

А. П. Кухаренко, А. Д. Швед

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЫ ВИЧ И ИХ РОЛЬ В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНОМА

*В обзоре кратко изложены данные научных публикаций по изучению роли вспомогательных регуляторных генов *nef*, *vri*, *vrg*, *vif*, *tat* и *rev* ВИЧ-1 в его репродукции. Основное внимание уделено генам *tat* и *rev* и их продуктам как важнейшим регуляторам активности ВИЧ и других представителей лентивирусов, а также белку *Nef*. Рассмотрены возможные механизмы их влияния на экспрессию провируса с участием факторов клетки-хозяина и на цитофизиологические процессы, протекающие в ВИЧ-инфицированных клетках.*

Введение. Общей способностью, характеризующей всех представителей семейства ретровирусов, является обратная транскрипция их однонитчатого РНК-генома в двунитчатую ДНК. Последняя способна интегрироваться в геном хозяина и длительное время пребывать в нем в виде провируса. Последующие фазы внутриклеточного цикла ретровирусов определяются факторами и условиями клетки-хозяина. Многим изученным ретровирусам для репликации и осуществления полного инфекционного цикла достаточно наличия трех собственных структурных генов — *gag*, *pol* и *env*. Лентивирусы, представляющие обширную группу внутри семейства ретровирусов, кроме трех перечисленных генов, имеют в своем геноме открытые рамки считывания, кодирующие вспомогательные регуляторные белки. Геному вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), относящегося к лентивирусам, присуще наиболее сложное строение среди всех известных ретровирусов; он кодирует гены, по крайней мере, шести вспомогательных белков — *nef*, *vri*, *vrg*, *vif*, *tat* и *rev*. В предлагаемом обзоре кратко отражены результаты современных исследований молекулярно-генетических свойств этих вирусных генов и их белковых продуктов, а также предпринята попытка обобщения существующих гипотез и научных взглядов на роль и значение вспомогательных генов ВИЧ-1 в реализации его генома. Рассмотрены также возможные механизмы патогенетического воздействия продуктов указанных генов на клетки хозяина.

Поскольку к настоящему времени в научной литературе нет обзоров, где были бы представлены данные обо всех регуляторных генах ВИЧ-1, мы решили предложить читателю эти обобщенные сведения следующим образом. Каждый отдельный ген охарактеризован по возможности в соответствии с некоторой схемой. Но приоритетное изучение наиболее важных регуляторных генов вируса и специфика каждого из них нередко заставляют отступать от шаблона при анализе всех вспомогательных генов ВИЧ-1. Свойства некоторых указанных генов даны в сравнении с гомологичными генами представителей лентивирусов HTLV-группы (Human T-Cell Leukemia Virus), генеалогически наиболее близких к ВИЧ. Следуя задаче представить наиболее существенные сведения о свойствах вирусных продуктов и их взаимодействии со структурами клетки-хозяина, мы не останавливались на характеристике последних, чтобы не отнимать внимание читателя на отдельные ракурсы клеточной биологии. По этой причине подачу такого объема информации, специализированной для молекулярной генетики, трудно адресовать широкому кругу исследователей, работающих в области ге-

ность считается эволюционным критерием и отражает значимость *nef* для репликации вируса [1—3].

Белок *Nef* появляется в клетке на ранних стадиях, но максимум его накопления наблюдается на третьи сутки после инфицирования одновременно с белками оболочки вириона *Gag* и *Env* [2]. Анализ состава ВИЧ-специфических мРНК в инфицированной клетке (амплификация, клонирование и сиквенс кДНК клонов) выявил наибольшую избыточность *nef*-специфических матриц, составляющих 79 % всех множественно сплайсированных малых мРНК (в соответствии с классификацией продуктов сплайсинга транскриптов ВИЧ, предложенной Muesing [4], — это мРНК, не имеющие интронов). Подобное соотношение постоянно для всех изолятов вируса и всех перmissive клеток [4].

Первые 16 N-концевых аминокислотных остатков белка составляют сигнальный пептид, локализующийся в цитоплазматической мембране, и 80 % клеточного пула *Nef* ассоциировано с мембранными структурами. Кроме основной формы *Nef*, ассоциированной с мембранами, экспрессируется укороченный на 16 аминокислот *Nef*, транслируемый с внутреннего инициатора Met-17. У двух форм могут быть разные функции — трансдукторная и регуляторная [5]. Показано также, что в инфицированных клетках зрелый белок меристилирован [5].

Nef — типичный фосфопротеин — активен только в фосфорилированном состоянии. Этот белок содержит домен связывания GTP и обладает GTPазной активностью. Он связывает GTP подобно белкам G-семейства сигнальных трансдукторов и является фосфокиназой, способной эффективно аутофосфорилироваться после активации [6]. Активатором *Nef* служит протеинкиназа C. Рекombинантный *Nef*, полученный в *Escherichia coli*, также способен аутофосфорилироваться в присутствии GTP или ATP [7].

Для репликации ВИЧ *in vitro* нет необходимости в *Nef*. Первые сведения, касающиеся продукта открытой рамки считывания на 3'-конце генома ВИЧ, свидетельствовали о том, что он ингибирует LTR-направленную транскрипцию [6] и таким путем определяет латентность провируса. По этой причине вирусный ген и его продукт названы NEF (Negative Element Factor) — производное от названия области LTR (Negative Regulation Elements, NRE) — предполагаемая аффлекторная область воздействия *Nef*. Другие авторы опровергают репрессивное действие *Nef* на ВИЧ [8, 9], по крайней мере, для некоторых изолятов вируса и отдельных клеточных систем. Так, в клетках, условно перmissive для ВИЧ, влияние *Nef* на LTR ВИЧ не реализуется, что, возможно, указывает на тканеспецифичность взаимодействующих с ним клеточных факторов [10]. Эксперименты по изучению влияния *Nef* на репликацию ВИЧ в зрелых Т-клетках и первичных лимфоцитах человека выявили активацию транскрипции вирусного генома в последних и отсутствие влияния в покоящихся Т-лимфоцитах [11]. Интересно, что в ряде опытов по мутагенезу гена *nef-2* ВИЧ-2 установлено, что его инактивация приводит к усилению репликации в Т-клетках, но не влияет на репликацию вируса в первичных макрофагах. Похоже, что ген *nef* у ВИЧ-2 играет более важную роль для утверждения латентности инфекции, чем у ВИЧ-1. Тканеспецифический характер действия *nef* ВИЧ-1 проявлялся при его экспрессии в трансгенных мышцах — его биологическое действие на CD4⁺ Т-лимфоциты тимуса отлично от действия на периферические Т-лимфоциты трансгенного животного [12]. В этих работах также обнаружено, что при трансформации *nef* ВИЧ-1 в мышечные клетки отмечается активация некоторых цитокинов.

Однако в том случае, если *Nef* оказывает репрессивное действие на промотор ВИЧ-1, его влияние не критическое, и даже избыток функционального *Nef* в клетке не может полностью подавить транскрипцию генов вируса. Но при этом существенно задерживается его репликация (в 2—4 раза) по отношению к вирусу с неактивным *nef*. Клоны ВИЧ, мутантные по *nef*, реплицируются эффективнее в сравнении с «диким» типом, у них более высокий уровень экспрессии антигенов *gp120* на

поверхности инфицированной клетки. Известен пример, когда нерегулируемая экспрессия *Nef in trans* по отношению к мутанту *nef*⁻ почти полностью подавляла синтез антигенов *Env* [5, 13]. Ряд авторов считает, что мутации *nef* могут менять культуральные свойства вируса от «медленного» типа к «быстрому» (более крутой временной профиль уровня вирусных антигенов и синцитийобразования в культуре клеток после инфицирования).

Исходя из представленных на VIII Международном конгрессе по СПИД (1992 г.) результатов и опубликованных данных принято относить *nef* к преимущественно ранним регуляторным генам ВИЧ-1 и считать его усилителем экспрессии структурных белков вириона.

Cis-элемент для *Nef*-влияний в пределах LTR ВИЧ-1 не локализован, поскольку непосредственно с ним белок не взаимодействует [5]. Косвенно установлено, что областью его воздействия на 5'-LTR может быть NRE (рис. 2). Некоторые мутации в этой области прерывают влияние *Nef in trans* на вирус так же, как LTR провирусов некоторых

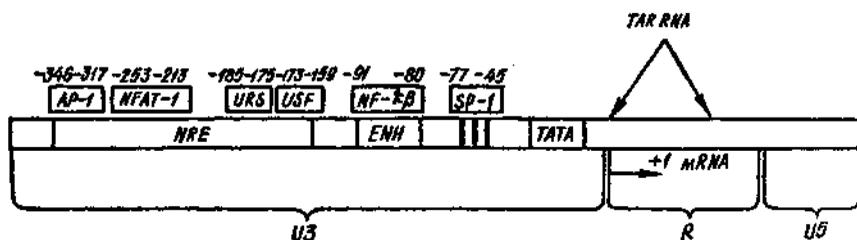


Рис. 2. Структура LTR ВИЧ-1 и расположение основных генетических сигналов в его пределах. Блоками показаны сайты узнавания ДНК LTR клеточными факторами. Участок, обозначенный NRE, — Negative Regulators Element; ENH — элемент ядерного фактора NF-каппа-β (стимулирует транскрипцию гена бета-субъединицы каппа-цепи иммуноглобулинов) — главный энхансер промотора ВИЧ-1; TATA — последовательность промотора; NFAT — Nucleic Factor in Activated T-cells (считывается репрессором LTR-транскрипции); URS — Upstream Repressive Sequence; USF — элемент Upstream Stimulating Factor; SP-1 — Stimulator of Promoter (элемент базального фактора транскрипции). Цифры отвечают расстоянию в нуклеотидах выше точки старта транскрипции (сайт копирования мРНК ВИЧ).

изолятов ВИЧ-1 (NRE вариабелен) не отвечают на такое воздействие [14, 15]. Клоны ВИЧ-1, выделенные из периферической крови больных с выраженным иммунодефицитом, часто не реагируют на влияние *Nef in trans*, что, возможно, в какой-то мере является дополнительным фактором в патогенезе вирусносительства [5].

Функциональные свойства *Nef* сходны с таковыми у ядерного фактора *p21*, продукта гена *ras*, от которого косвенно зависит связывание с ДНК транскрипционного фактора *AP-1* (комплекс продуктов гена *c-jun* и др.), влияющего на транскрипцию через *cis*-элемент в области выше TATA-промоторов. Очевидно, что *Nef* модулирует активность транскрипционных факторов, подобных *AP-1* [7], через каскад химических модификаций клеточных регуляторов транскрипции. Некоторые авторы приписывали *nef* онкогенные свойства, сходные с *sarc*, но эксперименты не подтверждают этого [14, 16].

Установлено, что *Nef* влияет на экспрессию клеточных генов — он подавляет транскрипцию с промотора гена интерлейкина-2 (iL-2) в Т-лимфоцитах, интерферируя с сигналами, идущими от рецепторного комплекса цитоплазматической мембраны Т-клеток [15]. Другими словами, *Nef* угнетает трансформирующие воздействия на инфицированную клетку извне. При таком воздействии *Nef* на Т-лимфоцит последний отвечает на внешние стимулы только синтезом альфа-цепи рецептора интерлейкина — iL-2Rα, и не индуцируется (как в норме) синтез iL-2. Для деления лимфоцита после индукции необходимо, чтобы iL-2 связался с высокоаффинным iL-2R на поверхности активированного лимфоцита. Это приводит к клонированию антигенузнающих лимфоцитов. Если в клетке экспрессируется *Nef*, то она может активироваться после

индукции антигеном только за счет *iL-2* других клеток. По мере увеличения количества *Nef*-экспрессирующих Т-клеток, т. е. уменьшения числа лимфоцитов с функциональной сигнал-индуцибельной системой, уменьшается тканевый пул доступного и необходимого для деления Т-клеток *iL-2*. Доказана также способность *Nef* подавлять синтез Т-клеточного рецептора CD4, необходимого Т-хелперам и Т-киллерам для их функционирования (поддержания иммунотолерантности организма и эффективных «ответов» гуморального иммунитета на внедрение антигенов) [5]. Учитывая такие биологические механизмы воздействия *Nef* на Т-клетки, считают, что этому вирусному продукту может принадлежать значимая роль в разрушении CD4⁺ Т-клеточного звена иммунной системы наряду с другими цитопатологическими действиями вируса.

Таким образом, *Nef* может влиять на экспрессию всего вирусного генома через транскрипционные факторы в определенных типах клеток, а также на экспрессию некоторых генов клетки. Оба воздействия помогают вирусу в некотором смысле избегать реагирования иммунной системы. Биохимический механизм такого влияния не расшифрован, хотя показана способность *Nef* фосфорилировать отдельные белки гетерогенного клеточного лизиса *in vitro* (однако отношение этого к цитофизиологическим эффектам *Nef* не установлено) [16].

Сравнение аминокислотной последовательности *Nef* с данными банков белковых последовательностей выявило определенное соответствие его протяженного участка с пептидами яда скорпиона, взаимодействующими с калиевыми каналами клеточных мембран. Это структурное соответствие в некоторой мере подтверждено *in vitro* функциональным сходством: *Nef* слабо усиливал токи в калиевых каналах мембран нейронов, взаимодействуя с последними [17]. Мы полагаем, что такой биофизический механизм цитопатичности ВИЧ-инфекции посредством *Nef* маловероятен. Также показано частичное соответствие нуклеотидной и аминокислотной последовательностей *Nef* последовательности рецептора тиротропина человека. Антитела к этому рецептору проявляли кросс-реактивность к *Nef* [18]. В целом для ретровирусных геномов показано наличие подпоследовательностей, гомологичных известным генам клетки. Структурные белки ВИЧ включают короткие аминокислотные мотивы, схожие с пептидами рецепторного аппарата лимфоцитов. В указанном случае в рамке считывания *Nef* также обнаружена хозяин-специфическая подпоследовательность. ВИЧ-1 не относят к «горячим» ретровирусам, которые, встраиваясь в геном хозяина, активно рекомбинируют и «захватывают» внешние последовательности в состав своего генома. Но каждый случай гомологии вирусной последовательности с клеточными генами может отражать отдаленную эволюционную связь ВИЧ с рекомбинационно-активными ретровирусами.

Отсутствие сведений о клеточном аффикторе для *Nef* среди белковых молекул клетки позволяет лишь рассуждать о гипотетическом субстрате для «*Nef*-киназы». Но очевидным результатом действия этого вирусного белка на уровне Т-лимфоцитарной иммунной системы (как человеческой, так и мышьиной) является элиминирование периферических CD4⁺-лимфоцитов и прежде всего ВИЧ-инфицированной их части.

Ген *vri* и его продукт. Белок *Vri* — фосфопротеин с молекулярной массой 16 000, состоящий из 81 аминокислотного остатка. Рамка считывания *vri* у всех клонов ВИЧ-1 перекрывается на несколько нуклеотидов с N-концом рамки гена *env* [19]. Этот ген отсутствует в геноме ВИЧ-2 и других лентивирусов человека и приматов. Некоторые инфекционные изоляты ВИЧ-1 (HXB2, VN10, Ma1, Z6) утратили способность его экспрессировать. Белок имеет гидрофобный N-конец и ассоциирован за счет последнего с мембранами клетки. При экспрессии *vri* в клетках *in vitro* значительные количества белка *Vri* обнаруживаются в перинуклеарном пространстве, что характерно и для ВИЧ-инфицированных периферических лимфоцитов [19].

Мутанты ВИЧ по *vri* обладают в 5—10 раз меньшей репликативной способностью и дают меньше зрелых вирионов. Анализ вирионов

мутанта одного изолята выявил нарушение процессинга коровых белков в них [20], при этом в другой работе показана продукция мутантом вирионов с нормальным по зрелости составом белков [19].

Клетки, зараженные мутантным по *vpr* ВИЧ, удерживают на клеточной мембране незрелые вирионы [21]. Экспрессия *Vpr in trans* по отношению к мутанту резко усиливает формирование синцитиев и ускоряет гибель инфицированных клеток [22]. Количество ассоциированных с клеткой вирионов при этом уменьшается, а их экспорт в среду возрастает. Эти *in trans* эффекты *vpr*, очевидно, и дали название его продукту — от *Virion Pubertation*.

В публикациях сообщается также о взаимодействии *Vpr* с *gp120* внутри клетки. Считается, что *Vpr* может способствовать транспорту или встраиванию *gp120* в капсид вириона [6]. Мы же предполагаем наличие у этого белка свойств шаперонов (белков, определяющих промежуточные конформационные состояния у других незрелых белков в ходе их процессинга и модификации химическими группировками их аминокислотных остатков) или транспортных белков. Хотя имеющиеся на сегодня сведения о его компартиментализации в клетке не подтверждают такой гипотезы.

Таким образом, функции *Vpr* связаны с созреванием и эффективным высвобождением инфекционных вирионов, из чего следует, что этот ген косвенным образом способствует межклеточной трансмиссии ВИЧ.

Vpr синтезируется с матрицы, кодирующей также *Env*, поэтому его уровень в клетке регулируется *Rev* [22]. На основании этого *vpr* относят к поздним вспомогательным генам ВИЧ-1.

Ген *vpr*. В геноме ВИЧ-1 рамка считывания *Vpr* перекрывается слева с С-концом *vif* (рис. 1). Длина белка составляет 96 аминокислотных остатков; первичная структура его гена высококонсервативна среди изолятов ВИЧ-1, ВИЧ-2 и SIV. Ген *Vpr* относится к поздним белкам ВИЧ и синтезируется с собственной (моноцистронной) мРНК. Экспрессия этой мРНК регулируется белком *Rev*. Пик уровня *Vpr* в клетке соответствует пику ревертазы. Последние два условия — основа для отнесения данного гена к поздним. Но белок является вирион-ассоциированным [24] и, таким образом, может выступать первым регуляторным белком в самом начале цикла репликации ВИЧ в клетке до тех пор, пока белки *Tat* и *Rev* не синтезируются *de novo* [25].

Некоторые клоны изолята HTLV 111В утратили функциональный *vpr*, но цитопатичность их нарушена слабо. Эксперименты с мутациями ВИЧ-1 по *vpr* показали, что этот белок вполне заменим для репликации ВИЧ [26], хотя все представители группы лентивирусов, кодирующие этот ген с функциональным фенотипом, реплицируются гораздо быстрее, чем мутантные по нему. Так, мутанты ВИЧ-1 по *vpr* отстают в проявлениях цитопатичности и профиле активности ревертазы во времени от дикого вируса на 7—10 дней (в культуре клеток). Кроме того, они не способны продуктивно инфицировать первичные моноцит/макрофаги. Однако при дифференцировке последних в миеломонобластные линии вирус реплицируется. В этом случае правомочной выглядит гипотеза о поддержании активности вируса на ранней стадии инфекции (иначе — индуцирование перmissивности клетки) индукцией изменений в клетке за счет вирион-ассоциированного *Vpr*. Тогда становятся объяснимыми отличия вирионов с нефункциональным фенотипом *Vpr* от «диких» и более «медленные» культуральные характеристики мутантов ВИЧ по этому гену. Установлено, что LTR ВИЧ-1 в отсутствие *Vpr* в три раза слабее отвечает на трансактивацию [25]. Вероятно, влияние белка на транскрипцию ВИЧ-1 не прямое, а опосредуется каскадными регуляторными системами клетки.

Подтверждением возможности влияния *Vpr* на течение клеточных процессов стало изучение его влияния на дифференцировку пролиферирующих клеток человека [27]. В этой работе показано, что вирус посредством *Vpr* может индуцировать дифференцировку клеток. Тогда при инфицировании лимфоцитов на перmissибельной (образно говоря —

предпермиссибельной) для ВИЧ стадии их созревания будет отмечаться истощение прогениторной части их популяции. Это наблюдается в некоторых случаях у ВИЧ-инфицированных на одной из стадий вирусносительства в форме высокого или нормального титра незрелых Т-лимфоцитов тимуса при дефиците их зрелых форм в периферической крови. Такая гипотеза о «лимфоцитопатичности» продукта *vpr* ВИЧ-1 выглядит правдоподобно.

Считается, что этот ген необходим для репликации вируса в некоторых типах клеток. Аффекторная цепь действия *Vpr* с участием определенных клеточных регуляторных факторов неизвестна. Конечной мишенью такой цепи, скорее всего, служат транскрипционные и энхансерные сигналы промоторов лентивирусов или некоторых генов клетки.

Ген *vif*. Молекулярная масса белкового продукта гена *vif* составляет 23 000, а его аминокислотная последовательность консервативна не только среди изолятов ВИЧ-1, но и ВИЧ-2, SIV и даже лентивируса Висны, что указывает на важность этой рамки считывания для многих лентивирусов, вызывающих иммунодефициты [28]. Белок *Vif* необходим вирусу для эффективной трансмиссии свободных вирионов из среды в клетки CD4⁺. Отсюда пошло название продукта гена — белка *Vif* (Viral Infectivity Factor). На прямую трансдукцию вируса при межклеточном контакте белок *Vif* не влияет [6, 30]. *Vif* не является структурным вирион-ассоциированным элементом ВИЧ и не связан с мембранами клетки. Его относят к поздним регуляторным белкам. Белок синтезируется с собственной мРНК (рис. 1).

Провирус клона ВИЧ-1, утративший *vif*, синтезирует то же количество белков и в той же мере цитопатичен, что и дикий клон. Продукция и почкование его вирионов на поверхности инфицированной клетки не нарушены, как и процессинг белковых продуктов структурных генов *gag* и *env* вируса. Но бесклеточные вирионы мутанта с нефункциональным фенотипом *vif*⁻ в 1000 раз менее эффективно инфицируют клетки, чем вирионы дикого клона *vif*⁺, то есть характеризуются медленной кинетикой инфицирования клеток и, следовательно, репликации при незатронутной активности промотора [29]. Зрелые В-клетки не пермиссивны для ВИЧ с генотипом *vif*⁻.

Очевидно, *Vif* влияет на созревание и морфогенез вирионов [30] и, возможно, определяет клеточную специфичность вируса. Принято считать его, как и *Vpr*, важным для экспрессии структурных белков вируса в лимфоцитах на определенной стадии их развития.

Ген *rev*. Последовательность открытой рамки считывания *Rev* консервативна среди изолятов ВИЧ-1 и составляет 116 аминокислотных остатков. Молекулярная масса белка 20 000. Все лентивирусы иммунодефицитов приматов и человека, а также HTLV-группа ретровирусов и вирус бычьего лейкоза (BLV) имеют в своем геноме эту открытую рамку считывания. В 80-е годы, в самом начале изучения структуры геномов лентивирусов, область, кодирующая неструктурные вирусные белки, была условно обозначена, как X-район. Открытые рамки считывания этого района, кодирующие «витально» важные для вируса белки *Rev* и *Tat*, называли в зависимости от их протяженности X-SOR и X-LOR (Small Open Reading Frame, Large ORF). Взаимное расположение экзонов, кодирующих эти рамки, и наличие интрона в них характерно для всех перечисленных лентивирусов. Мутации в последних, приводящие к появлению нефункционального фенотипа белка, летальны, и перечисленные вирусы в этом случае не способны эффективно реализовать свой инфекционный цикл.

Rev — один из самых ранних белков ВИЧ. В первые часы после инфекции все транскрипты вируса в клетках практически полностью сплайсируются до малых безынтронных мРНК длиной 1,8—2,1 тыс. оснований, кодирующих *Nef*, *Tat* и *Rev*. Позже в наборе вирусных транскриптов происходит сдвиг в сторону несплайсированных и превалируют мРНК *Gag* и *Env* — наступает период продукции вирионов в остроинфицированных клетках. Этот сдвиг определяется функцией регулятора

Rev [31, 32]. Пик синтеза *Rev* в клетке отмечен через 12 ч после инфекции. Это критическое время перехода в цикле вирусной инфекции на остропродуктивную стадию за счет сдвига сплайсинга и активации транскрипции вирусным трансактиватором [4]. У мутантов ВИЧ по гену *rev* этого перехода в фазе синтеза структурных белков из-за реверсии образцов сплайсинга не происходит. Такие провирусы дефектны и не дают продуктивной инфекции. Они также почти не проявляют ревертазной активности, нецитопатичны и синтезируют очень мало антигенов *Gag* и *Env* [32, 34]. Из всех мутантов ВИЧ по регуляторным белкам мутанты по *Rev* наиболее дефектны в репликации вируса и уровне синтеза продуктов его гена *gag* [34].

Rev имеет доменную структуру и является фосфопротеином, хотя состояние фосфорилирования не определяет критически его регуляторной активности (мутации в области сайтов фосфорилирования не влияли заметно на функции этого регулятора [35, 36]). Первый домен — N-концевая область белка — отвечает за связывание *Rev* с его *cis*-сайтом в РНК ВИЧ-1 — *Rev Responsive Element* (RRE). RRE — являясь районом мРНК в пределах рамки считывания гена *env*. Этот РНК-узловой домен белка *Rev* лежит между 14-м и 56-м аминокислотным остатком [37]. Мутации в этой области приводят к появлению белка с рецессивно-негативным (неактивным) фенотипом [39]. Подобный функциональный домен есть и у белка *Tat* ВИЧ. Эти два вирусных белка вместе с гомологичными у других лентивирусов образуют новое семейство РНК-связывающих белков. В пределах этого же домена существует аргинин-богатый мотив — с 35-го по 50-й аминокислотный остаток, представляющий собой сигнал локализации в ядрышке [39, 40]. Мутации в этом районе гена *rev* также дают нефункциональный белок. Последовательности, фланкирующие остатки 35—50, отвечают за мультимеризацию *Rev* в присутствии RRE. Второй домен, или вторая консервативная область *Rev*, — С-конец. Удаление 11 С-концевых аминокислот белка не влияет на его активность. Дальнейшее делетирование С-конца гена дает нефункциональный *Rev* [41]. Под действием мутаций в этом районе возникает доминантно-негативный (неактивный) фенотип белка, который эффективно конкурирует *in trans* с *Rev* дико-го вируса [37, 42—45].

В другой работе при делеции 14 С-концевых аминокислот способность *Rev* к гомодимеризации несколько изменялась, хотя он оставался функциональным и формировал димер в присутствии RRE [46]. Район, содержащий аминокислотные остатки 75—83, обуславливает взаимодействие *Rev* с клеточными факторами, влияющими на транспорт, локализацию или сплайсинг мРНК ВИЧ [47]. Этот домен определяется как *Rev Activation Domain*.

Хотя *Rev* локализуется в ядрышке, он не связан с процессами транскрипции и является посттранскрипционным регулятором экспрессии структурных белков вирионов ВИЧ и других лентивирусов [48]. Фактически провирус с нефункциональным фенотипом *rev* синтезирует нормальное количество мРНК *Gag* и *Env* и на их соотношение в ядре не влияет. Но у 90 % клеток культуры, несущей такой провирус, вся *Env*-мРНК удерживается в ядре. У остальных 10 % клеток плотность этого транскрипта градиентно убывает от ядра к цитоплазме, и ни в одной из них не обнаружено диффузного распределения несплайсированных мРНК в отсутствие *Rev*. При котрансфекции в такие клетки функционального гена *rev in trans* в цитоплазме резко возрастает количество *Env*- и *Gag*-мРНК, а в культуральной среде в десятки раз увеличивается уровень вирусных антигенов — производных *Env*- и *Gag*-полипротеинов [49—51].

Транспорт несплайсированных мРНК в обход системы *Rev* — RRE слабодетектируем только на уровне антигенов *Gag* и *Env*. Для эффективного функционирования этой системы и нормального синтеза структурных белков вируса необходим определенный уровень *Rev* в клетке. При низкой экспрессии *Rev* его функция как бы репрессирована. За-

висимость функции этого регулятора от его концентрации не линейна и существует критический порог, ниже которого влияние *Rev* ступенчато снижается [47]. Этот факт объясняет резкий временной переход от латентной фазы вирусного цикла к продуктивной фазе.

В экспериментах по индукции экспрессии ВИЧ в культуре хронически инфицированных промоноцитов и Т-клеток установлено, что переход из относительно латентного состояния к интенсивной продукции вирионов происходит в меньшей мере из-за повышения уровня транскрипции с LTR-промотора, но в большей мере за счет сдвига в сплайсинге [4]. Так, уровень общей транскрипции возрастал после индукции

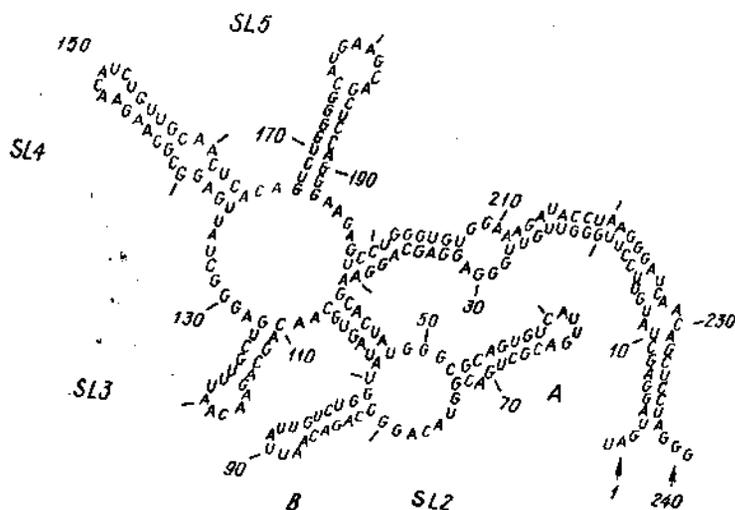


Рис. 3. Предсказанная вторичная структура RRE ВИЧ-1 (изолят SF-2). Нуклеотиды от 1 до 240 отвечают нуклеотидам от 7770 до 8009 provirusной последовательности ВИЧ-1 изолята SF-2. SL (Stem-Loop structure) — субэлементы структурированной РНК; В и А — части SL2.

в 4—5 раз, тогда как количество несплайсированных мРНК — в 25—30 раз и во столько же — продукция вирионов в клетках. При этом уровень множественно сплайсированных (не имеющих интронов) РНК увеличивался всего в 2—3 раза. При нормализации количества ВИЧ-транскриптов разных классов в клетке оказалось, что на одну копию несплайсированной мРНК ВИЧ в неактивированной клетке приходится 18 копий сплайсированных по первой ступени и по 9 копий двухкратно сплайсированных молекул. При химической индукции клеток извне цифры становятся соответственно 25, 36 и 24. Таким образом, налицо действие *Rev* на несплайсированные РНК (усиление транспорта в цитоплазму или защита от сплайсинга), как и эффект порогового уровня *Rev* в клетке, так как многократное усиление его стабилизирующей роли превосходит трехкратное увеличение копий *Rev*-специфических мРНК.

Действие *Rev* специфично в отношении мРНК ВИЧ за счет консервативности RRE. Этот чрезвычайно структурированный район РНК консервативен среди всех изолятов ВИЧ-1 [52—54], ВИЧ-2, а также SIV (рис. 3). Более того, гомологичные белки группы вирусов HTLV (*Rev*-регуляторы), как и белки-регуляторы SIV и ВИЧ-2 [44], узнают RRE ВИЧ-1, и такие гетерологичные системы отчасти функциональны [25, 45, 55, 56]. Однако здесь и далее следует подчеркнуть, что *cis*-элементы (RRE-X) в мРНК эволюционно близких BLV или HTLV смещены в правый конец вирусного генома в района 3'-LTR и не принадлежат кодирующим участкам или интронам, как в случае ВИЧ.

Таким образом, *Rev* не влияет на экспрессию или сплайсинг клеточных мРНК. Учитывая неполное соответствие нуклеотидных после-

довательностей RRE и аминокислотных последовательностей *Rev* между группами ВИЧ-1, ВИЧ-2, BLV, HTLV и SIV, но в то же время возможность функционирования гетерологичных систем (*Rex — Rev* или *Rev — RxE*), предполагалось, что RRE узнается на уровне вторичной структуры РНК [57]. В дальнейших исследованиях структуры RRE в его полноразмерной последовательности (длина свыше 240 нуклеотидов) был вычленен более короткий структурированный участок РНК (88 оснований) с очень высокой аффинностью к *Rev*, функционально активный *in vivo* [58, 59]. Две тандемные копии этого укороченного RRE в составе мРНК функционировали как полноразмерный элемент. Детерминирован минимальный сайт RRE размером в несколько нуклеотидов, узнаваемый *Rev* на уровне первичных последовательностей РНК *in vitro* [60—62]. Он представляет собой неспаренный участок («выпячивание») — дисторсию — по ходу двухспиральной структуры РНК с парами оснований G—G и G—A [63]. Атомные группы аминокислотных остатков *Rev* узнают рибозный остов и основания внутри главного расширенного желобка двойной спирали. Замена нуклеотидов в этом сайте более существенно сказывается на функции RRE, чем мутации в других районах структурированной РНК.

RRE расположен в пределах интрона мРНК ВИЧ, а знание роли *Rev* для лентивирусов обнаруживает его причастность к процессам сплайсинга и транспорта их транскриптов. Взаимодействие факторов сплайсинга с транскриптами не приводит к мгновенному высвобождению зрелых мРНК, и такие промежуточные продукты удерживаются в ядре в виде детектируемых сплайсом. Опыты по внедрению RRE в гетерологичные гены с последующей их трансфекцией в клетки выявили явное блокирование их экспрессии в цитоплазме и задержку в ядре. То есть RRE может нести в себе элементы, отвечающие за блок транспорта мРНК в цитоплазму. RRE использован рядом авторов в создании генноинженерных конструкций для экспрессии генетической информации под контролем белка *Rev* как вирусного продукта (патентные разработки анти-ВИЧ генотерапии). Это позволило авторам реализовать принцип обратной связи при экспрессии рекомбинантных генов (гены иммуноцитотоксинов и дифтерийного токсина, «помогающие» иммунной системе узнавать пораженные вирусом Т-клетки и бороться с инфекцией в инфицированной клетке) с уровнем вирусных продуктов в этой клетке.

В пределах геномных транскриптов ВИЧ известно, по крайней мере, три участка, критически влияющих на их транспорт из ядра в цитоплазму в несплайсированном виде. Участки расположены в границах интрона +5600 ... +7900. Это два негативных элемента, определяющих удерживание мРНК в ядре (+5700 ... +7330 и +7740 ... +7920), и позитивный (RRE, +7330 ... +7700) (номера нуклеотидов соответствуют ДНК целого провируса клона HXB2). После удаления этих элементов в составе интронов в ходе сплайсинга мРНК легко транспортируется в цитоплазму без участия *Rev*. Но механизм действия *Rev*, похоже, не определяется сигналами сплайсинга и осуществляется параллельно самому процессу сплайсирования. В одних случаях удаление 5'-сигнала сплайсинга вместе с акцепторным нуклеотидом не влияло на функционирование комплекса *Rev — RRE*. Известно, что предсплайсинговый комплекс формируется и в отсутствие 5'-сайта за счет связывания с 3'-сайтом в области донора. Такой транскрипт не может быть сплайсирован. Поэтому следовало ожидать для мРНК ВИЧ, содержащей указанные интроны и не имеющей акцептора, удерживания в ядре. *Rev* за счет RRE высвобождал такие мРНК из блока в ядре и способствовал их транспорту в цитоплазму и экспрессии. В других же случаях отсутствие 5'-сайта влияло на функцию *Rev* [64]. Есть сообщения об узнавании 3'-сайта сплайсинга белком *Rev* [65, 66].

Установлено также, что регулятор *Rev* косвенно продлевает период жизни несплайсированных мРНК ВИЧ в ядре независимо от наличия сайтов сплайсинга (это имеет место и в случае BLV).

Но, с другой стороны, возникает вопрос, не являются ли негативные элементы в интронах сайтами для сплайсомных белков (эти элементы расположены близко к сайтам сплайсинга). Кинетика сплайсинга не слишком высока, и сам его процесс может определять долю такого блока экспрессии вирусных мРНК. А «сброс» транскриптов в цитоплазму в обход сплайсинга при посредстве *Rev*, возможно, обеспечивает их стабильность и способствует экспрессии структурных белков.

Есть сообщения о влиянии *Rev* на трансляцию RRE-содержащих мРНК (мессенджеров для белков *Vif*, *Vpr*, *Env/Vpu*) [22]. В работе [22] получены данные, отличающиеся от предыдущих по регуляторной роли *Rev*. В отличие от традиционно использованных ранее субгеномных конструкций авторы исследовали экспрессию перечисленных RRE-содержащих мРНК на целом недефектном клоне ВИЧ в лимфоидных клетках. От *Rev* зависело цитоплазматическое накопление несплайсированной РНК, но он почти не влиял на однократно сплайсированные РНК. Однако *Vif*, *Vpr*, *Env/Vpu* не транслировались в отсутствие *Rev* в цитоплазме и не формировали полисом. Так или иначе, экспрессия геномной и субгеномной РНК ВИЧ блокировалась без *Rev*. Если не учитывать второстепенной регуляторной роли *Rev* на уровне трансляции, противоречивым кажется отсутствие его влияния на мРНК, сплайсированные по первой ступени и содержащие интрон с RRE. Подобные свойства этого регуляторного белка установлены для BLV. Здесь отсутствие функционального *Rev* не нарушало синтеза полипротеинов *Env* этого вируса, транслируемых с однократно сплайсированного транскрипта, однако при этом снижался синтез антигенов *gag*, транслируемых с геномного полноразмерного транскрипта. Но у BLV и вирусов группы HTLV *cis*-элемент лежит в U3/R-области 3'-LTR транскриптов и не принадлежит интронам. Перечисленные факты свидетельствуют больше в пользу экранирующе-транспортной роли *Rev*-регулятора. Это же подтверждают наиболее поздние исследования структурных особенностей *rev* — RRE-комплекса. *Rev* функционирует в виде димера или мультимера — более сложной четвертичной структуры, взаимодействуя в такой форме с клеточными белками [67]. Сolidным антагонистом-репрессором функции дикого *Rev* является *Rev*-белок с поврежденным *Rev* Activation Domain, отвечающим за узнавание клеточных белков, но способный к мультимеризации в присутствии RRE, что косвенно указывает на взаимодействие мультимера с белками клетки. Такие функции *Rev*, как связывание с RRE и мультимеризация, можно разграничить для разных структурных участков аминокислотной последовательности регулятора. Хотя присущие ему свойства усиливаются в присутствии RRE [68]. Мультимер белка связывается с центральными петлями RRE и его флангами и формирует протяженные филаменты нуклеопротеина, что, вероятно, определяет недоступность транскрипта сплайсомам и влияет на его прохождение через поры ядра [61]. Считается, что мультимеризация *Rev* факультативна, хотя *Rev*-мономер менее активен [46]. Учитывая здесь «пороговый» эффект количества регулятора в клетке для его воздействия, а также молярное соотношение *Rev*/RRE, большее единицы в высокоаффинном комплексе, можно предположить кооперативное связывание глобул *Rev* на RRE (т. е. вторая молекула белка усиливает прочность комплекса). Возможно, *Rev* не способен прямо влиять на факторы сплайсинга, но для формирования им нуклеосом с RRE-содержащими транскриптами важна их протяженность и месторасположение его *cis*-сайта в их пределах.

Наряду с указанной ролью акцептора и 5'-сайта второй главной ступени сплайсинга РНК ВИЧ показана роль малых ядерных РНК в работе комплекса *Rev* — RRE, в частности U1 мРНК, принимающих участие в сплайсинге [69]. Следовательно, хотя прямое влияние *Rev* на сплайсинг не доказано, очевидно некоторая функциональная близость этого процесса и механизма действия *Rev* и то, что он сосредоточивает мРНК на себе в виде нуклеосом и, таким образом, делает транскрипты недоступными факторам сплайсинга.

Связывание белков ядерного экстракта лимфоцитов на колонке с пришитым *Rev* (*Rev*-аффинность) показало специфическое взаимодействие только с фактором В23, который способствует транспорту рибосомных белков в ядро. В присутствии RRE стабильный комплекс В23 — *Rev* диссоциирует с образованием комплекса RRE — *Rev* [70]. Для других белков ядра высокоаффинного сродства к *Rev* пока не обнаружено.

Была также проведена работа по поиску белков из экспрессирующей библиотеки кДНК человека, специфически связывающихся с RRE. Выявили продукт массой 27 000. Этот белок эффективно связывался с RRE и интерферировал с *Rev*, ингибируя репликацию ВИЧ-1 в клетках [71]. Оказалось также, что ген этого белка индуцируется интерферонами альфа и гамма, ингибирующими экспрессию ВИЧ-1. Это открытие обнаружило один из возможных механизмов антивирусной активности указанных интерферонов.

Ген *rev*, являясь для ВИЧ жизненно важным и наиболее существенным наряду с *Tat* (регулятором репродукции вируса), служил объектом пристального внимания молекулярно-генетических лабораторий, изучавших в последнее десятилетие ВИЧ-1. К настоящему времени очевидно представляется механизм взаимодействия *Rev* с его *cys*-сайтом RRE, как и его роль в судьбе транскриптов лентивирусов. Но роль клеточных факторов в этом взаимодействии остается гипотетичной (возможно, по причине недостаточности сведений о системах сплайсинга и транспорта РНК в клетках).

Поскольку *Rev* препятствует сплайсингу мРНК, он косвенно репрессировать экспрессию самого себя, а также *Tat* и *Nef*.

Матрица *Rev* сложная и состоит из трех экзонов, а рамка трансляции перекрывает два экзона (рис. 1). Оба кодирующих экзона абсолютно необходимы для функционального *Rev*. Матрицы для регуляторных белков *Tat* и *Rev* различаются. Сайт Козак рамки трансляции *Tat* имеет больший инициаторно-трансляционный потенциал, чем таковой у рамки *Rev* [72, 73], и при наличии стартового кодона *Tat* выше рамки *Rev* в мРНК преимущественно транслируется *Tat*. Это соответствует теории сканирования рибосомой полицистронной мРНК, и с *Tat*-специфической мРНК белки *Rev* и *Nef* транслируются весьма слабо (хотя указанная мРНК полицистронна). Среди множества сплайсированных вирусных мРНК матрицы *Rev* представляют не более 20%. Удельное количество матриц *Rev* в индуцированных лимфоцитах, активно продуцирующих вирус, не превышает 6% всех вирусных транскриптов в клетке [4].

Ген *tat* критически (как и *rev*) необходим в геноме ВИЧ и других лентивирусов для их репликации. Рамка трансляции белка *Tat* лежит в пределах тех же двух экзонов, что и рамка *Rev*, и перекрывается с ней со сдвигом (рис. 1). *Tat* является ранним белком всех лентивирусов. В зависимости от изолята ВИЧ-1 длина белка варьирует от 86 до 101 аминокислоты, а масса соответственно — от 14 000 до 18 000 [74, 75]. Ген *tat* получил название от *Viral* Transcription Activator и является активатором промотора LTR ВИЧ.

Tat — металлофосфопротейн, но его фосфорилирование не обязательно и не влияет критически на трансактивацию [76]. Фосфорилирование гомологичных белков у других лентивирусов иммунодефицитов человека и животных имеет относительное значение для их функций. Консервативный участок белка, включающий с 37-го по 48-й аминокислотный остаток, считается металл-связывающим [77] и специфически взаимодействует с цинком. Этот участок вместе с предыдущим *Cys*-богатым мотивом (с 22-го по 37-й аминокислотный остаток) отвечает за связывание *Tat* с клеточными факторами и определен, как *Tat* Activation Domain. Другой консервативный участок белка от 49-го до 57-го аминокислотного остатка отвечает за его транспорт в ядро и ядрышковую локализацию (*Tat* в основном локализован в ядрышке) [77, 78]. Кроме того, этот пептид способен слабо активировать транскрипцию.

В экспериментах по мутагенезу обнаружено, что первые 58 аминокислот могут в определенной мере трансаktivировать LTR-направленную транскрипцию [74]. Пептид, соответствующий аминокислотным остаткам 58—72 (5'-конец первого кодирующего *Tat* экзона), высококонсервативен среди всех изолятов ВИЧ и значительно усиливает транскрипцию с LTR-промотора ВИЧ [79, 80].

Мутации в районе остатков 22—37 формируют негативно-доминантный фенотип белка *Tat*, конкурирующий как репрессор с диким функциональным трансаktivатором ВИЧ и подавляющий активацию транскрипции *in trans*. Мутации в других доменах *tat* приводят к появлению неактивного белка с рецессивным фенотипом.

Клоны ВИЧ, утратившие *tat*, характеризуются низким уровнем транскрипции, цитопатичности и экспрессии антигенов. При слабодетектируемых иммунологически уровнях синтеза *Gag* и *Env* продукция вирионов практически не обнаруживается, за исключением некоторых высокопермиссивных культур клеток. Провирус такого дефектного клона не дает инфекционных вирионов [25, 81].

Мишень, через которую трансаktivатор ВИЧ-1 влияет на транскрипцию, представляет собой структурированный участок РНК непосредственно на 5'-конце всех его транскриптов (от сайта кэпирования мРНК до нуклео-

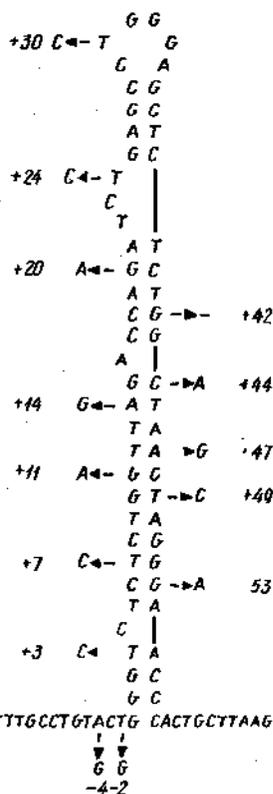


Рис. 4. Структура элемента TAR ВИЧ-транскриптов. Начало нумерации нуклеотидов соответствует сайту кэпирования мРНК (старт транскрипции). Стрелочки указаны возможные вариации консервативной последовательности TAR (более или менее модулирующие уровень трансаktivации) среди преобладающих изолятов ВИЧ-1. Функционально важные трехнуклеотидное «выпячивание» и петля шпильки, а также расстояние между ними

тида +58), названный Trans Activator Response element (TAR). Минимальный TAR расположен между нуклеотидами +18 ... +44 по отношению к старту транскрипции (рис. 4) и соответствует верхней части шпильки +1 ... +60. TAR выступает в роли энхансера и это единственный известный случай РНК-энхансера транскрипции. Трансаktivирующее действие *Tat*, таким образом, необычно [74, 82—86].

Tat и производные от него пептиды высокоаффинны к TAR [87], но до сих пор точно не установлено, что является пререквизитным для его функции — связывание с TAR или же предварительное узнавание *Tat* клеточными факторами перед связыванием с 5'-концом вновь синтезирующейся РНК ВИЧ в момент формирования шпильки TAR. Само же участие ядерных факторов в трансаktivации LTR-направляемой транскрипции через TAR показано достаточно [86, 87]. В структуре TAR РНК (рис. 4) чрезвычайно важны трехнуклеотидное «выпячивание» в шпильке и шестинуклеотидная петля. Белок *Tat* связывается с двухспиральной частью шпильки и «выпячиванием», узнавая последнее своим аргининовым остатком по типу «аргининовой вилки» [82, 88—91]. Взаимодействие с клеточными факторами, усиливающими трансаktivацию, осуществляется непосредственно через петлю шпильки. Оба эти события абсолютно необходимы для трансаktivации транскрипции, как

и взаимодействие *Tat* с его клеточными факторами — ядерными белками. Белок-нуклеиновое узнавание *Tat* — *TAR* достаточно изучено на различных структурных уровнях, включая попытки электронной микроскопии комплекса. Роль каждого нуклеотида в *TAR*-элементе рассмотрена на уровне активности всего LTR провируса и представлена в цифрах относительной трансактивации. Опуская подробное и емкое изложение структурных особенностей такого узнавания, отметим главный результат работы *Tat* — *TAR*-системы — критическое усиление транскрипции с ВИЧ-промотора в сотни и тысячи раз в сравнении с неактивированным LTR в отсутствие *Tat* [38, 83, 84, 92, 93]. При экзогенном введении *Tat* в клетки, несущие маркерный ген под контролем LTR ВИЧ, экспрессия возрастала более чем в 30 000 раз (при насыщении) [94].

До сих пор нет четких доказательств посттранскрипционного влияния *Tat* на мРНК ВИЧ. Практически все эксперименты, подтверждающие такое влияние *Tat* на трансляцию, проведены на ооцитах *Xenopus laevis*, где условия отличны от таковых в ядре пермиссибельных для ВИЧ клеток [95—97]. Ряд последних работ, проведенных с клетками HeLa, COS и др., опровергают посттранскрипционное влияние *Tat* [98]. Достоверно установлено только то, что присутствие *TAR*-элемента в мРНК между CAP-сайтом и инициаторным кодоном снижает трансляцию нижележащей открытой рамки считывания в 2—3 раза в клетках человека за счет мощной вторичной структуры (или других факторов, более или менее специфически узнающих эту структуру).

Таким образом, несмотря на обнаруженные факты существенного влияния *Tat* на трансляцию *TAR*⁺ РНК в ооцитах *Xenopus*, в клетках человека такого посттранскрипционного влияния не выявлено. Очевидно, ооциты представляют собой уникальную систему трансляции, не воспроизводимую в других эукариотических клетках. Но все же предполагаемые решения этого вопроса остаются противоречивыми.

Промотор ВИЧ имеет сравнительно низкий базальный уровень транскрипции полноразмерных мРНК в отсутствие белка-энхансера, и его можно в целом охарактеризовать как слабый TATA-инициатор транскрипции. Кроме того, выше промотора в LTR расположена протяженная и сложная по структуре генетических сигналов область NRE — Negative Regulation Elements (рис. 2). Эта область содержит мотивы в виде последовательностей ДНК, узнаваемых многими ядерными факторами-репрессорами, а также двумя активаторами транскрипции. Главный энхансер вируса способен усиливать экспрессию его генов до трех раз на фоне действия трансактиватора и на порядок — в его отсутствие. Чрезвычайно сложная структура LTR ставит экспрессию вирусных генов в значительную зависимость от условий (регуляторных факторов) клетки-хозяина. Последнее означает конкуренцию факторов за близкорасположенные сайты узнавания в LTR ВИЧ и интерференцию между собой. Такое строение генома вируса делает его уязвимым при отсутствии мощного трансактиватора, с одной стороны, но обуславливает высокочувствительное триггерное состояние его латентности в клетке при наличии гена *Tat* — с другой.

На основании большого количества работ по изучению влияния *Tat* на LTR-транскрипцию его действие представляется двояким и сводится к усилению инициации транскрипции, а также ее процессивности. Некоторые исследователи указывают на то, что *Tat* влияет только на элонгацию транскрипции [92]. Действительно, уровень инициации транскрипции с LTR-промотора ВИЧ достаточно высок и в отсутствие *Tat*, но элонгация транскрипции в этом случае не дает продуктов длиннее (обнаружено в экспериментах) 60 нуклеотидов. Такие короткие транскрипты присутствуют в инфицированной клетке в значительном количестве в отсутствие *Tat*. При экспрессии *Tat* короткие транскрипты почти исчезают, и в клетке критически возрастает синтез полноразмерных полиаденилированных мРНК ВИЧ [99]. С другой стороны, функция *Tat* вряд ли сводится к антитерминации транскрипции, поскольку не

обнаружено терминаторов в пределах R-области LTR, а клонирование этой области в другие гетерологичные транскрипционные единицы не влияло существенно на экспрессию генов независимо от *Tat* [83, 100]. Кроме того, *Tat* на фоне активации процессивной транскрипции увеличивает копияность лидерной (TAR) последовательности в клетке (иначе, уровень копий 5'-концевой 20-нуклеотидной последовательности в составе всех вирусных транскриптов в трансактивированной клетке выше такового в отсутствие *Tat*). Считают, что в действительности LTR ВИЧ при отсутствии *Tat* не может активно формировать транскрипционные комплексы по типу РНК-полимераза II, способных эффективно элонгировать транскрипцию [101]. А детектируемые короткие транскрипты могут представлять собой остатки более длинных, случайно терминированных транскриптов, стабилизированные вторичной структурой (шпилькой TAR) этого участка транскрипта и/или ядерными белковыми факторами, взаимодействующими с ней (например, протенинкиназой, зависящей от двунитчатых РНК и активируемой некоторыми интерферонами [102]).

Что касается элемента TAR, то он не похож ни на аттенуатор (как отмечено выше, его присутствие в других транскрипционных единицах не блокировало ощутимо экспрессию генов [101]), ни на энхансер, так как его действие строго определено ориентацией и критически зависит от расположения относительно промотора (при изменении оптимального расстояния от TAR до TATA трансактивация резко снижается) [84]. Долгое время существовала дилемма, является TAR-структурой РНК или ДНК? Большинство работ убедительно подтверждает функциональность TAR-РНК [103]. Связывание транскрипционных факторов клетки с LTR провируса (ДНК) и трансактивация *Tat* — независимые события. Сама структура TAR функционирует как вновь образованная (nascent) РНК, а на зрелые TAR-содержащие транскрипты (через отдельные TAR-РНК) *Tat* не оказывает влияния [74, 94]. В работе [104] была собрана уникальная конструкция — гибридный белок *Tat/Rev*, содержащий последовательность первого (трансактивирующего) экзона *Tat* и RRE-связывающий домен *Rev*. В транскрипционную единицу с маркерным геном под контролем LTR ВИЧ-1 на место удаленного TAR клонировали RRE. Такая транскрипционная единица отвечала активацией транскрипции в ответ на экспрессию гибридного *Tat/Rev*. Аналогичная конструкция с другим белком, узнающим свою специфическую РНК, также трансактивировала гибридный промотор при наличии *cis*-элемента на месте TAR [105]. Это также подтверждает то, что TAR для *Tat* выступает фактором локации, местом связывания трансактиватора для его функционирования *in situ*. Позже были собраны аналогичные функциональные конструкции [106] с другими лоцирующими элементами, представляющими собой, как и в предыдущем случае, домены в составе *Tat*-гибридного белка, узнающие *cis*-сайты выше промотора. При наличии таких элементов в гибридном промоторе (выше TATA) и отсутствии TAR гибридные белки трансактивировали транскрипцию в пределах того же порядка, что и нативная *Tat* — TAR-система. То есть TAR может замещаться как РНК-элементами ниже промотора, так и ДНК-сигналами выше промотора. А если специфический лоцирующий элемент TAR заместим, то клеточные факторы, взаимодействующие с ним, могут влиять только на его связывание с трансактиватором, модулируя аффинность комплекса. Следовательно, TAR-узнающие белковые факторы клетки выступают для промотора вируса в роли медиаторов регуляторных изменений в клетке, а участие их в работе комплекса элонгации маловероятно. Стадия узнавания TAR трансактиватором в этом случае может быть условнолимитирующей [107]. Исходя из этого принято считать клеточный белок TRBR (*Tat* Response Binding Protein), или TRP-185, усиливающий трансактивацию, ранним клеточным регулятором экспрессии ВИЧ-1. Для него установлен первичная структура, картирован его ген в пределах 12-й хромосомы человека, а также показано влияние клеточных

кофакторов и *Tat* на его взаимодействие с TAR [108]. В свою очередь, влияние фосфокиназ лимитирует роль кофакторов TRBR [107]. Так сложно выглядит один из «векторов» клеточных воздействий на функцию *Tat* и провирус в целом.

Показано также, что TAR способен функционировать с различными промоторами РНК-полимеразы II, в том числе не содержащими ТАТА-инициатора [109]. В комплексе с промоторами других полимераз TAR не функционирует.

Что касается элементов промотора, через которые *Tat* влияет на транскрипцию, то ряд авторов определяет в своих работах минимальный *Tat*-индуцибельный промотор как ТАТА-инициатор в комплексе с TAR в пределах $-40 \dots +60$ LTR ВИЧ-1 [110]. Но величины трансаактивации у такой транскрипционной единицы при индукции *Tat* были ниже на порядки, а в роли ТАТА-бокса выступал участок гетерологичного промотора. Так что результат можно трактовать как экстраполяцию. Другие авторитетные работы отрицают *Tat*-индуцибельность такого минимального промотора, несмотря на наличие полноценного TAR [111]. Эти исследования роли ТАТА-инициатора и энхансера ВИЧ в индукции транскрипции *Tat* показали, что для эффективной работы TAR — *Tat*-системы необходимо еще присутствие в транскрипционной единице хотя бы одного из элементов базальных факторов инициации транскрипции (таких как Sp1, AP1, Oct) или мотива энхансера (в том числе гетерологичного). При наличии энхансера ВИЧ-1 NF-карра-β уровни трансаактивации выше, чем в присутствии его элементов Sp1.

Не менее важной зависимостью, установленной в подобных исследованиях [112], является то, что небольшие модификации в ТАТА-мотиве, не влияющие на связывание ТАТА-binding protein (фактор транскрипции TFIID) и не изменяющие существенно уровень базальной транскрипции, значительно воздействовали на масштабы *Tat*-трансаактивации. Поскольку ТАТА-мотив и его фланги (элементы факторов) определяют состав комплекса инициации — элонгации транскрипции, то установленная зависимость утверждает связь между составом этого комплекса и функцией *Tat*. Обращает на себя внимание и «заинтересованность» *Tat* в энхансере NF-карра-β, который также влияет на состав комплекса инициации транскрипции. Промотор ВИЧ содержит две копии этого энхансерного элемента, узнающегося факторами Rel-типа (содержащими ДНК-связывающую Rel-субъединицу в составе энхансерного комплекса). В свою очередь, ВИЧ способен индуцировать экспрессию фактора NF-карра-β в некоторых клетках [113]. От наличия (уровня) этого фактора, а также уровня его активированности (фосфорилирование) в клетке зависит субъединичный состав энхансерного комплекса (и его активности). Похоже, что вирус при определенных условиях посредством факторов клетки индуцирует непрерывность активации собственного промотора-энхансера. Но для культуры лимфоидных клеток установлено, что трансаактивация LTR-направляемой транскрипции рекомбинантных последовательностей, наблюдаемая в первые часы после трансформации клеток геном *tat* в виде высокого пика, затем существенно снижается до порядков латентного состояния провируса в неактивированных клетках [114]. В случае трансформации клеток провирусной ДНК (трансфекция) также отмечено уменьшение трансаактивации рекомбинантной конструкции с LTR ВИЧ в те же часы после инфекции. Причем это не было связано со снижением уровня *Tat*-кодирующей мРНК. Таким образом, в клетке есть механизм обратной связи, регулирующий активность кофакторов *Tat* и, следовательно, LTR ВИЧ-1 через регуляторную цепь (каскад факторов), включающую вирусный трансаактиватор. Поскольку в работе [114] использовали LTR-промотор ВИЧ с делецией всех ДНК-сигналов выше энхансера (NF-карра-β-элемент), мы полагаем, что именно клеточный ген субъединицы фактора NF-карра-β занимает ключевое место в упомянутой регуляторной цепи и в значительной мере определяет латентный

период внутриклеточного цикла ВИЧ. Общеизвестным фактом для ВИЧ-инфекции лимфоцитов является то, что их активация антигенами (неспецифические или специфические инфекции ВИЧ-инфицированного организма) вызывает резкое усиление репродукции ВИЧ и нарушение латентности персистентной инфекции. Эта активация — следствие иммунного ответа клеток, который опосредуется NF-карра- β -фактором. Но поскольку энхансер заместим для функции *Tat*, молекулярный механизм его влияния на трансактивацию неясен.

Установлена необычная способность элемента LTR ВИЧ направлять синтез коротких транскриптов [109]. Этот элемент назван Inducor of Short Transcripts (IST). Неизвестно, каким образом функционирует IST, как РНК или ДНК, но установлено, что он является не только промотирующим, но и усиливающим элементом для нестабильных низкопроцессивных транскрипционных комплексов. Иначе говоря, его активность как бы накладывается на активность промотора (ВИЧ или гетерологического). IST расположен между нуклеотидами $-5 \dots +82$ относительно старта транскрипции и перекрывается с TAR. Но мутации, нарушающие функциональность TAR, не влияют на активность IST, следовательно, это разные структуры. Делетирование всего TAR снижало базальный уровень транскрипции LTR и прекращало синтез коротких транскриптов. Вероятнее всего, действие IST накладывается на конститутивную активность LTR-промотора до тех пор, пока в его работу не включится *Tat*. Поскольку при этом резко снижается синтез коротких РНК, можно предположить, что транскрипционный комплекс, сформированный при участии IST, стабилизируется или модифицируется действием *Tat*. Тогда короткие транскрипты как бы опосредуют (лоцируют) трансактивацию и затем утилизируются как старт для стабильной элонгации транскрипции модифицированным комплексом. Однако, скорее всего, сам *Tat* не влияет на слабые низкопроцессивные транскрипционные комплексы, а обуславливает формирование в области ТАТА стабильных полимеразных комплексов по типу РНК-полимераз II. В этом случае короткие транскрипты могут играть роль активаторов промотора в присутствии *Tat* в виде «nascent» РНК и/или регуляторов промотора при низком уровне *Tat* в клетке (несколькими авторами показано, что избыток TAR-транскриптов отвлекает на себя *Tat* и блокируют трансактивацию в клетке [114, 115]). Такой механизм функционирования *Tat* — TAR-системы наиболее вероятен, хотя не исключена гипотеза о том, что ее влияние осуществляется на уже преформированном транскрипционном комплексе при прохождении им области $+59$, и в этом случае *Tat* работает как ген-специфический фактор элонгации [93].

Так или иначе, положительная роль коротких транскриптов (в частности, IST) показана. Интересно, что TAR в клетке существует, в основном, в виде нуклеопротеиновых частиц — комплексов с *Tat*. Число таких комплексов составляет около 10^4 на клетку [116]. То есть мРНК ВИЧ остается *Tat*-ассоциированной при транспорте в цитоплазму и формировании полисом. Период жизни мРНК в комплексах длиннее, чем у свободных транскриптов. Это может обуславливать наблюдаемые на уровне клетки эффекты посттранскрипционного потенцирования экспрессии генов вируса и повышенной утилизации его транскриптов при наличии *Tat*.

Ключевым направлением активного изучения молекулярных механизмов влияния *Tat* является поиск молекул, подвергающихся его воздействию в клетке. Уже обнаружено и изучено влияние трех таких белков, специфически аффинных к *Tat*. Первый белок, выделенный на *Tat*-аффинной колонке, потенцировал трансактивацию ВИЧ-LTR в клетках мышей [117]. Второй (TRP-1) изолировали из экспрессирующей библиотеки ДНК человека. Установлено, что он подавляет трансактивацию [118]. Третий, полученный как кДНК человека и названный MSS1, имеет 42 % аминокислотной гомологии с TRP-1 и потенцирует действие *Tat* на репортерную конструкцию с ВИЧ-промотором [119].

Поскольку не все среди открытых аффлекторов *Tat* (и TAR-узнающих кофакторов) достаточно изучены на генетическом уровне, трудно составить общую для них картину, основываясь на их функциональных свойствах.

Чрезвычайно важным моментом в понимании выработанного эволюцией ВИЧ механизма трансактивации своих генов является определение стадии транскрипции, на которой *Tat* воздействует на транскрипционный комплекс. Суммируя известные результаты, мы пришли к выводу, что, вероятнее всего, это — стадия сборки комплекса инициации — элонгации и/или инициация транскрипции. Это подтверждается большим количеством работ по изучению функции *Tat* и результатов его влияния на транскрипцию LTR ВИЧ, а также косвенно — рядом исследований свойств гибридных и гетерологичных систем, «нацеливающих» *Tat* на всевозможные транскрипционные единицы и репортерные конструкции с TAR и без него [110, 120—122] в ВИЧ-пермиссивных и непермиссивных клетках.

Очевидно, что механизм влияния *Tat* на транскрипционный комплекс реализуется через универсальную функцию (компонент) последнего и не устанавливает специфического альтернативного пути индукции промотора-эхансера. По эффекту активирующего влияния на транскрипцию *Tat* похож на базальные факторы инициации транскрипции (Transcription Factors Inducing Initiating) TFIIIF и TFIIЕ (известные транскрипционные факторы классифицированы в ряд А, В, С, D, E, F, H, J, S, ...). Фактор TFIIIF необходим в транскрипционном комплексе для эффективного функционирования *Tat* и (в случае избытка TFIIIF в клетке) он активирует элонгацию транскрипции с ВИЧ-промотора в отсутствие трансактиватора [123]. Так как этот фактор мобилизует мРНК-полимеразу в преиницирующий комплекс и является лимитирующим для *Tat*, похоже, что последний может действовать на факторы элонгации, связывающиеся с комплексом после TFIIIF и полимеразы (такие как E, H, J, S), или замещать их. Среди таких факторов есть протеинкиназы и от *Tat* может зависеть химическая модификация элементов комплекса элонгации.

Для *Tat* и некоторых других трансактиваторов родственных ретровирусов HTLV-группы установлены протоонкогенные свойства и трансформирующее действие на клетки [124]. В целом ВИЧ не следует рассматривать как онкогенный, хотя его трансактиватор на продуктивной стадии вирусного цикла может существенно влиять на синтез некоторых цитокинов (иммунокинов) в определенных типах лимфоцитов. Так, для *Tat* обнаружена способность усиливать синтез Tumor Necrosis Factor Beta (TNF-β), возможно, интерлейкинов 1 и 6 [125]. Таким образом, *Tat* может модулировать активность иммунных клеток. Активируя синтез TNF-β в В-лимфоцитах и их предшественниках, ВИЧ ингибирует их антиген-индуцированную пролиферацию в периферической крови. Вместе с тем, этот цитокин (лимфотоксин) является фактором роста для некоторых недифференцированных клеток (клетки саркомы Капоши), и ВИЧ-инфекция может усиливать возникшие неоплазии [126]. Установлено также, что *Tat* увеличивает синтез Transforming Growth Factor β-1 (TGF-β1) первичными макрофагами костного мозга, что также подавляет гемопоэз [127].

Tat способен репрессировать в клетках ген главного комплекса гистосовместимости (МНС) на уровне транскрипции [128]. При снижении количества молекул МНС 1 на поверхности лимфоцита он становится менее уязвимым для цитолиза цитотоксическими Т-клетками и, таким образом, вирус «скрывает» себя от клеточного иммунитета.

В крови ВИЧ-носителей на определенной стадии обнаруживаются антитела к *Tat*. Внеклеточному трансактиватору приписывают свойства экзогенного трансформирующего агента (показан транспорт *Tat* в клетки и их ядра [124, 129]). В экспериментах с культурами клеток *Tat* из культуральной среды, куда он экскретировался клетками *Tat*-трансформантами, утилизировался другими клетками, не имеющими гена

tat. Последние несли в себе *Tat*-индуцибельную репортерную конструкцию, которая активировалась таким экзогенным *Tat* [130]. Это подтверждает возможность патофизиологических влияний ВИЧ-инфицированных лимфоцитов на соседние в субпопуляции (например, в плотно-локализованной популяции в строме лимфоидных органов).

Рядом работ подчеркивается влияние TAR *per se* на функционирование интерферон-опосредованной системы защиты клетки от вирусных РНК (Double-Strand-RNA-Activated Inhibitor of Translation). Часть авторов указывает на структуру TAR-РНК как мишень для этой защитной системы клетки. Другие исследования утверждают ингибирующий эффект TAR на синтез интерферонов [102]. TAR является непротяженной и несовершенной двухспиральной структурой РНК, малопредставленной в клетке в свободном виде. В работах по длительной суперэкспрессии TAR и анти-TAR РНК в культуре лимфоцитов метаболизм клеток не изменялся [114, 115]. Тем не менее, в ВИЧ-инфицированных лимфоцитах отмечается падение синтеза интерферонов, снижение уровня Double-Strand-RNA-Activated Inhibitor, а также незначительно повышается экспрессия 2'—5'-олигонуклеотид-синтазы в ответ на введение извне интерферона. (Хотя репликация ВИЧ ингибируется интерферонами, особенно γ -интерфероном.) Механизм разрушения интерферон-зависимой защиты вирусом здесь выглядит более сложным и, возможно, включает TAR.

Экспрессия и накопление *Tat* в остроинфицированной клетке, так же как и при хронической латентной инфекции, имеют ключевое значение для эффективной экспрессии всего вирусного генома и наступления активной продуктивной фазы его клеточного цикла. Очевидно, что накопление и влияние *Tat* должны предшествовать действию *Rev*, вслед за которым происходит переключение на синтез поздних структурных белков. Без достаточной степени трансактивации транскрипции *Rev* не функционирует эффективно, так как его накопление в ядре не достигает порогового уровня. Принимая во внимание сведения о свойствах *Tat*, можно сделать вывод о том, что именно этот вирусный продукт индуцирует такие изменения в инфицированной клетке, которые утверждают «права» его генома на инициацию цикла развития по пути латентной персистенции или репродукции [131].

Интересно, что почти все группы ретровирусов человека, в том числе близкородственные (HTLV), имеют трансактиваторы с высокой аминокислотной гомологией с *Tat*, но не имеют структуры, аналогичной TAR. Трансактивация у них осуществляется через ядерные белки, а сами они непосредственно с LTR не взаимодействуют. Криптический *cis*-элемент для этих регуляторов также расположен в пределах U3-области LTR вблизи старта транскрипции [132]. Эти гетерологичные трансактиваторы связываются с TAR, но не способны трансактивировать LTR ВИЧ-1. Возможно, из-за отсутствия элементов РНК-локации у этих гомологичных трансактиваторов они не обладают кросс-активностью по отношению к LTR ВИЧ. Некоторые вирусы человека, не относящиеся к лентивирусам, также имеют собственные активаторы транскрипции, но *Tat*, действующий через РНК-мишень, уникален. Есть сообщения об ингибировании активации транскрипции с LTR ВИЧ продуктами гена *E1A* аденовируса и белками предранних генов вируса герпеса, что, по-видимому, указывает на общие клеточные факторы, мобилизуемые промоторами перечисленных вирусов при участии указанных вирусных белков [132].

Для трансактиватора ретровируса HTLV-1 уже установлен в общих чертах молекулярный механизм воздействия на транскрипционный комплекс [135]. Трансактиватор Tax-1 усиливает димеризацию транскрипционных факторов и стабильность их комплексов за счет взаимодействия с их субдоменами, содержащими основные аминокислоты (в частности, лейциновые домены). Эти же основные районы активирующих транскрипцию факторов (ATF) определяют их связывание с ДНК в области *cis*-сайтов выше TATA. Активирующие транскрипцию факто-

ры, имеющие гомологичный ДНК-связывающий домен в виде последовательности основных аминокислот, известный под названием Basic Zipper Region (b-ZIP), объединены в семейство ATF. Так сильно смещает равновесие между неассоциированными ATF и их комплексами в сторону димеров. Димеризация ATF является пререквизитной для их взаимодействия с ДНК и Tax-1, усиливая степень ассоциации димеров, существенно (на несколько порядков) снижает пороговые концентрации различных ATF в клетке, необходимые для активации транскрипции. На стабильность связывания транскрипционных факторов с ДНК Tax-1 не влияял.

Соотнести результаты, полученные для Tax-1, с таковыми для трансактиватора *Tat* ВИЧ-1 можно только с большими ограничениями, так как *cis*-элемент в промоторе HTLV мобилизует другой набор ATF при формировании энхансера транскрипции [135], и другие структуры лоцируют трансактиватор. Но похоже, что здесь две соседние ветви эволюционного древа ретровирусов развивались в одном направлении, и итогом эволюционного отбора стали гомологичные системы регуляторных вирусных белков.

Tat транслируется с собственной мРНК (их три, рис. 1). Доля *Tat*-специфических мРНК среди всех малых множественно сплайсированных мРНК ВИЧ для всех типов перmissивных клеток во все фазы инфекции постоянна и не превышает 2—3 % (менее 1 % всех вирусных мРНК) [4]. Функциональные сайты в области старта трансляции *Tat* определяют высокую частоту трансляции его рамки в полицистронных мРНК. Спорной выглядит возможность синтеза укороченных форм *Tat* и гибридных форм *Tat*—*Env*, *Tat*—*Rev* (рис. 1), обладающих трансаkтивирующими свойствами (трансляция первого экзона дает отчасти активный белок) [4, 10, 133]. Кроме того, вирус синтезирует в очень малых количествах белок *Teu*, обладающий свойствами *Tat* [4, 76].

Белок *Teu*. В ряде работ по иммунологии СПИДа при фракционировании ВИЧ-специфических белков моноклональными антителами или сыворотками носителей ВИЧ-1 авторами обнаружен вирусный белок, реагирующий как с антителами к *Tat*, так и с антителами к *Rev*. Масса белка составляла около 28 000. Позже была клонирована кДНК указанного гибридного белка [4, 76], включающего экзоны *Tat*—*Rev*, а также экзон 6D (рис. 1), характерный только для этой специфической мРНК. Белок состоит из первых 57 N-концевых аминокислот *Tat*, небольшого участка *Env* и 91 аминокислоты на C-конце, кодируемых вторым экзоном *Rev*. Название белок получил как производное от *Tat*, *Env* и *Rev* (встречается также *Tnu*).

Экспрессия такой кДНК *in trans* по отношению к *tat*-индуцибельной транскрипционной единице (LTR-CAT) [4] показала, что *Teu* обладает всеми свойствами *Tat*. Говорить о наличии у *Teu* функциональных свойств *Rev* трудно, так как оба экзона последнего абсолютно необходимы, но RRE он способен узнавать. Наличие первого экзона *Tat* вряд ли компенсирует отсутствие первого экзона *Rev*.

Белка *Teu* в клетке очень мало. На более поздних стадиях инфекции его синтез подавляется на уровне сплайсинга белком *Rev*. Таким образом, можно предположить только слабое регуляторное действие его на ранней стадии репликации ВИЧ. Некоторые несущественные функции могут выполнять неполноразмерные и конъюгированные белки-химеры, производные альтернативного сплайсинга рамок считывания *Tat* и *Rev* (рис. 1).

Перечисленные в последнем разделе обзора химерные белки ВИЧ следует рассматривать как пример побочных продуктов эволюции ретро-геномов. Об остальных кратко охарактеризованных здесь вирусных продуктах можно судить как о генах эволюционного отбора. Принятое зарубежными авторами для этих шести определение Auxiliary genes (побочные или вспомогательные гены), пожалуй, нехарактерно для *tat* и *rev* — уникальных главнейших регуляторов экспрессии обширной группы лентивирусных геномов. Особенно это касается трансактива-

тора *Tat*, которому в данном обзоре уделено основное внимание. Дальнейшее изучение этой «загадки» изобретательной и изменчивой природы ретровирусов может приблизить нас к пониманию важных механизмов регуляции транскрипции в клетке.

О. П. Кухаренко, А. Д. Швед

РЕГУЛЯТОРНІ ГЕНИ ВІЛ ТА ЇХ РОЛЬ У РЕАЛІЗАЦІЇ ГЕНОМУ

Резюме

В огляді наведено відомості щодо наукових публікацій з вивчення ролі та функцій допоміжних регуляторних генів *nef*, *vpr*, *vpr*, *vif*, *tat* та *rev* ВІЛ-1 в його репродукції. Увагу переважно приділено генам *tat*, *rev* і їх продуктам як найвпливовішим регуляторам активності ВІЛ-1 та інших представників групи лентівірусів, а також гену *nef*. Розглянуто можливі механізми впливу цих генів на ексісію провірусу за участю факторів клітин-хазяїна та на фізіологічні процеси, що відбуваються у ВІЛ-інфікованих клітинах.

A. P. Kukharenko, A. D. Shved

HIV-1 REGULATORY GENES AND THEIR ROLE IN THE VIRAL GENOME REALIZATION

Summary

Review summarises recent data related to the role and function of the auxiliary regulatory genes *nef*, *vpr*, *vpr*, *vif*, *tat* and *rev* of HIV-1 in viral replication. We devoted attention rather to the *tat*, *rev*, *nef* and their products as to the main regulators of the realization of HIV-1 lentiviral genome. Possible mechanisms of influence of these viral products on proviral activity in couple with host-cellular factors are considered. Cytopathophysiological effections of some viral regulatory proteins upon HIV-1 persistence of permissible cells are also shortly reviewed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Delassus S., Cheynier R., Wain-Hobson S. Evolution of HIV-1 *nef* and LTR sequences over 4 years *in vivo* and *in vitro* // J. Virol.—1991.—65, N 1.—P. 225—231.
2. Kaminchik J., Bashan N., Itach A. et al. Genetic characterization of HIV-1 *nef* gene products translated *in vitro* and expressed in mammalian cells // Ibid.—N 2.—P. 583—588.
3. Guy B., Riviere Y., Dott K. et al. Mutational analysis of the HIV *nef* protein // Virology.—1990.—176.—P. 413—425.
4. Michael N. L., Morrow P., Mosca J. et al. Induction of human immunodeficiency virus type-1 expression in chronically infected cells is associated primarily with a shift in RNA splicing patterns // J. Virol.—1991.—65, N 3.—P. 1291—1303.
5. Laurent A. G., Hovanessian A. G., Riviere Y. et al. Production of the defective *nef* in HIV-1 infected CEM cells // J. Gen. Virol.—1990.—71, N 10.—P. 2273—2281.
6. Cullen B. R., Green W. C. Functions of the auxiliary gene products of the HIV-1 // Virology.—1990.—178, N 1.—P. 1—5.
7. Nebreda A. R., Bryan T., Segade F. et al. Biochemical and biological comparison of HIV-1 NEF and *ras* gene products // Ibid.—1991.—183.—P. 151—159.
8. Kim S., Ikeuchi K., Byrn R. et al. Lack of a negative influence on viral growth by the *nef* gene of HIV-1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 9544—9548.
9. Hammes S. R., Dixon E. P., Matim M. H. et al. *Nef* protein of HIV-1: Evidence against its role as a transcriptional inhibitor // Ibid.—P. 9549—9553.
10. Bachelierie F., Alcamí J., Hazan U. et al. Constitutive expression of HIV *nef* protein in human astrocytes does not influence basal or induced HIV LTR activity // J. Virol.—1990.—64, N 6.—P. 3059—3062.
11. Ronde A., Klaver B., Keulen W. et al. Natural HIV-1 NEF accelerates virus replication in primary human lymphocytes // Virology.—1992.—188.—P. 391—395.
12. Skowronski T., Parks D., Mariani R. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 *nef* gene // EMBO J.—1993.—12.—P. 703—713.
13. Ahmed N., Venkatesan S. *Nef* protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR // Science.—1988.—241, N 4872.—P. 1481—1485.
14. Cheng-Mayer C., Iannallo P., Shaw K. et al. Differential effects of *nef* on HIV replication: Implications for viral pathogenesis in the host // Ibid.—1989.—246, N 4937.—P. 1629—1633.

15. Luria S., Chambers I., Berg P. Expression of the HIV-1 *Nef* protein in T-cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin-2 messenger RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88, N 12.—P. 5326—5330.
16. Poulin L., Levy J. A. The HIV-1 *nef* gene product is associated with phosphorylation of a 46 kD cellular protein // AIDS.—1992.—6.—P. 787—791.
17. Werner T., Ferroni S., Saermark T. et al. HIV-1 *Nef* protein exhibits structural and functional similarity to scorpion peptides interacting with K⁺ channels // Ibid.—1991.—5.—P. 1301—1308.
18. Burch H. B., Nagy E. V., Lukes Y. G. et al. Nucleotide and amino acid homology between the human thyrotropin receptor and the HIV-1 *Nef* protein: identification and functional analysis // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1991.—181.—P. 501—505.
19. Strebel K., Klimkait T., Maldarelli F., Martin M. A. Molecular and biochemical analysis of HIV-1 *vpu* gene // J. Virol.—1989.—63, N 9.—P. 3784—3791.
20. Strebel K., Klimkait T., Martin M. A. A novel gene of HIV-1, *vpu*, and its 16 kD product // Science.—1988.—241, N 4870.—P. 1221—1223.
21. Terwilliger E. F., Cohen E. A., Lu Y. et al. Functional role of HIV-1 *vpu* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 5163—5167.
22. Arrigo S. J., Chen I. *Rev* is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 *vif*, *vpr*, and *env/vpu-2* RNAs // Genes and Dev.—1991.—5, N 5.—P. 808—819.
23. Schwartz S., Felber B. K., Fenyo E.-M., Pavlakis G. N. *Env* and *Vpu* proteins of HIV-1 are produced from multiple bicistronic mRNAs // J. Virol.—1990b.—64, N 11.—P. 5448—5456.
24. Cohen E. A., Dehni G., Sodroski J. G., Haseltine W. A. *Vpr* of HIV-1 is virion-associated regulator protein // Ibid.—1990.—64, N 6.—P. 3097—3099.
25. Shibata R., Tomoyuki M., Masanori H. et al. Mutational analysis of the HIV-2 genome in relation to HIV-1 and SIV (AGM) // Ibid.—N 2.—P. 742—747.
26. Ogawa K., Shibata R., Kiyomasu T. et al. Mutational analysis of the HIV *vpr* open reading frame // Ibid.—1989.—63, N 9.—P. 4110—4114.
27. Levy D. N., Fernandes L. S., Williams V. W., Weiner D. B. Induction of cell differentiation by HIV-1 *vpr* // Cell.—1993.—72.—P. 541—550.
28. Shibata R., Tomoyuki M., Masanori H. et al. Complementation of the *rev* gene mutation among human and simian lentiviruses // J. Virol.—1990.—64, N 5.—P. 2202—2207.
29. Golub E. I., Li G., Volsky D. I. Differences in the basal activity of the LTR determine different replicative capacities of two closely related HIV-1 isolates // Ibid.—N 8.—P. 3654—3660.
30. Sakai K., Ma X. Y., Gordienko I., Volsky D. S. Recombinational analysis of natural noncytopathic HIV-1 isolate—role of the *vif* gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathicity // Ibid.—1991.—65, N 11.—P. 5765—5773.
31. Felber B. K., Drisdale C. M., Pavlakis G. N. Feedback regulation of HIV-1 expression by the *Rev* protein // Ibid.—1990.—64, N 8.—P. 3734—3741.
32. Terwilliger E., Burghoijt R., Sia R. et al. The *art* gene product of HIV is required for replication // Ibid.—1988.—62, N 2.—P. 655—658.
33. Hammarshjold M.-L., Heimer J., Hammarshjold B. et al. Regulation of HIV-1 *env* expression by the *rev* gene product // Ibid.—1989.—63, N 5.—P. 1959—1966.
34. Sodroski J., Goh W., Rosen C. et al. A second posttranscriptional transactivator gene required for HTLV-III replication // Nature.—1986.—321.—P. 412—413.
35. Cochrane A. V., Golub E., Volsky D. et al. Functional significance of phosphorylation to the HIV *Rev* protein // J. Virol.—1989.—63, N 10.—P. 4438—4440.
36. Hope T. J., McDonald D., Huang X. et al. Mutational analysis of the HIV-1 *Rev* transactivator: Essential residues near the amino terminus // Ibid.—1990.—64, N 11.—P. 5360—5366.
37. Zapp M. L., Green M. R. Sequence specific RNA binding by the HIV-1 *Rev* protein // Nature.—1989.—342, N 6250.—P. 714—716.
38. Sadaie M. R., Benter T., Woong-Staal F. Site directed mutagenesis of two trans-regulatory genes (*tat* III, *trs*) of HIV-1 // Science.—1989.—239, N 4842.—P. 910—913.
39. Cochrane A. W., Perkins A., Rosen C. A. Identification of sequences important in the nucleolar localization of HIV *Rev*: relevance of nucleolar localization to function // J. Virol.—1990.—64, N 2.—P. 881—885.
40. Kubota S., Nosaka T., Cullen B. et al. Effects of chimeric mutants of human immunodeficiency virus type-1 *Rev* and HTLV type-1 *Rex* on nucleolar targeting signals // Ibid.—1991.—65, N 5.—P. 2452—2456.
41. Hadzopoulou-Cladaras M., Felber B. K., Cladaras C. et al. The (*trs/art*) protein of HIV-1 affects viral mRNA and protein expression via a *cis*-acting sequence in the *env* region // Ibid.—1989.—63, N 3.—P. 1265—1274.
42. Malim M. H., Bohnelein S., Hauber J., Cullen B. R. Functional desection of the HIV-1 *Rev* trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of *Rev* function // Cell.—1989.—58, N 1.—P. 205—214.
43. Rimski L., Dodon M. D., Dixon E. P., Greene W. C. Trans-dominant inactivation of HTLV-1 and HIV-1 gene expression by mutation of the HTLV-1 *Rex* transactivator // Nature.—1989.—341, N 6241.—P. 453—456.
44. Dillon P. J., Nelbock P., Perkins A., Rosen C. A. Structural and functional analysis of the HIV type-2 *Rev* protein // J. Virol.—1991.—65, N 1.—P. 445—449.

45. Bohnlein S., Pirker F. P., Hofer L. et al. Transdominant repressors for HTLV-1 *Rev* and HIV-1 *Rev* function // *Ibid.*—P. 81—88.
46. Daly T. J., Rennert P., Lynch P., Barry J. K. Perturbation of the carboxy terminus of HIV-1 *Rev* affects multimerization on the *rev* responsive element // *Biochemistry.*—1993.—32.—P. 8945—8954.
47. Malim M. H., Cullen B. R. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple *rev* monomers to the viral RRE—implications for HIV-1 latency // *Cell.*—1991.—65, N 2.—P. 241—248.
48. Felber B. K., Hadzopoulou-Cladaras M., Cladaras C. et al. *Rev* protein of HIV-1 affects the stability and transport of the viral mRNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 5.—P. 1495—1502.
49. Knight D. M., Flomerfelt F. A., Ghayeb G. Expression of the *Art/Trs* protein of HIV and study of its role in viral envelop synthesis // *Science.*—1987.—236.—P. 837—840.
50. Emerman M., Vaseux R., Reden K. The *Rev* gene product of the HIV affects envelop specific RNA localization // *Cell.*—1989.—57, N 6.—P. 1155—1162.
51. Kim J. H., Kaufman P. A., Hantly S. M. et al. *Rev* transregulation of human T-cell leukemia virus type-II gene expression // *J. Virol.*—1991.—65, N 1.—P. 405—414.
52. Rosen C. A., Terwilliger E., Dayton A. et al. Intragenic *cis*-acting *art* gene responsive sequences of the HIV // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85, N 7.—P. 2071—2075.
53. Malim M. H., Hauber J., Shu-Yun Le et al. The HIV *Rev* trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA // *Nature.*—1989.—338, N 6212.—P. 254—257.
54. Dayton E. T., Powell D. M., Dayton A. I. Functional analysis of CAR, the target sequence for the *Rev* protein of HIV-1 // *Science.*—1989.—246, N 4937.—P. 1625—1628.
55. Lewis N., Williams J., Rekosh D., Hammariskjold M. Identification of a *cis*-acting element in human immunodeficiency virus type-2 (HIV-2) that is responsive to the HIV-1 *Rev* and human T-cell leukemia virus type-I and type-II *Rev* proteins // *J. Virol.*—1990.—64, N 4.—P. 1690—1697.
56. Yip M., Dynan W., Green P. et al. HTLV Type-II *Rev* protein binds specifically to RNA sequences of the HTLV LTR but poorly to the HIV type-I *Rev*-responsive element // *Ibid.*—1991.—65, N 5.—P. 2261—2272.
57. Daly T. J., Cook S., Grey G. S., et al. Specific binding of HIV-1 recombinant *Rev* protein to the *Rev*-responsive element *in vitro* // *Nature.*—1989.—342, N 6251.—P. 816—819.
58. Huang X. J., Hope T. J., Bond B. L. et al. Minimal *Rev*-response element for type-I HIV // *J. Virol.*—1991.—65, N 4.—P. 2131—2134.
59. Cook K. S., Fisk G. J., Hauber J. et al. Characterization of HIV-1 *Rev* protein-binding stoichiometry and minimal RNA substrate // *Nucl. Acids Res.*—1991.—19, N 7.—P. 1577—1583.
60. Karn J., Dingwall C., Finch T. RNA binding by the *tat* and *rev* proteins of HIV-1 // *Biochimie.*—1991.—73.—P. 9—16.
61. Heaphy S., Finch J. T., Gait M. J. et al. Human immunodeficiency virus type I regulator of viron expression, *rev*, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich «bubble» located within the *rev*-responsive region of viral mRNAs // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 7366—7370.
62. Holland S. M., Chavez M., Gerstberger S., Venkatesan S. A specific sequence with a bulged guanosine residue 5' in a stem-bulge-stem structure of *Rev*-responsive element RNA is required for trans activation by human immunodeficiency virus type I *Rev* // *J. Virol.*—1992.—6.—P. 3699—3706.
63. Iwai S., Pritchard C., Mann D. A., et al. Recognition of the high affinity binding site in *Rev*-response element by the HIV-1 *Rev* protein // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 24.—P. 6465—6472.
64. Lu Y., Touzjian N., Stenzel M. et al. Identification of *cis*-acting repressive sequences within the negative regulatory element of HIV-1 // *J. Virol.*—1990.—64, N 10.—P. 5226—5229.
65. Chang D. D., Sharp P. A. Regulation by HIV *rev* depends upon recognition of splice sites // *Cell.*—1989.—59.—P. 789—795.
66. Chang D. D., Sharp P. A. Messenger RNA transport and HIV *rev* regulation // *Science.*—1990.—249.—P. 614—615.
67. Kijems J., Brown M., Chang D. D., Sharp P. A. Structural analysis of the interaction between the HIV *Rev* protein and the *Rev* response element // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88, N 3.—P. 683—687.
68. Olsen H. S., Cochrane A. W., Dillon P. J. et al. Interaction of the human immunodeficiency virus type I *Rev* protein with a structured region in *env* mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids // *Genes and Dev.*—1990.—4.—P. 1357—1364.
69. Lu X., Heimer J., Rekosh D., Hammariskjold M.-L. U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a *rev*-regulated HIV *env* mRNA that remains unspliced // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 7598—7602.
70. Fankhauser C., Izaurralde E., Adachi Y. et al. Specific complex of human immunodeficiency virus type-I *Rev* and nucleolar B23 proteins-dissociation by the *Rev* response element // *Mol. and Cell. Biol.*—1991.—11, N 5.—P. 2567—2575.

71. Constantoulakis P., Campbell M., Felber B. K. et al. Inhibition of *Rev*-mediated expression by an RNA binding protein encoded by the interferon-inducible 9—27 gene // *Science*.—1993.—259, N 5099.—P. 1320—1323.
72. Robert-Guroff M., Popovic M., Gartner S. et al. Structure and expression of *tat*, *rev*- and *nef*-specific transcripts of HIV-1 in infected lymphocytes and macrophages // *J. Virol.*—1990.—64, N 7.—P. 3391—3398.
73. Schwartz S., Felber B. K., Benko D. M. et al. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of HIV-1 // *Ibid.*—N 6.—P. 2519—2529.
74. Berkhout B., Silverman R. H., Jeang K.-T. *Tat* transactivate HIV-1 through a nascent RNA target // *Cell*.—1989.—59, N 2.—P. 273—282.
75. Wright C. M., Felber B. K., Paskalis H., Pavlakis G. N. Expression and characterization of the trans-activator of HTLV-III/LAV virus // *Science*.—1986.—234.—P. 988—992.
76. Benko D. M., Schwartz S., Pavlakis G. N., Felber B. K. A novel HIV-1 protein, *lev*, shares sequences with *tat*, *env*, and *rev* proteins // *J. Virol.*—1990.—64, N 6.—P. 2505—2518.
77. Sadaie M. R., Mukhopadhyaya R., Benaisa Z. N. et al. Conservative mutations in the putative metal-binding region of HIV *tat* disrupt virus replication // *AIDS Res. and Human Retrovir.*—1990.—6, N 11.—P. 1257—1263.
78. Gitlin S., Lindholm P., Marriott S., Brady J. Transdominant HTLV type-1 TAXI mutant that fails to localize to the nucleus // *J. Virol.*—1991.—65, N 5.—P. 2612—2621.
79. Green M., Ishio M., Loewenstein P. M. Mutational analysis of HIV-1 *Tat* minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression // *Cell*.—1989.—58, N 1.—P. 215—223.
80. Carroll R., Martarano L., Derse D. Identification of lentivirus *Tat* functional domains through generation of equine infectious anemia virus/HIV-1 *tat* gene chimeras // *J. Virol.*—1991.—65.—N 7.—P. 3460—3467.
81. Feinberg M. B., Jarrett R. F., Aldovini A. et al. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA // *Cell*.—1986.—46, N 6.—P. 807—817.
82. Feng S., Holland E. C. HIV-1 *tat* transactivation requires the loop sequence within TAR // *Nature*.—1988.—334, N 6178.—P. 165—167.
83. Hauber J., Perkin A., Heimer E. P., Cullen B. R. Transactivation of HIV gene expression is mediated by nuclear events // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84.—P. 6364—6368.
84. Jakobovits A., Smith D. H., Jakobovits A., Capon D. L. A discrete element 3' of AIV-1 and HIV-2 mRNA initiation sites mediates transcriptional elongation by an HIV trans activator // *Mol. and Cell. Biol.*—1988.—8, N 6.—P. 2555—2561.
85. Selby M. J., Bain E. S., Luciw P. A., Peterlin B. M. Structure, sequence and position of the stem-loop in TAR determine transcriptional elongation by *Tat* through the HIV-1 LTR // *Genes and Dev.*—1989.—3.—P. 547—558.
86. Selby M. J., Peterlin B. M. Transactivation by HIV-1 *Tat* via heterologous RNA binding protein // *Cell*.—1990.—62, N 4.—P. 769—776.
87. Galignol A., Buckler-White A., Berkhout B., Jeang K.-T. Characterization of a human TAR RNA binding protein that activates HIV-1 LTR // *Science*.—1991.—251, N 5001.—P. 1597—1602.
88. Weeks K. M., Ampe C., Schults S. C. et al. Fragments of the HIV-1 *Tat* protein specifically bind TAR RNA // *Ibid.*—1990.—249, N 4974.—P. 1281—1285.
89. Cordingley M. G., LaFemina R. L., Callahan P. L. et al. Sequence-specific interaction of *Tat* protein and *Tat* peptides with the transactivation-responsive sequence element of HIV-1 *in vitro* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 22.—P. 8985—8989.
90. Roy S., Parkin N. T., Rosen C. et al. Structural requirements for trans activation of HIV-1 LTR-directed gene expression by *tat*: importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the *tat*-responsive sequence // *J. Virol.*—1990.—64, N 3.—P. 1402—1406.
91. Weeks K. M., Crothers D. M. RNA recognition by *Tat*-derived peptides: Interaction in the major groove // *Cell*.—1991.—66, N 3.—P. 577—588.
92. Kao S., Calmon A., Luciw P., Peterlin B. Antitermination of transcription within the LTR of HIV-1 by *tat* gene product // *Nature*.—1987.—330.—P. 489—493.
93. Rice A. P., Mathews M. B. Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the *tat* gene product // *Ibid.*—1988.—332.—P. 551—553.
94. Feinberg M. B., Baltimore D., Frankel A. D. The role of *Tat* in HIV life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88, N 9.—P. 4045—4049.
95. Braddock M., Shambers A., Wilson W. et al. HIV-1 *Tat* «activates» presynthesized RNA in the nucleus // *Cell*.—1989.—58.—P. 269—279.
96. Braddock M., Therburn A. M., Chambers A. et al. A nuclear translational block imposed by the HIV-1 U3 region is relieved by the *Tat*-TAR interaction // *Ibid.*—1990.—62, N 6.—P. 1123—1133.
97. Braddock M., Therburn A. M., Kingsman A. J., Kingsman S. M. Blocking of *Tat*-dependent HIV-1 RNA modification by an inhibitor of RNA polymerase-II processivity // *Nature*.—1991.—350, N 6317.—P. 439—441.

98. Chin D. J., Selby M. J., Peterlin B. M. HIV-1 *Tat* does not transactivate mature trans-acting responsive region RNA species in the nucleus or cytoplasm of primate cells // *J. Virol.*—65, N 4.—P. 1758—1764.
99. Laspia M. F., Rice A. P., Mathews M. B. HIV-1 *Tat* protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation // *Cell.*—1989.—59, N 2.—P. 283—292.
100. Cullen B. R. Trans-activation of HIV occurs via a bimodal mechanism // *Ibid.*—1986.—46, N 7.—P. 973—982.
101. Greenblatt J., Nodwell J. R., Mason S. W. Transcriptional antitermination // *Nature.*—1993.—364, N 6436.—P. 401—406.
102. Gunnergy S., Rice A. P., Robertson H. D., Mathews M. B. *Tat*-responsive region RNA of HIV-1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 8687—8691.
103. Berkhout B., Gatignol A., Rabson A. B. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: Evidence that *Tat* requires specific regions of the promoter // *Cell.*—1990.—62, N 4.—P. 757—767.
104. Southgate C., Zapp M. P., Green M. R. Activation of transcription by HIV-1 *Tat* protein tethered to nascent RNA through another protein // *Nature.*—1990.—345.—P. 640—644.
105. Selby M. J., Peterlin B. M. Transactivation by HIV-1 *Tat* via a heterologous RNA binding protein // *Cell.*—1990.—62.—P. 769—776.
106. Kamine J., Chinnadurai G. Synergistic activation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the viral *Tat* protein and cellular transcription factor Sp1 // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 3932—3936.
107. Han X. M., Laras A., Rounseville M. P. et al. Human immunodeficiency virus type 1 *Tat*-mediated transactivation correlates with the phosphorylation state of a cellular TAR RNA stem-binding factor // *Ibid.*—P. 4065—4072.
108. Wu F., Garcia J., Sigman D., Gaynor R. *tat* regulates binding of the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA loop-binding protein TRP-185 // *Genes and Dev.*—1991.—5.—P. 2128—2140.
109. Ratnasabapathy R., Sheldon M., Johal L., Hernandez N. The HIV-1 LTR contains an unusual element that induces the synthesis of short RNAs from various messenger RNA and snRNA promoters // *Ibid.*—4, N 12A.—P. 2061—2074.
110. Han P., Brown R., Barsoum J. Transactivation of heterologous promoters by HIV-1 *tat* // *Nucl. Acids Res.*—1991.—19.—P. 7225—7229.
111. Berkhout B., Jeang K. T. Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and *Tat*-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 139—149.
112. Olsen H. S., Rosen C. A. Contribution of the TATA motif to *Tat*-mediated transcriptional activation of human immunodeficiency virus gene expression // *Ibid.*—P. 5594—5597.
113. Bachelerie F., Alcami J., Arenzana-Seisdedos F. et al. HIV enhancer activity perpetuated by NF-kappa- β induction on infection of monocytes // *Nature.*—1991.—350.—P. 709—712.
114. Sullenger B. A., Gallardo F. H., Ungers G. E., Gilboa E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to HIV replication // *Cell.*—1990.—63, N 2.—P. 601—608.
115. Grahem G. J., Maio J. J. RNA transcripts of the HIV TAR element can inhibit action of the viral transactivator // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 5817—5821.
116. Pfeifer K., Bachmann M., Schroder H. C. et al. Formation of a small ribonucleo-protein particle between *Tat* protein and trans-acting response element in human immunodeficiency virus-infected cells // *J. Biol. Chem.*—1992.—226.—P. 14620—14626.
117. Desai K., Loewenstein P. M., Green M. Isolation of a cellular protein that binds to the HIV-1 *Tat* protein and can potentiate transactivation of the viral promoter // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 8875—8879.
118. Nelbock P., Dillon P. S., Perkins A., Rosen C. A. cDNA for a protein that interacts with the HIV-1 *Tat* transactivator // *Science.*—1990.—248.—P. 1650—1653.
119. Shibuya H., Irie K., Ninomiya-Tsuji J., Goebel M. et al. New human gene encoding a positive modulator of HIV *Tat*-mediated transactivation // *Nature.*—1992.—357.—P. 700—702.
120. Kim J. S. TAR-independent transactivation of the murine cytomegalovirus major immediate-early promoter by the *Tat* protein // *J. Virol.*—1993.—67, N 1.—P. 239—248.
121. Taylor J. P., Pomerantz R., Bagasra O., Chowdhury M. et al. TAR-independent transactivation by *Tat* in cells derived from the CNS: a novel mechanism of HIV-1 gene regulation // *EMBO J.*—1992.—11.—P. 3395—3403.
122. Remenick J., Radonovich M. F., Brady J. N. Human immunodeficiency virus *Tat* transactivation: induction of a tissue-specific enhancer in a nonpermissive cell line // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 5641—5646.
123. Kato H., Sumimoto H., Pognonec Ph. et al. HIV-1 *Tat* acts as a processivity factor *in vitro* in conjunction with cellular elongation factors // *Genes and Dev.*—1992.—6, N 4.—P. 655—666.
124. Ensoli B., Barillari G., Salahuddin S. Z. et al. *Tat* protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients // *Nature.*—1990.—345.—P. 84—87.

125. Zauli G., Furlini G., Milani D. et al. HIV-1 Tat protein stimulates the production of interleukin-6 by peripheral blood monocytes // *Microbiologica*.—1993.—16, N 2.—P. 115—120.
126. Sastry K. J., Reddy R. H. R., Pandita R. et al. HIV-1 tat gene induces tumor necrosis factor- β (lymphotoxin) in a human B-lymphoblastoid cell line // *J. Biol. Chem.*—1990.—265, N 33.—P. 20091—20093.
127. Zauli G. Tat protein stimulates production of TGF- β by marrow macrophages: a potential mechanism for HIV-1 induced hematopoietic suppression // *Blood*.—1992.—80, N 12.—P. 3036—3043.
128. Howcroft T. K., Strebel R., Martin M. A., Singer D. S. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV // *Science*.—1993.—260, N 5112.—P. 1320—1323.
129. Mann D. A., Frankel A. D. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein // *EMBO J.*—1991.—10, N 7.—P. 1733—1739.
130. Helland D. E., Welles J. L., Caputo A., Haseltine W. A. Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 4547—4549.
131. Cullen B. R. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? // *Cell*.—1993.—73.—P. 417—420.
132. Nicholas J., Nevins J. R. Distinct DNA targets for transactivation by HTLV-1 tax and adenovirus E1A // *Virology*.—1991.—182, N 1.—P. 156—167.
133. Siegel L. J., Ratner S. F., Derse J. D. et al. Transactivation induced by HTLV-III maps to a viral sequence encoding 58 amino acids and lacks tissue specificity // *Ibid.*—1986.—148, N 1.—P. 226—231.
134. Drysdale C. M., Pavlakis G. N. Rapid activation and subsequent down-regulation of HIV-1 promoter in the presence of Tat: Possible mechanisms contributing to latency // *J. Virol.*—1991.—65, N 6.—P. 3044—3051.
135. Wagner S., Green M. R. HTLV-1 Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization // *Science*.—1993.—262, N 5132.—P. 395—399.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 31.01.94