся

РНК – RQ135 [23], которая так же эффективно размножается репликазой, как и MDV-1 (RQ223) РНК; в петлю одной из внутренних шпилек RQ135 РНК вставили мРНК дигидрофолатредуктазы (DHFR). Полученная РНК была названа RQ-DHFR. В качестве контроля мы взяли предоставленную Крамером MDV-CAT РНК, где внутри MDV-1 РНК содержится мРНК хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). По утверждению авторов, Q β -репликаза размножает эту рекомбинантную РНК экспоненциально [24].

К нашему разочарованию, обе РНК оказались не способными к экспоненциальному размножению; Q β -репликаза могла лишь однократно прочитывать эти матрицы [25]. В каждом случае синтезированная комплементарная цепь оказывалась в дуплексе с матрицей и на этом процесс останавливался, так как двутяжная РНК не может служить матрицей для Q β -репликазы. Однако выяснилось, что добавление в реакционную смесь полной системы трансляции с тем, чтобы кодирующая белок (+)-цепь могла прочитываться рибосомами, усиливает синтез РНК, которая теперь находится преимущественно в однотяжной форме (рис. 5а). Далее оказалось, что в однотяжной форме накапливается преимущественно (+)-цепь РНК, то есть та, которая транслируется (рис. 5б).

Этим фактам было дано следующее объяснение. Транслирующие рибосомы имеют два взаимно противоположных действия на репликацию RQ-DHFR РНК: с одной стороны, они конкурируют с репликазой за (+)-цепь, по которой движутся в направлении 5'→3', тогда как репликаза движется по ней же в противоположном направлении (3'→5'), и этим препятствуют синтезу (–)-цепи; с другой стороны, они препятствуют отжигу (+)-цепи с (–)-цепью, благодаря чему (–)-цепь образуется в однотяжной форме, доступной для синтеза новых (+)-цепей, и этим способствуют репликации. Как только появляется новосинтезированная (+)-цепь, она с большой вероятностью вступает в трансляцию и выходит из репликации. В то же время, неспособная транслироваться (–)-цепь служит матрицей для синтеза (+)-цепей. Это и приводит к наблюдаемой асимметрии синтеза цепей разной полярности, напоминающей асимметрию синтеза (+)- и (–)-цепей Q β -РНК в клетках *E. coli*, инфицированных РНК-содержащими бактериофагами [26].

Итак, сопряжение репликации с трансляцией позволяет, в принципе, размножить рекомбинантную RQ-мРНК *in vitro*, хотя и не в экспоненциальном режиме. Это, в свою очередь, увеличивает синтез белка, кодируемого (+)-цепью (рис. 5в). Таким образом, репликация и трансляция мРНК в бесклеточной системе взаимно стимулируют друг друга.

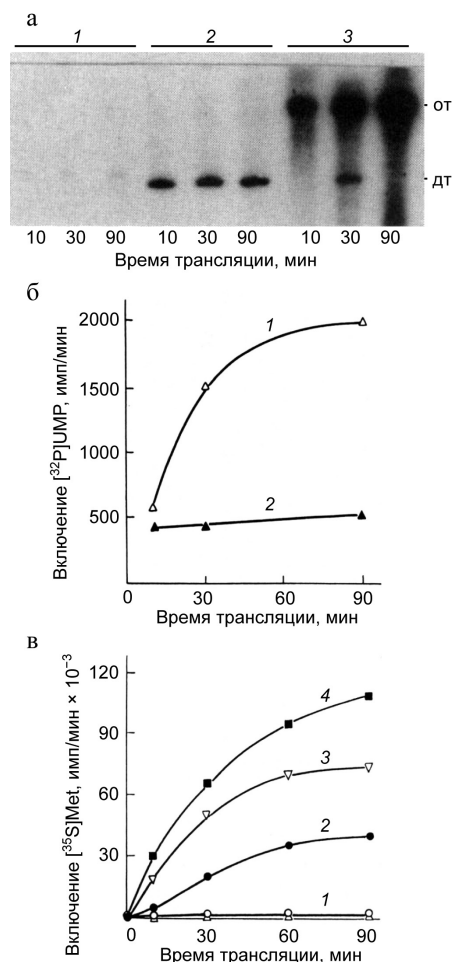


Рис. 5. Взаимное усиление репликации и трансляции рекомбинантной RQ-DHFR РНК [25].

а – Электрофоретический анализ продуктов синтеза РНК Q β -репликазой в присутствии $[^{32}\text{P}]\text{UTP}$, с использованием в качестве матриц DHFR-мРНК (1) или RQ-DHFR РНК (2,3), в отсутствие (1,2) или в присутствии (3) полной бесклеточной системы трансляции *E. coli*. Отмечено положение однотажной (от) и двутажной (дт) форм RQ-DHFR РНК.

б – Кинетика синтеза Q β -репликазой (+)-цепей (1) и (–)-цепей (2) RQ-DHFR РНК в присутствии полной бесклеточной системы трансляции *E. coli*.

в – Кинетика синтеза дигидрофолатредуктазы на RQ-DHFR РНК в бесклеточной системе трансляции *E. coli* в отсутствие (2) или в присутствии 1 мкг (1,3) или 2 мкг (4) Q β -репликазы, а также в отсутствие (2-4) или присутствии (1) 0,5 мМ пурамицина.

V. МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ МАТРИЦ Q β -РЕПЛИКАЗОЙ

Полученные результаты демонстрировали, что предложенная группой Крамера стратегия не работает: рекомбинантные RQ-мРНК не могут быть размножены Q β -репликазой в экспоненциальном режиме, а в отсутствие сопряженной системы трансляции не могут быть даже копированы ею больше одного раза. Чтобы решить поставленную в проекте задачу, надо было выяснить, почему Q β -репликаза одни РНК узнает как свои матрицы, а другие – нет.

Исследование первичной структуры Q β -РНК и ряда RQ-РНК показало, что они не имеют каких-либо общих элементов, за исключением концевых тринуклеотидов GGG и CCC на 5'- и 3'-конце, соответственно. Ничего похожего на промотор, который мог бы служить для узнавания матриц, обнаружено не было. Тем не менее, матричная специфичность Q β -репликазы оказалась исключительно высокой: только единичные РНК, отобранные с помощью процедуры SELEX из стартового набора 10¹² случайных последовательностей длиной 50–70 нт, заранее снабженных 5'-GGG и 3'-CCC концами, оказались в некоторой степени реплицируемыми [27].

На примере Q β -РНК Вайсманн с сотрудниками показал, что при экспоненциальном размножении двутяжные интермедиаты отсутствуют. Все ранее обнаруженные двутяжные структуры – артефакты процедуры выделения РНК: они образуются под действием любого агента, нарушающего целостность репликазы (фенол, детергент, протеаза). Более того, Q β -репликаза в принципе не способна прочитывать дуплексы [2].

С другой стороны, А. Палменберг и П. Кэсберг показали, что, при ее высокой матричной специфичности, Q β -репликаза способна сделать комплементарную копию почти любой РНК, независимо от ее концевых последовательностей, особенно при замене Mg²⁺ на Mn²⁺. Однако, в отличие от копирования экспоненциально размножаемых РНК, продукт реакции устойчив к панкреатической рибонуклеазе, то есть является двутяжным [28].

Таким образом, у Q β -репликазы есть 2 типа матриц. Первый тип мы назвали законными, а второй тип – незаконными матрицами. Эти матрицы различаются по ряду признаков [29], суммированных в таблице 1. В отличие от незаконных матриц, на 3'-конце законных матриц всегда присутствует CCC, а на стадии инициации синтеза РНК обязательно должен присутствовать GTP. Так, если вместо GTP на стадии инициации дать ИТР (инозинтрифосфат, который способен встраиваться напротив матричного цитидина), то копирование незаконных матриц будет происходить, а законных – нет.

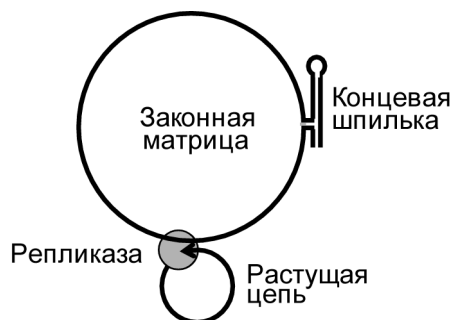
Таблица. Два типа матриц Q β -репликазы [29]

Признак	Законные матрицы (экспоненциально размножаемые)	Незаконные матрицы (однократно копируемые)
3'-концевая последовательность	ССС	Любая
Инициаторный нуклеотид	GTP	Любой
Синтез РНК в присутствии АТК	Возможен, если АТК добавлена после GTP	Невозможен
Переход в закрытую конформацию	Есть	Нет
Продукт синтеза	Однотяжный	Двутяжный

Важнейшим признаком является то, что на законных матрицах синтез полноразмерной комплементарной цепи может осуществляться в присутствии ауринтрикарбонической кислоты (АТК), если та добавлена после прохождения инициации, то есть на стадии элонгации. Напротив, АТК полностью подавляет копирование незаконных матриц, независимо от того, на какой стадии реакции она добавлена. Так как АТК является сильным ингибитором РНК-белковых взаимодействий [30], устойчивость к ней означает, что, в отличие от незаконных матриц, законная матрица и ее продукт не могут покинуть активный центр репликазы на стадии элонгации. Отсюда мы сделали вывод, что элонгация на законной матрице происходит в закрытой конформации Q β -репликазы, в которой запрещен обмен крупных молекул (РНК, полимерная АТК) между активным центром фермента и средой, тогда как при копировании незаконных матриц перехода в закрытую конформацию нет [29]. Наконец, продуктом синтеза на законной матрице является однотяжная РНК, а на незаконной – двутяжная.

Таким образом, было установлено, что, в отличие от ДНК-зависимых РНК-полимераз, матричная специфичность Q β -репликазы определяется не узнаванием специфической структуры матрицы (промотора) в начале инициации, а способностью перехода в закрытую конформацию – событием, следующим за инициацией. Репликаза узнает и начинает копировать как законные, так и незаконные матрицы, но только законные матрицы способны переводить репликазу в закрытую конформацию (в присутствии GTP), в которой синтез

Рис. 6. Модель, в соответствии с которой репликативный комплекс поддерживается в одנותажном состоянии благодаря тому, что матрица и синтезируемая цепь удерживаются в виде колец концевой шпилькой и Q β -репликазой, соответственно.



РНК устойчив к ауриINTRИкарбонОВОЙ кислоте. По-видимому, переход в закрытую конформацию позволяет репликазе удерживать репликативный комплекс в одנותажном состоянии [29].

Затем мы узнали также, что законные матрицы Q β -репликазы обладают свойством функциональной циркулярности [31]. Оказалось, что точечные мутации на 5'-конце законной матрицы снижают скорость и выход инициации, которая происходит на ее 3'-конце, а также усиливают зависимость инициации от концентрации Mg²⁺. Более того, эти мутации понижают стабильность постинициаторного репликативного комплекса в присутствии АТК. Отсюда следует, что Q β -репликаза одновременно взаимодействует с 3'- и 5'-концами законной матрицы на стадии инициации и после нее.

Мы также установили еще один факт. Все законные матрицы способны укладываться в структуру, где 3'- и 5'-концы сближены и образуют концевую шпильку, которая могла бы удерживать молекулу в кольцевой конфигурации [32]. В некоторых случаях (например, для RQ135 РНК [23]) наличие такой шпильки было доказано с помощью рибонуклеаз, способных расщеплять одנותажные, либо двутяжные участки РНК.

Кольцевая конфигурация матрицы может способствовать удержанию репликативного интермедиата в одנותажном состоянии. Если репликаза в процессе элонгации удерживает не только растущий 3'-конец синтезируемой цепи РНК, но и ее 5'-конец [2], то в этом случае и матрица, и ее комплементарная копия образуют кольцевые структуры (рис. 6), которые не могут завиться в протяженную двойную спираль из-за топологических ограничений.

VI. СТРУКТУРА КОРА Q β -РЕПЛИКАЗЫ

Чтобы понять, как Q β -репликаза узнает матрицу и как она дискриминирует между разными молекулами РНК, важно знать, как устроены репликаза и ее комплексы с законными матрицами. В этом направлении долгое время не было никакого прогресса. В 1988 году, тогда же, когда мы опубликовали в *Nature* сообщение о рекомбинантной RQ120 РНК, была опубликована совместная с В.Д. Васильевым работа по электронной микроскопии Q β -репликазы [33]. На рис. 7 представлена модель молекулы репликазы, предложенная В.Д. Васильевым на осно-

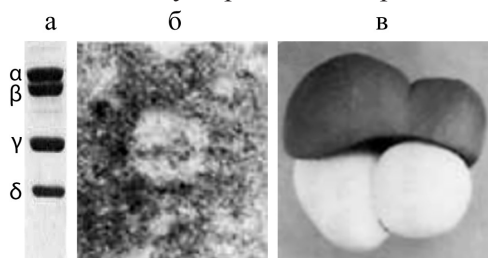


Рис. 7. Молекула Q β -репликазы. Из работы [33] с разрешения John Wiley and Sons. © 1988 Federation of European Biochemical Societies.

а – Субъединицы фермента по данным гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия: α – рибосомный белок S1, β – каталитическая субъединица, кодируемая геном фага Q β , γ и δ – трансляционные факторы элонгации EF-Tu и EF-Ts, соответственно.

б – Электронно-микроскопическое изображение молекулы Q β -репликазы, полученное при помощи негативного контрастирования образца.

в – Модель молекулы Q β -репликазы, предложенная на основании данных электронной микроскопии.

вании полученных изображений. Самым удивительным здесь было то, что все субъединицы Q β -репликазы выглядят глобулами, несмотря на то, что в молекулу входят, помимо кодируемой геном Q β -фага β -субъединицы, трансляционные факторы элонгации EF-Tu и EF-Ts, а также рибосомный белок S1 (рис. 7а), молекула которого всегда считалась сильно удлинённой.

Однако все попытки получить кристаллы холофермента Q β -репликазы были неудачными. Наконец, в 2010 году удалось получить кристаллы кора Q β -репликазы – молекулы, из которой удален белок S1 и которая способна сама

осуществлять синтез РНК. Для кристаллизации потребовалось дополнительно стабилизировать структуру молекулы – либо заменой EF-Ts *E. coli* на его гомолог из *Thermus thermophilus* [34], либо слиянием EF-Tu и EF-Ts в один полипептид [35]. Последние кристаллы дифрагировали с лучшим разрешением, поэтому была решена структура именно этой молекулы.

Оказалось, что общая архитектура кора Q β -репликазы похожа на структуру других вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз

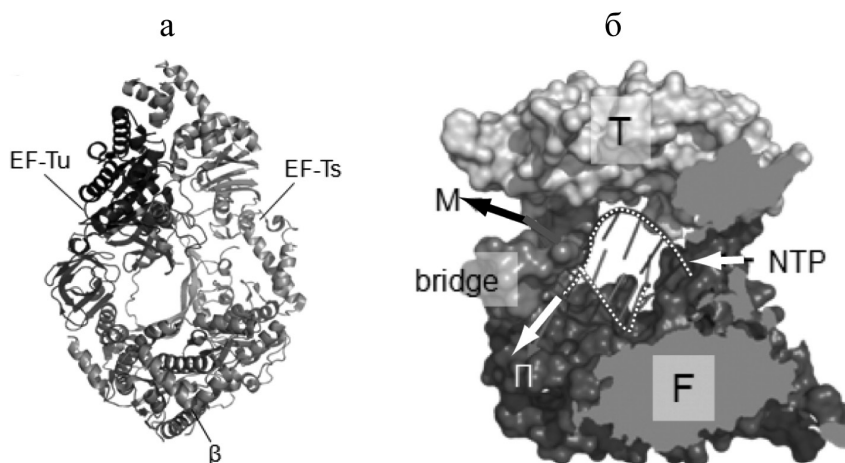


Рис. 8. Кристаллическая структура коа Q β -репликазы по данным работы [35]. Из диссертации Н.В. Васильева (Институт белка РАН) [46].

а – Структура мономера коа репликазы, состоящего из β -субъединицы и факторов элонгации EF-Tu и EF-Ts.

б – Модель активного центра Q β -репликазы, формируемого β -субъединицей. Стрелками показаны направления движения матрицы (М), продукта (П) и нуклеотидов (NTP). Буквами F и T обозначены домены пальцев (Fingers) и большого пальца (Thumb) β -субъединицы. Белым пунктиром обозначен ход сахарофосфатного остова матрицы и продукта (синтезируемой цепи РНК).

(рис. 8а), но у Q β -репликазы есть важная особенность: на выходе из ее активного центра стоит перегородка, названная «bridge» (мостик), которая делит выход на два отверстия – для матрицы и для синтезируемой цепи (рис. 8б) – и тем самым разделяет образуемую ими двойную спираль на отдельные цепи, действуя подобно замку застежки-молнии [35].

VII. РОЛЬ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1 В РЕПЛИКАЦИИ РНК

Выяснив структуру коа, мы решили убедиться, что тот является полноценным ферментом и что белок S1 не нужен для осуществления экспоненциального синтеза РНК, а нужен, как в свое время утверждал Вайсманн, лишь для того, чтобы узнавать (+)-цепь Q β -РНК при инициации ее копирования [36]. К нашему удивлению выяснилось, что это не так [37].

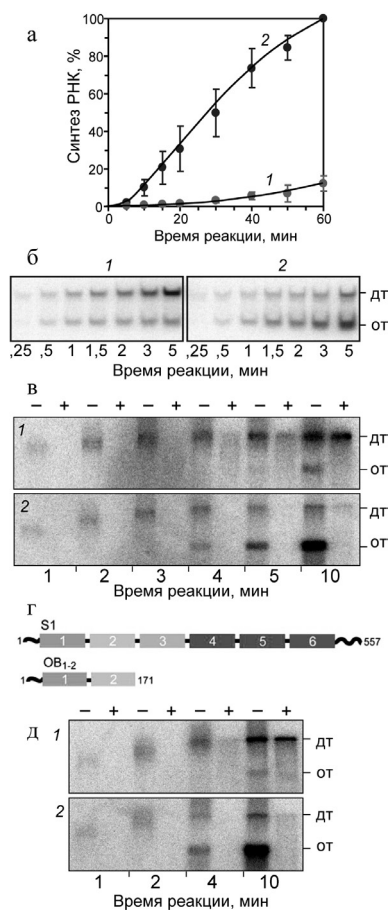


Рис. 9. Рибосомный белок S1 играет роль фактора терминации в синтезе РНК Qβ-репликазы [37].

а – Синтез RQ135 РНК кором Qβ-репликазы при стартовых концентрациях 1,66 пМ и 360 пМ, соответственно, в отсутствие (1) и присутствии (2) 360 пМ белка S1. Указаны количества полноразмерного продукта в процентах от максимального значения, достигнутого в присутствии S1.

б – Содержание одноцепочной (от) и двуцепочной (дт) форм в продуктах размножения RQ135 РНК кором Qβ-репликазы в отсутствие (1) и присутствии (2) белка S1. ³²P-меченные продукты экстрагировали фенолом и разделяли с помощью неденатурирующего гель-электрофореза.

в – Распределение ³²P-меченого продукта между одноцепочной (от) и двуцепочной (дт) формами в процессе репликации Qβ-РНК при 30°C в отсутствие (1) и присутствии (2) белка S1. Образец не обрабатывали (–) или обрабатывали (+) рибонуклеазой T1 перед экстракцией фенолом.

г – Доменная структура белка S1 и его N-концевого фрагмента OB₁₋₂. Белыми цифрами обозначены номера OB-доменов, черными – номера аминокислотных остатков.

д – Распределение ³²P-меченого продукта между одноцепочной (от) и двуцепочной (дт) формами в процессе репликации Qβ-РНК в отсутствие (1) и присутствии (2) фрагмента OB₁₋₂ белка S1. Образец не обрабатывали (–) или обрабатывали (+) рибонуклеазой T1 перед экстракцией фенолом.

Оказалось, что репликация RQ135 РНК, которая не имеет никакого отношения к фаговому геному и совсем не похожа на него по первичной структуре, в 10 раз усиливается в присутствии белка S1 (рис. 9а), если за репликацией наблюдают на экспоненциальной фазе, то есть при молярном избытке Qβ-репликазы над РНК. На линейной фазе (при избытке РНК) влияния белка S1 почти не заметно. Анализ продуктов репликации с помощью неденатурирующего электрофореза показал, что в присутствии белка S1 содержание одноцепочной (от) формы значительно выше, чем в его отсутствие (рис. 9б).

Тогда мы решили подробно исследовать репликативный цикл, используя в качестве матрицы (+)-цепь Q β -РНК. Эта РНК имеет в длину более 4000 нуклеотидов и ее копирование занимает несколько минут, что позволяет наблюдать отдельные стадии цикла. Здесь мы использовали прием, суть которого необходимо пояснить для понимания результата эксперимента. После отбора кинетических точек часть материала прямо экстрагировали фенолом и использовали для электрофореза (образцы, помеченные знаком «-» на рис. 9в), а другую часть сначала обрабатывали рибонуклеазой T1, которая разрушает однотяжную РНК и не трогает двутяжную, и лишь затем обрабатывали фенолом (образцы, помеченные знаком «+»). Это позволяло выяснить, в каком состоянии находился репликативный комплекс в данный момент времени.

На рис. 9в видно, что в образцах, не подвергнутых рибонуклеазной обработке, со временем происходит уменьшение электрофоретической подвижности меченой РНК. Это происходит потому, что синтезируемая (-)-цепь при фенольной экстракции отжигается с матрицей и по мере элонгации ее подвижность приближается к подвижности двутяжной Q β -РНК (дт). К концу четвертой минуты подвижность продукта становилась равной подвижности двутяжной Q β -РНК, что указывало на завершение элонгации. Видно, что в течение четырех минут подвижность продукта падала с одинаковой скоростью в образцах, содержащих и не содержащих белок S1. Отсюда следует, что белок S1 не влияет на скорость элонгации (-)-цепи. Более того, независимо от присутствия белка S1, все это время репликативный комплекс был чувствителен к рибонуклеазе T1 (образцы «+») и, следовательно, оставался в однотяжном виде. Однако, в присутствии белка S1, продукт покидал репликативный комплекс сразу по завершении элонгации и поэтому оказывался в однотяжной форме (от) после фенольной экстракции (образцы «-»), тогда как в отсутствие белка S1 количество свободного однотяжного продукта было незначительным, зато накапливался двутяжный продукт (дт), устойчивый к рибонуклеазе T1 (образцы «+»).

Из этого результата мы сделали вывод, что белок S1 является фактором терминации синтеза РНК. Он способствует выходу однотяжного продукта из репликативного комплекса на стадии терминации [37].

Далее мы выяснили, что весь белок S1 для выполнения этой функции не нужен. Достаточно N-концевого фрагмента, содержащего два из шести ОБ-доменов белка S1 (рис. 9г). Обычно наименование «ОБ» расшифровывается как «Oligonucleotide/oligosaccharide Binding»,



Рис. 10. Кристаллическая структура комплекса кора Q β -репликазы с фрагментом OB₁₋₂ белка S1 [38].

а – Структура комплекса в двух разных проекциях, повернутых на $\approx 180^\circ$ друг относительно друга.

б – Область положительного заряда (показана светлым тоном), расположенная у отверстия для выхода продукта на смежных поверхностях β -субъединицы и домена OB₂ белка S1.

однако, как мне недавно рассказал А.В. Финкельштейн, OB-домен был назван А.Г. Мурзиным в честь его учителя Олега Борисовича Птицына; то есть, это «*Oleg Borisovich*»-домен. Оказалось, что фрагмент OB₁₋₂, содержащий всего треть белка S1, делает то же, что и целый белок [37]: стимулирует терминацию синтеза РНК (рис. 9д).

VIII. СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА КОРА Q β -РЕПЛИКАЗЫ С N-КОНЦЕВЫМ ФРАГМЕНТОМ БЕЛКА S1

Используя вместо белка S1 его компактный фрагмент OB₁₋₂, мы получили кристаллы и установили структуру ферментативно полноценной Q β -репликазы [38] (рис. 10а), которая умеет не только инициировать и элонгировать, но также и терминировать синтезированную цепь РНК в одנותянном состоянии. При анализе распределения электрического заряда оказалось, что поверхность второго OB-домена содержит область положительного заряда, которая примыкает к району β -субъединицы, также заряженному положительно, и вся эта дорога ведет от отверстия, через которую выходит синтезированная цепь РНК (рис. 10б). Возможно, что этот положительно заряженный тракт каким-то образом способствует выдергиванию синтезированного продукта из активного центра и тем самым его терминации.

IX. РЕКОМБИНАЦИЯ РНК

Как указывалось выше, наша первая статья была посвящена обнаружению рекомбинантной RQ120 РНК в продуктах «безматричного» синтеза. Это свидетельствовало о том, что в бактериальных системах может происходить рекомбинация на уровне РНК [10]. Однако оставалось неясным, образовалась ли эта РНК в результате действия каких-то клеточных ферментов или самой Q β -репликазы, или же молекулы РНК рекомбинировали за счет своей собственной каталитической активности.

Чтобы это выяснить, мы создали бесклеточную систему рекомбинации РНК на основе Q β -репликазы и ее матриц, а для того, чтобы видеть только рекомбинантные молекулы и не видеть нерекомбинантные, мы использовали метод молекулярных колоний [39]. Взяли природную реплицирующуюся РНК, RQ135, и разрезали ее примерно пополам. Каждый из полученных фрагментов не способен реплицироваться Q β -репликазой и поэтому не образует колонии РНК. Однако, если в результате рекомбинации эти фрагменты объединятся в реплицируемую РНК, то на ее месте образуется колония. Подсчитывая колонии, мы можем определить число рекомбинантных молекул. Действительно, если смесь фрагментов высевали на агарозу с Q β -репликазой, то видели многочисленные колонии РНК, хотя при посеве каждого из фрагментов в отдельности никаких колоний не было (рис. 11).

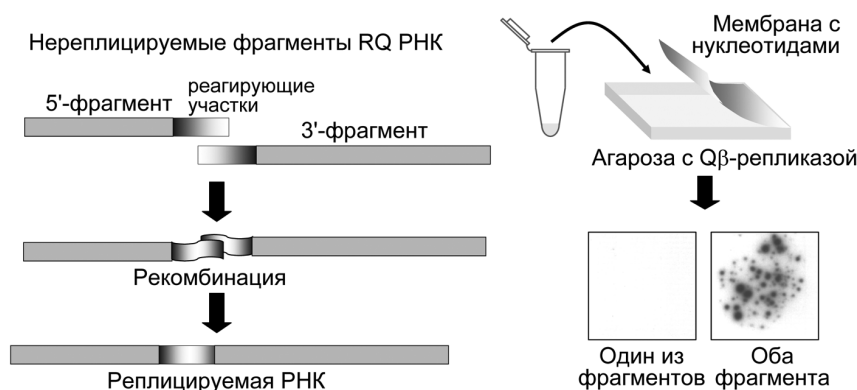


Рис. 11. Принцип обнаружения рекомбинационных событий с помощью метода молекулярных колоний [19]. Объяснения даны в тексте.

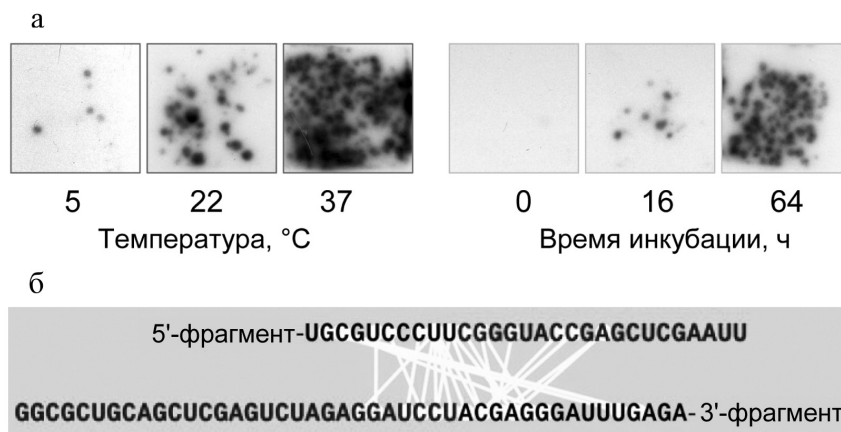


Рис. 12. Спонтанные рекомбинации между молекулами РНК.

а – Зависимость количества рекомбинантов от температуры и времени инкубации [19].

б – Нуклеотиды, которые оказываются рядом (соединены светлыми линиями) в составе рекомбинантных молекул. Из работы [47] с разрешения John Wiley and Sons. © 2004 Federation of European Biochemical Societies.

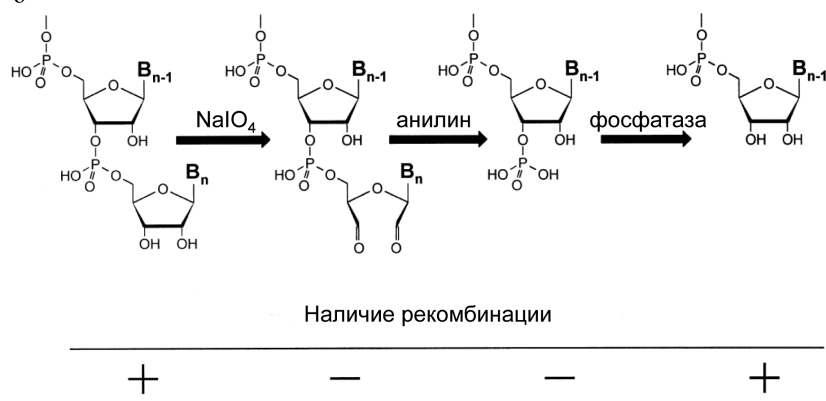
Используя эту систему детекции рекомбинантов, мы выяснили, что молекулы РНК могут сами по себе рекомбинировать, то есть спонтанно изменять свою первичную структуру [40]. Если смесь фрагментов инкубировали в разных условиях в течение разных промежутков времени, а перед посевом на агарозу окисляли перйодатом, чтобы дальнейшая рекомбинация не происходила (см. ниже), то вырастали колонии РНК, число которых было тем больше, чем дольше инкубировали смесь фрагментов до контакта с Q β -репликазой и чем выше была температура инкубации (рис. 12а). Когда определили нуклеотидную последовательность рекомбинантов, то оказалось, что рекомбинация происходит между внутренними участками РНК, более или менее случайным образом (рис. 12б).

Далее оказалось, что Q β -репликаза может стимулировать рекомбинацию РНК, но процесс идет по-другому. Во-первых, скорость рекомбинации в присутствии Q β -репликазы на несколько порядков выше, чем скорость спонтанной рекомбинации. Во-вторых, устроены рекомбинанты таким образом, что 5'-фрагмент в них входит целиком и присоединен к 3'-фрагменту в разных местах (рис. 13а). Интересно, что при этом полностью игнорируется гомология между чужеродными последовательностями, специально введенными во фрагменты для облегчения их рекомбинации по механизму смены матриц [39]. Это

а



б

Рис. 13. Рекомбинация РНК, катализируемая Q β -репликазой.

а – Нуклеотиды, которые оказываются рядом (соединены светлыми линиями) в составе рекомбинантных молекул. Идентичные нуклеотиды в чужеродных последовательностях показаны серыми буквами. Из работы [47] с разрешения John Wiley and Sons. © 2004 Federation of European Biochemical Societies.

б – Чтобы вступать в рекомбинацию, 5'-фрагмент должен иметь свободную 3'-гидроксильную группу. Из работы [48] с разрешения John Wiley and Sons. © 1999 Federation of European Biochemical Societies.

стало первым примером рекомбинации РНК по механизму, отличному от механизма смены матриц, ранее считавшимся единственно возможным [41]. Позже в совместной работе с лабораторией В.И. Агола было показано, что даже в случае РНК вируса полиомиелита, давшей классический пример рекомбинации путем смены матриц [42], возможна негомологичная рекомбинация нерепликативного типа [43].

Более того, оказалось, что если 3'-конец 5'-фрагмента окислить периодатом, в результате чего уничтожается 3'-гидроксил, то рекомбинация прекращается. Если окисленную РНК обработать анилином так, что элиминируется разорванное рибозное кольцо, а на 3'-гидроксильной группе остается фосфатная группа, то рекомбинация тоже не происходит. Однако если фосфатную группу удалить с помощью фосфатазы, то способность 5'-фрагмента к рекомбинации восстанавливается (рис.

136). Отсюда мы предположили, что Q β -репликаза катализирует реакцию трансэстерификации, при которой 3'-гидроксил 5'-фрагмента атакует фосфаты 3'-фрагмента [39]. Однако затем выяснилось, что картина не так проста. Оказалось, что для рекомбинации необходимо копирование 3'-фрагмента [44]. Этот факт в предложенную модель рекомбинации не вписывается. Поэтому пока мы можем сказать: необходимы дальнейшие исследования.

Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Что мы узнали

1. «Безматричный» синтез РНК Q β -репликазой вызывают РНК-матрицы, присутствующие в воздухе.
2. Если одиночные молекулы РНК и ДНК размножать в геле (пористой среде), то они формируют колонии (молекулярные клоны).
3. В молекулярных колониях может быть осуществлена экспрессия генов с образованием активного белка. В этом смысле молекулярные колонии могут служить функциональными аналогами живых клеток.
4. Молекулярные колонии могут служить инструментом абсолютной молекулярной диагностики.
5. Искусственно созданные рекомбинантные RQ-мРНК не размножаются Q β -репликазой, но могут быть размножены ею в присутствии системы трансляции. Это, в свою очередь, приводит к увеличению синтеза кодируемого белка.
6. Матричная специфичность Q β -репликазы определяется не узнаванием промотора, а способностью перехода фермента в закрытую конформацию в результате инициации.
7. В закрытую конформацию Q β -репликазу переводит инициация на законных матрицах, обладающих свойством функциональной и структурной (по-видимому, нековалентной) циркулярности.
8. Установлена кристаллическая структура кора Q β -репликазы (комплекса β -субъединицы с EF-Tu и EF-Ts). Обнаружен структурный элемент «bridge», способный разделять цепи матрицы и ее растущей комплементарной копии.
9. Кор репликазы способен, в отсутствие белка S1, переходить в закрытую конформацию и поддерживать однотяжное состояние репликативного комплекса.
10. Белок S1 является фактором терминации: катализирует выход однотяжного продукта из активного центра. Эту функцию выполняет фрагмент белка S1 OB₁₋₂₂, содержащий первые два OB-домена.

11. Установлена кристаллическая структура комплекса ко́ра Q β -репликазы с фрагментом ОВ₁₋₂. На пути выхода однотяжного продукта из активного центра обнаружен положительно заряженный тракт, формируемый с участием домена ОВ₂.

12. В бактериальных системах происходят рекомбинации между молекулами РНК.

13. Молекулы РНК способны самопроизвольно изменять свою первичную структуру в результате спонтанных рекомбинаций.

14. Помимо размножения молекул РНК, Q β -репликаза катализирует их рекомбинации, скорость которых гораздо выше скорости спонтанных рекомбинаций. При этом используется неизвестный ранее механизм.

Что предстоит узнать

Проект, начатый в 1986 году, еще не закончен; остались важные вопросы, на которые пока нет ответа. В частности:

1. Какова структура закрытой конформации и репликативного комплекса Q β -репликазы? Это необходимо выяснить, чтобы понять, как Q β -репликаза отличает свои (законные) матрицы от незаконных.

2. Каков механизм терминации синтезированной цепи и ее катализа белком S1? Сейчас мы знаем только то, что такой катализ существует, но его механизм остается загадкой.

3. Какова роль белков EF-Tu и EF-Ts в репликации РНК? Совершенно неясный вопрос, пока еще никому не удалось приблизиться к его решению.

4. Каков механизм катализа рекомбинации РНК Q β -репликазой?

5. Какова роль S1 в синтезе белка рибосомой, помимо связывания мРНК? Делает ли он в рибосоме что-то подобное тому, что делает в Q β -репликазе на стадии терминации?

Я благодарен внесшим вклад в работу над проектом сотрудникам группы/лаборатории биохимии вирусных РНК: Елене Владимировне Четверинной, Леониду Александровичу Воронину, Александру Валерьевичу Мунишкину, Виктору Ивановичу Угарову, Наталье Генриховне Берестовской, Александру Александровичу Волкову, Александру Петровичу Алимову, Александру Анатольевичу Демиденко, Тимуру Рустэмовичу Саматову, Марине Витальевне Фалалеевой, Дамиру Сергеевичу Копеину, Александре Владимировне Кравченко, Елене Александровне Узловой, Никите Николаевичу Васильеву, Александру Андреевичу Гордееву, Зарине Шаймуратовне Кутлубаевой; сотрудникам Института белка: Александру Сергеевичу Спирину, Виктору Дмитриевичу Васильеву, Игорю Юрьевичу Морозову, Петру Николаевичу Симоненко; зарубежным партнерам: Марату Миратовичу Юсупову, Lasse Jenner, Rune T. Kidmose, Gregers Rom Andersen, Charlotte R. Knudsen, Heidi Gytz, Durita Mohr, Paulina Seweryn, Yuichi Yoshimura, Fleur Dolman, Bosene Chelchessa, Frans A. A. Mulder, Ditlev E. Brodersen.

За финансовую поддержку работы над проектом благодарю Институт белка АН СССР, Российский фонд фундаментальных исследований, программу «Молекулярная и клеточная биология», Российский научный фонд, International Science Foundation, Howard Hughes Medical Institute, INTAS (International Association for the promotion of co-operation with scientists from the New Independent States of the former Soviet Union).

ЛИТЕРАТУРА

1. Haruna, I., Spiegelman, S. (1965) Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. *Science*, **150**, 884–886.
2. Weissmann, C., Feix, G., Slor, H. (1968) *In vitro* synthesis of phage RNA: The nature of the intermediates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 83–100.
3. Lewin, R. (1983) The birth of recombinant RNA technology. *Science*, **222**, 1313–1315.
4. Miele, E.A., Mills, D.R., Kramer, F.R. (1983) Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J. Mol. Biol.*, **171**, 281–295.
5. Mills, D.R., Peterson, R.L., Spiegelman, S. (1967) An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 217–224.
6. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Munishkin, A.V. (1991) On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q β replicase. *J. Mol. Biol.*, **222**, 3–9.
7. Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R., Spiegelman, S. (1972). A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, **69**, 3038–3042.
8. Mills, D.R., Kramer, F.R., Spiegelman, S. (1973) Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule. *Science*, **180**, 916–927.
9. Sumper, M., Luce, R. (1975) Evidence for *de novo* production of self-replicating and environmentally adapted RNA structures by bacteriophage Q β replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 162–166.
10. Munishkin, A.V., Voronin, L.A., Chetverin, A.B. (1988) An *in vivo* recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q β replicase. *Nature*, **333**, 473–475.
11. Horiuchi, K. (1975) Genetic studies of RNA phages. *RNA Phages* / ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 29–50.
12. Pasteur, L. (1860) Expériences relatives aux générations dites spontanées. *C. R. Acad. Sci.*, **50**, 303–307.
13. Chetverina, H.V., Chetverin, A.B. (1993) Cloning of RNA molecules *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2349–2353.
14. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (1995) Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления. *Патент РФ* 2048522.
15. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V. (1997) Method for amplification of nucleic acids in solid media. *U.S. Patent* 5,616,478.
16. Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B. (2005) Expressible molecular colonies. *Nucleic Acids Res.* **33**, e145.
17. Szostak, J.W. (1999) Constraints on the sizes of the earliest cells. *Size limits of very small microorganisms. Proceedings of a workshop* / Washington, D.C.: National Academy Press, 120–125.
18. Spirin, A.S. (2002) Omnipotent RNA. *FEBS Lett.*, **530**, 4–8.
19. Четверин А.Б. (2009) Можно ли собрать клетку из ее компонентов?

- Проблемы происхождения жизни / М.: Палеонтологический институт РАН, 9–27.
20. Chetverina, H.V., Samatov, T.R., Ugarov, V.I., Chetverin A.B. (2002) Molecular colony diagnostics: Detection and quantitation of viral nucleic acids by in-gel PCR. *BioTechniques* **33**, 150–156.
21. Четверин А.Б. (2010) Молекулярные колонии. *Вестник РАН*, **80**, 867–875.
22. Bentley, D.R. *et al.* (всего 194 авторов) (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, **456**, 53–59.
23. Munishkin, A.V., Voronin, L.A., Ugarov, V.I., Bondareva, L.A., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B. (1991) Efficient templates for Q β replicase are formed by recombination from heterologous sequences. *J. Mol. Biol.*, **221**, 463–472.
24. Wu, Y., Zhang, D.Y., Kramer, F.R. (1992) Amplifiable messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11769–11773.
25. Morozov, I.Yu., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B., Spirin A.S. (1993) Synergism in replication and translation of messenger RNA in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 9325–9329.
26. Billeter, M.A., Libonati, M., Viñuela, E., Weissmann, C. (1966) Replication of viral ribonucleic acid. X. Turnover of virus-specific double-stranded ribonucleic acid during replication of phage MS2 in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **241**, 4750–4757.
27. Brown, D., Gold, L. (1995) Selection and characterization of RNAs replicated by Q β replicase. *Biochemistry*, **34**, 14775–14782.
28. Palmenberg, A., Kaesberg, P. (1974) Synthesis of complementary strands of heterologous RNAs with Q β replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1371–1375.
29. Ugarov, V.I., Demidenko, A.A., Chetverin, A.B. (2003) Q β replicase discriminates between legitimate and illegitimate templates by having different mechanisms of initiation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44139–44146.
30. González, R.G., Haxo, R.S., Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein–nucleic acid interactions. *Biochemistry*, **19**, 4299–4303.
31. Ugarov, V.I., Chetverin, A.B. (2008) Functional circularity of legitimate Q β replicase templates. *J. Mol. Biol.*, **379**, 414–427.
32. Четверин А.Б. (2011) Парадоксы репликации РНК бактериального вируса. *Молекуляр. биология*, **45**, 160–172.
33. Berestovskaya, N.H., Vasiliev, V.D., Volkov, A.A., Chetverin A.B. (1988) Electron microscopy study of Q β replicase. *FEBS Lett.* **228**, 263–267.
34. Васильев Н.Н., Дженнер Л., Юсупов М.М., Четверин А.Б. (2010) Выделение и кристаллизация химерной Q β -репликазы, содержащей фактор элонгации EF-Ts *Thermus thermophilus*. *Биохимия*, **75**, 1091–1097.
35. Kidmose, R.T., Vasiliev, N.N., Chetverin, A.B., Andersen, G.R., Knudsen, C.R. (2010) Structure of the Q β replicase, an RNA-dependent RNA polymerase consisting of viral and host proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 10884–10889.
36. Kamen, R., Kondo, M., Römer, W., Weissmann, C. (1972) Reconstitution of Q β replicase lacking subunit α with protein-synthesis-interference factor i. *Eur. J. Biochem.*, **31**, 44–51.
37. Vasilyev, N.N., Kutlubaeva, Z.S., Ugarov, V.I., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B. (2013) Ribosomal protein S1 functions as a termination factor in RNA synthesis by Q β phage replicase. *Nat. Commun.*, **4**, 1781.

38. Gytz, H., Mohr, D., Seweryn, P., Yoshimura, Y., Kutlubayeva, Z., Dolman, F., Chelchessa, B., Chetverin, A.B., Mulder, F.A., Brodersen, D.E., Knudsen, C.R. (2015) Structural basis for RNA-genome recognition during bacteriophage Q β replication. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10893–10906.
39. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I. (1997) Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell*, **88**, 503–513.
40. Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B. (1999) Spontaneous rearrangements in RNA sequences. *FEBS Lett.*, **450**, 89–94.
41. Lai, M.M.C. (1992) RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.*, **56**, 61–79.
42. Kirkegaard, K., Baltimore, D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, **47**, 433–443.
43. Gmyl A.P., Belousov E.V., Maslova S.V., Khitrina E.V., Chetverin A.B., Agol V.I. (1999) Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. *J. Virol.*, **73**, 8958–8965.
44. Chetverin, A.B., Kopein, D.S., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov V.I. (2005) Viral RNA-directed RNA polymerases use diverse mechanisms to promote recombination between RNA molecules. *J. Biol. Chem.*, **280**, 8748–8755.
45. Четверин А.Б., Четверина Е. В. (2007) Научные и практические приложения молекулярных колоний. *Молекуляр. биология*, **41**, 284–296.
46. Васильев Н.Н. (2011) Структура коровой части репликазы фара Q β . Дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 135 с.
47. Chetverin, A.B. (2004) Replicable and recombinogenic RNAs. *FEBS Lett.*, **567**, 35–41.
48. Chetverin, A.B. (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett.* **460**, 1–5.