

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
АСПЕКТЫ ВИРУСОЛОГИИ

УДК 577.213/.217

ПАРАДОКСЫ РЕПЛИКАЦИИ РНК БАКТЕРИАЛЬНОГО ВИРУСА

© 2011 г. А. Б. Четверин\*

Институт белка Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 08.2010 г.

Принята к печати 08.2010 г.

Необычайная способность репликазы бактериофага Q $\beta$  размножить РНК вне клетки привлекала всеобщее внимание молекулярных биологов в конце 60-х—начале 70-х годов. Однако тогда ряд загадочных свойств этого фермента не получил удовлетворительного объяснения. Лишь в последнее время Q $\beta$ -репликаза начала раскрывать свои тайны, обещая дать ключ не только к пониманию механизма репликации генома этого бактериального вируса, но и к решению более общих фундаментальных и прикладных проблем.

**Ключевые слова:** РНК-зависимая РНК-полимераза, белки аппарата трансляции, экспоненциальное размножение РНК, концевое аденилирование, спонтанный синтез РНК, матричная специфичность, репликативный интермедиат.

PARADOXES OF REPLICATION OF RNA OF A BACTERIAL VIRUS, by A. B. Chetverin (Institute of Protein Research, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; \*e-mail: alexch@vega.protres.ru). The extraordinary ability of the bacteriophage Q $\beta$  replicase to amplify RNA outside the cell attracted attention of molecular biologists in the late 60's—early 70's. However, at that time, a number of puzzling properties of the enzyme did not receive a rational explanation. Only recently, Q $\beta$ -replicase began to uncover its secrets, promising to give a key not only to understanding the mechanism of replication of the genome of the bacterial virus, but also to the solution of more general fundamental and applied problems.

**Keywords:** RNA-dependent RNA polymerase, proteins of translation apparatus, exponential amplification of RNA, terminal adenylation, spontaneous RNA synthesis, template specificity, replicative intermediate.

ВВЕДЕНИЕ

Слово “парадокс” (от греческого παράδοξος — неожиданный, странный) толковый словарь русского языка Ожегова определяет как “явление, кажущееся невероятным и неожиданным” [1]. Словарь английского языка Вебстера предлагает следующее определение: “Нечто не согласующееся с повседневным опытом или имеющее противоречивые свойства” [2]. Наиболее интересное и образное определение парадокса принадлежит В.И. Далю: “[Нечто] странное, на первый взгляд дикое, озадачивающее, противное общему” [3]. Таких “противных общему” свойств много у Q $\beta$ -репликазы и осуществляемой ею репликации РНК.

Q $\beta$ -репликаза — это РНК-зависимая РНК-полимераза РНК-содержащего бактериального вируса бактериофага Q $\beta$ , паразитирующего на клетках *Escherichia coli*. Q $\beta$ -репликаза размножает РНК экспоненциально [4]. Такой процесс еще называют автокаталитическим, потому что реакция ускоряется по мере ее протекания. Матрицей

Q $\beta$ -репликазы является одноцепочечная РНК (оцРНК), на которой синтезируется одноцепочечная же комплементарная цепь. Как исходная матрица, так и продукт синтеза служат матрицами в следующем цикле репликации. Поэтому, пока репликаза остается в молярном избытке над матрицей, число матриц ( $N$ ) удваивается в каждом цикле репликации и нарастает как экспоненциальная функция от числа совершенных циклов ( $n$ ):  $N = 2^n$ . При продолжительности цикла 20 с (для РНК длиной 100–200 н. при температуре 37°C) из одной молекулы РНК за 10 мин образуется  $2^{30}$ , или около миллиарда, ее копий. Это — рекорд скорости амплификации генетического материала в бесклеточных системах. С помощью Q $\beta$ -репликазы была впервые продемонстрирована возможность образования молекулярных колоний — кластеров нуклеиновых кислот, являющихся клонами одиночных матричных молекул [5].

В конце 60-х годов наблюдался настоящий бум в исследованиях Q $\beta$ -репликазы, которая в то время была единственной РНК-зависимой РНК-по-

Принятые сокращения: АТК — аурицентрикарбоновая кислота; RQ-РНК — короткие РНК-матрицы Q $\beta$ -репликазы.

\* Эл. почта: alexch@vega.protres.ru

лимеразой, доступной в чистом виде. Ожидалось, что ее необычайную способность реплицировать РНК *in vitro* удастся использовать для решения разнообразных фундаментальных и прикладных задач, таких как клонирование и размножение генов в виде мРНК, исследование эволюции на молекулярном уровне, исследование молекулярного механизма репликации РНК, сверхчувствительная молекулярная диагностика [6, 7]. Однако в начале 80-х годов интерес к этому ферменту почти повсеместно угас из-за отсутствия существенного прогресса на всех направлениях (и, соответственно, сокращения финансирования исследований), и большинство исследователей переключились на более перспективные объекты.

Здесь будут рассмотрены пять парадоксов, хотя ими список “озадачивающих” свойств системы репликации бактериофага Q $\beta$  не исчерпывается. Это те самые парадоксы, о которых “сломали зубы” и прекратили исследования Q $\beta$ -репликазы ведущие лаборатории мира. Некоторые из этих парадоксов являются общими для репликаз целой группы РНК-вирусов, некоторые же присущи только Q $\beta$ -репликазе. Парадоксы пронумерованы произвольно, в соответствии с выбранным порядком изложения; номер не отражает ни хронологию открытия парадоксов, ни их относительную важность.

### ПАРАДОКС № 1: ДЛЯ СИНТЕЗА РНК Q $\beta$ -РЕПЛИКАЗА ИСПОЛЬЗУЕТ БЕЛКИ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ

Q $\beta$ -репликаза состоит из четырех белковых субъединиц, которые исходно были обозначены  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$  [8] – в соответствии с увеличением электрофоретической подвижности в ПААГ (рис. 1). Затем оказалось, что только одна из субъединиц,  $\beta$ , кодируется геномом бактериофага, а остальные три поставляются клеткой хозяина [8, 9]. Совершенно неожиданно выяснилось, что хозяйские субъединицы никакого отношения к синтезу РНК или ДНК не имеют, а являются компонентами клеточной системы трансляции. Это рибосомный белок S1 (субъединица  $\alpha$ ) [10–13] и факторы элонгации EF-Tu ( $\gamma$ ) и EF-Ts ( $\delta$ ) [14]. До сих пор неизвестно, что делают белоксинтезирующие компоненты в составе РНК-полимеразы. Показано лишь, что все они принимают участие в инициации синтеза РНК и не нужны для элонгации иницированных цепей [15].

В неинфицированных клетках *E. coli* EF-Tu катализирует при участии GTP кодон-зависимое связывание аминоксил-тРНК (aa-тРНК) с А-сайтом рибосомы через образование комплекса EF-Tu:GTP:aa-тРНК [16]. Поскольку при репликации инициаторным нуклеотидом является GTP, а 3'-конец природных матриц Q $\beta$ -репликазы (...CCA) совпадает с 3'-концом tRNA, предпола-

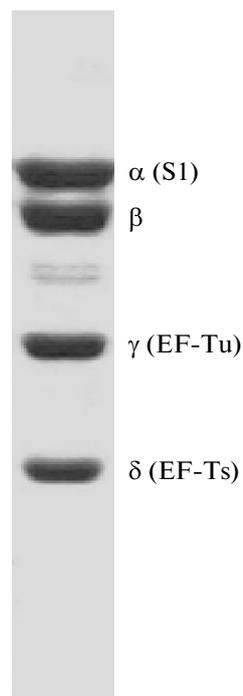
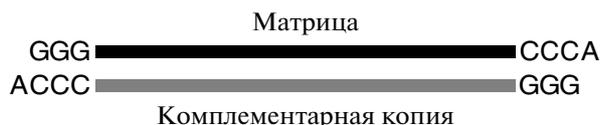


Рис. 1. Субъединицы Q $\beta$ -репликазы, разделенные с помощью ПААГ-электрофореза в присутствии SDS. Результат получен Н.Н. Васильевым.

галось, что роль EF-Tu при синтезе РНК аналогична его роли в синтезе белка, а именно что EF-Tu обеспечивает специфическое связывание GTP и 3'-конца матрицы в активном центре Q $\beta$ -репликазы при инициации синтеза РНК [14, 15]. Экспериментальная проверка этой гипотезы не дала однозначного ответа. Когда в молекуле Q $\beta$ -репликазы нормальный EF-Tu заменили на химически модифицированные варианты, не способные связывать aa-тРНК, это существенно не повлияло на активность Q $\beta$ -репликазы. Также не ухудшила активность Q $\beta$ -репликазы замена EF-Tu и EF-Ts на ковалентно перешитый комплекс EF-Tu–EF-Ts, не способный связывать GTP [17]. Однако исследования вариантов Q $\beta$ -репликазы, содержащих мутантные формы EF-Tu с нарушенной способностью связывать aa-тРНК, показали, что существует прямая корреляция между способностью EF-Tu связывать aa-тРНК и активностью Q $\beta$ -репликазы [18].

Клеточная роль EF-Ts состоит в катализе обмена GDP на GTP на EF-Tu, диссоциирующем от рибосомы в виде комплекса EF-Tu:GDP после связывания aa-тРНК в А-сайте и гидролиза GTP [16]. Было предположено, что в составе Q $\beta$ -репликазы EF-Ts стабилизирует EF-Tu в конформации, в которой тот приобретает сродство к матрицам репликазы вместо aa-тРНК [19]. Однако, как



**Рис. 2.** Схематичное изображение матрицы Q $\beta$ -репликазы и ее комплементарной копии.

сказано выше, не существует доказательств участия EF-Tu в связывании матриц Q $\beta$ -репликазы.

Долгое время детальные исследования структуры Q $\beta$ -репликазы были невозможны из-за отсутствия ее кристаллов, и была известна лишь грубая морфология этого фермента, полученная с помощью электронной микроскопии [20]. Совсем недавно получены первые кристаллы Q $\beta$ -репликазы, лишенной белка S1 [21, 22], и установлена ее кристаллическая структура с разрешением 2.5 Å [22]. Оказалось, что комплекс EF-Tu:EF-Ts в составе Q $\beta$ -репликазы имеет практически ту же структуру, что и в свободном виде, с той лишь разницей, что в составе репликазы структура “coiled-coil”, охватывающая остатки 190–217 молекулы EF-Ts, повернута на 18° по сравнению с ее положением в свободном комплексе EF-Tu:EF-Ts [23]. Каких-либо заметных изменений структуры EF-Tu, которые могли бы повлиять на его селективность в отношении РНК, не обнаружено. В то же время оказалось, что одна из  $\alpha$ -спиралей вирусной  $\beta$ -субъединицы репликазы взаимодействует с ССА-связывающим участком EF-Tu. Имеет ли это взаимодействие функциональное значение, в настоящий момент неизвестно.

Роль белка S1 представляется более определенной. При репликации геномной РНК фага Q $\beta$ -белок S1 в составе репликазы связывается с двумя участками (+)-цепи Q $\beta$ -РНК, называемыми “S-сайтом” и “M-сайтом”, удаленными от 5'-конца РНК приблизительно на 1/3 и 2/3 ее длины. С S-сайтом, расположенным перед цистроном белка оболочки, белок S1 связывается также и в составе рибосомы [6]. Однако функциональные последствия взаимодействия с S-сайтом в этих случаях различны. Если связывание рибосомы с S-сайтом приводит к усилению трансляции цистрона белка оболочки [24], то связывание Q $\beta$ -репликазы имеет прямо противоположный эффект – ингибирует трансляцию. Это освобождает (+)-цепь Q $\beta$ -РНК от рибосом и делает ее доступной для репликации [25]. Связывание же Q $\beta$ -репликазы с M-сайтом, в сочетании с действием белка Hfg (еще одного клеточного белка, необходимого для репликации геномной РНК фага Q $\beta$ , но не входящего в состав репликазы), индуцирует конформационное превращение (+)-цепи Q $\beta$ -РНК, экспонирующее обычно закрытый ее 3'-конец, и тем

самым запускает инициацию синтеза (–)-цепи Q $\beta$ -РНК [26].

Считается, что белок S1 нужен только для узнавания (+)-цепи Q $\beta$ -РНК и не нужен для синтеза РНК на других матрицах [10]. Однако, принимая во внимание тот факт, что этот вывод сделан на основании результатов, полученных при однократном копировании, а не экспоненциальном размножении РНК, к нему следует относиться с осторожностью.

## ПАРАДОКС № 2: НА 3'-КОНЦЕ МАТРИЦЫ ПРИСУТСТВУЕТ А, КОТОРЫЙ НИ ДЛЯ ЧЕГО НЕ НУЖЕН

Все реплицирующиеся матрицы Q $\beta$ -репликазы содержат на 3'-конце последовательность ...СССАОН [6, 7]. Первым прочитывается второй от 3' конца матрицы нуклеотид (С); первый же 3'-концевой нуклеотид (А) пропускается. Соответственно, первым 5'-концевым нуклеотидом продукта является GTP, чья трифосфатная группа сохраняется в зрелой РНК. На 3'-конце продукта тоже присутствует ...СССАОН, хотя на 5'-конце матрицы находится последовательность rppGGG... [27–30]. Таким образом, продукт синтеза не полностью комплементарен матрице (рис. 2). Было предположено, что для 3'-концевого аденилирования Q $\beta$ -репликаза использует внутреннюю последовательность ...UGGG... матрицы или растущей цепи, перескакивая на нее с 5'-концевого rppGGG... матрицы [31]. Однако такая последовательность встречается отнюдь не во всех реплицирующихся РНК, не говоря уже о трудности всегда определенным образом сориентировать ее относительно 5'-конца матрицы на стадии терминации.

Оказалось, что удаление 3'-концевого аденилата не снижает ни матричной активности, ни инфекционности Q $\beta$ -РНК, тогда как обе эти функции резко падают в результате удаления второго от 3'-конца цитидилата [31, 32]. Таким образом, 3'-концевой аденилат не только не прочитывается, но и вовсе не нужен ни для инициации синтеза РНК, ни для элонгации иницированной цепи. Более того, продуктом синтеза РНК на матрице, лишенной 3'-концевого А, является полноразмерная 3'-аденилированная РНК; следовательно, 3'-концевой аденилат не нужен также и для собственного воспроизведения на 3'-конце продукта. Аденилирование 3'-конца осуществляет именно Q $\beta$ -репликаза, так как оно наблюдается при использовании высокоочищенных препаратов фермента [31]. В то же время, Q $\beta$ -репликаза не может добавлять аденилат на 3'-конец РНК, ранее синтезированной и искусственно лишенной 3'-концевого А [30]. Следовательно, 3'-концевое аденилирование происходит до высвобождения растущей цепи РНК из репликативного комплекса. Отсюда родилась гипотеза, что 3'-

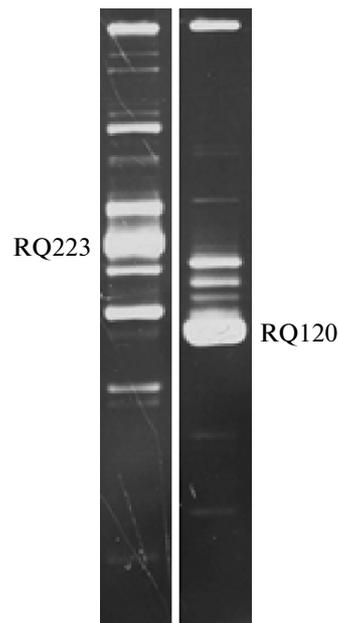
концевое аденилирование является составной частью механизма терминации [30].

До сих пор механизм терминации остается неизвестным, так как никому не удалось остановить процесс на этой стадии. Из кинетических исследований был сделан вывод, что при экспоненциальном синтезе коротких РНК на терминацию приходится около 90% времени репликационного цикла [33], т.е. 18 из 20 секунд и, следовательно, лишь 2 с – на инициацию и элонгацию вместе взятые. Таким образом, терминация является самой медленной стадией, и можно было предположить, что 3'-концевое аденилирование необходимо для преодоления кинетического барьера.

Попытка выяснить, нужно ли 3'-концевое аденилирование для терминации, была предпринята путем исследования синтеза РНК на укороченной с 5'-конца природной матрице Q $\beta$ -репликазы. Оказалось, что аденилирование не происходит, хотя такая матрица прочитывается неоднократно. Отсюда авторы сделали вывод, что не только инициация и элонгация, но также терминация и реинициация синтеза РНК (начало следующего цикла репликации) не требуют 3'-концевого аденилирования. В то же время, 3'-концевое аденилирование является матрице-зависимым, так как для него необходима 5'-концевая последовательность (или структура, формируемая с участием 5'-конца) реплицирующейся РНК. Поэтому, по выражению авторов, 3'-концевое аденилирование РНК “является репликативной функцией, которая не нужна для осуществления репликации” (it is a replicative function that is not required for replication to occur) [34]. В то же время, в этих экспериментах за 20 мин при 37°C на укороченной матрице синтезировалось лишь 3–5 комплементарных копий, что соответствует продолжительности репликационного цикла 4–6 мин. Это на порядок дольше, чем на полноразмерной матрице с участием 3'-концевого аденилирования (около 20 с). Поэтому сохраняется возможность, что 3'-концевое аденилирование ускоряет синтез РНК путем катализа терминации и/или реинициации. Для ответа на этот вопрос необходима разработка экспериментальной системы исследования терминации.

### ПАРАДОКС № 3: МАТРИЦЫ СТРОГО НЕОБХОДИМЫ, НО МОЖНО И БЕЗ НИХ

С момента открытия Q $\beta$ -репликазы было известно, что она является полимеразой, строго зависимой от матрицы. Более того, Q $\beta$ -репликаза оказалась исключительно избирательной в отношении матриц: она отказывалась размножать не только какие-либо клеточные РНК, но даже геномные РНК родственных бактериофагов, например MS2 [4, 35]. Тем более неожиданным оказалось наблюдение, что если очищенный препарат Q $\beta$ -репликазы инкубировать со всеми четырьмя NTP в



**Рис. 3.** Продукты спонтанного синтеза РНК, полученные в двух независимых реакциях [37]. Смесь очищенной Q $\beta$ -репликазы с АТФ, GTP, CTP и UTP инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Продукты реакции разделяли с помощью ПААГ-электрофореза и окрашивали бромистым этидием. Отмечено положение RQ223 РНК и RQ120 РНК длиной 223 и 120 н. соответственно.

отсутствие добавленной матрицы, то самопроизвольно синтезируются РНК [36]. На рис. 3 видно, что в этих условиях образуется много разных РНК, размер которых находится в диапазоне от нескольких десятков до тысяч нуклеотидов [37]. Казалось очевидным, что этот спонтанный синтез вызывается примесями RQ-РНК (коротких РНК, являющихся матрицами Q $\beta$ -репликазы, от *Replicable by Q $\beta$ -replicase*) в препаратах Q $\beta$ -репликазы [38].

Однако сотрудники лаборатории лауреата Нобелевской премии по химии Айгена (Eigen) в Геттингене (Германия) очистили Q $\beta$ -репликазу до состояния, когда добавление всего 5 молекул RQ-РНК вызывало стимуляцию синтеза РНК над спонтанным уровнем. Тем не менее, даже после того, как объем инкубационной смеси (и, следовательно, количество добавленной Q $\beta$ -репликазы) был уменьшен в 10000 раз, с 200 до 0.02 мкл, спонтанный синтез все равно наблюдался в каждом образце [39]. Чтобы объяснить этот парадокс, Айген и его сотрудники выдвинули гипотезу о самозарождении реплицирующихся РНК в пробирке. Более того, они объявили спонтанный синтез РНК “основополагающей (primary) экспериментальной моделью возникновения генетической информации путем эволюции на молекулярном уровне” [40]. По этой концепции [41, 42], в отсут-

ствии матрицы происходит следующее: сначала рибонуклеозидтрифосфаты беспорядочно конденсируются в полирибонуклеотиды, некоторые из полирибонуклеотидов случайно оказываются реплицируемыми, а затем слабо реплицируемые полирибонуклеотиды эволюционируют в эффективные матрицы РНК. Все это должно происходить в пределах часа при 37°C; поистине колоссальная скорость эволюции.

Удивительным было также то, что фингер-принты РНК, спонтанно синтезированных в независимых реакциях, часто оказывались очень похожими [39]. Наряду с другими обстоятельствами, это привело последователей Айгена к парадоксальному выводу: “Процесс “безматричного”, или *de novo*, синтеза РНК Q $\beta$ -репликазой важен для нашего понимания эволюции, поскольку он включает специфическое создание генетической информации белковым ферментом. Это противоречит центральной догме молекулярной биологии, согласно которой генетическая информация всегда передается от нуклеиновых кислот к белкам” [43].

Первое сомнение в состоятельности концепции самозарождения реплицирующихся РНК появилось после того, как мы случайно обнаружили среди продуктов спонтанного синтеза РНК, которая оказалась высокомолекулярной известным нуклеотидным последовательностям. Это RQ120 РНК, названная так из-за того, что она имеет в длину 120 н. Треть этой РНК оказалась почти идентичной половине транспортной РНК *E. coli* (tRNA<sup>Asp</sup>), а остальные 2/3 – почти идентичны участку цистрона белка оболочки геномной РНК фага Q $\beta$  [44]. Поскольку очевидно, что такие гомологии никак не могут возникнуть случайно, тем более, за время инкубации порядка одного часа, стало понятно, что так называемый спонтанный синтез направляется, в действительности, матрицами.

Источник матриц был установлен благодаря изобретению метода молекулярных колоний, в соответствии с которым РНК или ДНК размножают не в жидкости, а в геле (в частности, в агарозе). Это позволило подсчитывать число центров репликации. Использовали две чашки Петри с агарозой, в которой происходил синтез РНК. Одну чашку инкубировали открытой, другую закрытой. В открытой чашке образовалось гораздо больше центров репликации – колоний РНК (и, следовательно, в начале реакции там было гораздо больше реплицирующихся матриц), чем в закрытой чашке [45]. Отсюда следовало, что реплицирующиеся РНК, которые якобы синтезируются спонтанно, на самом деле привносятся в реакционную смесь из воздуха. Буквально единичных молекул матриц оказывается достаточно, чтобы “инфицировать” реакционную смесь и вы-

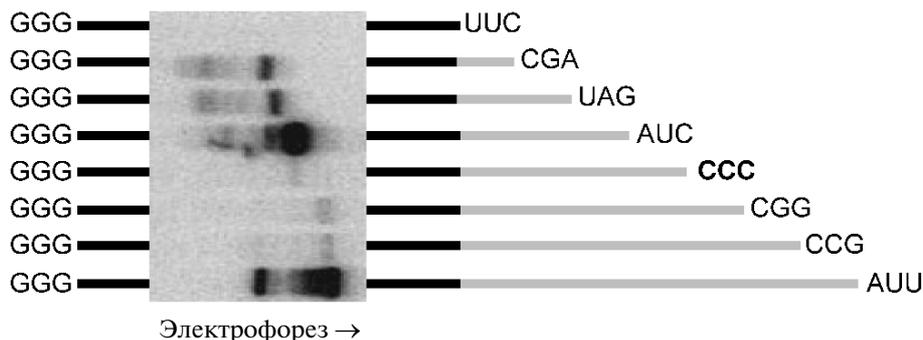
звать за короткое время образование большого количества продуктов.

Следует отметить, что данный парадокс является единственным, получившим к настоящему времени удовлетворительное объяснение.

#### ПАРАДОКС № 4: Q $\beta$ -РЕПЛИКАЗА ОЧЕНЬ СПЕЦИФИЧНА, НО КОПИРУЕТ ВСЕ ПОДРЯД

Следующий парадокс связан с матричной специфичностью Q $\beta$ -репликазы. По способу узнавания матриц Q $\beta$ -репликаза отличается от других известных полимераз, размножающих как РНК, так и ДНК. Она узнает свои матрицы, не используя ни праймеры, ни промоторы. Как она это делает, строго говоря, до сих пор не известно. Как сказано выше, общим у реплицирующихся молекул являются 3'-концевой СССА и 5'-концевой GGG. Кроме того, внутри молекулы обычно находится пиримидин-богатый участок [46], а вся молекула состоит из прочных шпилек [47]. Вот и все общие свойства реплицирующихся РНК, выявленные до сих пор. Казалось бы, РНК с такими свойствами должны встречаться весьма часто. Однако лишь единичные РНК, отобранные в лаборатории Ларри Голда с помощью процедуры SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) [48], из стартового набора 10<sup>12</sup> случайных последовательностей, заранее снабженных 5'-GGG и 3'-ССС концами, оказались реплицируемыми [49].

Дальнейшие исследования показали, что матричная специфичность Q $\beta$ -репликазы еще загадочнее. Хотя Q $\beta$ -репликаза исключительно избирательно *размножает* РНК, она крайне неразборчива в *однократном копировании* матриц (узнает практически любую РНК). Мы провели систематическое исследование этого вопроса [50]. Эффективно реплицирующуюся природную матрицу репликазы (RQ135 РНК) расщепили пополам, а затем на 3'-конец 5'-фрагмента добавили последовательности разной длины, разного нуклеотидного состава и получили набор нереплицирующихся РНК, различающихся 3'-концевыми (инициаторными) последовательностями (рис. 4). До этого считалось, что обязательным условием для прочитывания РНК Q $\beta$ -репликазой является наличие на 3'-конце олиго(С)-последовательности. Именно поэтому Голд и поместил ССС на 3'-конце всех случайных РНК, подвергнутых SELEX. Оказалась удивительная вещь: Q $\beta$ -репликаза узнает все варианты 5'-фрагмента, причем прочитывает их с начала до конца, а вариант, имеющий на 3'-конце олиго(С)-последовательность, вовсе не является лучшей матрицей для однократного копирования. То есть, на самом деле получается парадокс: с одной стороны, Q $\beta$ -репликаза исключительно привередлива, а с другой стороны, абсо-



**Рис. 4.** Способность вариантов 5'-фрагмента RQ135 РНК (обозначенного черной полосой), различающихся 3'-концевыми последовательностями (обозначенными серыми полосами), служить матрицами Q $\beta$ -репликазы. Продукты синтеза РНК в присутствии меченого нуклеотида разделяли с помощью ПААГ-электрофореза [50].

лютно всеядна и может копировать любую РНК. Тогда встает вопрос: если Q $\beta$ -репликаза умеет копировать практически любую РНК, то почему же не любую РНК она размножает?

Чтобы ответить на этот вопрос, мы сравнили, чем отличаются матрицы, которые просто копируются, и матрицы, которые размножаются. Матрицы, которые только копируются, но не умеют размножаться, мы назвали “незаконными”, а те, которые умеют размножаться — “законными”. Оказалось, что между законными и незаконными матрицами есть очень серьезные различия. Во-первых, на 3'-конце законной матрицы обязательно присутствует олиго(С), а у незаконной матрицы может быть любая 3'-концевая последовательность. Во-вторых, инициаторным нуклеотидом для законных матриц обязательно является GTP, а для незаконных матриц таковым может быть любой rNTP. В-третьих, если GTP заменить на ITP, то синтез РНК на законной матрице невозможен, потому что GTP строго необходим на стадии инициации. На незаконной же матрице синтез РНК происходит в отсутствие GTP столь же эффективно, как и в его присутствии. Самым же интересным различием оказалось следующее. Если провести инициацию на законной матрице, то образуется очень стабильный репликативный комплекс, который не разрушается вплоть до стадии терминации. Поэтому этот комплекс устойчив к ингибитору РНК-белковых взаимодействий ауринтрикарбоновой кислоте (АТК). Соответственно, если АТК добавить в реакционную смесь после инициации, то происходит элонгация вплоть до синтеза полноразмерной цепи, комплементарной матрице. Если же добавить АТК к незаконной матрице, то синтез РНК мгновенно останавливается. Это означает, что на незаконной матрице стабильный репликативный комплекс не образуется.

Таким образом, в отличие от ДНК-зависимых РНК-полимераз матричная специфичность Q $\beta$ -репликазы определяется не узнаванием специфич-

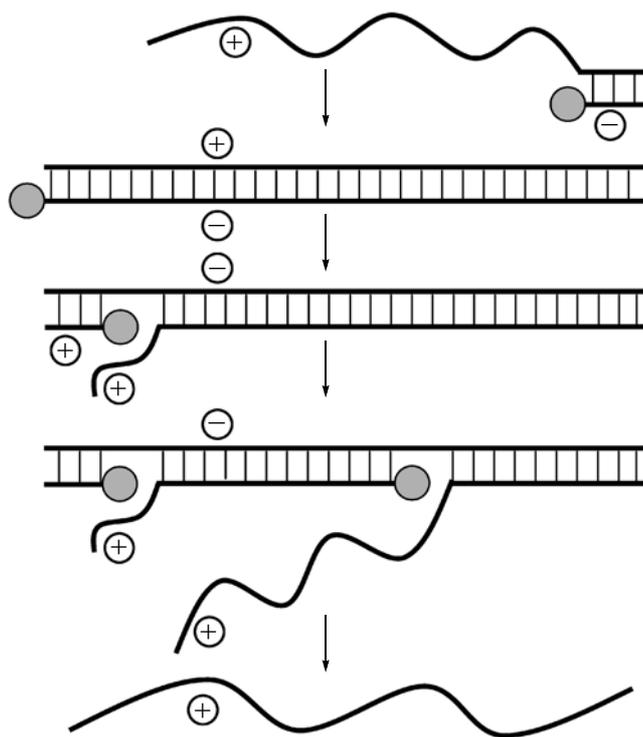
ческой структуры матрицы (промотора) в начале инициации, а способностью перехода в закрытую конформацию (устойчивую к АТК), т.е. событием, следующим за инициацией. Иными словами, Q $\beta$ -репликаза узнает и начинает копировать как законные, так и незаконные матрицы примерно одинаково хорошо, но только законные матрицы способны переводить репликазу в закрытую конформацию (в присутствии GTP). Устойчивость к АТК означает, что в закрытой конформации Q $\beta$ -репликаза является высокопроцессивной: репликативный комплекс не распадается до тех пор, пока не будет завершен синтез полноразмерной цепи, комплементарной матрице.

Выяснение структурных различий законных и незаконных матриц пока остается делом будущего. Решение этой проблемы позволило бы решить загадку матричной специфичности Q $\beta$ -репликазы и, вероятно, найти способ эффективного размножения *in vitro* любой заданной РНК.

#### ПАРАДОКС № 5: ОБРАЗУЯ ДВОЙНУЮ СПИРАЛЬ, МАТРИЦА И ПРОДУКТ ОСТАЮТСЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ

Остается открытым вопрос: а почему закрытая конформация Q $\beta$ -репликазы необходима для репликации РНК? И чем законная матрица отличается от незаконной (т.е., какая особенность законной матрицы вызывает переход репликазы в закрытую конформацию)?

Здесь мы переходим к пятому, последнему из рассматриваемых парадоксов. Когда в лаборатории Шпигельмана только начинали исследовать репликацию РНК Q $\beta$ -репликазой, то первые эксперименты привели авторов к выводу о том, что интермедиатом репликации является двуцепочечная РНК (дцРНК). Они испытывали промежуточные продукты на их устойчивость к РНКазе А, атакующей оцРНК. Оказалось, что самый ранний продукт репликации РНК полностью устойчив к РНКазе А. Авторы решили, что это — дцРНК,



**Рис. 5.** Схема репликации РНК через образование двуцепочечного интермедиата по Шпигельману [51]. Серыми кружками обозначена репликаза; знаки + и – обозначают полярность цепей РНК.

образующаяся в первом цикле репликации. Затем появляется продукт, который частично устойчив к РНКазе А. Это было интерпретировано как присутствие структур, в которых одноцепочечные копии синтезируются на двуцепочечной матрице. И только в конце второго репликативного цикла появляется чувствительная к РНКазе А одноцепочечная (+)-цепь, обладающая инфекционностью: ею можно трансфецировать сферопласты с образованием Q $\beta$ -фага [51]. Таким образом, согласно Шпигельману, репликация РНК происходит через образование двуцепочечного интермедиата (рис. 5).

Однако конкурент Шпигельмана Вайсманн продемонстрировал в очень изящных экспериментах, что все происходит не так и что в репликативном цикле двуцепочечные интермедиаты отсутствуют. На самом деле, все двуцепочечные и смешанные (частично двуцепочечные) интермедиаты – это артефакты процедуры выделения РНК: они образуются под действием любого агента, нарушающего целостность репликазы (фенол, детергент, протеаза). Более того, Q $\beta$ -репликаза в принципе не способна прочитывать дуплексы [52]. Вайсманн показал, что непосредственным продуктом копирования (+)-цепи является одноцепочечная (–)-цепь.

Получается парадокс: для синтеза комплементарной цепи по принципу Уотсона–Крика необходимо, чтобы она была спарена с матрицей, т.е. находилась в составе двойной спирали. Однако для обеспечения дальнейшей репликации матрица и комплементарная копия должны оставаться одноцепочечными, т.е. неспаренными. С тем же “конформационным парадоксом” должны были сталкиваться гипотетические репликазы древнего мира РНК [53]. Там возникают те же самые проблемы. К настоящему времени показано, что рибозимы могут копировать матрицу, но в результате образуется дцРНК, которая является конечным (мертвым) продуктом синтеза [54]. На этом репликация прекращается, и решение проблемы репликации РНК рибозимами пока так и не найдено.

Вайсманн рассмотрел три возможных решения конформационного парадокса [52].

(1) Двойную спираль разрушает репликаза, подобно молнии (zipper) разделяя матрицу и растущую цепь, которые затем стабилизируются в одноцепочечном состоянии внутримолекулярной вторичной структурой.

Однако, как следует из экспериментов Вайсманна, эти цепи немедленно образуют двойную спираль при воздействии на репликативный комплекс любого денатурирующего белок агента — не только фенола, но также протеаз и детергента, которые не влияют на стабильность вторичной структуры РНК, но разрушают структуру белка. Следовательно, внутримолекулярная структура РНК удерживать растущую цепь и матрицу в одноцепочечном состоянии (в составе репликативного комплекса) не может.

(2) Обратному отжигу матрицы и растущей цепи препятствует некий РНК-связывающий белок, одевающий их по всей длине.

Однако одноцепочечное состояние репликативного комплекса поддерживается даже в чистой системе репликации, где из белков есть только Q $\beta$ -репликаза; более того, даже тогда, когда молярная концентрация репликазы меньше, чем концентрация РНК. Иными словами, в условиях, когда нет белка, способного одеть комплементарные цепи РНК по всей длине.

(3) Репликаза удерживает 3'-конец матрицы и 5'-конец растущей цепи в течение всего цикла репликации с образованием структуры репликативного комплекса типа бабочки (рис. 6), что налагает топологические ограничения на завивание цепей в двойную спираль: растущая цепь сможет образовать с матрицей двойную спираль лишь на ограниченном протяжении, после чего цепи будут вынуждены разойтись.

Это действительно могло бы решить конформационный парадокс. Тем не менее, проблема состоит в том, что, как следует из экспериментов, на

одной матрице одновременно может синтезироваться несколько комплементарных цепей [55]. Модель же бабочки позволяет синтезировать на матрице только одну цепь, поскольку репликаза, синтезирующая эту цепь, должна постоянно удерживать инициаторный 3'-конец матрицы и тем самым не разрешать инициацию других цепей.

Однако проблема была бы решена, если бы матрица имела кольцевую структуру. Может ли матрица Q $\beta$ -репликазы образовать такую структуру? В свое время Шпигельман предположил, что такая структура существует на основании того, что матричная активность геномной РНК Q $\beta$ -фага резко падает при ее фрагментации на половинки. Чтобы объяснить этот результат, Шпигельман выдвинул концепцию функциональной циркулярности РНК, т.е. «способность матрицы предъявлять репликазе оба своих конца на стадии инициации». По Шпигельману, эта способность позволяет Q $\beta$ -репликазе уже при инициации «почувствовать», цела ли матрица. Он также предложил модель «амфоры», суть которой состоит в том, что матрица могла бы образовать кольцо, если бы имела комплементарные концы, способные спариваться, тогда репликаза могла бы узнавать концевую спираль, и это служило бы свойством, позволяющим узнавать целые матрицы [56]. Сейчас такая структура называется моделью «сковородки», а горлышко амфоры – «pan-handle» (ручкой сковородки).

Действительно, структура типа сковородки была продемонстрирована для многих вирусных РНК, но только не для РНК Q $\beta$ -фага. Оказалось, что матрицы Q $\beta$ -репликазы действительно имеют комплементарные концы, но слишком короткие, чтобы образовать стабильную спираль, – всего 3–4 н. Конечно, это не может удержать РНК в кольцевой структуре. Чтобы объяснить результат Шпигельмана, Вайсманн предположил, что неспособность фрагментированной матрицы размножаться может быть простым следствием того, что инициаторный 3'-ССС комплементарной цепи не может образоваться и, следовательно, такая укороченная (–)-цепь не может служить матрицей для синтеза (+)-цепи в следующем цикле репликации [57].

Тем не менее, анализ возможной укладки вторичной структуры известных законных матриц Q $\beta$ -репликазы показал, что все они потенциально способны спариваться своими концами с образованием черешка молекулы, и всегда обнаруживается прилегающая шпилька, способная образовать общую с черешком молекулы, стэкинг-структуру (рис. 7). Видно, что указанная прилегающая шпилька, как правило, содержит дефекты. Однако зондирование РНК с помощью рибонуклеаз показывает, что вся структура, состоящая из черешка молекулы и прилегающей шпильки,

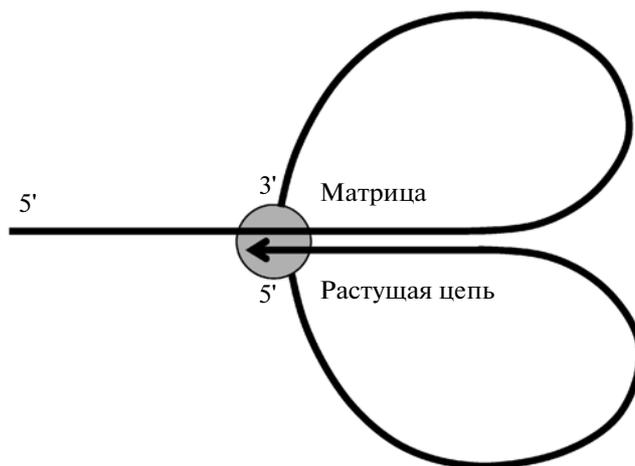
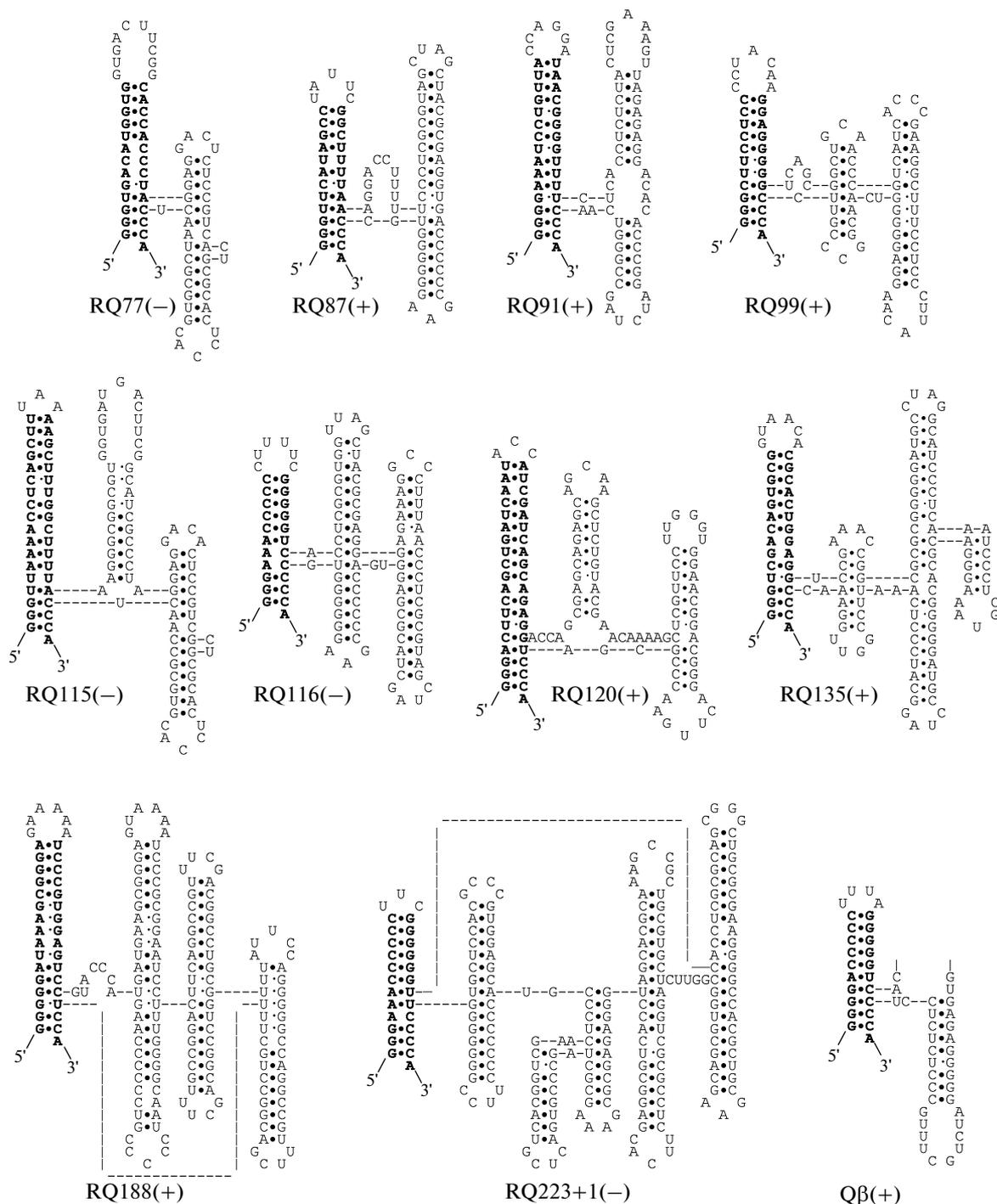


Рис. 6. Структура репликативного комплекса типа бабочки, которая препятствует формированию протяженной двойной спирали между прочитанным участком матрицы и растущей цепью РНК благодаря образованию двух колец, не способных завиться друг относительно друга из-за топологических ограничений.

узнается рибонуклеазой  $V_1$  (которая специфична к А-форме РНК) и не узнается нуклеазой из золотистой фасоли (mung bean), специфичной к одноцепочечным полинуклеотидам [44, 58]. Иными словами, такая комбинированная структура представляет собой непрерывную двойную спираль.

Играет ли такая структура какую-либо функциональную роль? Чтобы это выяснить, мы использовали RQ135 РНК, которую разными способами «портили» с тем, чтобы выяснить, какие из элементов ее структуры важны для репликации [66]. Во-первых, РНК расщепили приблизительно пополам (при этом полученные 5'- и 3'-фрагменты сохранили способность нековалентно ассоциировать через образование Уотсон–Криковских пар оснований), а во-вторых, ввели точечные мутации на 5'-конце целой РНК и ее 5'-фрагмента: G во втором и третьем положении оба или поодиночке заменили на А, тем самым ослабив способность 5'- и 3'-концов РНК к взаимодействию.

Оказалось, что повреждения 5'-конца матрицы резко снижают начальную скорость синтеза РНК. Полное удаление 5'-фрагмента снизило матричную активность остаточной РНК (3'-фрагмента) в 90 раз. Если 3'-фрагмент отжечь с 5'-фрагментом (т.е., восстановить вторичную структуру без восстановления ковалентной непрерывности полинуклеотида), то его матричная активность возрастает в 30 раз – почти до активности целой RQ135 РНК. Точечные мутации на 5'-конце на 20–30% снижают матричную активность целой РНК, но в гораздо большей степени (в 3–4 раза) снижают матричную активность фрагментированной РНК (отожженной смеси 5'- и 3'-фрагментов) [66].



**Рис. 7.** Модели вторичных структур реплицирующихся РНК: RQ77 (исходное название – СТ) [59], RQ87 (MNV-11) [60], RQ91 (WS-1, nanovariant) [61], RQ99 (MAR3) [62], RQ115 (microvariant) [63], RQ116 (SV-11) [64], RQ120 [44], RQ135 [58], RQ188 (SV-5) [64], RQ223 (MDV-1, midvariant) [65], Q $\beta$  [Martin Billeter, личное сообщение]. С левой стороны каждой структуры показана концевая спираль, образуемая черешком молекулы и прилегающей шпилькой. Для каждой РНК цепь противоположного знака способна образовать симметричную структуру, в которой концевая спираль располагается справа. Пунктирные линии соединяют нуклеотиды, соседствующие в первичной структуре. Для (+)-цепи геномной Q $\beta$ -РНК, длина которой превышает 4000 н., показаны только концевые участки.

Более того, оказалось, что мутации на 5'-конце матрицы усиливают зависимость законных матриц от концентрации инициаторного нуклеотида – GTP; причем чем больше испорчен 5'-конец, тем

бóльшая концентрация GTP необходима для синтеза такого же количества продукта. С другой стороны, копирование 5'-фрагмента, который является незаконной матрицей, нечувствительно к

концентрации ГТР независимо от того, какая мутация присутствует на его же 5'-конце и какая последовательность является инициаторной (3'-концевой). Мутации на 5'-конце матрицы также снижают скорость и выход инициации синтеза РНК. Скорость инициации измеряли путем инкубации репликазы, РНК и ГТР в течение разного времени с последующей остановкой инициации добавлением АТК. Образование инициаторного комплекса регистрировали путем измерения количества полноразмерного продукта при добавлении к такой смеси недостающих нуклеотидов. Оказалось, что эффективность инициации на РНК, несущей двойную мутацию на 5'-конце, вдвое меньше, чем на РНК дикого типа [66].

И наконец, мутации на 5'-конце снижают стабильность постинициаторного репликативного комплекса. Эксперимент осуществляли следующим образом. Проводили инициацию в присутствии ГТР, через 10 мин инкубации добавляли АТК и давали репликативному комплексу распаться разное время, а затем добавляли недостающие нуклеотиды, чтобы остановить распад и дать возможность сохранившемуся комплексу синтезировать полноразмерный продукт. Оказалось, что введение даже одиночных мутаций на 5'-конец матрицы существенно увеличивает скорость распада репликативного комплекса [66].

Таким образом, 5'-конец законной матрицы взаимодействует с 3'-концом на стадии инициации синтеза РНК и после нее. У незаконных матриц такое взаимодействие отсутствует. Законные матрицы Q $\beta$ -репликазы обладают свойством функциональной циркулярности – так, как это в свое время определил Шпигельман.

### ГИПОТЕЗА: КОНЦЕВАЯ СПИРАЛЬ – КЛЮЧЕВОЙ СТРУКТУРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЗАКОННЫХ МАТРИЦ

Обсужденная выше составная концевая спираль, которая может быть образована всеми реплицирующимися РНК, могла бы, во-первых, служить структурным элементом, отличающим законные матрицы от незаконных (в частности, обеспечивать переход репликазы в закрытую конформацию), а во-вторых, удерживая законную матрицу в кольцевой конфигурации (вероятно, с помощью Q $\beta$ -репликазы), препятствовать ее отжигу с растущей цепью на стадии элонгации. На рис. 8 показано, что в такой ситуации на одной матрице могли бы одновременно синтезироваться несколько комплементарных цепей РНК, как это и наблюдается в эксперименте. Подобным же образом, только уже без участия белков, конформационный парадокс мог решаться при репликации матриц в древнем мире РНК.

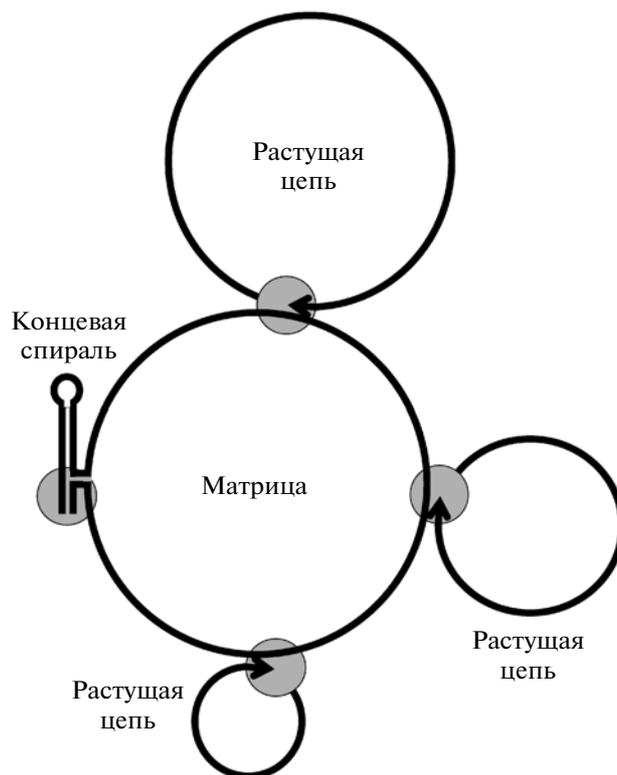


Рис. 8. Гипотетическая структура репликативного комплекса, в котором на одной матрице, удерживаемой в виде кольца с помощью концевой спирали, одновременно синтезируется несколько комплементарных цепей РНК.

Важно отметить, что для узнавания законных матриц важна не просто определенная вторичная структура (концевая спираль), но и первичная структура концевых участков. В частности, олиго(С) на 3'-конце совершенно необходим. Так, негативные эффекты 5'-концевых мутаций (G $\rightarrow$ A) нельзя исправить "компенсаторными" мутациями на 3'-конце (С $\rightarrow$ U). Возможно, что, подобно рестриктазам, Q $\beta$ -репликаза узнает не просто сахарофосфатный остов двойной спирали, но также и конфигурацию ее желобков.

Другой вопрос – как прочитывается концевая спираль на стадии инициации, если для инициации необходима именно спиральная конфигурация. Возможно, что элемент, образованный спаренными 5'-концевым олиго(G) и 3'-концевым олиго(С), Q $\beta$ -репликаза прочитывает без его расплетания и, синтезируя олиго(G), формирует тройную спираль. Именно это могло бы приводить к переходу репликазы в закрытую конформацию, из которой та не может выйти вплоть до терминации и в которой элонгация иницированной цепи происходит по правилу комплементарности Уотсона и Крика.

Еще один вопрос — как происходит выход репликазы из закрытой конформации на стадии терминации? Похоже, перейдя в закрытую конформацию, Q $\beta$ -репликаза оказывается в ловушке, из которой без посторонней помощи выбраться не может. Вероятно, безматричное добавление А на 3'-конце новосинтезированной цепи РНК (парадокс № 2) является спусковым механизмом для этого выхода, а роль АТФ на стадии терминации может быть прямо противоположна роли ГТФ при инициации: в то время как ГТФ вводит репликазу в закрытую конформацию, АТФ выводит ее из этой конформации. В этой связи напомним, что нигде, кроме терминации, 3'-концевой А не участвует. Вероятно, что многие парадоксы репликации тесно связаны друг с другом и являются разными проявлениями ее молекулярного механизма.

Все эти проблемы являются предметом дальнейших исследований. Большие надежды связаны с последними успехами в кристаллизации и рентгеноструктурном исследовании Q $\beta$ -репликазы [21, 22]. Дальнейшими шагами в этом направлении должны стать кристаллографические исследования функциональных комплексов Q $\beta$ -репликазы, прежде всего, ее комплексов с законными и незаконными матрицами до и после стадии инициации. Это дало бы возможность прямо проверить вышеизложенную гипотезу о роли концевой спирали в узнавании Q $\beta$ -репликазой ее законных матриц и в поддержании одноцепочечного состояния репликативного интермедиата.

Благодарю Е.В. Четверину за критическое чтение рукописи, а также ее и других соавторов за участие в исследованиях Q $\beta$ -репликазы в разное время на протяжении четверти века: В.И. Угарова, А.В. Мунишкина, Л.А. Воронина, А.А. Демиденко, Н.Н. Васильева.

Данная работа поддерживалась Академией наук СССР/Российской академией наук, Медицинским институтом Говарда Хьюза, Российским фондом фундаментальных исследований, ИНТАС и программой “Молекулярная и клеточная биология”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ожегов С.И., Шведова Н.Ю. 1993. *Толковый словарь русского языка*. М.: Азъ.
2. *Webster's New Universal Unabridged Dictionary*, 2nd edn. Ed. McKechnie J.L. Cleveland, Ohio: Dorset & Barber, 1983.
3. Даль В.И. 2002. *Толковый словарь живого великорусского языка*. М.: Олма-пресс.
4. Naruna I., Spiegelman S. 1965. Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. *Science*. **150**, 884–886.
5. Четверин А.Б., Четверина Е.В. 2007. Научные и практические приложения молекулярных колоний. *Молекуляр. биология*. **41**, 284–296.
6. Четверин А.Б. 1998. Бактериофаг Q $\beta$  как объект молекулярной биологии. *Успехи биол. химии*. **38**, 3–75.
7. Chetverin A.B., Spirin A.S. 1995. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **51**, 225–270.
8. Kondo M., Gallerani R., Weissmann C. 1970. Subunit structure of Q $\beta$  replicase. *Nature*. **228**, 525–527.
9. Kamen R. 1970. Characterization of the subunits of Q $\beta$  replicase. *Nature*. **228**, 527–533.
10. Kamen K., Kondo M., Romer W., Weissmann C. 1972. Reconstitution of Q $\beta$  replicase lacking subunit  $\alpha$  with protein-synthesis-interference factor i. *Eur. J. Biochem.* **31**, 44–51.
11. Groner Y., Scheps R., Kamen R., Kolakofsky D., Revel M. 1972. Host subunit of Q $\beta$  replicase is translation control factor i. *Nat. New Biol.* **239**, 19–20.
12. Wahba A.J., Miller M.J., Niveleau A., Landers T.A., Carmichael G.C., Weber K., Hawley D.A., Slobin L.I. 1974. Subunit I of Q $\beta$  replicase and 30S ribosomal protein S1 of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **249**, 3314–3316.
13. Inouye H., Pollack Y.I., Pêtre J. 1974. Physical and functional homology between ribosomal protein S1 and interference factor i. *Eur. J. Biochem.* **45**, 109–117.
14. Blumenthal T., Landers T.A., Weber K. 1972. Bacteriophage Q $\beta$  replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**, 1313–1317.
15. Landers T.A., Blumenthal T., Weber K. 1974. Function and structure in ribonucleic acid phage Q $\beta$  ribonucleic acid replicase. The roles of the different subunits in transcription of synthetic templates. *J. Biol. Chem.* **249**, 5801–5808.
16. Lucas-Lenard J., Lipmann F. 1971. Protein biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 409–448.
17. Blumenthal T., Carmichael G.G. 1979. RNA replication: Function and structure of Q $\beta$  replicase. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 525–548.
18. Mathu S.G.J., Knudsen C.R., van Duin J., Kraal B. 2003. Isolation of Q $\beta$  polymerase complexes containing mutant species of elongation factor Tu. *J. Chromatogr. B*. **786**, 279–286.
19. Karring H., Mathu S., van Duin J., Clark B.F.C., Kraal B., Knudsen C.R. 2004. Q $\beta$  phage resistance by deletion of the coiled-coil motif in elongation factor Ts. *J. Biol. Chem.* **279**, 1878–1884.
20. Berestovskaya N.H., Vasiliev V.D., Volkov A.A., Chetverin A.B. 1988. Electron microscopy study of Q $\beta$  replicase. *FEBS Lett.* **228**, 263–267.
21. Васильев Н.Н., Дженнер Л., Юсупов М.М., Четверин А.Б. 2010. Выделение и кристаллизация химерной Q $\beta$ -репликазы, содержащей фактор элонгации EF-Ts *Thermus thermophilus*. *Биохимия*. **75**, 1091 – 1097.
22. Kidmose R.T., Vasiliev N.N., Chetverin A.B., Andersen G.R., Knudsen C.R. 2010. Structure of the Q $\beta$  replicase, an RNA-dependent RNA polymerase consisting of viral and host proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 10884–10889.
23. Kawashima T., Berthet-Colomunas C., Wulff M., Cusack S., Leberman R. 1996. The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu·EF-Ts complex at 2.5E resolution. *Nature*. **379**, 511–518.

24. Boni I.V., Isaeva D.M., Musyuchenko M.L., Tzareva N.V. 1991. Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **19**, 155–162.
25. Kolakofsky D., Weissmann C. 1971. Possible mechanism for transition of viral RNA from polysome to replication complex. *Nat. New Biol.* **231**, 42–46.
26. Schuppli D., Miranda G., Qiu S., Weber H. 1998. A branched stem-loop structure in the M-site of bacteriophage Q $\beta$  RNA is important for template recognition by Q $\beta$  replicase holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **283**, 585–593.
27. Banerjee A.K., Eoyang L., Hori K., August J.T. 1967. Replication of RNA viruses. IV. Initiation of RNA synthesis by the Q $\beta$  RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **57**, 986–993.
28. Bishop D.H., Pace N.R., Spiegelman S. 1967. The mechanism of replication: a novel polarity reversal in the *in vitro* synthesis of Q $\beta$  RNA and its complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 1790–1797.
29. Goodman H.M., Billeter M.A., Hindley J., Weissmann C. 1970. The nucleotide sequence at the 5'-terminus of the Q $\beta$  RNA minus strand. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **67**, 921–928.
30. Weber H., Weissmann C. 1970. The 3'-termini of bacteriophage Q $\beta$  plus and minus strands. *J. Mol. Biol.* **51**, 215–224.
31. Rensing U., August J.T. (1969) The 3'-terminus and the replication of phage RNA. *Nature.* **224**, 853–856.
32. Kamen R. 1975. Structure and function of the Q $\beta$  RNA replicase. In: *RNA Phages*. Ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 203–234.
33. Biebricher C.K., Eigen M., Gardiner W.C. 1983. Kinetics of RNA replication. *Biochemistry.* **22**, 2544–2559.
34. Bausch J.N., Kramer F.R., Miele E.A., Dobkin C., Mills D.R. 1983. Terminal adenylation in the synthesis of RNA by Q $\beta$  replicase. *J. Biol. Chem.* **258**, 1978–1984.
35. Haruna I., Spiegelman S. 1965. Specific template requirements of RNA replicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 579–587.
36. 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.
37. Мунишкин А.В., Воронин Л.А., Четверин А.Б. 1987. Малая реплицирующаяся РНК, комплементарная участку цистрона белка оболочки фага Q $\beta$ . В сборнике: *Структура и биосинтез белков*, вып. 1. Ред. Спириин А.С. Пушино: Институт белка АН СССР, С. 35–42.
38. Weissmann C., Billeter M.A., Goodman H.M., Hindley J., Weber H. 1973. Structure and function of phage RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **42**, 303–328.
39. Sumper M., Luce R. 1975. Evidence for de novo production of self-replicating and environmentally adapted RNA structures by bacteriophage Q $\beta$  replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 162–166.
40. Biebricher C.K., Eigen M., McCaskill J.S. 1993. Template-directed and template-free RNA synthesis by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **231**, 175–179.
41. Biebricher C., Eigen M., Luce R. 1981. Product analysis of RNA generated *de novo* by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **148**, 369–390.
42. Biebricher C., Eigen M., Luce R. 1986. Template-free RNA synthesis by Q $\beta$  replicase. *Nature.* **321**, 89–91.
43. McCaskill J.S., Bauer G.J. 1993. Images of evolution: origin of spontaneous RNA replication waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 4191–4195.
44. Munishkin A.V., Voronin L.A., Chetverin A.B. 1988. An *in vivo* recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q $\beta$  replicase. *Nature.* **333**, 473–475.
45. Chetverin A.B., Chetverina H.V., Munishkin A.V. 1991. On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **222**, 3–9.
46. Brown D., Gold L. 1995. Template recognition by an RNA-dependent RNA polymerase: identification and characterization of two RNA binding sites on Q $\beta$  replicase. *Biochemistry.* **34**, 14765–14774.
47. Axelrod V.D., Brown E., Priano C., Mills D.R. 1991. Coliphage Q $\beta$  RNA replication: RNA catalytic for single-stranded release. *Virology.* **184**, 595–608.
48. Tuerk C., Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* **249**, 505–510.
49. Brown D., Gold L. 1995. Selection and characterization of RNAs replicated by Q $\beta$  replicase. *Biochemistry.* **34**, 14775–14782.
50. Ugarov V.I., Demidenko A.A., Chetverin A.B. 2003. Q $\beta$  replicase discriminates between legitimate and illegitimate templates by having different mechanisms of initiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 44139–44146.
51. Spiegelman S., Pace N.R., Mills D.R., Levisohn R., Eikhom T.S., Taylor M.M., Peterson R.L., Bishop D.H. 1968. The mechanism of RNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**, 101–124.
52. 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.
53. Gilbert W., de Souza S.J. 1999. Introns and the RNA world. In: *The RNA World*, 2nd edn. Eds Gesteland R.F., Cech T., Atkins J.F. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 221–231.
54. Bartel D.P. 1999. Re-creating an RNA replicase. In: *The RNA World*, 2nd edn. Eds Gesteland R.F., Cech T., Atkins J.F. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 143–162.
55. Thach S.S., Thach R.E. 1973. Mechanism of viral replication. I. Structure of replication complexes of R17 bacteriophage. *J. Mol. Biol.* **81**, 367–380.
56. Haruna I., Spiegelman S. 1965. Recognition of size and sequence by an RNA replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 884–886.
57. Weissmann C., Billeter M.A., Goodman H.M., Hindley J., Weber H. 1973. Structure and function of phage RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **42**, 303–328.
58. Munishkin A.V., Voronin L.A., Ugarov V.I., Bondareva L.A., Chetverina H. V., Chetverin A.B. 1991. Efficient templates for Q $\beta$  replicase are formed by recombination

- from heterologous sequences. *J. Mol. Biol.* **221**, 463–472.
59. Priano C., Kramer F.R., Mills D.R. 1987. Evolution of the RNA coliphages: the role of secondary structures during RNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 321–330.
60. Biebricher C.K. 1987. Replication and evolution of short-chained RNA species replicated by Q $\beta$  replicase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 299–306.
61. Schaffner W., Rüegg K.J., Weissmann C. 1977. Nano-variant RNAs: nucleotide sequence and interaction with bacteriophage Q $\beta$  replicase. *J. Mol. Biol.* **117**, 877–907.
62. Moody M.D., Burg J.L., DiFrancesco R., Lovern D., Stanik W., Lin-Goerke J., Mahdavi K., Wu Y., Farrel 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.
63. Mills D.R., Kramer F.R., Dobkin C., Nishihara T., Spiegelman S. 1975. Nucleotide sequence of microvariant RNA: another small replicating molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 4252–4256.
64. Biebricher C.K., Luce R. 1992. In vitro recombination and terminal elongation of RNA by Q $\beta$  replicase. *EMBO J.* **11**, 5129–5135.
65. Lizardi P.M., Guerra C.E., Lomeli H., Tussie-Luna I., Kramer F.R. 1988. Exponential amplification of recombinant-RNA hybridization probes. *BioTechnology.* **6**, 1197–1202.
66. Ugarov V.I., Chetverin A.B. 2008. Functional circularity of legitimate Q $\beta$  replicase templates. *J. Mol. Biol.* **379**, 414–427.