



УДК 578.835.15:578.56

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ОБЛАСТИ ПЕРЕКРЕСТА В ГЕНОМЕ
ДВУХ МЕЖТИПОВЫХ РЕКОМБИНАНТОВ ПОЛИОВИРУСА*Романова Л. И., Викторова Е. Г., Тольская Е. А.,
Колесникова М. С., Гусева Е. А., Агол В. П.**Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Рекомбинация между молекулами РНК была открыта около четверти века назад сначала у вируса полиомиелита, а затем и у других пикорна-вирусов [1] — мелких икосаэдрических вирусов животных, геном которых представлен единственной молекулой одноцепочечной РНК [2]. Доказательства того, что рекомбинанты полиовируса действительно содержат сегменты генома обоих родительских штаммов, были получены нами при исследовании вирус-специфических белков [3, 4] и при сравнении олигонуклеотидных карт соответствующих вирусных РНК [5–7]. Молекулярный механизм рекомбинации между геномными РНК неизвестен. Для понимания этого механизма крайне важно, в частности, выяснить: 1) насколько гомологичными должны быть рекомбинирующие последовательности РНК; 2) обладают ли какими-либо особенностями первичная и вторичная структуры РНК в области рекомбинации; 3) не сопровождается ли рекомбинация перестройками генома. Для ответа на эти вопросы было решено определить первичную структуру области перекреста у ряда межтиповых рекомбинантов полиовируса. В настоящем письме сообщаются результаты, полученные для двух рекомбинантов: $a3/a1-2$ и $v3(119)/a1-5/2$.

Рекомбинант $a3/a1-2$ описан нами ранее [7], а рекомбинант $v3(119)/a1-5/2$ был получен аналогичным методом [4] при скрещивании штамма 119 (нейровирулентного ревертанта вакцинного полиовируса типа 3 [8]) с клоном LSc-gr3 (гуанидин-резистентным мутантом вакцинного вируса типа 1 [7]). Судя по олигонуклеотидной карте, 5'-концевая половина генома $a3/a1-2$ представлена нуклеотидными последовательностями, характерными для полиовируса типа 3, а 3'-концевая половина генома — последовательностями, характерными для полиовируса типа 1 [7]. Олигонуклеотидные карты геномов межтиповых рекомбинантов $v3(119)/a1-5/2$ и $a3/a1-2$ оказались весьма сходными, что указывало на сходную локализацию участков перекреста. Границы области перекреста можно было приблизительно оценить по наличию на картах крупных олигонуклеотидов, характерных для геномных РНК серотипов 1 и 3 [7]. Мы предполагали, что у обоих рекомбинантов область перекреста находится между нуклеотидами 4008 и 4209 полиовирусной РНК [9], поскольку на картах присутствовали олигонуклеотиды 1' (характерен для РНК полиовируса типа 3 [10]) и 7 (характерен для РНК полиовируса типа 1 [11]), локализация которых в вирусном геноме известна.

Первичную структуру предполагаемой области перекреста в геномах рекомбинантов полиовируса определяли в результате обратной транскрипции соответствующих РНК с помощью ревертазы вируса птичьего миеобластома («primer extension», reverse sequencing [12]) в присутствии терминаторов синтеза ДНК 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид 5'-трифосфатов [13]. В качестве «затравки» использовали олигодезоксирибонуклеотид 5'-dCACCCTCCAG-3', синтезированный триэфириым методом [14] и комплементарный 3'-концевому участку предполагаемой области перекреста, который расположен между нуклеотидами 4198 и 4209 геномной РНК полиовируса типа 1.

	4100	4130
LSc 2ab		
a3/a1-2	cuUaGAaagaagcaugCgaUGUuCuggagauAccUuaug	
v3(119)/a1-5/2	cuGaAGaagaagcaugUgaCACuU <u>ggagau</u> AccUuaug	
Leon 12a ₁ b	cuGaAGaagaagcaugUgaCACuU <u>ggagau</u> UccCuaug	

	4140	4170
	uCaCCaAGcaAggugaCaguugguugaaGaaGuuuacuga	
	uCaCCaAGcaAggugaCaguugguugaaGaaGuuuacuga	
	uUaUUaGAcAGggugaU <u>aguugguugaa</u> GaaGuuuacuga	
	uUaUUaGAcAGggugaU <u>aguugguugaa</u> AaaAuuuacuga	

Первичная структура области перекреста в геномах родительских штаммов полиовируса и их рекомбинантах. Нуклеотиды, различающиеся в геномах родительских штаммов, обозначены прописными, а идентичные нуклеотиды — строчными буквами. Участки перекреста подчеркнуты. Нумерация нуклеотидов дана по [9]

На рисунке приведена структура области перекреста в геномах исследованных нами рекомбинантов, а также известная структура соответствующей области родительских полиовирусных геномных РНК [9]. Так, для штамма a3/a1-2 место перекреста может быть определено с точностью до 7 нуклеотидов (между нуклеотидами 4121 и 4127), а для штамма v3(119)/a1-5/2 — с точностью до 11 нуклеотидов (между нуклеотидами 4153 и 4163). Согласно рисунку, у исследованных вирусов рекомбинация не сопровождалась делециями, вставками или другими мутациями.

В настоящее время исследуется первичная структура области перекреста у других рекомбинантов полиовируса. Возможно, это позволит выявить структурные детерминанты, способствующие рекомбинации между геномными РНК полиовируса. Такие данные важны для построения общей модели рекомбинации между РНК-геномами.

Авторы выражают благодарность В. М. Кавсану за предоставление препарата ревертазы, А. А. Краевскому за терминаторы синтеза ДНК и В. Д. Смирнову за полезные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cooper P. D. In: Comprehensive virology. V. 9/Eds Fraenkel-Conrat H., Wagner R. N. Y.: Plenum Press, 1977, p. 133-207.
2. Cooper P. D., Agol V. I., Bachrach H. L., Brown F., Ghendon Y., Gibbs S. B., Poverly R. C., Rueckert R. R., Schaffer F. L., Tyrell D. A. J. Intervirology, 1978, v. 10, № 3, p. 165-180.
3. Romanova L. I., Tolskaya E. A., Kolesnikova M. S., Agol V. I. FEBS Lett., 1980, v. 118, № 1, p. 109-112.
4. Tolskaya E. A., Romanova L. I., Kolesnikova M. S., Agol V. I. Virology, 1983, v. 124, № 1, p. 121-132.
5. Романова Л. И., Викторова Е. Г., Тольская Е. А., Колесникова М. С., Агол В. И. Мол. генетика, микробиол., вирусол., 1983, № 7, с. 41-43.
6. Агол В. И., Викторова Е. Г., Грачев В. П., Дроздов С. Г., Козлов В. Г., Колесникова М. С., Ральф Н. М., Романова Л. И., Тольская Е. А., Тюфанов А. В. Мол. генетика, микробиол. и вирусол., 1984, № 11, с. 34-37.
7. Agol V. I., Grachev V. P., Drozdov S. G., Kolesnikova M. S., Kozlov V. G., Ralph N. M., Romanova L. I., Tolskaya E. A., Tyufanov A. V., Viktorova E. G. Virology, 1984, v. 136, № 1, p. 41-55.
8. Cann A. J., Stanway G., Hughes P. J., Minor P. D., Evans D. M. A., Schild G. C., Almond J. W. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 20, p. 7787-7792.
9. Toyoda H., Kohara M., Kataoka Y., Suganuma T., Omata T., Imura N., Nomoto A. J. Mol. Biol., 1984, v. 174, № 4, p. 561-586.

10. Agol V. I., Drozdov S. G., Grachev V. P., Kolesnikova M. S., Kozlov V. G., Ralph N. M., Romanova L. I., Tolskaya E. A., Tyufjanov A. V., Viktorova E. G. *Virology*, 1985, v. 143, № 2, p. 467-477.
11. Kitamura N., Semler B. L., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J., Dorner A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E. *Nature*, 1981, v. 291, № 5816, p. 547-553.
12. Benyajati C., Spoerel N., Haymerle H., Ashburner M. *Cell*, 1983, v. 33, № 1, p. 125-133.
13. Chidgevadze Z. G., Beabealashvili R. S., Atrazhev A. M., Kukhanova M. K., Azhaev A. V., Kraevsky A. A. *Nucl. Acids Res.*, 1984, v. 12, № 3, p. 1671-1686.
14. Добрынин В. П., Коробко В. Г., Северцова И. В., Власов В. П., Быстров Н. С., Колосов М. И. *Биоорганич. химия*, 1981, т. 7, № 11, с. 1745-1749.

Поступило в редакцию
17.VII.1985

PRIMARY STRUCTURE OF THE CROSSOVER REGION IN GENOMES OF TWO INTERTYPIC POLIOVIRUS RECOMBINANTS

ROMANOVA L. I., VIKTOROVA E. G., TOLSKAYA E. A., KOLESNIKOVA M. S.,
GUSEVA E. A., AGOL V. I.

*Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides, Academy of
Medical Sciences of the USSR, Moscow Region*

The nucleotide sequence of the crossover region on genomes of two intertypic (type 3/type 1) poliovirus recombinant: has been determined by the primer extension method. No deletions, insertions or rearrangements have been observed. Identical contiguous sequences, 7 or 11 nucleotides in length, respectively, have been found in two regions of the parental genomes, involved in the recombination.