

## РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭФФЕКТА «СМЕНЫ МАТРИЦЫ» ПРИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ *IN VITRO*

\*А.Ю. Комков, аспирант, инженер-исследователь,

\*Ю.Б. Лебедев, заведующий лабораторией,

В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

\* Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

e-mail: alexandrkomkov@mail.ru

**П**редложена система *in vitro* для анализа эффекта «смены матрицы» РНК-зависимой ДНК-полимеразой в ходе реакции обратной транскрипции. Реализуется подход, основанный на ступенчатой обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР). В качестве матрицы используется РНК, имеющая участок со стабильной вторичной структурой, который фланкирован короткими гомологичными фрагментами. Описанная система может найти применение при тестировании эффективности работы новых и существующих мутантных форм обратных транскриптаз, предназначенных для решения исследовательских и генноинженерных задач.

We investigated an *in vitro* system for the analysis of template switching effect of RNA-dependent DNA-polymerase during reverse transcription reaction. An RT-PCR-based approach was realized. An RNA sample was used as a template. The RNA contains a region with a stable secondary structure flanked by two homologous sequences. The described system can find use for testing overall performance of new and existing forms of the reverse transcriptase.

**Ключевые слова:** *Alu-повтор, ретроэлемент, обратная транскриптаза, эффект «смены матрицы».*

**Key words:** *Alu repeat, retroelement, reverse transcriptase, template switching effect.*

### Введение

В последнее десятилетие значительно возрос интерес к изучению структуры и функций различных кодирующих и некодирующих РНК. Активно исследуются механизмы модификаций первичных и зрелых транскриптов (редактирование [1, 2], альтернативный сплайсинг [3–6], участие малых РНК в регуляции экспрессии генов [7, 8], обсуждаются возможные функции длинных некодирующих РНК [9–11]. Многие экспериментальные задачи предполагают работу с минимальными количествами РНК из ограниченных источников (например, определенные субпопуляции клеток отдельного организма). Рутинным подходом, применяемым в таких случаях, является исследование структуры молекул РНК по их амплифицированным кДНК-копиям. Кроме того, многие генноинженерные задачи требуют получения кДНК-копий различных сплайсированных и несплайсированных транскриптов.

Ферментом, осуществляющим синтез комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК, является обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза). Первоначально обратная транскриптаза была обнаружена у ретровирусов, в жизненном цикле которых она играет ключевую роль, копируя одноцепочечную геномную РНК вируса в двухцепочечную ДНК для последующей интеграции в геном хозяина [12]. В настоящее время для генноинженерных работ применяются модифицированные обратные транскриптазы из таких первоначальных источников как вирус лейкоза мыши (MMLV) и вирус миелобластома птицы (AMV). Основными характеристиками обратных транскриптаз, на которые прежде всего обращают внимание

исследователи, является точность синтеза кДНК (минимальное количество ошибочно встроенных нуклеотидов), оптимальная длина РНК-матрицы и оптимальный температурный режим работы. Большинство производимых в настоящее время обратных транскриптаз по заверениям фирм-производителей (Promega, США; Invitrogen, США; Fermentas, Литва; Eurogen, Россия и др.) эффективно для использования на матрицах длиной до 7 и более тысяч п.о. (пар оснований) при температурах в пределах 40–50°C.

В стороне остается вопрос о работе со сложными матрицами, способными образовывать устойчивые вторичные структуры. Также умалчивается о таком немаловажном свойстве как эффект «смены матрицы», в большей или меньшей степени характерном для разных типов обратных транскриптаз. Это свойство первоначально было обнаружено при изучении процесса репликации генома ретровирусов. В ходе первой стадии репликации смена РНК-матрицы происходит дважды. Во время этого процесса обратная транскриптаза без высвобождения синтезированной кДНК «перескакивает» с одного участка матрицы на другой, в котором и продолжается синтез [13, 14]. В исследовательской работе эффект «смены матрицы» может быть ответственен за неправильную интерпретацию экспериментальных данных [15]. Это касается выводов об альтернативном сплайсинге [16] по неканоническим сайтам и о случаях широко обсуждаемого в последние несколько лет транс-сплайсинга [17].

В данном исследовании мы рассматриваем эффект «смены матрицы» как один из возможных путей появления артефактных продук-

тов при синтезе кДНК человека *in vitro* и анализируем ограничения, вносимые структурой РНК-матриц, на использование обратных транскриптаз MMLV-типа для корректного синтеза кДНК. Также мы предлагаем систему тестирования обратных транскриптаз для оценки ожидаемого уровня артефактных продуктов синтеза кДНК.

### Результаты и их обсуждение

«Смена матрицы» в ходе реакции обратной транскрипции (рис. 1) происходит между фрагментами РНК, имеющими микрогомологичные последовательности [17]. Кроме того, необходимо наличие фактора, который бы препятствовал обратной транскриптазе продолжить синтез в текущем участке РНК и, таким образом, способствовал бы перемещению фермента в другой участок матрицы. Наиболее вероятным из таких факторов *in vitro* является образование вторичных структур РНК, которые могут создавать стерические затруднения для продвижения обратной транскриптазы по матрице. Стабильность вторичных структур должна определять степень проявления эффекта «смены матрицы» для одной и той же обратной транскриптазы. Образование вторичных структур РНК определяется наличием в их нуклеотидных последовательностях взаимно комплементарных участков, богатым источником которых являются противоположно ориентированные повторяющиеся элементы.

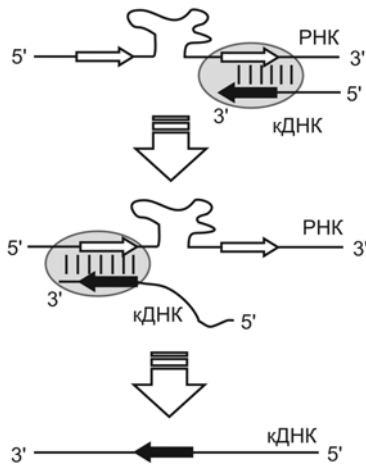


Рис. 1. Схема обратной транскрипции со «сменой матрицы». Белыми стрелками показаны участки гомологии в последовательности РНК, по которым происходит «смена матрицы».

В геноме человека основным источником повторов является семейство Alu-ретроэлементов, насчитывающее более 1 млн. копий [18], что в среднем соответствует одной инсерции через каждые 2.5–3 тысячи п.о. Но в действительности могут встречаться участки с более плотным расположением Alu и более разреженным. Alu-повторы имеют длину около 300 п.о. и состоят из двух GC-обогащенных участков, соединенных коротким poly(A)-линкером, оканчиваются длинным poly(A)-фраг-

ментом и фланкированы с обеих сторон парой коротких (до 20 п.о.) прямых повторов. Ближайшие копии Alu могут находиться в геноме как в совпадающих ориентациях, так и в противоположных. Повторы Alu рассеяны по геному случайным образом, поэтому ими одинаково насыщены и транскрибирующиеся участки генома, и межгенные области. Внутри транскрибирующихся районов основная доля Alu приходится на интроны, кроме того, инсерции Alu встречаются в 5'- и 3'-нетранслируемых областях (НТО) [18]. В силу достаточной протяженности и высокой степени комплементарности разно ориентированные Alu-повторы, присутствующие в нуклеотидных последовательностях РНК-матриц на небольшом расстоянии друг от друга, способствуют формированию высоко устойчивых вторичных («шпилечных») структур. В связи с этим, транскрипты интронов и НТО, насыщенных Alu-повторами, вероятно, наиболее подвержены воздействию эффекта «смены матрицы» при обратной транскрипции *in vitro*.

Для некоторых пар разнонаправленных Alu-повторов, локализованных в 3'-НТО генов, ранее были описаны случаи делетирования участка кДНК, фланкированного инсерциями Alu [19], но авторы работы интерпретировали наблюдаемые результаты как события альтернативного сплайсинга по неканоничным сайтам. Такая интерпретация может быть ошибочна. Для того чтобы избегать дальнейших ошибок, нужно иметь надежный критерий (тест-систему) для выбора подходящих обратных транскриптаз, который также позволял бы сделать вывод о необходимости смены стратегии эксперимента.

В настоящей работе мы проводили анализ эффекта «смены матрицы» на примере РНК, имеющей фиксированную длину, содержащей пару противоположно ориентированных инсерций Alu-ретроэлементов и две пары коротких гомологичных (но не идентичных) участков, фланкирующих область инсерций Alu (одна пара находится ближе к инсерциям, другая – дальше). Вывод о «смене матрицы» делали по наличию артефактных продуктов амплификации синтезированной кДНК. РНК-матрицы, обладающие подобными структурами, для которых описаны воспроизводимые события «смены матрицы» при обратной транскрипции *in vitro*, являются прекрасными моделями для создания на их основе систем тестирования обратных транскриптаз.

Схема эксперимента представлена на рис. 2а. Процесс подготовки РНК-матрицы включал несколько этапов. На первом этапе с использованием методов биоинформатики в геноме человека был выбран локус (первый интрон гена *RSRC2*), фрагмент которого мог быть ис-

пользован в качестве модели. Структура этого фрагмента отвечала заданным требованиям: присутствие единственной пары противоположно ориентированных инсерций Alu (AluYa5 и AluSq2), расположенных на достаточно близком расстоянии (около 400 п.о.) друг от друга, и наличие участков микрогомологии. Основные характеристики инсерций представлены в табл. 1. Одна из инсерций (AluYa5) полиморфна в популяциях человека. Это выражается в существовании в популяции двух типов аллелей: содержащих обе инсерции Alu (AluYa5 и

AluSq2) и аллелей, содержащих в том же локусе только AluSq2-инсерции. Фрагменты, содержащие обе инсерции, были использованы как «целевые», фрагменты с единственной инсерцией были выбраны в качестве контроля. Оба фрагмента были амплифицированы с помощью ПЦР. Источником для амплификации целевого фрагмента послужил образец ДНК, гомозиготный по присутствию инсерции AluYa5, источником для «контрольного» фрагмента – образец, гомозиготный по отсутствию инсерции AluYa5.

Таблица 1. Основные характеристики инсерций AluYa5 и AluSq2.

Ген/локус	RSRC2	12q24.31
Семейство Alu	AluYa5	AluSq2
Координаты UCSC	chr12:123010358-123010668	chr12:123009639-123009940
Длина всего Alu	311 п.о.	302 п.о.
Длина основной части	282 п.о.	285 п.о.
Длина poly(A)	29 п.о.	17 п.о.
Ориентация	Прямая	Обратная
Расстояние между Alu	418 п.о.	
Гомология	88%	

Вторым этапом было создание конструкта ДНК для осуществления транскрипции *in vitro*. Для этого полученные на предыдущей стадии эксперимента фрагменты ДНК были лигированы в вектор рGEM-T, содержащий промотор T7 РНК-полимеразы. Векторами со «вставками» были трансформированы клетки *E. coli* (штамм DH5 $\alpha$ ), из которых были отобраны клоны, содержащие плазмиды со «вставками» в нужной ориентации. Участки обоих типов плазмид, включающие промотор и соответствующую «вставку», были амплифицированы. Полученные конструкты использовали в качестве матриц для наработки необходимого количества «целевой» и «контрольной» РНК. Таким образом, были получены два образца РНК, обладающие фиксированной длиной и имеющие известные (заданные) нуклеотидные последовательности, которые затем будут сравнены с последовательностями соответствующих продуктов синтеза кДНК.

На следующем этапе эксперимента была осуществлена реакция обратной транскрипции *in vitro*. В качестве РНК-матрицы использовали подготовленные образцы РНК. Для реакции применяли обратную транскриптазу Mint (Евроген, Россия), относящуюся к MMLV-типу. Синтезированные «контрольный» и «целевой» образцы кДНК были амплифицированы с помощью ПЦР. После электрофоретического анализа амплификатов (рис. 2б) были определены нуклеотидные последовательности ампликонов (рис. 3а). Размер наблюдаемого ампликона «целевого» образца (122 п.о.) значительно отличается от ожидаемого (1154 п.о.) (рис. 2б). Разница в длинах ожидаемого и наблюдаемого

ПЦР-продуктов соответствует длине фрагмента, фланкированного парой инсерций Alu (включая обе инсерции). Это предположение было подтверждено в ходе анализа нуклеотидной последовательности полученного укороченного ПЦР-продукта (рис. 3а). Помимо этого, в его нуклеотидной последовательности отсутствует один из двух (левый) ближайших к инсерциям участков микрогомологии.

Помимо обратной транскрипции в эксперименте присутствуют еще две стадии, на которых потенциально могла происходить «смена матрицы» с удалением фрагмента, фланкированного парой инсерций Alu. К этим стадиям относится транскрипция *in vitro* и ПЦР-амплификация. Исходя из того, что образец одноцепочечной РНК, полученной при транскрипции *in vitro*, по электрофоретической подвижности соответствует фрагменту двуцепочечной ДНК длиной 500–600 п.о. (рис. 2б), его длина должна превышать 1000 нуклеотидов и соответствовать длине полноразмерной «целевой» РНК. ПЦР-амплификация также исключается в данном эксперименте из списка процессов, потенциально ответственных за формирование укороченного продукта. Это объясняется тем, что при амплификации полноразмерного фрагмента ДНК (содержащего обе инсерции Alu и участок между ними) появление укороченного ПЦР-продукта не детектируется (рис. 2б). Поэтому причиной появления такого ампликона при ПЦР-анализе кДНК должно являться его наличие в матрице, т. е. в образце синтезированной кДНК. Единственно возможным этапом появления укороченной артефактной кДНК является реакция обратной транскрипции.

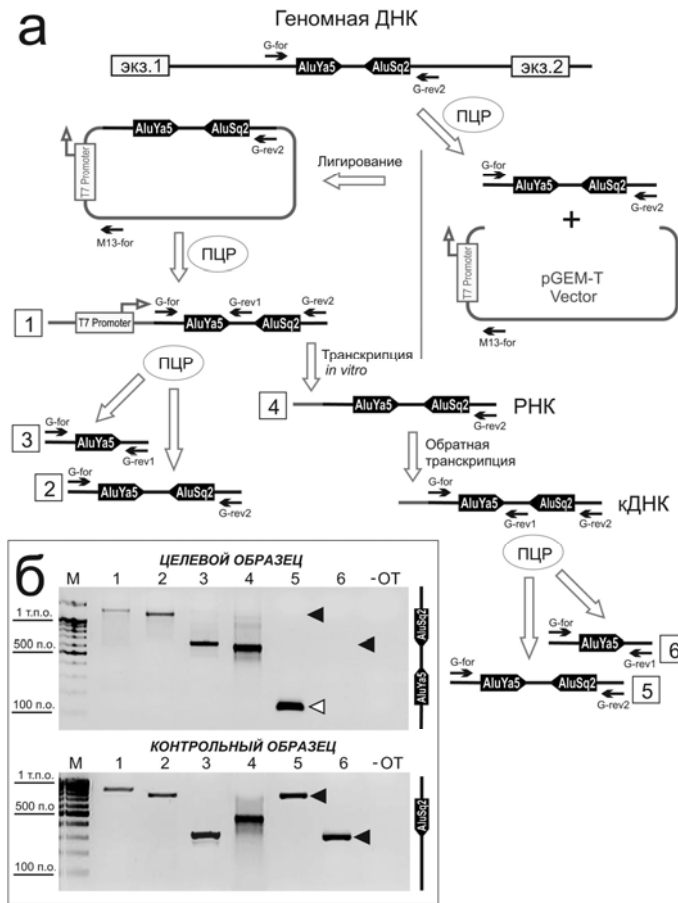


Рис. 2. Схема эксперимента. (а) Этапы эксперимента. Экз. – экзон, черными пятиугольниками показаны инсерции Alu, черными стрелками – положение праймеров. (б) Электрофореграммы амплификатов «целевого» и «контрольного» образцов. М – маркер длин ДНК 100 п.о. (Сибэнзим, Россия); цифры над электрофореграммами соответствуют цифрам в блоке (а); -ОТ – отрицательный контроль.

Слева от электрофореграмм показаны длины, соответствующие некоторым полосам маркера; справа от электрофореграмм схематично представлены структуры «целевого» и «контрольного» образцов РНК.

Суммируя вышеизложенные наблюдения, можно утверждать, что появление укороченного продукта является следствием «смены матрицы» обратной транскриптазой в ходе синтеза кДНК.

Анализ амплификата контрольного образца кДНК, полученного на матрице, содержащей единственную инсерцию Alu, показал отсутствие артефактных продуктов (рис. 2б). Единственный электрофоретически детектируемый ампликон имел ожидаемую длину и по структуре соответствовал РНК-матрице. Эти результаты говорят о том, что в рассмотренном случае наличие пары противоположно ориентированных инсерций Alu является необходимым фактором для реализации механизма «смены матрицы». Такие пары Alu в РНК способны образовывать вторичные структуры, напоминающие «стебель» (рис. 3б). По сравнению с РНК, содержащей одну инсерцию Alu («контрольный образец»), РНК, имеющие два разнонаправленных Alu-повтора («целевой образец»), обладают существенно повышенной температурой плавления и свободной энергией, сниженной в 4–5 раз (рис. 3б), что характеризует высокую устойчивость подобных структур. Эти наблюдения указывают на то, что именно вторичная

структура, в рассмотренном случае образованная парой Alu, является ключевым условием осуществления «смены матрицы» при обратной транскрипции.

Интересно отметить, что смена матрицы происходит по сайтам микрогомологии, наиболее приближенным к обоим инсерциям Alu, дальние участки гомологии остаются незадействованными (рис. 3а). Это может свидетельствовать о том, что синтез кДНК в первоначальном сегменте РНК продолжается без остановки, пока обратная транскриптаза не встретит стерическое препятствие на своем пути продвижения по матрице. В качестве такого препятствия выступает вторичная структура РНК, образованная парой Alu и имеющая вид «стебля». Эта вторичная структура, помимо того что затрудняет продолжение синтеза кДНК, способствует пространственному сближению двух сайтов микрогомологии, что повышает вероятность продолжения синтеза кДНК, сопряженного со «сменой матрицы», и снижает вероятность преждевременной остановки обратной транскрипции.

Таким образом, механизм «смены матрицы» предстает в следующем виде (см. рис. 1). Обрат-

ная транскриптаза, встретив устойчивую вторичную структуру РНК, «перескакивает» в ближайший участок цепи РНК, комплементарный 3'-концу уже синтезированной цепи кДНК (т.е. в участок, гомологичный матрице, на которой этот 3'-конец был синтезирован). После «смены матрицы» продолжается обратная транскрипция. В качестве затравки используется 3'-конец синтезированной цепи кДНК. Иными словами, сайт, в который произойдет «перескок» обрат-

ной транскриптазы, определяется последовательностью небольшого фрагмента РНК-матрицы, непосредственно прилегающего (со стороны 3'-конца цепи РНК) к основанию «стебля» вторичной структуры РНК, ингибирующей обратную транскрипцию. Не находит объяснения палиндромная структура (5'-CCCGGCCGGG-3') сайта, в котором происходит смена матрицы (рис. 3).

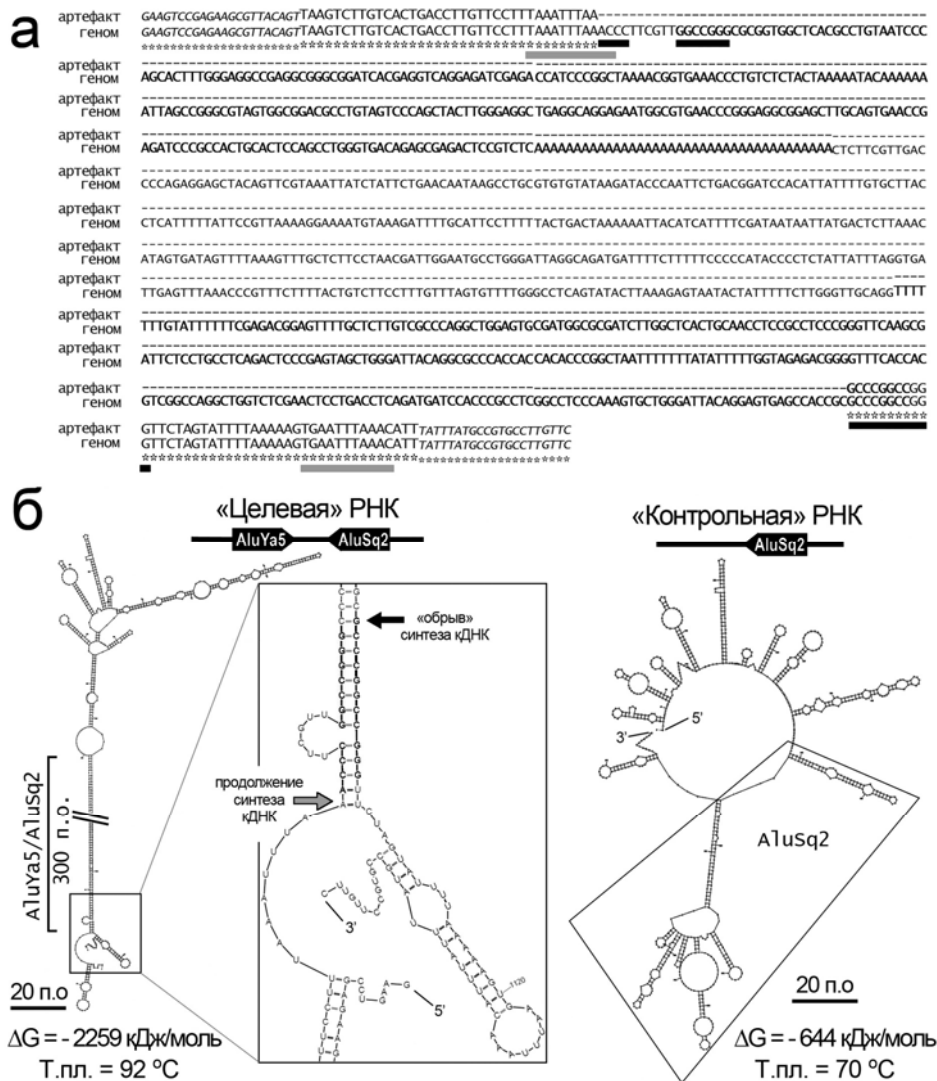


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности артефактного продукта обратной транскрипции. (а) Выравнивание нуклеотидных последовательностей укороченного продукта синтеза кДНК («артефакт») и исходного образца ДНК («геном»). «\*» – показывают совпадающие участки, «-» – делетированные участки. Черной чертой подчеркнуты ближайшие к паре Alu гомологичные фрагменты, серой чертой подчеркнута вторая пара гомологичных фрагментов. Наклоненным шрифтом на обоих концах нуклеотидных последовательностей показаны положения праймеров. (б) Расчетные вторичные структуры «целевого» и «контрольного» образцов РНК. Жирным шрифтом на выноске показаны гомологичные участки, по которым происходит «смена матрицы».  $\Delta G$  – свободная энергия; Т.пл. – температура плавления; 20 п.о. над черной горизонтальной чертой показывают масштаб воспроизведения на рисунке вторичных структур.

Для того чтобы определить, насколько полно блокируется синтез кДНК вторичной структурой на РНК-матрице, была проведена ступенчатая обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (ОТ–ПЦР). Типичные результаты представлены на рис. 4. Через каждые 4 цикла, начиная с 20-го, отбирали равные аликвоты реакционной смеси и анализировали

их электрофоретически. О степени проявления эффекта «смены матрицы» можно судить по запаздыванию появления полноразмерного продукта по сравнению с укороченным (артефактным) или количественно, рассчитывая коэффициент  $k = 2^{n-m}$ , где n и m – число циклов ПЦР, при которых электрофоретически детектируется «артефактный» и полноразмерный

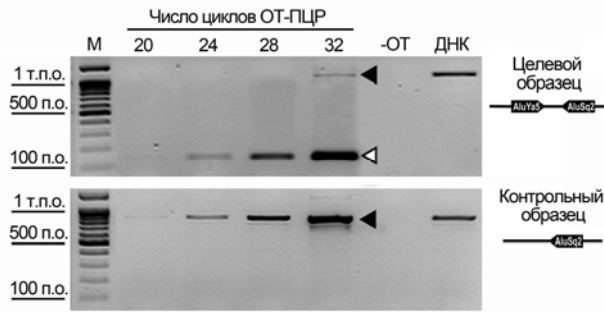


Рис. 4. Ступенчатая ОТ-ПЦР. Верхняя электрофореграмма соответствует «целевому» образцу, нижняя – «контрольному». М – маркер длин ДНК 100 п.о. (Сибэнзим, Россия). Цифры над электро-фореграммами показывают числа циклов ПЦР, на которых отбирали аликвоты. - ОТ – отрицательный контроль, ДНК – положительный контроль (результат амплификации геномной ДНК). Черными треугольниками показаны положения ожидаемых (полноразмерных) продуктов амплификации, белым треугольником отмечено положение укороченного (артефактного) ампликона. Слева от электрофореграмм отмечены длины некоторых полос маркера. Справа от электрофореграмм под соответствующими надписями схематично изображены структуры «целевого» и «контрольного» образцов РНК.

ампликоны соответственно. Чем ниже значение коэффициента  $k$ , тем менее значительно проявляется эффект «смены матрицы» и тем качественнее работает обратная транскриптаза. Так, ОТ-ПЦР исследуемых кДНК, построенных по протоколу фирмы-производителя, показал за-

паздывание на 12 циклов ( $k = 4096$ ), т.е. обратная транскриптаза синтезирует «артефактную» кДНК более чем на три порядка эффективнее, чем полноразмерную.

Представленные результаты свидетельствуют в пользу предположения о двух ключевых факторах, которые требуются для осуществления «смены матрицы» обратной транскриптазой *in vitro*. Необходимым, но недостаточным фактором является присутствие двух или более гомологичных участков в последовательности РНК. Вторым ключевым фактором является наличие между этими гомологичными участками РНК-матрицы сегментов, образующих стабильную вторичную («шпильчатую») структуру. Эти сведения могут быть использованы для биоинформационного предсказания сайтов вероятной «смены матрицы» *in vitro*.

Наличие надежной тест-системы для выбора подходящей для планируемого эксперимента обратной транскриптазы позволит в некоторых случаях снизить число артефактных результатов и избежать ложных интерпретаций экспериментальных данных. РНК-матрица с описанной выше структурой и пара соответствующих праймеров (табл. 2) в сочетании со ступенчатой схемой ОТ-ПЦР может представлять значительный интерес как потенциальная система тестирования уровня артефактных продуктов при работе различных типов коммерческих обратных транскриптаз.

Таблица 2. Характеристики праймеров.

Название	Нуклеотидная последовательность	Сочетание праймеров	Продукт, п.о. «целевой»/«контрольный»
G-for	GAAGTCCGAGAAGCGTTACAGT	G-for/G-rev1	639/298
G-rev1	CCAATCGTTAGGAAGAGCAAA	G-for/G-rev2	1154/813
G-rev2	GAACAAGGCACGGCATAAATA	M13-for/G-rev2	1221/880
M13-for	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC		

### Экспериментальная часть

#### Образцы геномной ДНК

В работе использовали образцы геномной ДНК из лейкоцитарной фракции доноров, предварительно генотипированных по локусу *RSRC2*, содержащему полиморфную инсерцию *AluYa5*. Геномную ДНК выделяли с помощью стандартной фенол-хлороформной экстракции [20].

#### ПЦР-амплификация ДНК и кДНК

ПЦР-амплификация осуществлялась в реакционном объеме 25 мкл, содержащем 40 нг геномной ДНК (или 10 нг плазмиды или кДНК), 5 пмоль каждого олигонуклеотидного праймера (табл. 2), 125 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 16.6 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 0.01% Tween 20, 1.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.5U Taq ДНК-полимеразы (Сибэнзим, Россия) в РТС-0200 DNA Engine (BIO-RAD, США) ПЦР-амплификаторе. Продукты ПЦР анализировались методом электрофореза в 1.5% агарозном геле. Амплификация проводилась до 30-го цикла (если матрица – геномная ДНК) или 20-го

цикла (если матрица – продукт ПЦР или кДНК) при температурном профиле: 95°C – 20 с; 62°C – 20 с; 72°C – 60 с. Ступенчатая ОТ-ПЦР проводилась до 32-го цикла. В качестве матрицы использовали 10 нг кДНК (остальные условия те же). После каждых 4-х циклов, начиная с 20-го, из реакционной смеси отбирали равные аликвоты (по 4 мкл), которые анализировали электрофоретически в 1.5% агарозном геле.

#### Подготовка матрицы для транскрипции *in vitro*

Амплифицированный фрагмент геномной ДНК (50 нг) был лигирован в вектор pGEM-T (Promega, США), согласно протоколу фирмы-производителя. Полученным лигатом были трансформированы компетентные клетки *E. coli* (штамм DH5 $\alpha$ ) по стандартному протоколу [20]. Трансформированные клетки поместили в жидкую питательную среду LB объемом 1.5 мл и инкубировали 1 ч при 37°C с помешиванием в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия). 150 мкл смеси высеяли на чашку Петри с

твердой питательной средой, содержащей 1.5% агар-агар, 40 мл LB (10 г/л Vasto-tryptone, 5 г/л Vasto-yeast extract, 5 г/л NaCl, pH 7.0), 100 мкг/мл ампицилина, 0.5 мМ IPTG и 80 мкг/мл X-Gal, и инкубировали 12 ч при 37°C в термостате EB-53 (Joan, Франция). Поиск нужного клона производили среди белых колоний при помощи ПЦР с праймерами M13 for и G-rev2.

#### **Транскрипция *in vitro***

Транскрипцию *in vitro* осуществляли с помощью набора реактивов AmpliScribe T7 Kit (Epicentre, США), согласно протоколу фирмы-производителя. В качестве матрицы использовали подготовленный образец ДНК, содержащий промотор T7 РНК-полимеразы. Образец синтезированной РНК инкубировали 15 мин при 37°C в присутствии 1U ДНКазы RQ1 (Promega, США), осаждали 96% этанолом и растворяли в 100 мкл воды.

#### **Синтез кДНК**

Синтез первых цепей кДНК осуществляли в реакционном объеме 10 мкл, содержащем 5 мкг РНК, праймер G-rev2 и обратную транскриптазу

Mint (Евроген, Россия), по протоколу фирмы-производителя. Для прекращения синтеза реакционную смесь прогревали 15 мин при 72°C. Финальный объем доводили до 100 мкл водой.

#### **Дизайн праймеров**

Дизайн праймеров для ПЦР осуществлялся с помощью сервиса Primer-BLAST, доступного на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, и программы GeneRunner, находящейся в свободном доступе по адресу: <http://www.generunner.net>.

#### **Расчет вторичных структур РНК**

Предсказание вторичных структур РНК и расчет их термодинамических характеристик производились при помощи он-лайн программы Mfold версии 2.3, доступной по адресу: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>. Вторичную структуру РНК моделировали с учетом температуры, при которой осуществлялась реакция обратной транскрипции (42°C).

*Работа выполнена при поддержке грантов Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ 11-04-01159а.*

#### **ЛИТЕРАТУРА:**

1. Amariglio N., Rechavi G. A-to-I RNA editing: A new regulatory mechanism of global gene expression // *Blood Cells Mol. Dis.* 2007. V. 39. № 2. P. 151–155.
2. Maas S., Kawahara Y., Tamburro K.M., Nishikura K. A-to-I RNA editing and human disease // *RNA Biol.* 2006. V. 3. № 1. P. 1–9.
3. Lopez-Saavedra A., Herrera L.A. The role of alternative mRNA splicing in chromosome instability // *Mutat. Res.* 2010. V. 705. № 3. P. 246–251.
4. Hallegger M., Llorian M., Smith C.W. Alternative splicing: Global insights // *FEBS J.* 2010. V. 277. № 4. P. 856–866.
5. David C. J., Manley J.L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: Pathways and programs unhinged // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 21. P. 2343–2364.
6. Khanna A., Stamm S. Regulation of alternative splicing by short non-coding nuclear RNAs // *RNA Biol.* 2010. V. 7. № 4. P. 480–485.
7. Huang Y., Shen X.J., Zou Q., Zhao Q.L. Biological functions of microRNAs // *Биоорган. химия.* 2010. Т. 36. № 6. С. 747–752.
8. Huntzinger E., Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 2. P. 99–110.
9. Wang K.C., Chang H.Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs // *Mol. Cell.* 2011. V. 43. № 6. P. 904–914.
10. Wapinski O., Chang H.Y. Long noncoding RNAs and human disease // *Trends Cell Biol.* 2011. V. 21. № 6. P. 354–361.
11. Liao Q., Liu C., Yuan X., Kang S., Miao R., Xiao H., Zhao G., Luo H., Bu D., Zhao H., Skogerbo G., Wu Z., Zhao Y. Large-scale prediction of long non-coding RNA functions in a coding-non-coding gene co-expression network // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 9. P. 3864–3878.
12. Temin H.M. Proceedings: Molecular mechanisms for cancer induction by viruses // *Proc. Natl. Cancer Conf.* 1972. V. 7. P. 415–419.
13. Gilboa E., Mitra S. W., Goff S., Baltimore D. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects // *Cell.* 1979. V. 18. № 1. P. 93–100.
14. Temin H.M. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 15. P. 6900–6903.
15. Roy S. W., Irimia M. When good transcripts go bad: Artfactual RT-PCR 'splicing' and genome analysis // *Bioessays.* 2008. V. 30. № 6. P. 601–605.
16. Cocquet J., Chong A., Zhang G., Veitia R.A. Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts // *Genomics.* 2006. V. 88. № 1. P. 127–131.
17. Houseley J., Tollervey D. Apparent non-canonical trans-splicing is generated by reverse transcriptase *in vitro* // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 8. P. e12271.
18. International human genome consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature.* 2001. V. 409. № 6822. P. 860–921.
19. Osenberg S., Dominissini D., Rechavi G., Eisenberg E. Widespread a cleavage of A-to-I hyperediting substrates // *RNA.* 2009. V. 15. № 9. P. 1632–1639.
20. Sambrook J., Russel D. *Molecular cloning: A laboratory manual.* – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.