

УДК 577.213/.217

НЕРАЗГАДАННЫЕ ЗАГАДКИ Q β -РЕПЛИКАЗЫ¹© 2019 г. А. Б. Четверин^a, *, В. И. Угаров^a, Е. В. Четверина^a^aИнститут белка Российской академии наук, Пущино, Московская область, 142290 Россия*e-mail: achetverin@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2019 г.

После доработки 01.06.2019 г.

Принята к публикации 01.06.2019 г.

Репликаза фага Q β стала первой РНК-зависимой РНК-полимеразой, очищенной до гомогенности и интенсивно изучаемой *in vitro*. В середине шестидесятых годов статьи о ней и родственных репликазах появлялись едва ли не в каждом номере журнала Proc. Natl. Acad. Sci. USA. К 1968 году механизм действия Q β -репликазы казался почти полностью ясным. Однако даже сейчас, спустя полвека, ряд фундаментальных вопросов остается без ответа. Как репликазе удается предотвратить отжиг матрицы и комплементарной ей копии в течение всего репликационного цикла? Как она узнает свои матрицы? Какова функция факторов трансляции, присутствующих в молекуле репликазы? Какой механизм использует репликаза для объединения (рекомбинации) молекул РНК? Даже определение в 2010 году кристаллической структуры Q β -репликазы не сильно помогло ответить на эти вопросы. Таким образом, все еще остается большой простор для открытий в репликации фага Q β , одного из самых маленьких известных вирусов.

Ключевые слова: РНК-зависимая РНК-полимераза, репликативный интермедиат, распознавание матриц, закрытая конформация, рибосомный белок S1, фактор элонгации Tu, фактор элонгации Ts, рекомбинация РНК

DOI: 10.1134/S0026898419060041

ВВЕДЕНИЕ

Как следует из названия статьи, еще остаются нерешенные вопросы, связанные с репликацией бактериофага Q β , несмотря на то, что это один из самых маленьких и наиболее интенсивно изучавшихся вирусов. Геном фага Q β представлен (+)-цепью РНК, состоящей всего из 4217 н., из которых почти половина кодирует каталитическую субъединицу репликазы – РНК-зависимой РНК-полимеразы, отвечающей за репликацию геномной РНК [1].

Репликаза Q β известна своей беспрецедентной способностью размножить генетический материал *in vitro*. Еще в 1965 году группа S. Spiegelman показала, что эта репликаза размножает РНК в экспоненциальном режиме (т.е. число молекул РНК удваивается в каждом цикле репликации), и экспоненциальная кинетика наблюдается до тех пор, пока реплика остается в избытке над матрицей [2]. Всего 3 года спустя на симпозиуме в Колд-Спринг-Харборе в докладах трех известных лабораторий [3–5] была представлена грандиоз-

ная картина успешного изучения механизма первой РНК-зависимой РНК-полимеразы. Казалось, совсем немного осталось до полного решения проблемы. Однако приходится констатировать, что даже теперь, полвека спустя, остались нерешенными почти все загадки, занимавшие умы исследователей в 1968 году. Более того, к ним добавились новые. Среди немногих, которые были решены, – природа спонтанного синтеза РНК Q β -репликазой [6].

В нашей лаборатории Q β -репликазу изучали более 30 лет. Надо сказать, что эти исследования были инициированы и решительно поддержаны академиком Александром Сергеевичем Спириным, основателем и первым директором Института белка РАН, который одновременно возглавлял кафедру молекулярной биологии биологического факультета МГУ, 90-летию, которой посвящен этот выпуск. Совсем недавно Александр Сергеевич был избран иностранным членом Национальной академии наук США. Это давно заслуженное признание его выдающегося вклада в становление и развитие молекулярной биологии как области науки. Среди многих достижений Александра Сергеевича – открытие матричных РНК (мРНК) [7]. Вместе со своим учителем Андреем Николаевичем Белозерским он получил первые доказательства существова-

¹ Краткая версия этого обзора была представлена на Международной конференции “Вирусы: открывая большое в малом”, проходившей 11–12 марта 2019 года в Москве и посвященной 90-летию профессора Вадима Израилевича Агола.

ния одного из ключевых элементов жизни – нового класса РНК, передающих генетическую информацию от ДНК к рибосомам, которые транслируют эту информацию в белки.

Результаты нашего 30-летнего исследования Q β -репликазы обобщены в недавнем обзоре [8]. Здесь мы постарались сосредоточиться не на успехах, а на еще не решенных проблемах.

ЗАГАДКА 1: КАК Q β -РЕПЛИКАЗЕ УДАЕТСЯ СОХРАНЯТЬ РЕПЛИКАТИВНЫЙ ИНТЕРМЕДИАТ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМ

В начале исследований Q β -репликазы считалось, что репликация происходит через образование двухцепочечного интермедиата. В согласии с этой концепцией S. Spiegelman и его коллеги наблюдали следующий порядок появления различных форм РНК в продуктах реакции при использовании геномной Q β -РНК в качестве матрицы: сначала дцРНК, затем частично дцРНК и только после этого – инфекционный одноцепочечный продукт [9].

Однако группа С. Weissmann показала, что все двухцепочечные промежуточные формы являются артефактами выделения РНК, предшествующего анализу, и вызываются любым агентом, который нарушает целостность репликазы, таким как фенол, детергент или протеаза. До выделения все формы РНК в образце полностью доступны рибонуклеазе, разрушающей одноцепочечные молекулы [10]. Поэтому был сделан вывод, что в цикле репликации Q β -РНК двухцепочечные интермедиаты отсутствуют [4].

Следовательно, несмотря на то что синтезируемая РНК полностью комплементарна матричной и две цепи РНК сближены в репликативном комплексе, они не схлопываются в двухцепочечную форму в процессе всего цикла репликации, длительность которого составляет от ~100 с при 37°C [9] до ~4 мин при 30°C [11]. С. Weissmann и соавт. рассмотрели три возможных решения этой проблемы [4].

(1) Матрица и комплементарная растущая цепь стабилизируются в одноцепочечном состоянии внутримолекулярными вторичными структурами. Действительно, существует ряд публикаций, указывающих на важность стабильной вторичной структуры для эффективного размножения РНК Q β -репликазой [12–16]. Однако это не может быть основной причиной предотвращения отжига цепей, поскольку они немедленно образуют двойную спираль при обработке протеазами и детергентами, которые не могут влиять на стабильность вторичной структуры РНК, но разрушают или разворачивают структуру белка. Следовательно, белок, а не РНК играет основную роль в предотвращении образования спирали.

(2) Цепи РНК защищены от отжига белком, связывающимся с одноцепочечной формой, который покрывает цепи по всей их длине. Однако репликативный комплекс остается одноцепочечным даже в чистой бесклеточной системе, которая не содержит других белков, кроме Q β -репликазы, даже при низком соотношении репликазы к РНК (см., например, Fig. 4a и 4b в [11]).

(3) Репликаза постоянно удерживает 3'-конец матрицы и 5'-конец удлиняемого продукта, так что синтезируемая РНК и уже прочитанная часть матрицы образуют два кольца (структуру “бабочки” [17]) в течение всего цикла репликации. Это создает топологические ограничения для скручивания цепей РНК, необходимого для формирования двойной спирали. Однако позже обнаружили, что Q β -репликаза способна прочно связывать 5'-, но не 3'-конец реплицируемой РНК [18, 19], так что формирование матричного кольца не может быть обеспечено таким способом.

Вариант кольцевой формы матрицы был ранее предложен I. Haguna и S. Spiegelman [20], но совершенно по иной причине. Они обнаружили, что расщепление Q β -РНК примерно пополам приводит к резкому снижению матричной активности РНК. Чтобы объяснить этот результат, предположили, что Q β -РНК обладает свойством “функциональной циркулярности”, которое позволяет Q β -репликазе определять, цела матрица или нет, проверяя, находится ли каждый из концов РНК на своем месте. В качестве примера предположили, что Q β -РНК может приобретать кольцевую конфигурацию благодаря взаимодействию комплементарных концов, свернутых в короткую двойную спираль – структуру, теперь обычно называемую “ручкой сковороды”, которая распознается репликазой Q β при инициации синтеза РНК.

Позднее обнаружили, что Q β -РНК, а также другие эффективные матрицы Q β -репликазы действительно имеют комплементарные концевые последовательности (см. обзор [21]). Однако они слишком короткие (от 3 до 4 п.н.), чтобы зафиксировать матрицу в кольцевой конфигурации. Также С. Weissmann и соавт. [22] отметили, что неспособность фрагментированной матрицы к репликации может быть простым следствием того факта, что инициаторный 3'-конец комплементарной цепи не может быть синтезирован, что делает невозможным экспоненциальное размножение.

Таким образом, способность Q β -репликазы поддерживать одноцепочечность репликативного интермедиата остается необъясненной.

ЗАГАДКА 2: КАК Q β -РЕПЛИКАЗА РАСПОЗНАЕТ СВОИ МАТРИЦЫ?

В самом начале I. Naruna и S. Spiegelman сообщили, что Q β -репликаза может размножить лишь Q β -РНК и не воспринимает в качестве матриц другие РНК, включая РНК клетки-хозяина и даже геномные РНК родственных бактериофагов, таких как MS2 [23]. Позже обнаружили, что она также размножает короткие (70–250 н.) РНК, называемые 6S, или RQ-РНК (от Replicable by Q β replicase), которые образуются путем рекомбинации молекул РНК *in vitro* или в инфицированных клетках [24–26].

Оказалось, что Q β -репликаза очень неразборчива в копировании полинуклеотидов любого типа. В частности, она копирует поли(С) и С-содержащие случайные полирибонуклеотиды [27], поли-3'-дезоксирибонуклеотиды, оканчивающиеся на олиго(dC) [28], практически любую природную РНК, снабженную 3'-концевым олиго(С) или олиго(dC) [28, 29], практически любую РНК в присутствии рибо- или дезоксирибонуклеотидного праймера, комплементарного ее 3'-концу [30–32], и, наконец, почти любую РНК в присутствии ионов Mn²⁺ [33].

Однако следует подчеркнуть, что копирование матрицы Q β -репликазой – это не то же самое, что репликация. В тех случаях, когда исследовали продукт, синтезированный на гетерологичной матрице, он оказывался устойчивым к действию рибонуклеазы, расщепляющей оцРНК, т.е., образовывал дуплекс с матрицей и не высвобождался в одноцепочечной форме. Это тупиковый продукт, так как Q β -репликаза не способна копировать двухцепочечную матрицу [4] и, следовательно, дальнейшее размножение невозможно.

Все реплицируемые РНК содержат на 5'-конце pppGGG... и ...СССА-ОН на 3'-конце [21]. 3'-Концевой А не нужен для узнавания матрицы Q β -репликазой [34] и пропускается при ее копировании. Поэтому первым нуклеотидом РНК-продукта является GTP, который сохраняет свою 5'-трифосфатную группу [35].

Общие у известных реплицируемых РНК лишь последовательности 5'-GGG и 3'-ССС. Тем не менее, вероятность, что случайная РНК будет размноженной, крайне низкая: лишь единичные из 10¹² случайных последовательностей длиной 50 или 77 н., фланкированных 5'-GGG и 3'-ССС, оказались в некоторой степени реплицируемыми [36]. На чем может быть основана столь высокая матричная специфичность?

Чтобы ответить на этот вопрос, мы решили напрямую проверить гипотезу функциональной циркулярности. С этой целью мы портили РНК RQ135, одну из наиболее эффективных матриц Q β -репликазы [37], двумя способами: (1) расщепляли ее на 5'- и 3'-фрагменты близкого размера

(примерно пополам, как I. Naruna и S. Spiegelman и поступали с Q β -РНК [20]) и (2) вводили мутации в 5'-конец полноразмерной РНК RQ135 и ее фрагментов, а затем проверяли эффект этих манипуляций [19].

Мы обнаружили, что удаление 5'-половины РНК резко (в 90 раз) снижает скорость синтеза РНК на оставшейся 3'-половине в согласии с наблюдением I. Naruna и S. Spiegelman [20]. Вопреки предположению С. Weissmann и соавт. [22] это снижение не связано с неспособностью репликазы синтезировать инициаторный 3'-конец комплементарной цепи, так как скорость реакции снова возрастала почти до исходного уровня (в 30 раз) после отжига 3'-фрагмента с удаленным 5'-фрагментом без восстановления ковалентной связи между ними. Точечные мутации в 5'-концевой последовательности (изменение 5'-GGG на 5'-GAG, 5'-GGA или 5'-GAA) снижали скорость инициации на 3'-конце матрицы и кажущееся сродство к инициаторному субстрату GTP. Наконец, эти мутации снижали стабильность постинициаторного комплекса, образованного при инкубации Q β -репликазы с РНК-матрицей и GTP. В целом эти результаты показывают, что во время инициации Q β -репликаза взаимодействует как с 3'-, так и с 5'-концом RQ-РНК в соответствии с гипотезой функциональной циркулярности реплицируемой матрицы [19]. Тем не менее, точный механизм распознавания РНК-матриц остается неизвестным, и необходимы дополнительные исследования, чтобы разгадать эту загадку.

Функциональная циркулярность могла бы помочь в решении первой загадки в соответствии с модифицированной двухкольцевой моделью С. Weissmann и соавт. [4], в которой вся матрица целиком, а не только ее прочитанная часть, образует кольцо. В этой модели взаимодействие между короткими комплементарными концами матрицы стабилизируется прилегающей шпилькой [38]. Однако неясно, является ли время жизни такой составной концевой спирали большим, чем продолжительность стадии элонгации, что необходимо для поддержания одноцепочечного репликативного интермедиата.

ЗАГАДКА 3: ЧТО ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ “ЗАКРЫТАЯ КОНФОРМАЦИЯ” Q β -РЕПЛИКАЗЫ?

В 1973 году было обнаружено, что после инициации синтез РНК Q β -репликазой становится устойчивым к ауринтрикарбонической кислоте (АТК) [39], полимерная фракция которой является мощным ингибитором РНК-белковых взаимодействий [40]. Однако это верно только для некоторых матриц Q β -репликазы. Например, многие из лишенных 3'-последовательности вариантов РНК RQ прекрасно копируются Q β -репликазой, но элонга-

ция уже иницированных цепей полностью подавляется добавлением АТК [41].

Дальнейший анализ показал, что существует принципиальная разница между синтезом РНК, который подавляется, и тем, который не подавляется АТК [41]. Устойчивый к АТК синтез всегда начинается с прочитывания олиго(С)-кластера на 3'-конце матрицы или рядом с ним и требует, чтобы на стадии инициации присутствовал GTP. При этом первый нуклеотид синтезируемой цепи продукта всегда GTP. Эти признаки считались обязательными для всех матриц Q β -репликазы [35]. В отличие от этого, чувствительный к АТК синтез начинается независимо от наличия и положения олиго(С)-кластера в матричной последовательности, а синтезируемая цепь РНК может начинаться с нуклеозидтрифосфата, отличного от GTP [41].

Таким образом, вопреки бытовавшему убеждению [35, 39], инициация синтеза РНК Q β -репликазой не обязательно приводит к устойчивости к АТК. Чтобы сделать АТК неспособной вытеснить матрицу из активного центра фермента, должно произойти некое дополнительное событие, прежде чем Q β -репликаза перейдет на стадию элонгации. Мы предположили [41], что это событие включает в себя переход репликативного комплекса в закрытую конформацию, в которой макромолекулы, такие как РНК или АТК, не могут покинуть или войти в активный сайт фермента. Переход в закрытую конформацию индуцируется связыванием Q β -репликазы с определенной матрицей (называемой “законной” в отличие от “незаконных” матриц, которые не могут индуцировать такой переход) и определенным нуклеотидом — GTP. Та ли это молекула GTP, которая становится первым нуклеотидом РНК-продукта, не ясно.

Также не ясно, каковы структурные особенности закрытой конформации. Все опубликованные кристаллические структуры Q β -репликазы неотличимы от структуры белка, не связанного с РНК-матрицей или нуклеотидами, что, очевидно, соответствует открытой конформации фермента [42–47]. Однако кристаллизации закрытого репликативного комплекса мешает его метастабильность. Хотя такой комплекс живет дольше, чем необходимо для полного прочитывания даже геномной Q β -РНК длиной более 4000 н. [19], он неизбежно распадется в процессе длительных инкубаций, необходимых для образования кристаллов.

Устойчивость к АТК означает, что в закрытой конформации фермент не диссоциирует от матрицы пока синтезирует РНК-продукт; другими словами, Q β -репликаза очень процессивна. Это свойство может быть важным для предотвращения спаривания комплементарных матрицы и синтезируемой РНК, что необходимо для экспо-

нционального размножения РНК. Действительно, непрерывное взаимодействие матрицы и синтезируемой РНК с Q β -репликазой необходимо для предотвращения их схлопывания в дуплекс [4, 10]. Поэтому расшифровка структуры закрытого репликативного комплекса имеет первостепенное значение для ответа на самые интригующие загадки Q β -репликазы, такие как механизм распознавания матриц, механизм поддержания одноцепочечного репликативного интермедиата, а также рассмотренные ниже функции белков клетки-хозяина, присутствующих в молекуле репликазы.

ЗАГАДКА 4: КАКОВЫ ФУНКЦИИ ХОЗЯЙСКИХ БЕЛКОВ, ПРИСУТСТВУЮЩИХ В МОЛЕКУЛЕ Q β -РЕПЛИКАЗЫ?

Помимо кодируемой фагом каталитической β -субъединицы, холофермент Q β -репликазы содержит три белка хозяина, обычно участвующих в синтезе белка в клетках *E. coli*. Это рибосомный белок S1 (α -субъединица) [48–51] и факторы элонгации EF-Tu (γ -субъединица) и EF-Ts (δ -субъединица) [52].

Белок S1 как фактор инициации

Белок S1 слабо связан с кором репликазы (β -Tu-Ts), который способен синтезировать РНК в отсутствие белка S1, и может быть легко отделен от него [48]. Также, кор способен прочитывать законную матрицу в присутствии АТК, если та добавлена после инициации [11]; это означает, что белок S1 не требуется для перехода Q β -репликазы в закрытую конформацию.

Когда белок S1 был впервые отделен от кора репликазы, обнаружили, что он нужен для копирования лишь одной матрицы Q β -репликазы — геномной (+)-цепи Q β -РНК [48]. Еще один белок *E. coli*, “хозяйский фактор”, теперь обычно обозначаемый как Hfq, также необходим для копирования (+)-цепи Q β -РНК [3]. Оба белка необходимы на стадии инициации; следовательно, они могут рассматриваться как факторы инициации. Белки S1 и Hfq не требуются для копирования (–)-цепи Q β -РНК, поли(С) или негеномных RQ-РНК [22].

Q β -репликаза узнает внутренние участки (+)-цепи Q β -РНК: она специфически с высоким сродством взаимодействует с двумя участками, расположенными на расстоянии ~1500 и ~2900 н. от 3'-конца, и обозначаемых “М-сайт” и “S-сайт” соответственно [1, 53]. В экспериментах *in vitro* с использованием очищенной Q β -РНК, Q β -репликазы и Hfq связывания с М-сайтом достаточно для инициации синтеза РНК на 3'-конце [54]. Однако в природных условиях это не так. Про-

никшая в клетку Q β -РНК должна быть сначала транслирована для синтеза β -субъединицы, которая связывается с EF-Tu, EF-Ts и белком S1, образуя активную Q β -репликазу, которая затем должна реплицировать ту же матрицу. Однако репликаза и рибосомы прочитывают матрицу в противоположных направлениях, 3' \rightarrow 5' и 5' \rightarrow 3' соответственно. Поэтому матрицу надо освободить от рибосом, чтобы сделать ее доступной для репликазы. Эта задача решается путем связывания репликазы с S-сайтом, с которого начинается трансляция матрицы, что предотвращает дальнейшее связывание рибосом [55].

Таким образом, инициация репликации *in vivo* требует, чтобы Q β -репликаза связалась с каждым из сайтов M и S. В принципе, эти два сайта могут быть заняты разными молекулами репликазы. Однако то, что эти сайты близки друг к другу во вторичной структуре РНК Q β [56] и выглядят связанными с одной молекулой репликазы на электронных микрофотографиях [57], делает вероятным взаимодействие во время инициации одной молекулы Q β -репликазы с обоими сайтами одновременно. Следующим логическим шагом было бы предположить, что существуют, по крайней мере, два сайта связывания РНК на белке S1, поскольку белок S1 опосредует взаимодействие Q β -репликазы с каждым из этих двух сайтов Q β -РНК [53].

Из экспериментов по гашению собственной флуоресценции триптофанов в белке S1 при связывании олигонуклеотидов сделан вывод, что молекула S1 имеет два более или менее независимых центра связывания РНК [58–60]. Однако двухцентровая модель S1 была скептически встречена другими учеными, работающими в этой области [61–63]. В частности, подчеркнуто, что “не существует независимых доказательств второго центра связывания ДНК (или РНК) на S1” [61] и “необходимы дальнейшие исследования, например, дополнительные эксперименты, способные установить одновременное присутствие двух разных молекул нуклеиновых кислот, связанных с S1” [63]. До сих пор вопрос о числе РНК-связывающих центров на молекуле белка S1 остается без ответа.

Белок S1 как фактор терминации

Долгое время считалось, что белок S1 лишь способствует инициации на (+)-цепи Q β -РНК и не участвует в копировании других матриц или на других этапах репликации Q β -РНК [1, 48, 64]. Однако, как мы уже отмечали ранее [38], этот вывод сделан из результатов однократного копирования, а не экспоненциального размножения РНК, поэтому к нему следует относиться с осторожностью.

Действительно, при исследовании репликации негеномной RQ-РНК на экспоненциальной фазе мы обнаружили, что добавление белка S1 к кору репликазы на порядок увеличивало скорость и выход реакции, а также долю одноцепочечных продуктов реакции [11]. Ввиду известной способности белка S1 плавить РНК-дуплексы [65] напрашивается вывод, что эта субъединица помогает репликазе поддерживать репликативный интермедиат в одноцепочечной форме.

Однако обработка продуктов реакции рибонуклеазой, разрушающей одноцепочечные РНК, показала, что даже при копировании длинной Q β -РНК белок S1 не увеличивал способность самого кора поддерживать одноцепочечное состояние репликативного интермедиата. Также белок S1 не влиял на скорость элонгации. Неожиданно оказалось, что белок S1 помогает быстрому высвобождению одноцепочечного продукта после завершения стадии элонгации, т.е. функционирует в качестве фактора терминации, тем самым обеспечивая продолжение синтеза РНК. Если реакцию проводили с одним лишь кором, то небольшая часть продукта медленно покидала комплекс в одноцепочечной форме, тогда как его основная часть образовывала тупиковый дуплекс с матрицей [11].

Этот результат оказался неожиданным, поскольку белок S1 традиционно рассматривали как РНК-связывающий белок, функция которого в различных клеточных процессах заключается в усилении ассоциации РНК с функциональным комплексом [66]. Например, в усилении связывания мРНК с рибосомой при инициации трансляции [61] или связывания (+)-цепи Q β -РНК с кором репликазы при инициации ее считывания [48]. Фактически этот результат изменил парадигму S1, поскольку выявил ранее неизвестную способность этого белка способствовать диссоциации РНК из комплекса РНК–фермент.

Далее обнаружили, что N-концевой фрагмент, содержащий два из шести ОВ-мотивов (от “*O*ligo-nucleotide/*o*ligosaccharide *B*inding”), составляющих последовательность белка S1, так же эффективно стимулирует стадию терминации, как и интактный S1, тогда как более длинный фрагмент, дополнительно содержащий третий ОВ-мотив, необходим для максимального стимулирования инициации на (+)-цепи Q β -РНК [11]. Поскольку все предыдущие попытки кристаллизовать холофермент Q β -репликазы были безуспешными, предположительно из-за гибкой структуры S1 [61], это открытие инициировало опыты по кристаллизации репликазы, в которой полноразмерный белок S1 был заменен либо его двухдоменным [47], либо трехдоменным [46] фрагментом. В результате определена кристаллическая структура кора, связанного с двумя первыми ОВ-домена-

ми белка S1 [46, 47]; структуру и положение третьего ОВ-домена не удалось определить, вероятно, из-за его плохой фиксации на молекуле репликазы [46].

В кристаллической структуре второй ОВ-домен и прилегающая область β -субъединицы образуют единый положительно заряженный тракт, ведущий от отверстия, через которое синтезированная цепь РНК покидает активный центр [47]. Это могло бы помочь высвобождению РНК-продукта. Однако следует отметить, что белок S1 и его N-концевые фрагменты могут способствовать высвобождению продукта, только если они добавлены до завершения стадии элонгации [11], т.е. когда кор Q β -репликазы находится в закрытой конформации. Следовательно, необходимо определить структуру закрытой конформации, чтобы обсуждать возможный механизм стадии терминации.

Вероятные функции EF-Tu и EF-Ts

Вклад факторов элонгации EF-Tu и EF-Ts в работу Q β -репликазы гораздо менее ясен. Частично это связано с тем, что в отличие от белка S1 эти субъединицы не могут быть удалены из Q β -репликазы без инактивации фермента, поскольку они необходимы для поддержания нативной структуры каталитической β -субъединицы [35]. Единственным исключением является стадия элонгации, когда структура β -субъединицы поддерживается связанными матрицей и синтезируемой РНК [67].

До обнаружения незаконных матриц [41] считалось, что GTP, специфический лиганд EF-Tu, абсолютно необходим для инициации синтеза РНК Q β -репликазой, и каждая матрица имеет такой же 3'-конец ...ССА, как и тРНК – другой специфический лиганд EF-Tu [35]. Поэтому можно было предположить, что EF-Tu действует на стадии инициации, распознавая 3'-конец матрицы и предоставляя связанный GTP в качестве праймера для синтеза РНК-продукта [52, 64]. В кажущемся согласии с представлением о EF-Tu, как о факторе инициации, показано, что если после инициации на случайном сополимере (С + А) субъединицы EF-Tu и EF-Ts удалить центрифугированием репликативного комплекса через градиент сахарозы, то β -субъединица продолжает достраивать инициированные цепи, но не может инициировать синтез новых цепей РНК [67].

Однако некоторые факты противоречат такому предположению. Во-первых, EF-Tu специфически связывает аминокислотированную, а не деацилированную тРНК, но матрицы Q β -репликазы не аминокислотированы. Во-вторых, EF-Ts, который также присутствует в Q β -репликазе, понижает сродство EF-Tu как к аминокислот-тРНК, так и к

GTP. Наконец, способность Q β -репликазы копировать РНК, не заканчивающиеся на ССА, и без использования GTP в качестве инициаторного нуклеотида [41] предполагает, что ни одна из двух активностей EF-Tu не требуется для инициации синтеза РНК.

Более того, обнаружено, что модификации EF-Tu и EF-Ts, которые нарушают их функции в синтезе белка, не ухудшают способность Q β -репликазы синтезировать РНК [68, 69]. Поэтому высказано предположение, что комплекс EF-Tu · EF-Ts выполняет лишь структурную роль в Q β -репликазе, помогая каталитической β -субъединице приобрести конформацию, необходимую для инициации синтеза РНК [70]. Однако, как и в случае ранних исследований функций белка S1, этот вывод сделан из результатов однократного копирования РНК, а не их экспоненциального размножения, поэтому к нему следует относиться с осторожностью. Давным-давно опубликованы две работы, указывающие на важность EF-Tu и EF-Ts для многократного копирования матрицы.

В одной из них использовали очищенные кроличьи γ -глобулины против EF-Tu, EF-Ts и S1, чтобы исследовать роль этих субъединиц в синтезе РНК Q β -репликазой [71]. Ни один из этих препаратов не ингибировал заметно копирование поли(С), приводящее к образованию дуплекса поли(С): поли(Г), но каждый из них сильно подавлял репликацию Q β -РНК, причем подавление полностью снималось избытком очищенных субъединиц. В последнем случае γ -глобулин против S1 почти полностью подавлял стадию инициации, но почти не влиял на стадию элонгации. Этот результат показывает, что действие иммуноглобулина было специфическим. В то же время каждый из γ -глобулинов против EF-Tu и против EF-Ts подавлял как инициацию, так и элонгацию при копировании РНК Q β , при том что γ -глобулин против EF-Tu даже стимулировал копирование поли(С).

В другой работе Q β -репликазу, содержащую чувствительный к температуре мутант EF-Ts, использовали для изучения функции этой субъединицы [72]. Сдвиг температуры от 30 до 42°C практически не влиял на копирование поли(С), но в 10 раз снижал репликацию Q β -РНК.

Эти две работы убедительно показывают, что при экспоненциальном размножении РНК EF-Tu и EF-Ts выполняют некоторые функции, которые не используются и могут даже мешать синтезу РНК на матрице, которую можно прочитать лишь 1 раз, такой как поли(С). Что это за функции, неизвестно. Однако одно из неопубликованных наблюдений, сделанных двумя из нас (ЕВЧ и АБЧ) много лет назад, может иметь отношение к этой загадке.

Мы исследовали способность Q β -репликазы связывать олиго(G), присутствующий в начале РНК-продукта, синтезируемого на каждой реплицируемой РНК. Олиго(G)-5'-трифосфаты различной длины (pppG $_n$) синтезировали, инкубируя Q β -репликазу с [γ - 32 P]GTP в присутствии смеси RQ-РНК и после экстракции фенолом разделяли с помощью ВЭЖХ-хроматографии на ионнообменной колонке. Длину полученного олиго(G) определяли с помощью электрофореза в секвенирующем геле.

На рис. 1 показано, что Q β -репликаза образует стабильные комплексы с олиго(G), которые сохраняются при фильтровании через нитроцеллюлозную мембрану. GTP (pppG $_1$) связывается с Q β -репликазой с кажущейся константой $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, которая соответствует константе Михаэлиса для GTP при репликации Q β -РНК ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) [73]. Динуклеотид pppG $_2$ связывается почти на два порядка лучше, чем GTP. Прочность комплекса репликазы с pppG $_3$ немного выше (кажущаяся константа связывания $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$). Дальнейшее удлинение олиго(G) мало влияет на прочность комплекса. Полученные результаты согласуются с наблюдениями, что в отличие от 3'-концевых фрагментов RQ-РНК Q β -репликаза способна прочно связывать 5'-концевые фрагменты, начинающиеся с pppG $_3$ [18, 41].

Интересно, что строго параллельно с увеличением сродства к Q β -репликазе увеличивается сродство pppG $_n$ к EF-Tu при возрастании n от 1 до 3 (рис. 1). Это говорит о том, что EF-Tu может отвечать за связывание олиго(G) репликазой. Однако в отличие от репликазы, EF-Tu демонстрирует снижение сродства к pppG $_n$, когда n становится больше трех. Причиной такого несоответствия может быть либо отличие свойств EF-Tu в молекуле репликазы от свойств свободного EF-Tu, либо то, что другие субъединицы фермента также участвуют в связывании длинных олиго(G).

Связывание с 5'-концом РНК является известной способностью EF-Tu. В кристаллической структуре комплекса аминоксил-тРНК · EF-Tu · GTP фосфорилированный 5'-конец тРНК плотно связан в положительно заряженном кармане на стыке трех структурных доменов EF-Tu, образующем контакты с тремя 5'-концевыми нуклеотидами [74, 75]. В составе Q β -репликазы EF-Tu мог бы либо отвечать за взаимодействие с 5'-концом законной матрицы на этапе инициации [19], либо связывать 5'-конец растущей цепи на стадии элонгации, как это требуется для формирования кольца синтезируемой РНК по модели С. Weissmann и соавт. [4], либо и то, и другое.

В отличие от EF-Tu, для EF-Ts еще не предложена даже гипотетическая роль в работе Q β -репликазы.

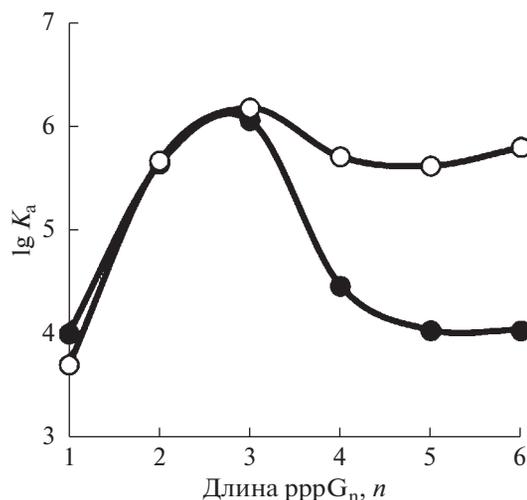


Рис. 1. Зависимость логарифма кажущейся константы связывания олиго(G) с Q β -репликазой (○) и EF-Tu-GDP (●) от длины лиганда. 32 P-меченый лиганд смешивали с белком в буфере (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 6.5 мМ MgCl $_2$, 0.5 мМ EDTA и дитиотреитол, 5%-ный глицерин), инкубировали в течение 1 ч при 0°C, смесь пропускали через 0.45 мкм фильтр HAWP (“Millipore”, США), и фильтр дважды промывали тем же буфером.

ЗАГАДКА 5: КАК Q β -РЕПЛИКАЗА ДЕЛАЕТ РЕКОМБИНАНТНЫЕ РНК?

По-видимому, образование рекомбинантных РНК наблюдали в самом начале исследований Q β -репликазы, но смысл этого наблюдения не был полностью понят до конца восьмидесятых годов [26]. В 1967 году S. Spiegelman и его коллеги сообщили, что Q β -РНК быстро эволюционировала в короткие и неинфекционные виды РНК, имеющие большую скорость репликации, при последовательных переносах части продуктов реакции в реакционную смесь, которая содержала свежую Q β -репликазу и не содержала матрицу [24, 76]. Полученные продукты имели длину ~ 550 н. ($\sim 13\%$ генома фага) и гибридизовались с Q β -РНК [77]. Это указывает на их происхождение от Q β -РНК. Поэтому эти РНК названы “вариантами” Q β -РНК.

Еще меньшие РНК, несколько длиннее 100 и 200 н., обнаружены среди “6S РНК”, выделенных из клеток *E. coli*, инфицированных Q β -фагом [78], а также в продуктах реакции, к которым не была добавлена матрица [79], и которые были названы “минивариант” (MV-1) и “мидивариант” (MDV-1) соответственно. Обнаружено, что РНК MDV-1 [80] действительно содержит два длинных участка, гомологичных Q β -РНК [18]. Две меньшие RQ-РНК, WS-1 [18] и MNV-11 [81], также оказались частично гомологичными Q β -РНК [21]. Считалось, что присутствие в этих RQ-РНК участков, которые не имеют гомологии с

Q β -РНК, а также отсутствие сходства некоторых RQ-РНК с Q β -РНК обусловлено дегенерацией последовательностей в результате эволюции вариантов в направлении более быстро размножающихся фенотипов.

Таким образом, считалось, что негеномные RQ-РНК это дефектные геномы фага Q β , образующиеся в инфицированных клетках или в бесклеточной системе в результате ошибок репликации, таких как делеции и нуклеотидные замены, которые часто наблюдаются и приводят к гетерогенности популяций RQ-РНК [18, 37, 81]. Считалось также, что любые изменения последовательности происходят только *in cis*, потому что любые попытки обнаружить рекомбинацию между геномами РНК-фагов были безуспешными [82].

Первым прямым доказательством рекомбинации в системе Q β стала РНК RQ120 длиной 120 н., состоящая из почти неизменных ~80 н. сегмента Q β -РНК и 33 н. сегмента тРНК *E. coli* [26]. Поскольку один из участников рекомбинации – Q β -РНК – существует в природе только в виде РНК, образование последовательности RQ120 должно было происходить без участия ДНК-интермедиатов. Этот факт стал первым доказательством существования рекомбинации РНК в бактериях. Позже этот вывод был подтвержден секвенированием рекомбинантной РНК RQ135 [37], выявлением гомологии между сегментом MDV-1 РНК с ранее неустановленным происхождением и геномной РНК фага Ф6 бактерий рода *Pseudomonas* [21], а также в экспериментах *in vivo* на зараженных клетках *E. coli* [83].

Чтобы исследовать механизм рекомбинации РНК в системе Q β , мы разработали чистую бесклеточную систему [84] с использованием очищенной Q β -репликазы и двух фрагментов РНК, полученных путем расщепления РНК RQ135, одной из наиболее эффективных матриц Q β -репликазы [37], примерно пополам. К тому времени считалось, что рекомбинация в РНК-вирусах всегда происходит по механизму смены матриц, при котором вирусная репликаза, копируя одну молекулу РНК, с некоторой вероятностью переходит, вместе с растущей цепью РНК, на гомологичный участок другой молекулы, где возобновляет синтез РНК [85–87]. Поэтому к обрезанным концам были добавлены гомологичные последовательности, чтобы облегчить переключение репликазы между фрагментами РНК. Ни один из фрагментов не способен к экспоненциальной репликации. Однако их объединение в одной молекуле и в правильном порядке приводит к возникновению РНК, размножаемой репликазой. Это обеспечивает положительный отбор продуктов рекомбинации. Редкие рекомбинантные РНК обнаруживаются путем их размножения в геле, содержащем Q β -репликазу и NTP [88]. В этом формате, ныне из-

вестном как метод молекулярных колоний [89], потомство каждой реплицируемой молекулы образует колонию, которую легко обнаружить на большом фоне нереплицируемых РНК.

Мы наблюдали два типа рекомбинации РНК в этой системе: катализируемую ионами Mg²⁺ неферментативную рекомбинацию, происходящую со скоростью 10⁻⁹ ч⁻¹ на нуклеотид [90] и на три–четыре порядка более эффективную рекомбинацию, катализируемую репликазой [84]. Удивительно, но ни один из них не оказался гомологичной рекомбинацией, какую можно было ожидать от механизма смены матрицы, что установлено путем секвенирования образуемых рекомбинантных РНК [84, 90, 91]. Гомология последовательностей, добавленных на концы фрагментов, неизменно игнорировалась, однако последовательности продуктов неферментативной и катализируемой репликазой рекомбинаций имели четко различимые особенности. В то время как при неферментативной реакции объединение фрагментов происходило по случайно выбранному внутреннему участку [90], все продукты ферментативной рекомбинации целиком включали 5'-фрагмент, в том числе его 3'-концевое расширение, а также либо весь, либо 5'-усеченный вариант 3'-фрагмента [84].

Поэтому мы предположили, что Q β -репликаза катализирует реакцию трансэстерификации, при которой 3'-гидроксил 5'-фрагмента атакует фосфаты 3'-фрагмента: либо его межнуклеотидные фосфаты, либо α -фосфат его 5'-концевой трифосфатной группы. В подтверждение этой гипотезы мы обнаружили, что ферментативная рекомбинация полностью зависит от наличия 3'-гидроксильной группы в 5'-фрагменте: рекомбинация полностью подавлялась, если гидроксил удаляли (например, путем окисления фрагмента периодатом) или блокировали (например, фосфатной группой), и возвращалась к исходному уровню после восстановления гидроксила [84]. Однако были предложены два альтернативных объяснения эффекта 3'-концевых модификаций 5'-фрагмента.

P.D. Nagy и A.E. Simon предположили, что либо отсутствие гидроксила, либо “громоздкие и заряженные боковые группы, введенные в 3'-конец 5'-фрагмента, вероятно, препятствовали связыванию репликазы Q β во время смены матрицы” [92]. В этой связи следует подчеркнуть, что в 5'-фрагмент не вводили какие-либо громоздкие или заряженные боковые группы. Осуществленные модификации либо разрушали 3'-концевое рибозное кольцо, либо приводили к его удалению, т.е. ничего не вводили, скорее что-то удаляли. Более того, мы прямо показали, что используемые модификации 3'-конца РНК не мешают ее копированию Q β -репликазой [41, 84].

A. Pierangeli и соавт. [93] предположили, что 3'-концевой гидроксил 5'-фрагмента может быть

необходим для функционирования фрагмента в качестве праймера, который ферментативно удлиняется с использованием в качестве матрицы комплементарной копии 3'-фрагмента (3'-фрагмента), у которого более чем 20-нуклеотидная 3'-концевая последовательность комплементарна 3'-концевому расширению 5'-фрагмента. Чтобы проверить эту возможность, мы синтезировали 3'-фрагмент с помощью транскрипции и исследовали его способность продуцировать рекомбинанты при инкубации с Q β -репликазой и 5'-фрагментом. В качестве контроля мы провели эксперименты, в которых Q β -репликаза была заменена белком 3Dpol, РНК-репликазой полиовируса, которая, как считается, способна к смене матриц. В каждом случае рекомбинанты обнаруживали как молекулярные колонии в геле, содержащем Q β -репликазу [91].

Оказалось, что в присутствии 3Dpol и NTP 3'- и 5'-фрагменты эффективно рекомбинируют, образуя РНК, размножаемые Q β -репликазой; выход рекомбинантов значительно увеличивался при отжиге фрагментов, и все секвенированные рекомбинанты были гомологичного типа, т.е. фрагменты действительно служили праймерами и удлинялись, используя друг друга в качестве матриц. Напротив, в присутствии Q β -репликазы и NTP те же самые фрагменты рекомбинировали на четыре–пять порядков реже и даже в 1000 раз реже, чем фрагменты одинаковой полярности (т.е. 3'- и 5'-фрагменты). Более того, все секвенированные рекомбинанты были негомолгичными. Из этого следует, что репликазы фага Q β и полиовируса используют принципиально разные стратегии рекомбинации РНК, и механизм удлинения праймеров не реализуется Q β -репликазой [91].

Еще более усложнило загадку то, что рекомбинантные РНК обнаруживаются лишь тогда, когда Q β -репликазе позволено синтезировать РНК, т.е. копировать рекомбинирующие фрагменты РНК. Отсутствие гомологичных рекомбинантов можно было бы объяснить предположением, что в этом случае рекомбинация является результатом смены матриц, независимой от спаривания оснований [92, 94]. Однако такое предположение не позволяет объяснить зависимость рекомбинации, катализируемой Q β -репликазой, от наличия 3'-гидроксила в 5'-фрагменте. На сегодняшний день эта загадка также остается неразгаданной.

ВЫВОДЫ

Таким образом, несмотря на полувековую историю исследований и усилия ряда ведущих лабораторий, наиболее фундаментальные аспекты функционирования Q β -репликазы остаются невыясненными. Разгадывание этих загадок — не просто тренировка ума, но вполне достойная задача, которая имеет общебиологическое значе-

ние. Например, выяснение механизма поддержания одноцепочечности репликативного комплекса важно не только для понимания работы Q β -репликазы, но и для решения такой глобальной проблемы, как репликация генетического материала в мире РНК [95]. Мы не можем исключить, что все эти загадки имеют общий корень, обнаружение которого рано или поздно прояснит всю картину, еще скрытую от глаз исследователя.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Программы фундаментальных исследований Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Duin J., Tsareva N. (2006) Single-stranded RNA phages. In: *The Bacteriophages*, 2nd ed. Ed. Calendar R.L. New York: Oxford University Press, pp. 175–196.
2. Haruna I., Spiegelman S. (1965) Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. *Science*. **150**, 884–886.
3. August J.T., Banerjee A.K., Eoyang L., de Fernandez M.T.F., Hori K. (1968) Synthesis of bacteriophage Q β RNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**, 73–81.
4. 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.
5. 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.
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. Belozersky A.N., Spirin A.S. (1958) A correlation between the compositions of deoxyribonucleic and ribonucleic acids. *Nature*. **182**, 111–112.
8. Четверин А.Б. (2018) Тридцать лет исследований Q β -репликазы: Что мы узнали и что предстоит узнать? *Успехи биол. химии*. **58**, 41–66.
9. Pace N.R., Bishop D.H., Spiegelman S. (1967) The kinetics of product appearance and template involvement in the *in vitro* replication of viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **58**, 711–718.
10. Feix G., Slor H., Weissmann C. (1967) Replication of viral RNA. XIII. The early product of phage RNA synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **57**, 1401–1408.
11. 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.

12. Mills D.R., Dobkin C., Kramer F.R. (1978) Template-determined, variable rate of RNA chain elongation. *Cell*. **15**, 541–550.
13. 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.
14. Axelrod V.D., Brown E., Priano C., Mills D.R. (1991) Coliphage Q β RNA replication: RNA catalytic for single-strand release. *Virology*. **184**, 595–608.
15. Arora R., Priano C., Jacobson A.B., Mills D.R. (1996) *cis*-Acting elements within an RNA coliphage genome: fold as you please, but fold you must!! *J. Mol. Biol.* **258**, 433–446.
16. Usui K., Ichihashi N., Yomo T. (2015) A design principle for a single-stranded RNA genome that replicates with less double-strand formation. *Nucl. Acids Res.* **43**, 8033–8043.
17. Robertson H.D. (1975) Functions of replicating RNA in cells infected by RNA bacteriophages. In: *RNA Phages*. Ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 113–145.
18. Schäffner W., Ruegg K.J., Weissmann C. (1977) Nano-variant RNAs: nucleotide sequence and interaction with bacteriophage Q β replicase. *J. Mol. Biol.* **117**, 877–907.
19. Ugarov V.I., Chetverin A.B. (2008) Functional circularity of legitimate Q β replicase templates. *J. Mol. Biol.* **379**, 414–427.
20. Haruna I., Spiegelman S. (1965) Recognition of size and sequence by an RNA replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **54**, 1189–1193.
21. Chetverin A.B., Spirin A.S. (1995) Replicable RNA vectors: Prospects for cell-free gene amplification, expression and cloning. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **51**, 225–270.
22. 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.
23. Haruna I., Spiegelman S. (1965) Specific template requirements of RNA replicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **54**, 579–587.
24. Mills D.R., Peterson R.L., Spiegelman S. (1967) An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **58**, 217–224.
25. Banerjee A.K., Rensing U., August J.T. (1969) Replication of RNA viruses. X. Replication of a natural 6S RNA by the Q β RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **45**, 181–193.
26. 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.
27. Hori K., Eoyang L., Banerjee A.K., August J.T. (1967) Replication of RNA viruses. V. Template activity of synthetic ribopolymers in the Q β RNA polymerase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **57**, 1790–1797.
28. Feix G., Sano H. (1976) Polydeoxyribonucleotides as templates for RNA synthesis catalysed by Q β replicase. *FEBS Lett.* **63**, 201–204.
29. Owens R.A., Diener T.O. (1977) Synthesis of RNA complementary to potato spindle tuber viroid using Q β replicase. *Virology*. **79**, 109–120.
30. Feix G., Hake H. (1975) Primer directed initiation of RNA synthesis catalysed by Q β replicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 503–509.
31. Feix G. (1976) Primer-dependent copying of rabbit globin mRNA with Q β replicase. *Nature*. **259**, 593–594.
32. Vournakis J.N., Carmichael G.G., Efstratiadis A. (1976) Synthesis of RNA complementary of rabbit globin mRNA by Q β replicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 774–782.
33. Palmenberg A., Kaesberg P. (1974) Synthesis of complementary strands of heterologous RNAs with Q β replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **71**, 1371–1375.
34. Rensing U., August J.T. (1969) The 3'-terminus and the replication of phage RNA. *Nature*. **224**, 853–856.
35. Blumenthal T., Carmichael G.G. (1979) RNA replication: Function and structure of Q β replicase. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 525–548.
36. Brown D., Gold L. (1995) Selection and characterization of RNAs replicated by Q β replicase. *Biochemistry*. **34**, 14775–14782.
37. 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.
38. Четверин А.Б. (2011) Парадоксы репликации РНК бактериального вируса. *Молекуляр. биология*. **45**, 160–172.
39. Blumenthal T., Landers T.A. (1973) The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurointricarboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 680–688.
40. Gonzalez R.G., Haxo R.S., Schleich T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurointricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein-nucleic acid interactions. *Biochemistry*. **19**, 4299–4303.
41. 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.
42. 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. USA*. **107**, 10884–10889.
43. Takeshita D., Tomita K. (2010) Assembly of Q β viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 15733–15738.
44. Takeshita D., Tomita K. (2012) Molecular basis for RNA polymerization by Q β replicase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 229–237.
45. Takeshita D., Yamashita S., Tomita K. (2012) Mechanism for template-independent terminal adenylation activity of Q β replicase. *Structure*. **20**, 1661–1669.
46. Takeshita D., Yamashita S., Tomita K. (2014) Molecular insights into replication initiation by Q β replicase

- using ribosomal protein S1. *Nucl. Acids Res.* **42**, 10809–10822.
47. 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. *Nucl. Acids Res.* **43**, 10893–10906.
 48. Kamen K., Kondo M., Romer W., Weissmann C. (1972) Reconstitution of Q β replicase lacking subunit α with protein-synthesis-interference factor i. *Eur. J. Biochem.* **31**, 44–51.
 49. Groner Y., Scheps R., Kamen R., Kolakofsky D., Revel M. (1972) Host subunit of Q β replicase is translation control factor i. *Nat. New Biol.* **239**, 19–20.
 50. 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 β replicase and 30S ribosomal protein S1 of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **249**, 3314–3316.
 51. 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.
 52. Blumenthal T., Landers T.A., Weber K. (1972) Bacteriophage Q β replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF-Tu and EF-Ts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 1313–1317.
 53. Meyer F., Weber H., Weissmann C. (1981) Interactions of Q β replicase with Q β RNA. *J. Mol. Biol.* **153**, 631–660.
 54. Miranda G., Schuppli D., Barrera I., Hausherr C., Sogo J.M., Weber H. (1997) Recognition of bacteriophage Q β plus strand RNA as a template by Q β replicase: role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor. *J. Mol. Biol.* **267**, 1089–1103.
 55. Kolakofsky D., Weissmann C. (1971) Possible mechanism for transition of viral RNA from polysome to replication complex. *Nat. New Biol.* **231**, 42–46.
 56. Jacobson A.B. (1991) Secondary structure of coliphage Q β RNA. Analysis by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **221**, 557–570.
 57. Vollenweider H.J., Koller T., Weber H., Weissmann C. (1976) Physical mapping of Q β replicase binding sites on Q β RNA. *J. Mol. Biol.* **101**, 367–377.
 58. Draper D.E., Pratt C.W., von Hippel P.H. (1977) *Escherichia coli* ribosomal protein S1 has two polynucleotide binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 4786–4790.
 59. Draper D.E., von Hippel P.H. (1978) Nucleic acid binding properties of *Escherichia coli* ribosomal protein S1. I. Structure and interactions of binding site I. *J. Mol. Biol.* **122**, 321–338.
 60. Draper D.E., von Hippel P.H. (1978) Nucleic acid binding properties of *Escherichia coli* ribosomal protein S1. II. Co-operativity and specificity of binding site II. *J. Mol. Biol.* **122**, 339–359.
 61. Subramanian A.R. (1983) Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **28**, 101–142.
 62. Gassen H.G. (1980) Ligand-induced conformational changes in ribonucleic acids. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **24**, 57–86.
 63. Thomas J.O., Szer W. (1982) RNA-helix-destabilizing proteins. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **27**, 157–187.
 64. Kamen R. (1975) Structure and function of the Q β RNA replicase. In: *RNA Phages*. Ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 203–234.
 65. Kolb A., Hermoso J.M., Thomas J.O., Szer W. (1977) Nucleic acid helix-unwinding properties of ribosomal protein S1 and the role of S1 in mRNA binding to ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 2379–2383.
 66. Hajnsdorf E., Boni I.V. (2012) Multiple activities of RNA-binding proteins S1 and Hfq. *Biochimie.* **94**, 1544–1553.
 67. Landers T.A., Blumenthal T., Weber K. (1974) Function and structure in ribonucleic acid phage Q β ribonucleic acid replicase. The roles of the different subunits in transcription of synthetic templates. *J. Biol. Chem.* **249**, 5801–5808.
 68. Brown S., Blumenthal T. (1976) Reconstitution of Q β RNA replicase from a covalently bonded elongation factor Tu-Ts complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 1131–1135.
 69. Brown S., Blumenthal T. (1976). Function and structure in ribonucleic acid phage Q β ribonucleic acid replicase. Effect of inhibitors of EF-Tu on ribonucleic acid synthesis and renaturation of active enzyme. *J. Biol. Chem.* **251**, 2749–2753.
 70. Blumenthal T. (1980) Interaction of host-coded and virus-coded polypeptides in RNA phage replication. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **210**, 321–335.
 71. Carmichael G.G., Landers T.A., Weber K. (1976) Immunochemical analysis of the functions of the subunits of phage Q β ribonucleic acid replicase. *J. Biol. Chem.* **251**, 2744–2748.
 72. Hori K., Harada K., Kuwano M. (1974) Function of bacteriophage Q β replicase containing an altered subunit IV. *J. Mol. Biol.* **86**, 699–708.
 73. Mitsunari Y., Hori K. (1973) Q β replicase-associated, polycytidylic acid-dependent polyguanylic acid polymerase. I. Characterization of the reaction. *J. Biochem.* **74**, 263–271.
 74. Nissen P., Kjeldgaard M., Thirup S., Polekhina G., Reshetnikova L., Clark B.F., Nyborg J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science.* **270**, 1464–1472.
 75. Nissen P., Thirup S., Kjeldgaard M., Nyborg J. (1999) The crystal structure of Cys-tRNA^{Cys}-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure.* **7**, 143–156.
 76. Levisohn R., Spiegelman S. (1968) The cloning of a self-replicating RNA molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **60**, 866–872.
 77. Mills D.R., Bishop H.L., Spiegelman S. (1968) The mechanism and direction of RNA synthesis templated by free minus strands of a “little” variant of Q β RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **60**, 713–720.
 78. Kacian D.L., Mills D.R., Spiegelman S. (1971) The mechanism of Q β replication: sequence at the 5' terminus of a 6-S RNA template. *Biochim. Biophys. Acta.* **238**, 212–223.
 79. Kacian D.L., Mills D.R., Kramer F.R., Spiegelman S. (1972) A replicating RNA molecule suitable for a de-

- tailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**, 3038–3042.
80. Mills D.R., Kramer F.R., Spiegelman S. (1973) Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule. *Science*. **180**, 916–927.
 81. Biebricher C.K. (1987) Replication and evolution of short-chained RNA species replicated by Q β replicase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 299–306.
 82. Horiuchi K. (1975) Genetic studies of RNA phages. In: *RNA Phages*. Ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 29–50.
 83. Palasingam K., Shaklee P.N. (1992) Reversion of Q β RNA phage mutants by homologous RNA recombination. *J. Virol.* **66**, 2435–2442.
 84. 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.
 85. Cooper P.D., Steiner-Pryor S., Scotti P.D., DeLong D. (1974) On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J. Gen. Virol.* **23**, 41–49.
 86. Kirkegaard K., Baltimore D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*. **47**, 433–443.
 87. Lai M.M.C. (1992) RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* **56**, 61–79.
 88. Chetverina H.V., Chetverin A.B. (1993) Cloning of RNA molecules *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **21**, 2349–2353.
 89. Chetverin A.B., Chetverina H.V. (2008) Molecular colony technique: a new tool for biomedical research and clinical practice. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **82**, 219–255.
 90. Chetverina H.V., Demidenko A.A., Ugarov V.I., Chetverin A.B. (1999) Spontaneous rearrangements in RNA sequences. *FEBS Lett.* **450**, 89–94.
 91. 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.
 92. Nagy P.D., Simon A.E. (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology*. **235**, 1–9.
 93. Pierangeli A., Bucci M., Forzan M., Pagnotti P., Equestre M., Pérez Bercoff R. (1999) “Primer alignment-and-extension”: a novel mechanism of viral RNA recombination responsible for the rescue of inactivated poliovirus cDNA clones. *J. Gen. Virol.* **80**, 1889–1897.
 94. Kim M.J., Kao C. (2001) Factors regulating template switch *in vitro* by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 4972–4977.
 95. Gilbert W., de Souza S.J. (1999) Introns and the RNA World. In: *The RNA World*, 2nd ed. Eds Gesteland R.F., Cech T.R., Atkins J.F. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 221–231.

UNSOLVED PUZZLES OF Q β REPLICASE

A. B. Chetverin¹, *, V. I. Ugarov¹, H. V. Chetverina¹

¹*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*e-mail: achetverin@yandex.ru

Q β phage replicase has been the first RNA-directed RNA polymerase purified to homogeneity and intensively studied *in vitro*. In the mid-sixties, papers on Q β and related replicases appeared in nearly every issue of the PNAS journal. By 1968, the mechanism of its action seemed to be almost completely understood. However, even now, a half of century later, a number of fundamental questions remains unanswered. How does the replicase manage to prevent the template and its complementary copy from annealing during the entire replication round? How does it recognize its templates? What is the function of the translation factors present in the replicase molecule? What is the mechanism the replicase uses to join (recombine) separate RNA molecules? Even the determination of the crystal structure of Q β replicase did not help much. Certainly, there remains a lot to discover in the replication of Q β phage, one of the smallest viruses known.

Keywords: RNA-directed RNA polymerase, replicative intermediate, template recognition, closed conformation, ribosomal protein S1, elongation factor Tu, elongation factor Ts, RNA recombination