

© О.В. ТРОФИМОВ  
oleg\_v\_trofimov@mail.ru

УДК 577.215

## ПОДАВЛЕНИЕ РЕКОМБИНАЦИИ В ПРОЦЕССЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ\*

**АННОТАЦИЯ.** Показано, что проведение обратной транскрипции фрагментов РНК (партнеров рекомбинации) в иммобилизованной среде (полиакриламидном геле), а также уменьшение концентрации обратной транскриптазы в реакционной смеси позволяет понизить примерно в 10000 раз частоту гомологичной рекомбинации, осуществляемой данным ферментом.

**SUMMARY.** The research shows that realization of reverse transcription of RNA fragments (partners of recombination) into immobilized environment (polyacrylamidic gel) and also the decrease of reverse transcriptase concentration in reaction mixture allow to reduce approximately in 10000 times the frequency of homologous recombination, accomplished by this enzyme.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Обратная транскрипция, рекомбинация, смена матриц.  
**KEY WORDS.** Reverse transcription, recombination, template switching.

Рекомбинация РНК представляет собой перераспределение нуклеотидных последовательностей (как между молекулами, так и внутри одной молекулы), приводящее к возникновению новых молекул РНК. Существуют два принципиально разных способа рекомбинации: репликативный (при котором комплементарная копия первой матрицы служит праймером для копирования другой матрицы) и нерепликативный (рекомбинация происходит путем трансэтерификации — разрыва и перекрестного соединения родительских цепей). Было предложено два механизма репликативной рекомбинации: механизм «смены матриц» [1], [2] и его частный случай — механизм «отжига и удлинения праймера» [3]. Суть их обоих сводится к удлинению праймера, поэтому репликативную рекомбинацию также называют праймер-зависимой.

Впервые о рекомбинации РНК было заявлено в начале 1960-х гг. при изучении обмена генетическими маркерами между родственными штаммами вируса полиомиелита [4], [5]. Позднее это явление наблюдали у множества животных и растительных вирусов [6]. Большинство данных о рекомбинации РНК и ее механизмах получены в системах *in vivo* на пикорнавирусах, у которых она происходит по гомологичному типу. Гомологичная рекомбинация РНК была также обнаружена в экспериментах *in vivo* в клетках *E.coli* [7]. Однако существует несколько примеров негомологичной рекомбинации у РНК-содержащих вирусов. Наиболее распространенный случай — образование дефектных интерферирующих геномов (DI-геномов) в результате делеции части вирусного генома. DI-геномы обнаружены у большинства РНК-содержащих вирусов [8].

\* Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственный контракт № П621).

Первое серьезное указание на наличие негомологичной рекомбинации РНК в прокариотических системах было получено в результате определения последовательностей негеномных (сателлитных) РНК фага Q $\beta$  [9]. Эти РНК принято обозначать «RQ» с указанием их точной длины в нуклеотидах.

Для прямого наблюдения негомологичной рекомбинации требуются специальные подходы. Так, например, используют делеционные варианты или фрагменты вирусного генома, перекрывающиеся в нетранслируемой области, рекомбинация между которыми может привести к образованию полноценного вируса [10]. Негомомологичную рекомбинацию можно также наблюдать, если вирус несет вставку в нетранслируемом участке генома. Показано, что с некоторой частотой вирус спонтанно возвращается к дикому фенотипу. Секвенирование ревертантов указывает на тот факт, что их образование сопряжено с делецией вставки [11].

Очевидно, что подавляющее большинство работ в этой области посвящено исследованиям РНК-рекомбинации *in vivo*. Однако такой подход не может дать ответы на все поставленные вопросы. В частности, остается неясным, посредством каких именно компонентов, присутствующих в клетке, происходит рекомбинация. Кроме того, в исследованиях *in vivo* решающее значение принимает отбор рекомбинантов по принципу жизнеспособности, то есть имеет место селективность условий их размножения.

Таким образом, на современном этапе исследований РНК-рекомбинации, а также и в других областях молекулярной биологии и генетики возникла острая необходимость применения методов эффективного размножения молекул РНК в отсутствие селекции. Основным таким методом в наши дни является обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией [12] (далее ОТ-ПЦР). Техника ОТ-ПЦР широко применяется для размножения продуктов рекомбинации в препаратах РНК, выделенных из инфицированных клеток [13], [14]. Однако использование ОТ-ПЦР зачастую может приводить к искажению экспериментальных результатов вследствие образования артефактных (рекомбинантных) кДНК (ДНК-копий РНК) в процессе обратной транскрипции, в результате чего среди детектированных молекул могут быть широко представлены гомологичные рекомбинанты. Данная проблема является следствием способности обратной транскриптазы к смене матриц на гомологичных участках РНК [15]. Наибольшее свое проявление артефактная рекомбинация находит в экспериментах с использованием в качестве матрицы смеси различных РНК, многие из которых с большой долей вероятности могут содержать гомологичные нуклеотидные последовательности.

Для процесса обратной транскрипции механизм смены матриц был доказан экспериментально [16]. Перенос растущей цепи кДНК на новый участок той же или другой молекулы РНК имеет место в жизненном цикле ретровирусов и является естественным свойством обратных транскриптаз [17].

Необходимым условием для смены матриц является взаимное сближение (встреча) гомологичных участков молекул РНК — партнеров рекомбинации. Следовательно, понизив вероятность такой встречи, можно добиться значительного снижения частоты смены матриц, а значит, и частоты рекомбинации, осуществляемой обратными транскриптазами. На практике это возможно реализовать с помощью проведения обратной транскрипции не в жидкости, а в среде, существенно ограничивающей свободу перемещения молекул РНК-субстратов рекомбинации, например, в слое полиакриламидного геля.

Целью данного исследования явилось понижение частоты рекомбинации в процессе обратной транскрипции. Для этого необходимо было сконструировать и получить фрагменты РНК с гомологичными участками, на которых может происходить смена матриц; определить частоту рекомбинации этих фрагментов в процессе обратной транскрипции в жидкой среде; выяснить, удастся ли понизить частоту артефактной рекомбинации, если проводить обратную транскрипцию в геле.

Разработка эффективных способов снижения частоты рекомбинации, осуществляемой обратными транскриптазами, позволит существенно увеличить информативность и точность результатов фундаментальных и прикладных исследований, проводимых с использованием данных ферментов. В частности, метод подавления рекомбинации в процессе обратной транскрипции может с успехом применяться не только в исследованиях собственно рекомбинации РНК, но и в области молекулярной диагностики заболеваний с помощью ОТ-ПЦР. В данном случае низкий уровень рекомбинации на стадии обратной транскрипции будет способствовать увеличению специфичности ОТ-ПЦР, и, следовательно, повышению эффективности и точности клинического анализа.

В данном исследовании использовали две пары фрагментов РНК: 5'- и 3'-фрагменты RQ135<sub>1</sub> РНК (одной из сателлитных РНК фага Q $\beta$ ) с гомологичными участками длиной 23 нуклеотида, а также 5'- и 3'-фрагменты GFP РНК (матричной РНК зеленого флуоресцентного белка) с гомологичными участками длиной 88 нуклеотидов. Для их получения были приготовлены плазмидные конструкции, содержащие в своем составе последовательности кДНК данных фрагментов под контролем T7-промотора. Процедуру клонирования кДНК проводили с применением основных методов генетической инженерии, таких, как выращивание бактериальной культуры, ее трансформация, ПЦР, гель-электрофорез нуклеиновых кислот (в агарозе и полиакриламиде), а также методы рестрикции и лигирования *in vitro*. Наличие в полученных конструкциях T7-промотора позволило синтезировать фрагменты РНК с помощью *in vitro* транскрипции с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7.

Для определения частоты рекомбинации, осуществляемой обратной транскриптазой (в работе использовали обратную транскриптазу M-MLV — фермент вируса мышиной и крысиной лейкемии Молони) 5'- и 3'-фрагменты РНК расплавляли, а затем проводили обратную транскрипцию и гель-фильтрацию. Аликвоты этого препарата кДНК добавляли в смеси для ПЦР. Частоту рекомбинации определяли, сравнивая эффективность обратной транскрипции фрагментов РНК с эффективностью обратной транскрипции полноразмерной РНК. Стоит отметить, что 5'- и 3'-фрагменты (как RQ, так и GFP) РНК по отдельности не могли давать специфического продукта ОТ-ПЦР. Только в том случае, когда между фрагментами происходила рекомбинация, то есть они оказывались частями одной молекулы, наблюдался синтез специфического ПЦР-продукта.

Стандартная концентрация обратной транскриптазы в смеси, рекомендуемая фирмами, поставляющими фермент, составляет 10 единиц/мкл. Однако ранее было показано, что уменьшение этой концентрации в 100 раз не приводит к снижению эффективности обратной транскрипции. Поэтому сначала эксперименты по определению частоты артефактной рекомбинации фрагментов РНК

в жидкой среде проводили при использовании уменьшенной концентрации фермента (0,1 единицы/мкл). Выяснилось, что частота артефактной рекомбинации в этом случае составляет приблизительно  $10^{-5}$ . При использовании стандартной концентрации обратной транскриптазы частота рекомбинации возрастала примерно на 2 порядка (рис. 1).

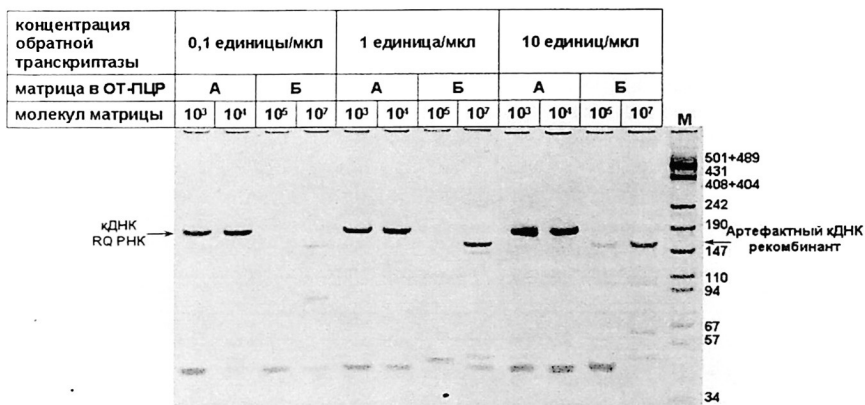


Рис. 1. Снижение частоты артефактной рекомбинации при уменьшении концентрации обратной транскриптазы

Примечание: А. Полноразмерная RQ РНК. Б. Смесь 5'- и 3'-фрагментов RQ РНК. М. Маркеры длины (плазмида pUC129, обработанная рестриктазой HpaII). Справа указаны длины фрагментов маркерной ДНК.

Электрофорез в 8% полиакриламидном геле в нативных условиях. Окрашено бромистым этидием.

Видно, что понижение концентрации обратной транскриптазы в 100 раз действительно существенно не влияет на эффективность обратной транскрипции. Сопутствующее этому снижению частоты артефактной рекомбинации, возможно, связано с тем, что эффективность рекомбинации (события, носящего случайный, вероятностный характер) зависит от количества молекул обратной транскриптазы, готовых в конкретный момент времени сменить матрицу.

Во всех последующих экспериментах использовали стандартную концентрацию обратной транскриптазы (10 единиц/мкл). Частота артефактной рекомбинации 5'-RQ- и 3'-RQ-фрагментов в процессе обратной транскрипции в жидкой среде, проведенной с использованием стандартной концентрации обратной транскриптазы, составила примерно  $10^{-3}$  (рис. 2). Аналогичный эксперимент проводили с использованием фрагментов RQ-GFP РНК (рис. 3). Выяснилось, что фрагменты GFP РНК рекомбинируют в этих условиях с частотой, равной примерно 10%. Это значение на 2 порядка выше, чем значение частоты артефактной рекомбинации фрагментов RQ РНК в жидкой среде. Возможно, столь высокая частота артефактной рекомбинации GFP-фрагментов обусловлена наличием в их составе гомологичных участков большей длины (88 нуклеотидов, в то время как длина гомологичных участков RQ-фрагментов — 23 ну-

клеотида), что может усиливать их комплементарное взаимодействие и увеличивать вероятность смены матриц.

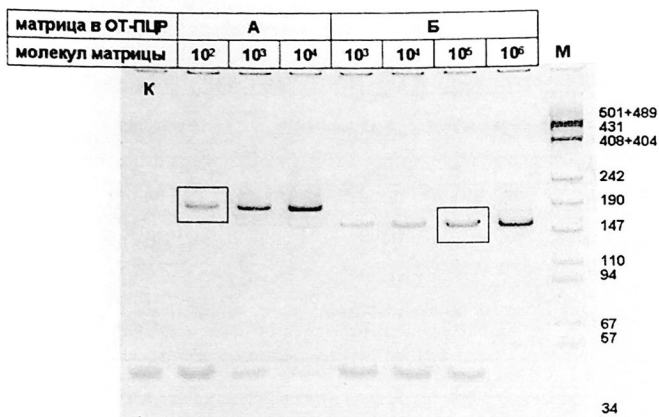


Рис. 2. Определение частоты артефактной рекомбинации в процессе обратной транскрипции в жидкости с использованием RQ-фрагментов

Примечание: А. Полноразмерная RQ РНК. Б. Смесь 5'- и 3'-фрагментов RQ РНК. К. Контроль без добавления матрицы. М. Маркеры длины (плазмида рUC129, обработанная рестриктазой HpaII). Справа указаны длины фрагментов маркерной ДНК. Электрофорез в 8% полиакриламидном геле в нативных условиях. Окрашено бромистым этидием.

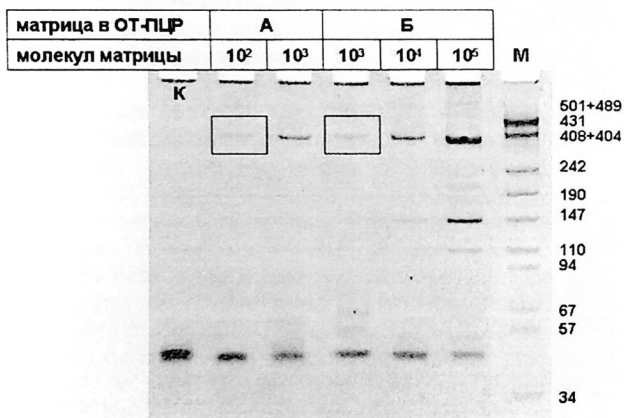


Рис. 3. Определение частоты артефактной рекомбинации в процессе обратной транскрипции в жидкости с использованием GFP-фрагментов

Примечание: А. Полноразмерная GFP РНК. Б. Смесь 5'- и 3'-фрагментов GFP РНК. К. Контроль без добавления матрицы. М. Маркеры длины (плазмида рUC129, обработанная рестриктазой HpaII). Справа указаны длины фрагментов маркерной ДНК. Электрофорез в 8% полиакриламидном геле в нативных условиях. Окрашено бромистым этидием.

ПЦР в геле проводили с использованием метода молекулярных колоний [18]. В ходе экспериментов по определению частоты артефактной рекомбинации, происходящей в процессе обратной транскрипции в геле, 5'- и 3'-фрагменты RQ или GFP РНК расплавляли, затем с частью из них проводили ОТ-ПЦР в геле, а с частью — обратную транскрипцию в жидкости, гель-фильтрацию и ПЦР в геле. Частоту рекомбинации определяли, сравнивая эффективность обратной транскрипции фрагментов РНК с эффективностью обратной транскрипции полноразмерной РНК. Оказалось, что проведение обратной транскрипции в геле действительно позволяет снизить частоту артефактной рекомбинации. Для фрагментов RQ РНК частота артефактной рекомбинации в геле составила примерно  $10^{-5}$  (рис. 4), для фрагментов GFP РНК — примерно  $10^{-3}$  (рис. 5), то есть в обоих случаях частота артефактной рекомбинации за счет проведения обратной транскрипции в геле снизилась примерно в 100 раз.

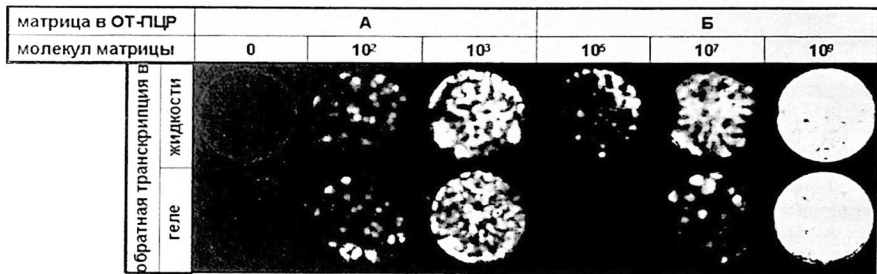


Рис. 4. Снижение частоты артефактной рекомбинации в процессе обратной транскрипции в геле с использованием RQ-фрагментов

Примечание: А. Полноразмерная RQ РНК. Б. Смесь 5'- и 3'-фрагментов RQ РНК.

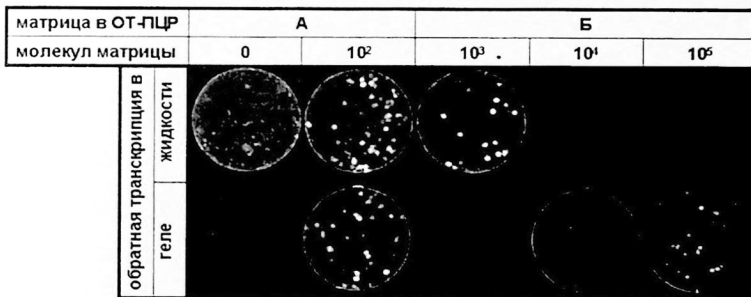


Рис. 5. Снижение частоты артефактной рекомбинации в процессе обратной транскрипции в геле с использованием GFP-фрагментов

Примечание: А. Полноразмерная GFP РНК. Б. Смесь 5'- и 3'-фрагментов GFP РНК.

В заключение хотелось бы отметить, что проведение обратной транскрипции в геле — не единственный способ понижения частоты образования артефактов. В ходе данной работы было показано, что, помимо снижения частоты артефактной рекомбинации на 2 порядка в результате проведения реакции в геле, воз-

можно также и ее снижение примерно на 2 порядка за счет уменьшения концентрации обратной транскриптазы. Поскольку на молекулярном уровне первопричины этих явлений различны, то в результате комплексного применения вышеперечисленных подходов эффекты подавления артефактной рекомбинации должны суммироваться, что позволит наблюдать снижение ее частоты примерно в 10000 раз.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooper, P.D. [et al.]. On the nature of poliovirus genetic recombinants // J. General Virology. 1974. №23. P. 41-49.
2. Kirkegaard, K., Baltimore, D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus // Cell. 1986. №47. P. 433-443.
3. Pierangeli, A. [et al.]. 'Primer alignment-and-extension': a novel mechanism of viral RNA recombination responsible for the rescue of inactivated poliovirus cDNA clones // J. General Virology. 1999. №80. P. 1889-1897.
4. Hirst, G.K. Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza virus // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1962. №27. P. 303-309.
5. Ledinko, N. Genetic recombination with poliovirus type 1: studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain // Virology. 1963. №180. P. 107-119.
6. Lai, M.M.C. RNA recombination in animal and plant viruses // Microbiol. Rev. 1992. № 56. P. 61-79.
7. Palasingam, K., Shaklee, P.N. Reversion of Q $\beta$  phage mutants by homologous RNA recombination // J. Virology. 1992. №66. P. 2435-2442.
8. Четверин, А.Б. Новый взгляд на рекомбинацию РНК // Молекулярная биология. 1999. №33. С. 985-996.
9. Munishkin, A.V., Voronin, L.A., Chetverin, A.B. An *in vivo* recombinant RNA capable of autocatalytic synthesis by Q $\beta$  replicase // Nature. 1988. № 333. P. 473-475.
10. Hajjou, M. [et al.]. Nonhomologous RNA-RNA recombination events at the 3' non-translated region of the Sindbis virus genome: hot spots and utilization of nonviral sequences // J. Virology. 1996. №70. P. 5153-5164.
11. Olsthoorn, R.C.L., Duin, J., van. Random removal of inserts from an RNA genome: selection against single-stranded RNA // J. Virology. 1996. № 63. P. 1069-1075.
12. Simpson, D., Crosby, R., Skopek, T. A method for specific cloning and sequencing of human hprt cDNA for mutation analysis // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1988. № 151. P. 487-492.
13. Jarvis, T.S., Kirkegaard, K. The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination // Trends Genetics. 1991. № 7. P. 186-191.
14. Nagy, P.D., Bujarski, J.J. Efficient System of homologous RNA recombination in brome mosaic virus: sequence and structure requirements and accuracy of crossovers // J. Virology. 1995. № 69. P. 131-140.
15. Negroni, M. [et al.]. Homologous recombination promoted by reverse transcriptase during copying of two distinct RNA templates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. № 92. P. 6971-6975.
16. Diaz, L., DeStefano, J.J. Strand transfer is enhanced by mismatched nucleotides at the 3' primer terminus: a possible link between HIV reverse transcriptase fidelity and recombination // Nucleic Acids Res. 1996. № 24. P. 3086-3092.
17. Gilboa, E. [et al.]. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects // Cell. 1979. № 18. P. 93-100.
18. Chetverina, H.V. [et al.]. Molecular colony diagnostics: detection and quantitation of viral nucleic acids by in-gel PCR // Biotechniques. 2002. № 33. P. 150-156.