

Антисенсові РНК як засіб регуляції експресії генів

О. П. Кухаренко, А. Д. Швед

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

В огляді на прикладах багатьох досліджень розглянуто проблеми регуляції експресії генів за допомогою антисенсових РНК у прокаріотах та в еукаріотичних клітинах. Значну увагу приділено проблемі створення внутрішньоклітинної резистентності проти вірусів з використанням антисенсових РНК. Аналізуються загальна концепція та стратегія побудови штучних систем антисенсової регуляції експресії генів у клітинах еукаріот.

Вступ. Сучасні наукові погляди на проблему регуляції окремих генів у клітині ґрунтуються на досвіді досліджень природних механізмів експресії генетичної інформації та точному визначенні первинної структури ДНК обраних генів. Цей напрямок започатковано у шестидесяті роки, коли дослідження базувалися на феноменологічному підході. За браком інформації про первинну послідовність генів досліди тих часів нагадували пошуки гіпотетичної «нуклеїнової субстанції», коли до культур клітин додавали нефракціоновану суміш природних нуклеїнових кислот, одержаних з різних джерел, як вірусного походження, так і гомологічних клітинних РНК та ДНК, намагаючись у такий спосіб підвищити опір клітин проти вірусної інфекції. Згодом, з опануванням хіміками методів штучного синтезу нуклеїнових кислот з певною послідовністю та секвенування ДНК ці дослідження набули характеру досконалої наукової методології і стали теоретичним підґрунтям галузі сучасної біотехнології — створення штучних олігодеоксинуклеотидів та їхніх похідних з визначеною біологічною та біохімічною активністю. Такі підходи до регуляції генів базуються на здатності комплементарних послідовностей нуклеїнових кислот утворювати двоспіральні гібридні ланцюги Уотсона-Крика. За цим принципом комплементарні олігонуклеотиди було названо гібридонами, або антисенсовими нуклеїновими кислотами, оскільки вони за структурою первинної послідовності збігаються з ланцюгами ДНК, протилежними кодуєму (сенсовому) ланцюгу.

Публікації [1, 2] вважаються основоположними в цій галузі та часто цитуються у наукових оглядах і експериментальних роботах стосовно випробувань антисенсових синтетичних олігодеоксинуклеотидів та антисенсових РНК з метою регуляції експресії клітинних і вірусних генів [3—5].

На певному етапі цих досліджень, а саме тоді, коли розробки генної інженерії створили можливість для конструювання штучних генів, або рекомбінантних ДНК, виникла ідея побудови молекулярних конструкцій, які після введення їх до живої клітини здійснювали б синтез подовжених (сотні або тисячі нуклеотидів завдовжки) антисенсових РНК (асРНК), спрямованих проти визначеного гена-мішені [6, 7]. Відкриття на початку 80-х років природного механізму антисенсової регуляції експресії бактеріальних генів [8—11] стало базою для ідеї створення систем ендogenous синтезу асРНК з метою штучної регуляції генів. Розпочалося активне дослідження можливостей та механізмів антисенсової регуляції експресії генів за допомогою штучно створених рекомбінантних конструкцій на різних клітинних моделях та еукаріотичних клітинно-вірусних системах [12—14]. Згодом, наприкінці 80-х років, ідея антисенсової регуляції набула наукового визнання у молекулярній біології. Цьому сприяло відкриття природних ендogenous асРНК в еукаріотичних клітинах та у вірусів еукаріот [15—17]. Зараз асРНК застосовуються в багатьох лабораторіях світу як альтернатива генним мутаціям у дослідженнях функцій генів.

Регуляторний механізм асРНК полягає в тому, що, крім транскрипції гена з сенсового ланцюга

ДНК, здійснюється транскрипція з другого, антисенсового, у зворотному напрямку. В результаті подвійної антипаралельної транскрипції з'являються мРНК і комплементарні їм асРНК. За існуючими уявами, мРНК, утворюючи дуплекс з асРНК, втрачає здатність зв'язуватися з рибосомою і не транлюється. Перспектива створення штучної системи регуляції генів спонукала дослідників до експериментів, які показали, що трансляцію дійсно можна блокувати введенням до клітини асРНК, комплементарних мРНК конкретного білка. Накопичені на сьогодні дані переконливо свідчать про здатність асРНК специфічно регулювати експресію визначеного гена на посттранскрипційних стадіях.

Приклади природної антисенсової регуляції генів у прокаріотах. У роботі [10] вперше було отримано експериментальне підтвердження природного механізму, в якому інвертована послідовність (IS10-елемент) транспозона Tn10 може негативно регулювати експресію свого власного білка транспозази на рівні трансляції. На 5'-кінці IS10 РНК було знайдено ділянку довжиною 36 пар основ (п. о.), комплементарну мРНК транспозази. Ця антисенсова послідовність перекриває стартовий AUG-кодон і послідовність Шайна-Дальгарно транспозазного гена. Гібридизація цих двох транскриптів перешкоджає зв'язуванню мРНК з рибосомою та її трансляції. Але найперший доказ регуляторної ролі природних асРНК було отримано при вивченні механізму контролювання копійності плазмід у бактеріальних клітинах. Механізм регуляції реплікації плазмідних ДНК з репліконами родин *ColEIMD* та *incFII* відбувається через взаємодію двох РНК-транскриптів [18]. Ініціація синтезу одного з цих транскриптів (РНК II) починається на відстані 555 п. о. від точки початку реплікації *ori*. В цьому районі РНК II залишається згібридизованою зі своєю ДНК-матрицею і розщеплюється РНКазою H в точці початку реплікації. Фрагмент розщепленої РНК служить затравкою для ДНК-полімерази I, яка синтезує новий ланцюг ДНК. Друга РНК довжиною 108 основ (РНК I) транскрибується з протилежної нитки ДНК в області, що кодує 5'-кінець РНК II. Комплементарне зв'язування РНК I та РНК II порушує гібридизацію останньої з ДНК-матрицею та її функцію як РНК-затравки для ДНК-полімерази.

Ефективність блокування залежить від швидкості гібридизації РНК I з РНК II, яка повинна відбуватися раніше, ніж згібридизуються РНК II та ДНК. Швидкість зв'язування двох РНК регулюється вторинною структурою взаємодіючих молекул та білком Rom, що їх стабілізує. Аналіз вторинної структури послідовностей РНК I і РНК II

виявив у них обох три паліндроми, які утворюють три шпильки [18]. Згідно з запропонованою моделлю, взаємодія між молекулами РНК I і РНК II відбувається спочатку в районі відкритих петель відповідних паліндромів (RNA kissing), що забезпечує наступне просторове зближення 5'-кінця РНК I з РНК II і утворення гібриду довжиною 108 п. о. за принципом «застібки-блискавки». Білок Rom, який сприяє утворенню гібриду в клітинах, кодується ділянкою плазміди, що знаходиться між 402 та 708 п. о. у 3'-напрямку від точки ініціації реплікації. Отже, синтез мРНК білка активується реплікацією ДНК, білок Rom прискорює гібридизацію РНК I та РНК II, що призводить до блокування реплікації плазміди і обмеження її копіювання у клітині.

Регуляція ініціації реплікації плазмід за участю низькомолекулярних РНК у прокаріот є розповсюдженим механізмом. Такий спосіб регуляції є загально визнаним також для плазмід родин *RI*, *F* та *NRI* бактерій *Escherichia coli*, *pT18* бактерій *Staphylococcus aureus*. Причому наслідки асРНК регуляції реплікації та копійності плазмід *RI* та *F* є фатальними для клітин *E. coli*. Тут асРНК (ген *sok*) довжиною 180 п. о. блокує мРНК гена *mok*. А білок Mok позитивно регулює трансляцію мРНК гена *hok*, білковий продукт якого є летальним токсином для *E. coli*. У разі недостатньої копійності плазміди синтезується багато білка Hok, від якого бактерія загине. Якщо копійність плазміди з геном *sok* вище необхідного порога, *sok* блокують трансляцію *mok* і трансляція мРНК *hok* не активується, оскільки гібрид перших двох (асРНК : мРНК) руйнується у клітині РНКазою III.

У *E. coli* також за участю асРНК, комплементарної мРНК гена білка OmpF, регулюється життєво важлива для бактерій функція. Білки OmpC та OmpF виконують функцію пор клітинної мембрани бактерії, через які відбувається дифузія гідрофільних молекул і завдяки яким бактерії пристосовані до змін осмотичного тиску поживного середовища. Експресія OmpC регулюється осмосом через сигнали у промоторі гена, але підвищення осмотичного тиску поряд із збільшенням продукції OmpC призводить до зниження продукції OmpF. Секвенування цих генів [19] дозволило виявити унікальний механізм регуляції генної експресії, опосередкований новим різновидом РНК, яку було названо *micRNA* (mRNA-interfering complementary RNA). Виявлена РНК довжиною 174 п. о. кодується незалежною транскрипційною одиницею, названою *micF*-геном, який розташований у 5'-напрямку від гена *ompC*, але транскрибується в зворотному напрямку. Цей РНК-транскрипт містить ділянку до-

вжиною 80 п. о., комплементарну 5'-кінцю мРНК білка OmpF в районі, що охоплює послідовність Шайна-Дальгарно і AUG-кодон [19]. Автори припустили, що ця miRNA, гібридизуючись з мРНК OmpF, блокує трансляцію останньої. Продукція цієї РНК здійснюється пропорційно продукції мРНК білка OmpC, тому паралельно з підсиленням його синтезу відбувається зростання транскрипції асРНК, здатної блокувати експресію білка OmpF. У цьому полягає механізм підтримання постійно сумарної кількості білків OmpF і OmpC.

Цей природний механізм було відтворено в модельному експерименті і доведено можливість пригнічення експресії білка OmpF за допомогою штучного гена асРНК [20]. Для цього ділянку гена *ompC* довжиною біля 300 п. о. (антисенсова до *ompF* область) було вирізано вище промотора, зшити з геном β -галактозидази і вбудовано в плазмиду. У клітинах, трансформованих такою плазмидою з химерною послідовністю разом з асРНК до вищерозташованої послідовності-мішені, в разі індукції галактозидазного гена спостерігали майже повне пригнічення синтезу білка OmpF.

Приклади природної асРНК-регуляції експресії генів у еукаріот. Про існування природного механізму антисенсової регуляції генів у клітинах вищих еукаріот вперше засвідчено у роботі [15] при вивченні транскрипції гена дегідрофолатредуктази (ДФФР) у клітинах миші. Рівень цього ферменту регулюється протягом клітинного циклу, хоча транскрипцією гена керує конститутивний промотор. На певній стадії розвитку клітин відбувається різке зростання синтезу білка. Встановити підвищення чи зниження рівня транскрипції гена ДФФР не вдалося, але в ядрах клітин виявлено групу неполіаденільованих транскриптів довжиною 180—240 п. о., які синтезувалися на протилежному ланцюгу ДНК гена ДФФР. Експериментально доведено, що згадані транскрипти, які комплементарні ділянці сигналу термінації транскрипції мРНК ДФФР, за рахунок спарювання з останньою можуть впливати на експресію всього гена.

Слід відмітити, що малі неполіаденільовані транскрипти детектувалися лише в ядрі, тобто їхня регуляторна роль, можливо, асоційована з транскрипцією або транспортом мРНК у цитоплазму.

Згодом свідчення про існування і регуляторні функції природних асРНК з'явилися у ході досліджень експресії *c-myc* протоонкогена у лімфоцитах людини та в клітинах лімфоми Беркіта [16] (раніше було досліджено вплив штучних конструкцій з асРНК проти транскриптів генів *myc*). За антисенсовим механізмом регулюється також синтез фак-

тора трансляції *eIF-2 α* в Т-лімфоцитах людини [17] та процесинг мРНК гена *p53* у клітинах еритролейкемії мишей під час їхньої індукованої диференціації [21]. В останніх двох випадках синтез транскриптів з асРНК регулювався трансдукторними шляхами, а самі асРНК мали лише 80 % гомології з мішенню.

Цікавим проявом антисенсової регуляції є блокування експресії мієлінового білка у нейронах дефіцитних за мієліном мишей-мутантів [22]. Тут відбулася еволюційна дуплікація цілого гена мієліну та прилеглих послідовностей одночасно з реверсією в його межах ланки з кількома центральними екзонами та інтронами. Незалежна транскрипція нормального та мутантного генів, розташованих тандемно у хромосомі, ефективно блокує процесинг мРНК обох генів та призводить до спадкової патології тварин.

Віднайдено також, що на ранніх стадіях інфекційного циклу ВІЛ-1 з його 3'-LTR експресуються довгі антисенсові транскрипти, які пригнічують його 5'-LTR промотор [23, 24].

Число прикладів природного механізму антисенсової регуляції генів у клітинах еукаріот постійно збільшується і зараз сягає десятків. Проте поки що не знайдено природних асРНК у рослинах. Подальші дослідження природних клітинних механізмів антисенсової регуляції можуть допомогти узагальненню розрізнених уявлень про регуляцію генів за допомогою асРНК та вдосконаленню підходів до моделювання штучних генетичних конструкцій на цій основі.

Використання асРНК для штучної регуляції генів в еукаріотах. Свідчення про можливість використання асРНК в еукаріотичній системі вперше були представлені [6] на прикладі експресії тимидинкіназного (ТК) гена. В цій роботі транскрипти з антипаралельного ланцюга гена вперше було названо «антисенсовими РНК». Автори видалили фрагмент структурної частини гена ТК вірусу герпесу довжиною 1364 п. о., починаючи з 51-го нуклеотиду нижче AUG-кодону, і вбудували у плазмиду під промотор у зворотній орієнтації. При спільній мікроін'єкції в ядра ТК⁺-клітин мишей двох плазмід — з ТК-геном і з асРНК у співвідношенні копій 1:100 — частота появи ТК⁺-клітин знижувалася у 4—5 разів порівняно з клітинами, до яких вводили таку ж надлишкову кількість плазмиди без анти-ТК-послідовностей разом з ТК-геном. Ефект був специфічним, оскільки асРНК проти герпетичного ТК-гена не впливали на експресію ТК-гена курчати. І, навпаки, анти-ТК-послідовність до ТК-гена курчати пригнічувала експресію ТК курчати, але не вірусного гена.

У своїх подальших дослідженнях [7] автори використали різні асРНК до мРНК ТК герпесу. Було сконструйовано плазмиду, що експресує асРНК, комплементарні до 5'-кінця мРНК ТК-гена вірусу герпесу, які перекривають 80 п. о. вище AUG-кодона і 343 основи його структурної області. Мікроін'єкція такої плазмиди разом з ТК-плазмидою у співвідношенні 200:1 у ядра L-клітин забезпечувала суттєвіше зниження частоти появи ТК⁺-клітин, ніж попередньо створена плазміда, що утримувала ас-послідовності тільки до структурної частини ТК-гена.

Для визначення мінімальної довжини РНК, достатньої для блокування гена комплементарними транскриптами, було створено конструкцію, у якій промотор і 52 п. о. лідерної 5'-області ТК-гена вірусу герпесу були вбудовані перед рамкою трансляції ТК-гена курчати [7]. Ця химерна конструкція при мікроін'єкції у ядра L-клітин забезпечувала нормальну експресію ТК курчати. Однак у разі спільної ін'єкції цієї плазмиди з надлишком антисенсової (до 5'-кінця ТК-гена вірусу герпесу) плазмиди спостерігали майже повне пригнічення експресії ТК-гена курчати. Але при співвідношенні цих плазмід 1:1 відтвореного блокування не спостерігалось.

Варто відмітити, що у цих перших роботах з асРНК-регуляції автори відтворили дві можливі моделі штучного блокування гена. У першій вплив спрямовано на ендogenous клітинні транскрипти — спочатку переводили клітини у тип ТК⁺, а потім трансдукували в них антисенсову конструкцію і отримували ефект пригнічення. У другій моделі асРНК спрямовували проти екзогенних послідовностей, що відповідає системі внутрішньоклітинного опору проти певного екзогена. Автори створили таку систему на прикладі бактеріального гена хлорамфеніколацетилтрансферази (ХАТ). Вони спочатку трансфікували клітини вектором з геном асРНК та отримали високий рівень його експресії, а вже потім ввели до клітин плазмиду з геном ХАТ і спостерігали повне пригнічення синтезу білка [7].

У ході досліджень ще однієї штучної системи антисенсової регуляції, яка відповідала першій згаданій моделі, автори також отримали докази пригнічення за допомогою асРНК природних клітинних генів [7]. Автори створили вектор, що експресує асРНК проти β -актину. При введенні до клітини вектора, продукуючого асРНК до гена структурного білка цитоскелету β -актину, відбувалося пригнічення синтезу цього білка, уповільнювався ріст клітин і знижувалася кількість мікрофібрилярних актинових структур. Руйнування актинових волокон у клітинах було відмічено і при

введенні 5'-кепованої асРНК довжиною 500 п. о., синтезованої *in vitro* на фрагменті ДНК-матриці актинового гена. Зміни в мікроін'єктованих клітинах свідчили про те, що регуляторні механізми, які мають забезпечувати необхідний рівень актину, були не спроможні компенсувати вплив асРНК.

Згодом було створено та досліджено ще кілька конструкцій з асРНК проти різних ділянок ТК-гена вірусу герпесу [12]. Плазміда *pMDKT1* містила фрагмент довжиною 1100 п. о., що включав 53 п. о. 5'-неструктурної частини ТК мРНК і всі кодуючі послідовності, за винятком останніх 23 п. о. Плазміда *pMDKT2* включала 5'-фрагмент довжиною 301 п. о. (сегмент А) і 225 п. о. 3'-кінця ТК-гена (сегмент С). Плазміда *pMDKT3* — тільки сегмент С. При трансфекції в ТК⁺ L-клітини плазмиди *pMDKT2* (сегменти А і С) або *pMDKT3* (тільки сегмент С) у клонах відбувалося пригнічення на 80—90 % ТК-активності. При цьому синтез у клітинах асРНК в кількості $5 \cdot 10^3$ молекул на клітину в 300 разів перевищував ТК мРНК. Однак у клітинах, трансформованих плазмидою *pMDKT1*, що утримувала майже всю ас-послідовність ТК-гена, високого рівня синтезу асРНК і пригнічення ТК-активності не спостерігали. Питання про те, чому конструкції з коротшими асРНК ефективніше блокували ТК мРНК, залишилося без відповіді. Крім того, не було виявлено різниці між впливом асРНК, комплементарних 5'- і 3'-ділянкам мРНК ТК-гена. Отже, з отриманих результатів випливає, що блокування 5'-ділянки мРНК не є обов'язковою умовою активності асРНК, оскільки асРНК, комплементарна 225 п. о. 3'-ділянці мРНК, що кодує С-кінець білка, також пригнічувала її експресію. Причому 95 % двониткових РНК, що мали ТК-послідовності, містилися в ядрі, а довжина дуплексних ділянок, захищених від нуклеазного розщеплення, складала 225 п. о., тобто дорівнювала С-сегменту асРНК. Оскільки у вихідних ТК⁺ L-клітинах вся ТК мРНК виявлялася в цитоплазмі, а в клітинах, що продукують ас-транскрипти, ТК мРНК містилися переважно в ядрі, автори припустили, що зниження ТК-активності асРНК до С-фрагмента гена обумовлене порушенням транспорту ТК мРНК у цитоплазму, де вона залучається до трансляції у полісомах.

За сучасними поглядами, результати тут пояснюються кращими кінетичними характеристиками коротких асРНК. При цьому автори не мали відомостей стосовно того, що сигнали транспорту та поліаденілювання ТК мРНК також могли бути мішенями асРНК у клітинах.

Детально досліджено механізм блокування гена креатинкінази у лімфоїдних клітинах людини

штучними асРНК [25]. Тут різними асРНК блокували 3'-область гена. Виявилось, що асРНК, яка перекривала два останні екзони з інтроном, стоп-кодон та сайт 3'-процесингу-поліаденілювання мРНК, ефективно пригнічувала синтез креатинкінази у трансформованих клітинах. Однак асРНК не впливала ні на сплайсинг, ні на поліаденілювання, ні на транспорт мРНК у цитоплазму. Не відмічено навіть погіршення зв'язування мРНК з полісомами трансляції. Отже, автори дійшли висновку, що асРНК блокували синтез білка на стадії термінації трансляції.

Визначним дослідженням штучної антисенсової регуляції в еукаріотах було вивчення впливу асРНК на гени теплового шоку *Drosophila melanogaster* [26]. Ця робота цікава тим, що автори використали систему індукцйбельного синтезу асРНК і, таким чином, продемонстрували можливість визначення на рівні трансгенного організму функції гена, який є летальним. Раніше отримати такі мутації класичними підходами на рівні цілого організму було неможливо. Аналіз впливу різних асРНК показав, що блокування відбувається при зв'язуванні останніх із трансляційними сигналами мРНК, оскільки асРНК, які блокували лише кодуючу ділянку мРНК, не змінювали рівня експресії її білка. Це був перший приклад використання асРНК у дослідженнях з біології розвитку.

У подальших дослідженнях з використанням асРНК, які здійснювалися на різних моделях (клітини миші та ооцити *Xenopus*, цілі трансгенні по асРНК організми комах *D. melanogaster* та грибів *Dictyostelium*), отримували споріднені результати. За цими результатами, пригнічення було суттєвим у разі націлення асРНК на сигнали трансляції (сайт кепування, зв'язування з рибосомою) або інші важливі сигнали процесингу транскриптів. У кількох випадках ефективними були асРНК до 3'-кінця кодуючої послідовності генів та термінатора трансляції. Відмічалася також значущість надлишкової експресії асРНК проти мРНК-мішені для її ефективного блокування. Інколи ефективною була експресія асРНК на однаковому з мішенню рівні. Також сповіщалося про те, що асРНК здатні блокували разом з геном-мішенню транскрипти високогомологічного гена, що теж доводило специфічність дії асРНК [16].

Застосування антисенсових РНК для пригнічення репродукції вірусів. Одну з перших систем внутрішньоклітинного імунітету на основі асРНК було створено в клітинах *E. coli* на прикладі однострочкового +РНК фага родини SP [27]. Геном вірусу має найпростішу будову і містить гени лише чотирьох білків. Два з них було обрано за міше-

ні — ген білків оболонки і ген реплікази. Фрагменти кДНК цих двох генів відповідно довжиною 247 та 159 п. о. (А і В) охоплювали ділянку з послідовностями Шайна-Дальгарно та ініціаторного кодону. Третій, С-фрагмент, являв собою 3'-кінцеву ділянку геному, кодуючу С-кінець реплікази. Ці фрагменти було вбудовано в антисенсовій орієнтації та різній комбінації у плазміді під контроль промотора лактозного оперона.

В трансформованих плазмідами клітинах, зоброблених перед інфікуванням ІПТГ (індуктор лактозного оперона), відбувалося пригнічення репродукції фага SP до 95%. Результати свідчили, що найвпливовішими були асРНК, комплементарні послідовностям Шайна-Дальгарно та AUG-кодону мРНК. Оскільки асРНК з С-фрагментом 3'-кінця геному також блокувала продукцію фага, що не могло бути пов'язане з процесами ініціації трансляції, автори припустили, що асРНК може перешкоджати РНК-залежній РНК-репліказі в процесі транскрипції плюс-нитки геномної РНК у мінус-нитку. Це відкривало перспективу для асРНК як інгібіторів транскрипції РНК-вірусів.

Згодом автори випробували асРНК проти іншої мішені в геномі фага SP — гена білка дозрівання [28]. На відміну від конструкцій попередньої роботи [27], де мішенями асРНК були капсидні білки та репліказа фага, копійність яких у клітині на літично-продуктивній стадії інфекції висока, у нових конструкціях автори спрямували асРНК на мішень, копійність якої підтримувалася вірусом у кількості однієї молекули на фагову частку, що робило її вразливішою. Було створено п'ять плазмід з генами асРНК різної довжини, комплементарних різним ділянкам мРНК-мішені. Виявилось, що для суттєвого пригнічення експресії гена достатньо асРНК довжиною 19 нуклеотидів, яка перекривала послідовність Шайна-Дальгарно. Довші молекули асРНК до сайту ініціації трансляції були дещо ефективнішими. Майже повного пригнічення репродукції фага SP вдалося досягти за допомогою асРНК, що відповідали повнорозмірній мРНК з сайтами ініціації трансляції. Однак, якщо цей асРНК бракувало лише 19 нуклеотидів, комплементарних послідовності Шайна-Дальгарно вище AUG-кодону, вона пригнічувала репродукцію фага лише на 21%.

На сьогодні створено чимало ефективних конструкцій з асРНК проти фагів, проти вірусів рослин [29—30], ще більше відомо про антисенсових систем регуляції проти вірусів людини. Але перші конструкції з асРНК для пригнічення вірусів ссавців були створені на моделі пташиних ретровірусів. У роботі [31] внутрішньоклітинний синтез

двох різних асРНК до гена *env* вірусу саркоми Рауса специфічно пригнічував експресію мРНК-мішені. При цьому дія асРНК, комплементарної некодуєчому 3'-кінцю мРНК, не відрізнялася від такої асРНК, комплементарної 5'-кінцю мРНК, і завдяки кожній з них рівень *Env* знижувався до 20 %. Пригнічення репродукції вірусу асРНК, спрямованими проти 3'-кінця мРНК, на думку авторів, було результатом блокування сигналу пакування вірусної РНК у віріони або її транспорту з ядра в цитоплазму. Можливо також, що кінцевою причиною пригнічення репродукції вірусу був дефіцит капсидних білків *Env*, оскільки блокування 3'-кінця мРНК може призводити до блокування поліаденілювання та прискорення деградації транскрипту.

Також було створено векторну конструкцію на базі ретровірусу, яка наводила в клітинах синтез асРНК проти іншого плазминого ретровірусу [32, 33]. У цьому випадку вдалося досягти значного пригнічення репродукції вірусу за рахунок блокування сайту зв'язування праймера зворотної транскрипції PBS (який є комплементарним 3'-кінцю клітинної тРНК). Механізм пригнічення вірусу було встановлено набагато пізніше [34].

Згодом було створено вектори на базі ретровірусу мишей MMLV, які експресували дві різні асРНК проти ретровірусу HTLV-1 в гемопоетичних клітинах кісткового мозку людини [35]. Це була перша модель генотерапії лентівірусної інфекції людини за допомогою асРНК. Одна з цих асРНК блокувала понад 1000 п. о., починаючи з 5'-кінця вірусних РНК. Друга перекривала перший кодуєчий екзон гена трансактиватора Tax. Обидві асРНК, синтез яких спрямовував ранній промотор цитомегаловірусу, суттєво знижували продукцію вірусу і його трансформуючий вплив на клітини, хоча синтез вірусної РНК та білків оболонки вірусу не змінювався. Імовірно, що перша асРНК блокувала упакування РНК у віріони, оскільки вона перекривала *cis*-сигнал інкапсидзації, а друга пригнічувала синтез життєво важливого для продуктивної інфекції HTLV вірусного трансактиватора Tax.

Другий вектор з асРНК на базі MMLV було створено іншими авторами для пригнічення самого ж MMLV у лімфоцитах мишей [36]. Тут для забезпечення синтезу асРНК було використано промотор гена тРНК (високоєфективний промотор, з якого транскрибує клітинна РНК-полімераза III). Вектор утримував відразу дві копії гена асРНК — по одній в кожному LTR. Довжина асРНК, спрямованих на гени *gag* та *pol*, становила всього 25 п. о. Рівні пригнічення продукції вірусу були відповідно

97 та 40 % для конструкцій з різними асРНК. Дослідження механізму пригнічення показало, що блокування відбувається на стадії трансляції вірусних мРНК.

Було створено вектори, що експресували асРНК проти вірусу бичачого лейкозу BLV, який є генеалогічно близький до ретровірусів імунодфіцитів людини. Тут дві різні асРНК були комплементарними до 300 п. о. послідовності LTR або 1000 п. о. гена X трансактиватора вірусу [37]. Промотором, що контролював експресію асРНК, авторами було обрано повнорозмірний власний LTR BLV [38], оскільки транскрипція з останнього здатний трансактивувати X-білок BLV. Рівень пригнічення продукції вірусу у культурі клітин, трансфікованих конструкцією, сягав 70 %.

Було реалізовано спробу пригнічення за допомогою асРНК репродукції вірусу SV40. Цей ДНК-вірус має нескладну будову, його молекулярна біологія добре вивчена, і визначити мішень серед ключових генів було нескладно. За мішень асРНК було обрано послідовність 5'-кінця мРНК Т-антигена довжиною 160 п. о., отже, пригнічення було спрямовано на послідовність *ori* вірусу. Модель внутрішньоклітинного противірусного імунітету, основана на пригніченні вірусного реплікона, виявилася цілком вдалою. Транскрипція направленою промотор РНК-полімерази III (промотор VA1 РНК аденовірусу людини). За отриманими результатами, *ori*-залежна реплікація у трансформованих антисенсовою конструкцією клітинах COS, що конститутивно синтезують Т-антиген, була пригнічена більш як на 50 %.

Про блокування за допомогою асРНК репродукції вірусів з великими розмірами геному у людини сповіщалося рідко, оскільки будова та регуляція їхніх генів складна та недостатньо досліджена. Але робота [39] є прикладом того, коли експресія всього величезного геному може бути значно пригнічена через блокування його ключових генів. Тут асРНК блокували мРНК структурно-регуляторного білка pp65 (UL83) цитомегаловірусу (CMV). Цей білок — структурний віріон-асоційований продукт, копійність якого є високою в інфікованій клітині і у віріонах. Він також трансформує клітини за якимось невідомим регуляторним механізмом. Експресія із складу плазмідного вектора, створеного на основі ретровірусної ДНК *pp65* гена довжиною 4000 п. о. у антисенсовій орієнтації значно знижувала в інфікованих клітинах рівні мРНК-мішені та білка вірусу. Синтез вірусної ДНК та продукція CMV були майже повністю пригнічені. Але в інфікованих клітинах також відмічено пригнічення експресії другого важ-

CMV *pp71* (UL82), послідовність якого розташована у тій самій мРНК, але нижче *pp65*. Обидва гени є гомологічними і виникли внаслідок дуплікації. За попередніми даними, *pp71* є трансактиватором безпосередньо раннього промотора CMV. Отже, створена конструкція, можливо, блокувала відразу дві мішені в межах однієї біцистронної матриці.

Згодом у ході досліджень з молекулярної біології вірусів та спроб впливу на їхню репродукцію за допомогою асРНК почали з'являтися підтвердження гіпотези про існування природних регуляторних асРНК в сукаріотах на прикладі вірусних геномів. У роботі [40] експериментально показано можливість антисенсового блокування РНК вірусу поліоми та підтверджено існування природного механізму антисенсової регуляції його генів. У циклі репродукції цього вірусу на ранніх стадіях інфекції з'являються транскрипти трьох генів, що кодують пухлинні білки. В цей період транскрипти пізніх генів присутні у клітині в дуже малій кількості. З початком реплікації вірусної ДНК кількість пізніх транскриптів різко зростає разом з копійністю ДНК, а вміст пухлинних білків у клітині в цей період зменшується, незважаючи на те, що синтез ранніх транскриптів майже не змінюється. Як виявилось, репресія синтезу пухлинних білків спричиняється антисенсовим блокуванням ранніх мРНК пізніми транскриптами, в інтронах яких містяться комплементарні раннім послідовності. Далі автори експериментально довели, що при штучному зменшенні в ядрі пізніх транскриптів відбувається різке збільшення ранніх білків, а в разі штучного синтезу надлишку пізніх — зменшується кількість ранніх РНК. Тобто регуляція експресії генів вірусу поліоми здійснюється шляхом зворотного зв'язку з залученням асРНК.

На завершення огляду досліджень асРНК можна навести приклади проєктів практичного застосування внутрішньоклітинної імунізації проти вірусів. Цікавою тут є модель противірусної резистентності за рахунок асРНК на прикладі збудника тропічної лихоманки вірусу Денге та його специфічного носія — москіта [41]. Москіти є ланкою трансмісивного шляху інфікування людини цим вірусом. Організм та слинні залози паразита є місцем персистентної інфекції та ампліфікації збудника у природі. Отже, через надання резистентності проти вірусу клітинам комах можна блокувати вірус у його природному резервуарі і в такий спосіб перервати трансмісивний шлях зараження ним людей. Автори розробки скористалися для переносу гена асРНК в організм комах вектором на базі іншого вірусу — Синдбіс. Введення в ендодель комах рекомбінантного векторного вірусу Синдбіс з

геном асРНК повністю блокувало репродукцію вірусу Денге у слинних залозах. За мішень асРНК у геномі вірусу Денге було обрано ділянку 5'-кінця його транскрипту довжиною 560 п. о. Ця ділянка мРНК кодує рамку примембранного білка, потрібного для пакування РНК у віріони, та містить інші генетичні сигнали, важливі для репродукції вірусу.

Протягом 90-х років було створено та перевірено функціональну активність близько 20 різних векторних конструкцій, експресуючих асРНК проти збудника СНІДу ВІЛ-1. Першою публікацією стосовно створення внутрішньоклітинної стійкості до ВІЛ були роботи [42, 43]. Автори досягли 70—80 %-го пригнічення продукції ВІЛ за рахунок експресії асРНК довжиною 407 п. о., яка блокувала 112 п. о. перед та 295 п. о. після стартового кодону гена білка Gag, включаючи головний донорський сайт сплайсингу першого екзона всіх вірусних мРНК та частину сайта пакування РНК у віріон. Сенсовий транскрипт цієї ж послідовності теж пригнічував репродукцію ВІЛ у випадку гострої інфекції клітин, але не діяв у хронічно інфікованих. Експресія асРНК відбувалася з плазмідного вектора під контролем раннього промотора/синайсера цитомегаловірусу у вигляді поліаденільованих транскриптів довжиною біля 600 п. о.

У роботі [44] сконструювали вектор на основі MMLV-ретровірусу, який експресував асРНК проти ВІЛ до його сайта зв'язування праймера зворотної транскрипції PBS та до мРНК вірусного трансактиватора Tat. АсРНК проти PBS мали довжину 18—20 нуклеотидів та перекривали або безпосередньо сам PBS, або послідовність, розташовану з 5'-кінця PBS у напрямку елонгації праймера. У створених конструкціях вторинна структура ділянки з асРНК була штучно детермінована таким чином, щоб остання знаходилася на верхівці петлі шпильки. Антисенсовою послідовністю проти Tat була кДНК Tat-мРНК. Вона включала перший, спільний для всіх вірусних мРНК некодуєчий екзон довжиною 280 п. о., та перші 60 п. о. першого кодуючого екзона Tat, які перекривали стартовий кодон трансактиватора. Всі ці послідовності експресували у складі мРНК селективного гена неоміцинофототрансферази (*neo^r*) під контролем промотора гена тимідинкінази вірусу герпесу. АсРНК проти PBS частково пригнічували ВІЛ в обох випадках, причому асРНК проти PBS була ефективнішою, ніж асРНК проти 5'-PBS. АсРНК проти Tat не впливала на репродукцію ВІЛ внаслідок невдало обраних системи експресії та антисенсової послідовності.

У роботі [45] автори створили та перевірили противірусну активність серії конструкцій, які експресували 10 різних асРНК практично проти всіх

ділянок геному ВІЛ, виключаючи область R-U5 LTR. Вектор та промотор для ендогенної експресії були ті ж самі, що й у роботі [42]. Тобто у цих роботах використано єдину векторно-клітинну модель, і результати дослідження 11 конструкцій підлягали порівнянню. З дослідів випливало, що найефективнішими є асРНК, які блокують ділянку першого кодуєчого Tat/Rev екзона разом з флангами (78 % пригнічення). Також значне пригнічення репродукції ВІЛ забезпечували асРНК до послідовності рамки Gag довжиною 1000 п. о. Ніяких *cis*-сигналів ця асРНК не блокувала і гібридувалася лише з центральною ділянкою рамки Gag. Інші асРНК спричиняли незначний рівень пригнічення або не впливали на вірус.

Ще одну конструкцію, яка експресувала асРНК проти Tat екзона, було досліджено у роботі [46]. Автори створили рибозим типу «головки молотка», який розрізав вказаний екзон, та вбудували його у 3'-некодуєчу ланку мРНК гена *neo^r*. Для порівняння вони створили аналогічну конструкцію, яка відрізнялася від рибозим-експресуючого вектора відсутністю каталітичного домену рибозиму і утримувала лише антисенсові послідовності рибозиму довжиною 48 п. о., комплементарні Tat екзона. Експресія цього рибозиму та асРНК у складі ретровірусного вектора на основі MMLV пригнічувала продукцію вірусу, причому асРНК впливала суттєвіше.

Було випробувано противірусну активність асРНК проти 5'-кінця мРНК ВІЛ, який відповідає за зв'язування з рибосомами та утримує *cis*-сигнали кепування мРНК і TAR-елемент [47]. Довжина послідовності асРНК складала лише 63 п. о. Експресія асРНК відбувалася під контролем ретровірусного промотора LTR RSV. Транскрипти у клітинах були кеповані та поліаденільовані. Рівень пригнічення репродукції віріонів складав від 60 до 90 %.

Ми також здійснили спробу пригнічення ВІЛ-1 за допомогою асРНК та сконструювали вектор, який експресує асРНК проти першого кодуєчого Tat/Rev екзона ВІЛ-1 довжиною 386 п. о. під контролем власного безенхансерного промотора ВІЛ-1 [48]. Антисенсова послідовність синтезувалася у клітинах як складова частина 5'-некодуєчої ділянки мРНК селективного гена *neo^r*. У разі трансфекції цієї конструкції у ембріональні гемопоетичні клітини людини вона знижувала продукцію вірусу у 100 разів та на 70 % блокувала синтез його антигенів Gag.

Варто відзначити, що на прикладі РНК ВІЛ-1 було детально досліджено залежність блокуючого впливу асРНК від вторинної структури мРНК-

мішені [49-51]. Спочатку автори підраховали за допомогою комп'ютерного аналізу вільну енергію утворення вторинних структур асРНК або відповідними мРНК в межах всього геному ВІЛ. Виявилось, що рівень вільної енергії утворення вторинної структури певною ланкою мРНК (або асРНК) корелює з її блокуючою активністю *in vivo*. Мішені-мРНК з слабкою вторинною структурою ефективніше пригнічувалися асРНК. Така ж залежність відмічалася у випадках природної асРНК-регуляції генів у прокариот.

Гіпотези стосовно механізмів антисенсової регуляції експресії генів та стратегія добору мішені для асРНК. Найпоширенішим принципом асРНК-регуляції вважається блокування трансляції мРНК, тому сигнали ініціації цього процесу у стратегії добору мішені асРНК є пріоритетними. Але ґрунтуючись на сучасних публікаціях з проблем асРНК-регуляції, при доборі ділянки та стратегії блоку трансляції мРНК автори інколи нехтують вибором 5'-кінця певної мРНК як мішені. У разі прокариотичних систем та вірусів еукариот вони аргументують це тим, що у випадку поліцистронних матриць ефект пригнічення не буде розповсюджуватися на рамки трансляції, які розташовані нижче і виходять за межі ділянки-мішені. Ця обставина, на думку авторів, диктує необхідність конструювання систем, продукує яких більш подовжені ас-транскрипти, комплементарні тільки кодуєчим послідовностям мРНК з незначною вторинною структурованістю. Ще одним аргументом авторів на користь довших асРНК, відповідно існуючому уявленню про механізм їх дії, є деградація їхніх дуплексів з мРНК у клітині. Тому довші дрониткові РНК-гібриди повинні являти собою уразливіші мішені для деградуєчих ферментів, що підсилюватиме ефект пригнічення їхньої трансляції. Деякі автори, застосовуючи асРНК у фундаментальних дослідженнях, не вдаються до аналітичного пошуку ділянки для блокування в межах мРНК-мішені і використовують повнорозмірну послідовність означеного гена або його кДНК у антисенсовій орієнтації. Проте за рахунок довжини асРНК рідко досягається максимальний ефект блокування мРНК-мішені.

З накопиченням позитивного та негативного досвіду з використання асРНК фахівці, аналізуючи «невдалі конструкції», дійшли висновку, що для блокування мРНК важливо враховувати ступінь вторинної структурованості мішені та націленої на неї асРНК. Ступінь вторинної структурованості транскриптів, а також білки клітини, які взаємодіють з мРНК, суттєво впливають на ефективність утворення гібриду мРНК : асРНК у про-

каріотах та клітинах еукаріот. Частіше ефективнішими є асРНК, спрямовані проти ділянок мРНК з вторинною структурою типу шпильки з великими неспарованими петлями. Цій петлі у межах мішені відповідатиме відкрита для спарювання петля асРНК і ініціювання утворення гібриду буде енергетично вигідним.

З метою досягнення мінімальної структурованості асРНК та збільшення її «мобільності» не варто використовувати транскрипти довше 150—350 нуклеотидів, оскільки з досвіду відомо, що асРНК довжиною 75—125 п. о. проти вдало вибраної мішені є не менш ефективними і більш специфічними, ніж транскрипти довше 1000 п. о.

Варто відзначити, що механізм дії асРНК у прокаріотах досліджено краще, ніж в еукаріотах. Відмінним тут є те, що в бактеріальних клітинах показано руйнування довгих двоспіральних РНК РНКазою III [52]. В еукаріотах механізм блокування внаслідок деградації гібридів нуклеазами є найпростішою серед інших гіпотез, жодну з яких поки що не доведено. Серед останніх це інтерференція з транспортними білками та блок транспорту мРНК через ядерні пори, блокування сигналів процесингу (сплайсингу, поліаденілювання, кепування та ін.). Чимало спекулятивного матеріалу представлено стосовно клітинних білків еукаріот, які можуть модулювати утворення гібридних двоспіральних РНК [3]. Також вже є відомості про кілька ферментів еукаріотичних клітин, які направлено модифікують нуклеотиди двоспіральних РНК та роблять неможливою їхню трансляцію (наприклад, Double Strand RNA Unwindase). Але вказані білки відкриті у клітинах віддалених організмів, їхні основні функції не схожі, а їхня експресія регулюється за механізмами, де двоспіральні РНК не відіграють ролі активаторів. Тому робити узагальнення щодо всіх таких випадків, як механізм асРНК-блокування, неможливо. Однак двоспіральні РНК здатні активувати 2'-5'-олігоаденілатсинтетазу, яка продукує ppp(2'p5'A)_n поліаденілати. Ці незвичайні молекули активують ендорибонуклеазу L, яка деградує вірусні та клітинні РНК [53]. Двоспіральні РНК також здатні активувати у клітинах хребтних кіназу DDPK (Double-strand-RNA Dependent Protein Kinase серин-треонінової специфічності), субстратом якої служить трансляційний eIF4a, активний у нефосфорильованій формі. Звичайно, ця кіназа може якимось впливати через інші субстрати у клітині на активність РНКаз, але це ще досконало не досліджено. Двоспіральні РНК також можуть піддаватися у клітині ковалентній модифікації та інактивації білком, який активується інтерферо-

ном — Interferon-Inducible Double-Stranded RNA-specific Adenosine Deaminase (dsRAD) [54].

При конструюванні штучних систем регуляції генів за допомогою асРНК намагаються досягти максимального рівня останніх у клітині завдяки сильному конститутивному промотору, що виглядає цілком виправданим. Однак відомо, що для кожного окремого випадку існує пороговий рівень відношення копійності асРНК/мРНК, вище якого ефект блокування не сягає [51]. У багатьох випадках тисячкратний надлишок асРНК проти мішені не давав повного пригнічення її експресії. Іноколи ефективною була експресія асРНК на однаковому з мішенню рівні. У деяких випадках асРНК-регуляції в еукаріотах як у природних клітинних системах, так і в експериментально створених відбувається суттєве блокування гена незначним рівнем асРНК, навіть стехіометрично меншим від рівня мішені, що пояснити механістично не просто. Вірогідніше всього, тут має місце специфічна взаємодія асРНК з певними сайтами мРНК, що викликає дестабілізацію і втрату функціональних властивостей мішені без ефекту «вититровування» асРНК.

Таким чином, за браком повної картини молекулярних механізмів асРНК-блокування в еукаріотичних клітинах у пошуках мішені для асРНК поки що значну роль відіграє емпіричний підхід. Проте застосування антисенсового методу регуляції генів поширюється, і у сучасних наукових дослідженнях асРНК, як і антисенсові олігонуклеотиди, використовують в експериментальній онкології [55—56], біотехнології, оскільки асРНК є зручним аналогом генних мутацій. Також асРНК займають одне з перших місць серед засобів внутрішньоклітинної імунізації клітин проти вірусів у генотерапії.

А. П. Кухаренко, А. Д. Швед

Антисенсовые РНК как средство регуляции экспрессии генов

Резюме

В обзоре рассмотрены результаты многих публикаций по проблеме регуляции экспрессии генов с помощью антисенсовых РНК в прокариотических и эукариотических клетках. Уделено внимание созданию моделей внутриклеточной устойчивости против вирусов с использованием антисенсовых РНК. Анализируются общая концепция и стратегия создания систем антисенсовой регуляции экспрессии генов в клетках эукариот.

A. P. Kukharensko, A. D. Shved

Antisense RNA as a tool for regulation of gene expression

Summary

The review summarises results of a large number of publications on the problem of gene expression regulation by antisense RNA in:

procaryotic and eucaryotic cells. A special attention devoted to the intracellular immunization and antiviral resistance based on anti-sense RNA. Common principles of modelling of antisense regulation in eucaryotic cells are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zamecnik P. S., Stephenson M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxy-nucleotide // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 1.—P. 280—284.
2. Stephenson M. L., Zamecnik P. S. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxynucleotide // Ibid.—P. 285—288.
3. Stein C. A., Cheng Y. C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents — is the bullet really magical? // Science.—1993.—261, N 5124.—P. 1004—1012.
4. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G. et al. Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 21.—P. 7706—7710.
5. Zamecnik P. S., Goodchild J., Taguchi Y., Sarin P. Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA // Ibid.—1986.—83, N 12.—P. 4143—4147.
6. Izant J. G., Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis // Cell.—1984.—36, N 4.—P. 1007—1015.
7. Izant J. G., Weintraub H. Constitutive and conditional suppression of exogenous genes by anti-sense RNA // Science.—1985.—229, N 4711.—P. 345—352.
8. Tomizawa J.-I., Itoh T., Selzer G., Som T. Inhibition of *ColEI* RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 3.—P. 1421—1425.
9. Light J., Molin S. The sites of action of the two copy number control functions of plasmid R1 // Mol. and Gen. Genet.—1982.—187, N 3.—P. 486—493.
10. Simons R. W., Kleckner N. Translational control of IS10 transposition // Cell.—1983.—34, N 3.—P. 683—691.
11. Tomizawa J.-I., Som T. Control of *ColEI* plasmid replication: enhancement of binding of RNAI to the primer transcript by the Rom protein // Ibid.—1984.—38, N 3.—P. 871—878.
12. Kim S. K., Wold B. J. Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA // Ibid.—1985.—42, N 1.—P. 129—138.
13. Preiss A., Rosenberg U. B., Kienlin A. et al. Molecular genetics of Kruppel, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo // Nature.—1985.—313, N 5997.—P. 27—32.
14. Crowley T. E., Nellen W., Gamer R. N., Firtel R. A. Phenocopy of discoidin I-minus mutants by anti-sense transformation in *dictyoselium* // Cell.—1986.—43, N 3.—P. 633—641.
15. Farnham P. J., Abrams J. M., Schimke R. T. Opposite-sense RNAs from the 5'-flanking region of the mouse dihydrofolate reductase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 12.—P. 3978—3982.
16. Celano P., Craig M. Characterization of a naturally occurring antisense RNA transcript with homology to the second intron of the human *c-myc* gene // J. Cell. Biochem., Suppl. 15D.—1991.—P. 13.
17. Boal T., Cohen R., Noguchi M. Identification of potential antisense regulation of *eIF-2 α* gene expression // Ibid.—P. 15.
18. Tomizawa J.-I. Control of *ColEI* plasmid replication: initial interaction of RNAI and the primer transcript is reversible // Cell.—1985.—40, N 3.—P. 527—535.
19. Mizuno T., Chou M.-J., Inouye M. A comparative study on the genes for three proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 11.—P. 6932—6940.
20. Mizuno T., Chou M.-J., Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 7.—P. 1966—1970.
21. Khochbin S., Lawrence J.-J. An antisense RNA involved in p53 mRNA maturation in murine erythroleukemia cells induced to differentiation // EMBO J.—1989.—8, N 13.—P. 4107—4117.
22. Tosic M., Roach A., de Rivaz J.-C. et al. Post-transcriptional events are responsible for low expression of myelin basic protein in myelin deficient mice: role of natural antisense RNA // Ibid.—1990.—9, N 2.—P. 401—406.
23. Michael N., Vahey M. T., d'Arcy L. et al. Negative-strand RNA transcripts are produced in HIV-1 infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat // J. Virol.—1994.—68, N 2.—P. 979—987.
24. Lai P. K., Barsov E. V., Nonoyama M. Detection of leftward transcripts of HIV-1 in infected cells // IXth Int. Conf. on AIDS: Abstrs.—Berlin, 1993.—PO-A05-0078.
25. Ch'ng J. L. C., Mulligan R. C., Schimmel P., Holms E. W. Anti-sense RNA complementary to 3' coding and noncoding sequences of creatine kinase is a potent inhibitor of translation *in vivo* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86, N 24.—P. 10006—10010.
26. McGarry T. J., Lindquist S. Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible anti-sense RNA // Ibid.—1986.—83, N 2.—P. 399—403.
27. Coleman J., Hirashima A., Inokuchi Y. et al. A novel immune system against bacteriophage infection using complementary RNA (micRNA) // Nature.—1985.—315, N 6020.—P. 601—603.
28. Hirashima A., Sawaki S., Inokuchi Y., Inouye M. Engineering of the mRNA-interfering complementary RNA immune system against viral infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83.—P. 7726—7730.
29. Hemenway C., Fang R. X., Kaniewski W. K. et al. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA // EMBO J.—1998.—7, N 5.—P. 1273—1280.
30. Powell P. A., Stark D. M., Sanders P. R., Beachy R. N. Protection against tobacco mosaic virus antisense RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 6949—6952.
31. Chang L.-J., Stoltzfus C. M. Gene expression from both intronless and intron-containing Rous sarcoma virus clones is specifically inhibited by anti-sense RNA // Mol. Cell. Biol.—1985.—5.—P. 2341—2348.
32. To R. Y.-L., Booth S. C., Neiman P. E. Inhibition of retroviral replication by anti-sense RNA // Ibid.—1986.—6, N 12.—P. 4758—4762.
33. Neiman P. E., Booth S. C., To R. Y.-L. Antisense inhibition of viral replication and host-cell gene expression in avian retroviral systems // Current Communications in Molecular Biology: Antisense RNA and DNA / Ed. D. A. Melton.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1988.—P. 125—128.
34. To R. Y.-L., Neiman P. E. Inhibition of replication of avian retroviruses by antisense RNA // J. Cell. Biochem., Suppl. 15D.—1991.—P. 11.
35. Von Ruden T., Gilboa E. Inhibition of human T-cell leukemia virus type 1 replication in primary human T cells that express antisense RNA // J. Virol.—1989.—63, N 2.—P. 677—682.
36. Sullenger B. A., Lee T. C., Smith C. A. et al. Expression of chimeric tRNA driven antisense transcripts renders NIH 3T3

- cells highly resistant to moloney murine leukemia virus replication // *Mol. Cell. Biol.*—1990.—10.—P. 6512—6523.
37. Томсон В. П., Чернобаева Л. Г., Козырева С. В. и др. Экспрессия специфических РНК в культурах клеток с интегрированным асРНК-геном и их корреляция с подавлением репродукции ВЛВ // *Биополимеры и клетка.*—1993.—9, № 4.—С. 59—62.
 38. Борисенко А. С., Шаяхметов Д. М., Герзилова А. Г., Тихоненко Т. И. Использование промотора U3 области LTR ВЛВ для экспрессии генов противовирусных асРНК в клеточных культурах // *Мол. генетика, микробиология и вирусология.*—1994.—№ 3.—С. 16—20.
 39. Monte P. D., Bessia C., Ripalti A. et al. Stably expressed antisense RNA to Cytomegalovirus UL83 inhibits viral replication // *J. Virol.*—1996.—70, N 4.—P. 2086—2094.
 40. Liu Z., Batt D. B., Carmichael G. G. Targeted nuclear antisense RNA mimics natural antisense-induced degradation of polyoma virus early RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91, N 10.—P. 4258—4262.
 41. Olson K. E., Higgs S., Gaines J. et al. Genetically engineered resistance to Dengue-2 virus transmission in mosquitoes // *Science.*—1996.—272.—P. 884—886.
 42. Sczakiel G., Pawlita M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T-cells stably expressing antisense RNA // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 468—472.
 43. Sczakiel G., Pawlita M., Klienheinz A. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA transcribed in sense and antisense orientation from the 5'-leader/gag region // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—169.—P. 643—651.
 44. Joshi S., van Brunschot A., Asad S. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 multiplication by antisense and sense RNA expression // *J. Virol.*—1991.—65, N 10.—P. 5524—5530.
 45. Rittner K., Sczakiel G. Identification and analysis of antisense RNA target regions of the human immunodeficiency virus type-1 // *Nucl. Acids Res.*—1991.—19, N 7.—P. 1421—1426.
 46. Lo K. M. S., Biasolo M. A., Dehni G. et al. Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing *tat*-antisense and anti-*tat* ribozyme RNA // *Virology.*—1992.—190.—P. 176—183.
 47. Chatterjee S., Johnson P. R., Wong K. K. Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adeno-associated virus antisense vector // *Science.*—1992.—258.—P. 1485—1488.
 48. Кухаренко О. П., Швед А. Д., Рибалко С. Л. та ін. Створення модельної векторної конструкції, що експресує антисенсові РНК проти ВІЛ-1, для внутрішньоклітинної імунізації гемопоетичних клітин // *Інфекц. хвороби.*—1996.—2, № 3.—С. 22—25.
 49. Sczakiel G., Homann M., Rittner K. Computer-aided search for effective antisense RNA target sequences of the human immunodeficiency virus type 1 // *Antisense Res. Develop.*—1993.—3.—P. 45—52.
 50. Rittner K., Burmester C., Sczakiel G. *In vitro* selection of fast-hybridizing and effective antisense RNAs directed against the human immunodeficiency virus type 1 // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21, N 6.—P. 1381—1387.
 51. Homann M., Rittner K., Sczakiel G. Complementary large loops determine rate of RNA duplex formation *in vitro* in the case of a effective antisense RNA directed against the HIV-1 // *J. Mol. Biol.*—1993.—233.—P. 7—15.
 52. Hjalil T. A., Wagner E. G. Bulged-out nucleotides protect asRNA from RNase III cleavage and are required for rapid target RNA binding *in vitro* and inhibition *in vivo* // *Nucl. Acids Res.*—1995.—24, N 3.—P. 571—587.
 53. Maitra R. K., Li G., Xiao W. et al. Catalytic cleavage of an RNA target by 2-5A antisense and RNase L // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 25.—P. 15071—15075.
 54. Liu Y., Samuel S. E. Mechanism of interferon action: Functionally distinct RNA-binding and catalytic domains in the interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase // *J. Virol.*—1996.—70, N 3.—P. 1961—1968.
 55. Cheng J. Q., Ruggeri B., Klein W. M. et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cancer cells and inhibition of AKT expression by antisense RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 3636—3641.
 56. Burfeind P., Chernicky C. L., Rininsland F. et al. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells *in vivo* // *Ibid.*—1996.—93.—P. 7263—7268.

Надійшла до редакції 11.09.97