



УДК 577.218

АНТИСМЫСЛОВЫЕ РНК: НОВЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

А. Д. Швед, С. Б. Золотухин, Г. Х. Мацука

В последние годы появились сведения о том, что в природе существуют системы регуляции генной экспрессии, где ведущую роль выполняют особого рода РНК. Накопленные данные, хотя пока и немногочисленные, составили доказательную информацию о причастности РНК к регуляции экспрессии генов на уровне трансляции. Обнаруженный механизм регуляции, основанный на взаимодействии молекул РНК, в общем виде состоит в том, что наряду с транскрипцией структурного гена со смысловой нити ДНК в некоторых случаях происходит транскрипция второй, антисмысловой нити, но в обратном направлении (рис. 1). В результате такой двунаправленной транскрипции появляются молекулы мРНК, или смысловые РНК, и комплементарные им антисмысловые РНК (асРНК). По доминирующему представлению, мРНК, образуя гибрид с асРНК, теряет способность связываться с рибосомой и участвовать в акте трансляции.

Заманчивая перспектива создания искусственной системы такой регуляции индуцировала появление ряда экспериментальных работ, показавших, что трансляция действительно может быть подавлена введением в клетку асРНК, комплементарной мРНК какого-то конкретного белка. Общий принцип построения искусственной системы, продуцирующей ас-транскрипты, заключается в том, что последовательности определенного гена либо какие-то его участки выделяются с помощью рестриктаз и затем встраиваются в подходящий вектор под контроль того же (или другого) промотора, но в обратной, антисмысловой, ориентации (рис. 2). В исходной молекуле промотор направляет транскрипцию смысловой, или мРНК, в реконструированной системе транскрипция идет в том же направлении, но на противоположной, антисмысловой нити, что обеспечивает накопление асРНК-транскриптов, комплементарных мРНК.

Короткий список публикаций о регуляторной роли асРНК быстро пополняется новыми работами, что свидетельствует о большом интересе исследователей к недавно открытому новому механизму регуляции генной экспрессии.

В представленном обзоре мы попытались суммировать имеющиеся в литературе сведения об уже известных примерах такой регуляции, а также об экспериментальном использовании асРНК в качестве ингибиторов трансляции.

В работе [1] были представлены доказательства того, что инвертированная последовательность (*IS10*-элемент) транспозона *Tn10* может негативно контролировать на уровне трансляции экспрессию своего собственного белка — транспозазы. Транспозон *Tn10* имеет на концах молекулы инвертированные *IS10*-последовательности. Левый *IS10*-элемент функционально неактивен, правый же (*IS10R*) — обладает рядом функций, одной из которых является кодирование транспозазы — белка, обеспечивающего узнавание и разрезание ДНК-мишени. Синтез мРНК транспозазы включает промотор *pIN*, второй промотор (*pOUT*) распо-

ложен в 3'-направлении от первого и обеспечивает транскрипцию в обратном направлении (рис. 1).

Строгий генетический анализ показал, что плазмидные конструкции, содержащие много копий участка наружного конца *IS10R* длиной 180 пар оснований (п. о.), обеспечивают негативную регуляцию трансляции мРНК транспозазы, транскрибированной с соответствующего гена транспозона *Tn10*, присутствующего в бактериальной хромосоме в

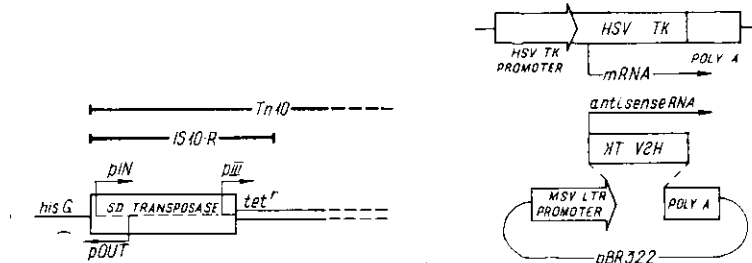


Рис. 1. Структура правого *IS10*-элемента транспозона *Tn10* [1].

Fig. 1. Structure of the right *IS10*-element of *Tn10* transposone [1].

Рис. 2. Схема построения плазмиды, продуцирующей антисмысловые транскрипты *TK*-гена вируса герпеса [11].

Fig. 2. The construction diagram of recombinant plasmid coding for antisense RNA to *HSV TK*-gene [11].

единичной копии. Обнаруженный феномен был назван «многокопийным ингибированием» (МКИ). Кодированная плазмидой детерминанта, ответственная за МКИ, представляет собой транскрипт с *pOUT*-промотора. 5'-концы этого транскрипта и мРНК транспозазы имеют взаимно комплементарные участки длиной 36 п. о., включающие иницирующий АУГ-кодон транспозазного гена и последовательность Шайн — Дальгарно. Спаривание этих двух транскриптов в комплементарных участках предотвращает, по представлениям авторов, связывание мРНК с рибосомами и последующую ее трансляцию.

Известны и другие примеры регуляции по механизму взаимодействия комплементарных РНК, наиболее изученным из которых является контроль копийности плазмид. Результаты отдельных работ уже анализировались в кратком обзоре [2], в дополнение к которому мы также кратко рассмотрим некоторые сообщения.

Взаимодействие двух РНК-транскриптов лежит в основе регуляции репликации ДНК плазмид из семейства *ColE1* [3, 4]. Инициация синтеза одного из этих транскриптов (РНК II) начинается на расстоянии 555 п. о. от точки начала репликации плазмиды. В этом районе РНК II образует гибрид с ДНК-матрицей, который подвергается расщеплению РНКазой N в точке начала репликации. Образовавшийся фрагмент расщепленной РНК служит затравкой для ДНК-полимеразы I, синтезирующей новую цепь ДНК. Другая РНК длиной 108 оснований (РНК I) транскрибируется с противоположной нити ДНК в области, кодирующей 5'-конец РНК II. Комплементарное связывание РНК I и РНК II предотвращает гибридизацию последней с ДНК-матрицей, ингибируя таким путем образование РНК-затравки для репликации ДНК. Эффективность ингибирования зависит от скорости гибридизации РНК I и РНК II, которая должна состояться раньше, чем произойдет гибридизация РНК II с ДНК. Скорость связывания двух РНК, регулируемая двумя факторами, имеет первостепенное значение для образования затравки и, следовательно, для репликации плазмиды.

Первый фактор, влияющий на гибридизацию, — пространственная структура взаимодействующих молекул. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК, кодирующей РНК I и РНК II, позволил обнаружить три палиндрома, благодаря которым эти РНК обладают специфической пространственной структурой, состоящей из трех шпилек [3]. Мутации в центральных неспаренных областях палиндромов, не приводящие к

изменениям в пространственной структуре, тем не менее приводили к уменьшению скорости связывания РНК I и РНК II. Согласно предложенной модели, взаимодействие между молекулами РНК I и РНК II происходит вначале в районе неспаренных последовательностей соответствующих палиндромов. Этот первый контакт, по-видимому, обеспечивает последующее пространственное сближение 5'-конца РНК I с соответствующей областью РНК II и образование прочного гибрида длиной 108 п. о.

Вторым фактором, влияющим на сродство двух молекул РНК, является так называемый *Rom*-белок [5]. Этот полипептид длиной 63 аминокислотных остатка кодируется областью ДНК, находящейся между 402 и 708 п. о., в 3'-направлении от точки инициации репликации. В присутствии белка *Rom* скорость гибридизации РНК I и РНК II значительно увеличивается, что в свою очередь приводит к уменьшению синтеза плазмидной ДНК.

Регуляция инициации репликации плазмид при участии низкомолекулярных РНК у прокариот является, по-видимому, распространенным механизмом, во всяком случае для плазмид семейств *R1* и *NR1 E. coli*, *pT181 Staph. aureus* такой способ регуляции можно считать установленным фактом [2—9]. Показано [6, 7], что низкомолекулярная РНК, именуемая *CorA* РНК, влияет на способность более длинного транскрипта служить матрицей для синтеза белка *RepA*, оказывающего стимулирующее действие на репликацию плазмиды *R1*. *CorA* РНК также имеет палиндромную структуру, которая, по мнению авторов, принимает участие в узнавании и сближении двух молекул РНК, результатом чего является блок трансляции мРНК.

Подобный же механизм регуляции копийности обнаружен и у плазмиды *NR1* [8]. Участок плазмидной ДНК, ответственный за контроль количества копий этой плазмиды, транскрибируется в обоих направлениях — вправо и влево. Правонаправленный транскрипт представляет собой мРНК для белка *RepA1*, необходимого для репликации ДНК. С противоположной нити влево синтезируется небольшой РНК-транскрипт длиной 91 нуклеотид, комплементарный правонаправленному транскрипту вблизи его 5'-конца. Генетический анализ, проведенный с использованием различных плазмидных конструкций, позволил установить, что избыток левонаправленной РНК приводит к ингибированию *in trans* экспрессии *repA1*-гена, обеспечивая тем самым подавление репликации плазмиды *NR1*, а точкой ее приложения является комплементарный участок правонаправленной мРНК. Аналогичным способом взаимодействия комплементарных РНК-противотранскриптов контролируется также копийность плазмиды *pT181 Staph. aureus* [9], сходные черты имеет и механизм регуляции синтеза *Q*-белка — антитерминатора, необходимого для экспрессии поздних генов фага λ [10]. Обсуждается регуляторная роль сателлитной РНК вируса огуречной мозаики [11], которая, обладая участком комплементарности с геномной РНК этого вируса, может оказывать влияние на экспрессию гена белка оболочки. Показано [12], что по механизму взаимодействия комплементарных последовательностей регулируется и эффективность трансляции мРНК зенна, в молекуле которой на 5'- и 3'-концах имеются инвертированные повторы. Спаривание комплементарных участков концевых повторов ведет к блоку трансляции собственной мРНК.

Данные о возможности использования асРНК в эукариотической системе впервые были представлены [13] на примере экспрессии тимидинкиназного (ТК) гена, здесь же транскрипты с незначительной цепи ТК-гена впервые были названы антисмысловыми РНК. Из плазмиды *pTK102*, включающей функционально активный ген ТК вируса герпеса, был выделен фрагмент его структурной части длиной 1364 п. о., начинающая с 51-го нуклеотида в 3'-направлении от АУГ-кодона, и повторно встроена в плазмиду в обратной ориентации. При совместной микроинъекции в ядра ТК-мышинных *L*-клеток плазмиды, несущей ТК-ген, и плазмиды с его копией в ас-ориентации в соотношении 1 : 100 частота

появления ТК⁺-клеток снижалась в 4—5 раз в сравнении с клетками, где вместо ас-плазмиды вводили такое же избыточное количество другой плазмиды, не имевшей анти-ТК-последовательностей. Обнаруженный эффект проявлялся при наличии специфических последовательностей, так как плазмиды, несущие герпетический анти-ТК-ген, не влияли на экспрессию ТК-гена цыпленка. И наоборот, анти-ТК-последовательность к ТК-гену цыпленка ингибировала экспрессию ТК цыпленка, но не вируса герпеса.

Что касается механизма ингибирования экспрессии ТК-гена, то в цитируемой работе ставится больше вопросов, чем дается на них ответов. Так, отмечается, что в клеточных линиях, трансформированных плазмидами с анти-ТК-последовательностями, асРНК содержится в малых количествах сравнительно с большим количеством интегрированных анти-ТК-плазмид. Поэтому неясным остается вопрос о стабильности как асРНК, так и вероятных дуплексов асРНК:мРНК. Ничего нельзя сказать также ни о локализации, ни о молекулярных механизмах феномена ингибирования. Авторы подчеркивают, что представленные ими данные не дают возможности разграничить этапы, на которых осуществляется ингибирование, — происходит ли быстрая деградация мРНК в ядре, нарушается ли ее транспорт в цитоплазму, либо блокируется трансляция. Если основные события происходят на уровне трансляции, то также ничего нельзя сказать о том, блокируется ли акт связывания рибосом, процесс инициации или элонгации полипептидной цепи.

Дальнейшее развитие исследований отражено в последней работе тех же авторов [14], где использованы различные гены и подходы к их ас-ингибированию. Была сконструирована плаزمида, обеспечивающая наработку ас-транскриптов, комплементарных 5'-концу мРНК ТК-гена вируса герпеса и перекрывающих 80 оснований нетранслируемой и 343 основания его структурной областей. Микроинъекция 200-кратного избытка такой 5'-ТК-ас-плазмиды совместно с нормальной ТК-плазмидой в ядра L-клеток обеспечивала более существенное снижение частоты появления ТК⁺-клеток, чем при использовании плазмиды, содержащей ас-последовательности, комплементарные только структурной части ТК-гена [13].

Для определения минимальной длины участка комплементарности между асРНК и мРНК, достаточной для проявления эффекта ингибирования гена, создана остроумная конструкция, в которой участок, содержащий промоторную последовательность и 52 п. о. 5'-нетранслируемой области ТК-гена герпесвируса, был лигирован со структурным геном ТК цыпленка [14]. Эта химерная конструкция при микроинъекции в ядра L-клеток обеспечивала нормальную экспрессию ТК цыпленка. Однако при совместной инъекции этой плазмиды с избытком герпетической 5'-ТК-ас-плазмиды наблюдали почти полное подавление экспрессии ТК-гена цыпленка. Отмечается, что в данном случае, когда участок комплементарности составлял 52 нуклеотида в 5'-направлении от АУГ-кодона мРНК, ингибиторный эффект был существенно выше, чем в экспериментах [13], где использовали ас-вектор, перекрывающий структурный домен ТК-гена.

В работе [14] аналогичные плазмидные конструкции вместо инъекций вводили в клетки методом трансфекции. При этом ингибирование экспрессии ТК-гена достигало 20-кратного уровня с введением 10—100-кратного избытка ас-плазмид, однако при соотношении плазмид 1:1 воспроизводимого ингибирования не наблюдалось. На клетках, предварительно трансформированных в ТК⁺-фенотип, показана возможность ингибирования также эндогенного герпетического ТК-гена с помощью доследующей трансфекции ас-плазмидой. Мышечные L-клетки, трансформированные плазмидой, содержащей ас-фрагмент гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (ХАТ-ген), имели около 20 копий асХАТ-гена на клетку и конститутивно продуцировали до 500 копий асРНК, что создавало подобие «молекулярного иммунитета» к доследующей эк-

спрессии экзогенного ХАТ-гена. Действительно, при трансфекции таких клеток ХАТ-плазмидами наблюдалось полное ингибирование синтеза этого фермента.

Пожалуй, наиболее замечательным результатом цитируемой работы [14] является доказательство возможности ингибирования с помощью асРНК экспрессии нормального клеточного гена. При введении в клетки вектора, способного продуцировать асРНК к гену цитоплазматического β -актина, происходило подавление синтеза этого белка, что проявлялось в замедлении роста клеток и снижении количества микрофибриллярных актиновых структур. Разрушение актиновых жгутов в клетках было отмечено и при введении кэпированной актиновой асРНК, наработанной *in vitro* на 5'-фрагменте актинового гена длиной 500 п. о. Здесь также была доказана высокая специфичность действия ас-транскриптов, ибо инъекция в клетки ТК асРНК на синтез актина влияния не оказывала. Авторы подчеркивают, что наблюдаемые фенотипические изменения в микроинъекцированных клетках свидетельствуют о том, что любые механизмы обратной связи, призванные обеспечить поддержание необходимого уровня актинового пула, не способны компенсировать снижение содержания актина, обусловленное воздействием асРНК.

Вопрос о возможности регуляции синтеза ас-транскриптов для ингибирования определенного гена исследовали в той же работе с использованием дексаметазон-индуцибельного промотора из *LTR* вируса молочной железы мышей, под контроль которого был встроен ТК-ген вируса герпеса в ас-ориентации. Снижение в 5—10 раз ТК-активности в клетках, трансформированных в ТК⁺-фенотип, после трансфекции ас-плазмидой и обработки дексаметазоном авторы приводят как аргумент в пользу того, что этот реактив может быть использован для регуляции транскрипции асРНК и, следовательно, индуцированного (управляемого) ингибирования генной активности. Для этой же цели пригоден, по их мнению, и промотор гена теплового шока.

Действительно, использование набора генов теплового шока позволило на культурах клеток дрозофилы разработать удобную модель для изучения феномена ингибирования с помощью асРНК [15]. При температуре выше 30 °С эти клетки продуцируют шесть белков теплового шока, которые названы *hsp83*, *hsp70*, *hsp28*, *hsp26*, *hsp23* и *hsp22* соответственно их молекулярной массе. Гены этих белков не поддаются классическому генетическому анализу ввиду трудности получения мутаций генов, экспрессия которых находится в зависимости от регуляторной функции ряда генов развития.

Поэтому осуществление ас-ингибирования данных генов могло бы открыть новый подход для генетических исследований в подобных системах. Целью воздействия в данной работе была выбрана мРНК белка *hsp26*.

Для получения ас-транскриптов была создана плазмидная конструкция *pDM402*, содержащая обратно ориентированный фрагмент гена *hsp26* длиной 682 п. о., кодирующий первые 155 аминокислот и весь лидерный участок, кроме первых шести нуклеотидов. Транскрипция данного фрагмента находилась под контролем промотора *hsp70* — наиболее сильного из термоиндуцибельных промоторов клеток дрозофилы. При трансфекции клеток плазмидой *pDM402* совместно с плазмидой *pHGC0* (в соотношении 1 : 1), несущей ген дигидрофолатредуктазы (ДФФР) *E. coli*, у клонов, устойчивых к метотрексату, наблюдали стабильную интеграцию *pDM402* в клеточные хромосомы. Термоиндукция трансформированных клеток приводила к подавлению синтеза белка *hsp26* на 11—44 % в зависимости от количества интегрированных копий ас-плазмиды на клетку (от 50 до 1000), но ингибирование никогда не было полным, однако было высокоспецифичным, так как синтез остальных белков теплового шока протекал обычно. Интересно, что асРНК к гену *hsp26* содержала участок длиной 210 оснований, комплементарный мРНК *hsp28*, однако экспрессия последней протекала

нормально. Участок гомологии этой мРНК соответствовал белоккодирующей части и составлял 72 %.

В цитируемом выше сообщении [14] ас-ингибирование обеспечивал участок гомологии длиной 52 п. о., ниже будут рассмотрены работы [24—26], где существенный эффект достигался наличием гомологичных участков длиной около 80 оснований. Обсуждая различие экспериментальных данных, авторы [15] предполагают, что ингибиторное действие асРНК обеспечивается, по-видимому, не только наличием гомологичных участков в соответствующей мРНК, но также и какими-то другими факторами. Но в любом случае подход, основанный на применении асРНК, является высокоспецифичным, благодаря чему может быть использован для подавления любого гена, а промотор гена теплового шока, например промотор *hsp70*, обладая рядом присущих ему свойств, вполне подходит для изучения функций генов, делеционные мутации которых по каким-либо причинам получить невозможно.

В недавней работе [16] также использовали плазмиды, содержащие различные фрагменты герпетического ТК-гена. Плазида одного варианта (*pMDKT1*) содержала фрагмент длиной 1100 п. о., включающий 53 п. о. 5'-нетранслируемой области ТК мРНК и всю кодирующую область, за исключением последних 23 п. о., кодирующих карбоксильный конец полипептидной цепи. Плазида *pMDKT2* включала 5'-фрагмент длиной 301 п. о. (сегмент А) и 225 п. о. 3'-конца ТК-гена (сегмент С), *pMDKT3* — только сегмент С. При трансфекции ТК⁺ L-клеток плазмиды, содержащие сегменты А и С или только С, обеспечивали наработку в клетках асРНК в количестве $(5-10) \cdot 10^3$ молекул на клетку, что в 300 раз превышало уровень содержащихся в них молекул ТК мРНК. В этих же клонах происходило и подавление на 80—90 % ТК-активности, однако в клетках, трансформированных плазмидой *pMDKT1*, содержащей почти всю ас-последовательность ТК-гена, высокого уровня синтеза асРНК и ингибирования ТК-активности не наблюдалось. Вопрос о том, почему конструкции, содержащие более короткие вставки ТК-гена, эффективнее транскрибировали асРНК, остается пока без ответа. Кроме того, не было выявлено разницы в активности ас-транскриптов, комплементарных 5'- и 3'-участкам мРНК ТК-гена. Из представленных данных следует, что наличие в молекуле асРНК-последовательностей, комплементарных 5'-участку мРНК, не является обязательным условием их ингибиторной активности, ибо 225 п. о., комплементарных 3'-участку мРНК, кодирующему С-конец белка, оказалось достаточно для подавления ее экспрессии.

В плане выяснения механизма ингибиторного действия асРНК было исследовано содержание РНК : РНК-дуплексов в изучаемых клетках. Оказалось, что 95 % двуниевых РНК, имевших ТК-последовательности, содержалось в ядре, а длина дуплексных участков, защищенных от нуклеазного расщепления, составляла 225 п. о., т. е. ровно столько, сколько п. о. содержится в С-сегменте асРНК. Поскольку в исходных ТК⁺ L-клетках вся ТК мРНК обнаруживалась в цитоплазме, а в клетках, продуцирующих ас-транскрипты, ТК-последовательности содержались преимущественно в ядре, предполагается, что снижение ТК-активности обусловлено нарушением транспорта ТК мРНК в цитоплазму, где она может быть транслирована.

Активность искусственно синтезированных асРНК в регулировании экспрессии генов ХАТ и герпетической ТК изучали также на ооцитах лягушки [17]. Инъекция в цитоплазму ооцитов 10-кратного избытка асРНК ХАТ или ТК обеспечивала в разных экспериментах от 8- до 80-кратного подавления экспрессии соответствующих мРНК, введенных в ооциты спустя 5—6 ч после введения асРНК. Ингибиторное действие асРНК проявлялось только по отношению к гомологичной мРНК и не влияло на экспрессию эндогенных белков ооцитов, однако асРНК подавляли эндогенную экспрессию соответствующих генов, введенных в ядра ооцитов в составе плазмид. В последнем случае отмечена резкая неоднозначность эффекта в четырех разных экспериментах: степень ин-

гибирования плазмидного ХАТ-гена составляла 5, 8, 30 и 140-кратные значения в сравнении с контролем, где вместо ХАТ асРНК вводили ТК асРНК. Объяснения столь выраженной вариабельности авторы не находят, однако предполагают, что наряду с блоком трансляции в цитоплазме асРНК могут в каких-то случаях проникать и в ядро и там ингибировать некоторые стадии процессинга РНК.

В цитируемой работе отмечена также зависимость ингибиторной активности асРНК от длины транскриптов. Так, если асРНК соответствовала полной длине ХАТ-гена, степень ингибирования достигала 10-кратного уровня. Молекулы, укороченные до 154 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу мРНК, включая АУГ-кодон и 37 кодонов структурной последовательности, обеспечивали только трехкратное ингибирование экспрессии ХАТ-гена. Такой же уровень ингибирования зарегистрирован и при использовании асРНК, комплементарных 3'-концам мРНК обоих изучаемых генов.

На той же экспериментальной модели показано подавление экспрессии мРНК β -глобина под влиянием глобиновой асРНК [18]. Блок трансляции имел четко выраженные черты специфичности, ибо введение в ооциты только асРНК β -глобина не влияло на общий белковый синтез, а предварительное введение гистоновой асРНК не сказывалось на экспрессии мРНК глобина. Кроме того, ни асРНК глобина, ни асРНК гистона не влияли на трансляцию в ооцитах мРНК β -интерферона человека.

Блок трансляции глобиновых мРНК объясняется образованием дуплексов асРНК : мРНК, что подтверждено экспериментально. Меченая глобиновая мРНК после инъекции в ооциты, последующего выделения и обработки РНКазой полностью деградировала. Однако в препаратах, выделенных через 5 ч после инъекции в ооциты асРНК и мРНК, обнаруживали материал, устойчивый к РНКазной обработке. Длина защищенных дуплексов составляла примерно 220 п. о., такие же дуплексы были получены и при гибридизации этих РНК *in vitro*. Образование дуплексов зависит от времени, ибо в препаратах, выделенных сразу после инъекции, молекул, защищенных от РНКазной обработки, обнаружено не было.

Эффект ингибирования трансляции в данной работе обеспечивали только асРНК, комплементарные 5'-концу мРНК глобина, причем равноэффективными были как более протяженные ас-транскрипты, охватывающие некодирующую и часть структурной области мРНК, так и короткие, перекрывающие всего 45 нуклеотидов 5'-участка, не доходя двух оснований до АУГ-кодона. Транскрипты, комплементарные 3'-концу мРНК, на синтез глобинового белка влияния не оказывали. Полученные данные привели авторов к выводу, что ингибиторный эффект асРНК реализуется на стадии инициации, но не элонгации синтеза полипептидной цепи.

Возможность регуляции экспрессии генов *in vivo* с помощью экзогенных асРНК изучали на эмбрионах дрозофилы [19, 20], где мишенью воздействия был избран Кгүррел-ген (*Kr*), который выполняет раннюю зиготную функцию в контролировании сегментации эмбрионов. *Kr*-ген удобен для использования в подобной работе тем, что его транскрипция происходит на определенной стадии развития эмбрионов. Это приводит к накоплению в них специфических поли(А)⁺ РНК-транскриптов длиной 2500 оснований. Транскрипты переводили в кДНК копии и затем клонировали в плазмиде в обеих ориентациях по отношению к *Sр6*-промотору. Используемый подход позволил получать *in vitro* в одном случае *Kr* мРНК, в другом — *Kr* асРНК. Щелочным гидролизом получали фрагменты асРНК длиной 120—130 оснований, и этот материал использовали для инъекции эмбрионов. У эмбрионов дикого типа, инъецированных на стадии синцитиальной бластодермы (в момент включения *Kr*-гена) препаратом асРНК, с высокой частотой развивались летальные *Kr*-фенокопии, введение же *Kr* мРНК не оказывало на эмбрионы никакого специфического эффекта. Обрашает

на себя внимание количество вводимого материала. Получение эффекта в 50 % случаев достигалось введением в эмбрионы $5 \cdot 10^8$ фрагментированных асРНК-транскриптов, что на три порядка превышает количество *Kr*-молекул мРНК, содержащихся в эмбрионах дрозофилы дикого типа. В работах не представлена количественная оценка эффективного отношения *in vivo* асРНК к эндогенному мРНК-транскрипту ввиду отсутствия данных о стабильности асРНК, а также о кинетических параметрах образования *in vivo* дуплексов РНК : РНК. Отмечается, однако, что, по-видимому, большинство вводимых незащищенных молекул асРНК быстро деградирует.

Блок экспрессии специфических генов с помощью эндогенно синтезируемых асРНК позволил получить фенкопии мутантов плесневого гриба *Dictyostelium*, дефектных по синтезу белка дискоидина I [21]. Участок гена дискоидина I длиной 320 п. о. был вырезан на удалении 120 п. о. от АУГ-кодона в сторону 3'-конца мРНК и повторно встроен в ту же плазмиду, но в обратной ориентации. Оставшаяся 3'-область гена была deletирована. В клетках, трансформированных такой плазмидной конструкцией, наблюдалось снижение более чем на 90 % уровня накопления дискоидина и его мРНК. Показано, что в этих клетках транскрипция как мРНК дискоидина, так и асРНК происходит нормально, т. е. механизм ингибирования не связан с конкуренцией за факторы транскрипции. Поскольку в цитоплазме ас-транскриптов авторам выявить не удалось, считается, что процесс образования гибридов мРНК : асРНК происходит в ядре, а сформировавшиеся дуплексы подвергаются быстрой деградации.

Замечательным примером обнаружения и дальнейшей экспериментальной проверки существующего в природе механизма регуляции генной экспрессии с помощью асРНК являются работы [22—27], проведенные на *E. coli* при изучении регуляции синтеза белков наружной мембраны. Эти белки — *OmpF* и *OmpC* — функционируют в качестве пор, через которые происходит диффузия малых гидрофильных молекул, и кодируются структурными генами *ompF* и *ompC*, а их экспрессия регулируется уровнем осмотического давления питательной среды. Повышение последнего приводит к снижению продукции *OmpF* с одновременным увеличением продукции *OmpC*, что обеспечивает постоянное суммарное количество этих белков. Сиквенс этих генов [22—24] позволил выявить уникальный механизм регуляции генной экспрессии, опосредованный новой разновидностью РНК, которая была названа *micRNA* (*mRNA-interfering complementary RNA*). Обнаруженная РНК длиной 174 нуклеотида кодируется независимой транскрипционной единицей, названной *micF*-геном, который расположен в 5'-направлении от гена *ompC*, но транскрибируется в обратном направлении. Было показано [25, 26], что этот РНК-транскрипт содержит участок длиной около 80 оснований, комплементарный 5'-концу мРНК белка *OmpF* в районе, охватывающем последовательность Шайн-Дальгарно и АУГ-кодон. По предположениям авторов, эта РНК, гибридизуясь с *OmpF* мРНК, блокирует ее трансляцию, т. е. является антисмысловой РНК по отношению к мРНК белка *OmpF*. Продукция этой РНК осуществляется пропорционально продукции мРНК белка *OmpC*, поэтому параллельно усилению его синтеза происходит нарастание транскрипции асРНК, способной блокировать экспрессию белка *OmpF*. В этом состоит механизм поддержания постоянства суммарного количества белков *OmpF* и *OmpC*.

В предварительных исследованиях экспериментально была доказана принципиальная возможность ингибирования экспрессии белка *OmpF* с помощью асРНК [26]. Для этого участок гена *ompC* длиной около 300 п. о. был вырезан выше промотора, сшит с геном β -галактозидазы и встроен в плазмиду. В клетках, трансформированных такой плазмидой, при воздействии изопропил- β -D-тиогалактозидом (ИПТГ) — индуктором лактозного оперона — наблюдали почти полное подавление синтеза белка *OmpF*. В препаратах РНК, выделенных из таких кле-

ток, были обнаружены молекулы около 6S, которые гибридизовались с встроенными в плазмиду ДНК-фрагментами гена *otrC*, в контрольных клетках подобной РНК выявлено не было. Кроме того, было показано, что в клетках, несущих плазмиду с информацией для асРНК, содержится существенно меньшее количество мРНК белка *OtrF*. Когда вместо участка гена *otrC* встраивали последовательность длиной 430 п. о. из аналогичной области гена *otrF*, ингибирующего эффекта не наблюдалось. То есть здесь также продемонстрирована специфичность действия асРНК, которая определяется нуклеотидной последовательностью и реализуется только на мРНК, содержащих комплементарные участки.

Обнаружение у прокариот асРНК-регуляторной системы побудило исследователей опробовать привлекательную возможность подавления экспрессии определенных (или любых) генов с помощью искусственно созданных конструкций, продуцирующих асРНК, комплементарные выбранным генам [27]. Ряд таких генов составляли мРНК белков наружной мембраны *E. coli*: липопротейна (*lpp*), *otrA* и *otrC*. С этой целью были сконструированы плазмиды, несущие ДНК-фрагменты указанных генов, встроенных в количестве одной — трех копий в обратной ориентации под контроль промотора лактозного оперона. Индукция таких плазмид с помощью ИПТГ стимулировала синтез в клетках асРНК-транскриптов, комплементарных мРНК соответствующих белков.

Ас-фрагмент гена *lpp* содержал 112 п. о., соответствующих 5'-концу мРНК и охватывающих последовательность Шайн—Дальгарно и участок, кодирующий первые 29 аминокислот с N-конца липопротейна. Клетки, несущие такую плазмиду, после индукции ИПТГ синтезировали в 16 раз меньше белка, чем контрольные клетки, не имевшие ее либо содержавшие исходную плазмиду без вставки ас-фрагмента. В клетках, содержавших плазмиду с двумя копиями ас-гена *lpp*, продукция липопротейна снижалась в 31 раз.

Сходные результаты были получены авторами и на клетках, трансформированных плазмидой, несущей ас-фрагмент *otrC*-гена. Среди вариантов этой плазмиды были конструкции, содержащие по 100 п. о., комплементарных кодирующему 5'-участку мРНК *otrC*, а из некодирующего (в 5'-направлении от АУГ-кодона) — одни содержали 20, другие — 72 п. о. Оказалось, что более длинные ас-транскрипты эффективнее ингибируют экспрессию гена-мишени. Увеличение числа копий ас-гена *otrC*, как и в опытах с *lpp*-геном, усиливает эффект ингибирования. Интересно, что плазмиды с ас-*lpp* и ас-*otrC* перекрестно ингибировали экспрессию как «своего», так и «чужого» белка. Оказалось, что мРНК для *lpp* и *OtrC* имеют неожиданно высокую степень гомологии 5'-концов, что объясняет перекрестную активность соответствующих асРНК, а также подтверждает зависящую от последовательности специфичность их действия.

Для решения вопроса о том, какой из фрагментов асРНК способен обеспечить наиболее выраженный эффект подавления экспрессии соответствующей мРНК, был сконструирован ряд плазмид, несущих ас-вставки, комплементарные различным участкам мРНК белка *OtrA*. Результаты экспериментов показали, что гибридизация асРНК с сайтом инициации белкового синтеза и/или с 5'-лидерным участком мРНК белка *OtrA* не имеет решающего значения для проявления ее ингибирующей активности. Так, фрагмент длиной 185 п. о., комплементарный только структурной части гена *otrA*, по активности даже несколько превосходил фрагмент длиной 258 п. о., содержащий как структурную часть этого гена, так и участок связывания с рибосомой. Не существенна как будто и длина ас-фрагментов, ибо вставки длиной 258 и 73 п. о. были равны по эффективности ингибирования продукции клетками белка А в отличие от гена *otrC*, где длина ас-транскриптов играла важную роль.

С другой стороны, на примере липопротейна была обнаружена иная закономерность. Две плазмиды со вставками ас-фрагментов, комплементарных участкам *lpp* мРНК, кодирующим аминокислотные остат-

ки с 3-го по 29-й и с 43-го по 63-й, обеспечивали только двукратное снижение синтеза продукта, в то время как фрагменты, перекрывающие сайт инициации трансляции мРНК, приводили к 16-кратному подавлению продукции липопротеина. То есть в данном случае наибольший эффект ингибирования прямо зависел от наличия в составе асРНК последовательности, перекрывающей участок связывания с рибосомой. Как нетрудно заметить, в работе [27] наряду с убедительными фактами о высокой активности асРНК имеются свидетельства об умеренной эффективности их действия. А именно, на примере гена *lpp* наблюдали снижение синтеза продукта в 16 раз, а экспрессия гена *ompA* подавлялась максимально только на 54 %. Плазмиды, содержащие две копии асРНК *lpp*-гена снижали экспрессию липопротеина в 31 раз, а двойной набор ас-генов *ompA* — только на 69 %. То есть возможности ингибирования разных генов с помощью асРНК-транскриптов сильно различаются. В обеспечении ингибиторной активности асРНК авторы цитируемой работы придают значение вторичной структуре этих молекул в виде двух стебле-петлевых образований. Однако конкретная их функция пока не выяснена.

Возможность использования асРНК, которую авторы, как и в прежних работах [25—27], именуют *micRNA*, для подавления репродукции вирусов была реализована в исследовании [28], где в качестве объекта служил колифаг *SP* — плюс-геномный вирус, содержащий однонитевую РНК, кодирующую четыре вирусных белка. В качестве мишеней были избраны гены белка оболочки и репликазы. Фрагменты А и В этих генов длиной 247 и 159 п. о. соответственно охватывали участок, включающий последовательность Шайн — Дальгарно и иницирующий кодон. Третий, С-фрагмент, представлял собой 3'-концевой участок генома, кодирующий С-конец репликазы. Названные фрагменты в виде кДНК были встроены в ас-ориентации в плазмиду *pIDC404* под контроль лактозного промотора-оператора. Рекомбинантные плазмиды содержали различные варианты вставок: *pMIC-A*, *pMIC-B* и *pMIC-C*, несущие фрагменты А, В и С соответственно, а также *pMIC-A:A*, *pMIC-A:В* и *pMIC-A:В:С*, содержащие различные комбинации фрагментов в одной плазмиде.

Исследования показали, что в трансформированных плазмидами клетках, обработанных перед инфицированием ИПТГ, происходит подавление репродукции фага *SP*. Наиболее выраженный эффект (95 %-ное ингибирование) наблюдался на клетках, несущих плазмиду *pMIC-A:В:С*. Ингибиторный эффект плазмид *pMIC-A:A* и *pMIC-A:В* составлял 91 %, а единичные копии фрагментов А, В и С обеспечивали эффект подавления на 61, 64 и 38 % соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что существенной активностью обладают асРНК, имеющие последовательности, комплементарные мРНК в участке, охватывающем последовательность Шайн — Дальгарно и иницирующий кодон.

Механизм ингибиторного действия асРНК, по крайней мере частично, объясняется подавлением синтеза белка, что было показано по снижению включения метки. Заслуживает, однако, внимания то обстоятельство, что эффект подавления репродукции фага вызывал С-фрагмент, не имеющий последовательности, перекрывающей участок связывания с рибосомой и АУГ-кодон. Обсуждая данный факт, авторы предполагают, что эта асРНК может препятствовать репликазе в процессе транскрипции плюс-нити геномной РНК в минус-нить образованном гибрида на 3'-конце фагового генома. Если ингибиторные свойства асРНК могут проявляться и на этапе транскрипции, то поиск стратегически важных геномных «мишеней» может открыть заманчивую перспективу воздействия на этот процесс хотя бы применительно к вирусам с однонитевым геномом.

Систему регуляции с помощью асРНК в качестве инструмента противовирусной защиты авторы называют «новой иммунной системой». Не вдаваясь в сравнения и поиски аналогий в устоявшихся представле-

ниях об иммунитете, можно согласиться с тем, что, если иммунная система на уровне полинуклеотидных макромолекул и не существует в природе, ее можно искусственно сконструировать и привести в действие. Самым убедительным аргументом в пользу обсуждаемого явления как иммунной системы служит факт высокой специфичности действия асРНК: они регулируют функцию только тех молекул, которые содержат комплементарные им последовательности, что является важным свойством в применении их для контроля вирусных инфекций или экспрессии определенных генов.

Если для прокариот наличие механизма генной регуляции с участием асРНК является установленным фактом, то на эукариотах доказательной информации на этот счет пока не получено, хотя имеются некоторые сведения, позволяющие предположить наличие подобного механизма и у высших организмов. Так, в пользу его существования у эукариот свидетельствуют данные [29], полученные в процессе изучения транскрипции гена ДГФР в мышинных клетках. Синтез этого фермента строго регулируется в процессе клеточного цикла и его резкое возрастание на определенной стадии развития клеток происходит благодаря усилению транскрипции с конститутивного промотора. Однако механизм, регулирующий пиковое повышение и снижение интенсивности транскрипции гена ДГФР, неизвестен. Проведенные исследования показали, что процесс транскрипции ДГФР сопровождается появлением в ядре серии поли(А)-РНК-транскриптов длиной 180—240 п. о., которые синтезируются в обратном направлении на нити ДНК, противоположной гену ДГФР.

Авторы не имеют оснований утверждать, есть ли у обнаруженных небольших РНК какое-либо функциональное назначение или они представляют собой случайные транскрипты, синтез которых идет с необычного промоторного участка, однако приводят ряд экспериментальных и логических доводов в пользу того, что их происхождение не связано с деградацией продуктов сплайсинга. Поскольку эти РНК-транскрипты имеют последовательность, комплементарную 10 нуклеотидам мРНК ДГФР в участке, прилежащем к стоп-кодону транскрипции, высказывается предположение, что спаривание комплементарных последовательностей этих транскриптов может оказывать регуляторное влияние на функционирование гена ДГФР. Следует отметить, что мРНК ДГФР была обнаружена как в ядре, так и в цитоплазме, в то время как маленькие поли(А)-РНК-транскрипты — только в ядре.

В контексте данного обзора обсуждаемые маленькие РНК вряд ли можно рассматривать как ас-ингибиторы трансляции мРНК. Их регуляторная роль, если она существует, вероятнее может касаться уровня транскрипции, возможность чего была показана на вирусной модели [28].

Возможность создания искусственной системы антикомплементарной регуляции экспрессии специфических транскриптов изучали также с использованием *lacZ*-гена *E. coli* как в про- [30, 31], так и эукариотической системах [32]. Фрагмент этого гена, кодирующий N-конец β-галактозидазы, начиная с 6-й аминокислоты, длиной с 19-го по 440-й нуклеотид, встраивали в плазмиду в ас-ориентации под контроль промотора P_L фага λ [30]. Регуляция продукции асРНК обеспечивалась другой плазмидой, синтезирующей термолabile репрессор, который при 30 °С выключает синтез *lacZ* ас-транскрипта связыванием λ-оператора. При 42 °С репрессор инактивируется, что ведет к запуску транскрипции асРНК. Исследование проводили на клетках *E. coli*, несущих плазмиду *pRC23* с встроенным лактозным опероном. Под влиянием ИПТГ при 42 °С в клетках происходило быстрое нарастание синтеза β-галактозидазы. Однако при наличии в клетках плазмиды, несущей анти-*lacZ*-последовательности, при тех же условиях синтез фермента подавлялся на 98 %. Более того, синтез тиагалактозид-трансацилазы и лактозной пермеазы тоже снижался на 80 и 55 % соответственно. Все три фермента синтезируются на одной полицистронной мРНК, причем

трансляция начинается с цистрона β -галактозидазы. Дистальнее расположены области для трансацилазы и пермеазы. Интересно, что чем дальше на полицистронной матрице расположены участки инициации трансляции соответствующих ферментов, тем менее чувствителен их синтез к ингибирующему влиянию асРНК. Авторы рассматриваемой работы объясняют это тем, что в клетке может происходить реинициация трансляции на соответствующих АУГ-кодонах, в то время как трансляция β -галактозидазы, последовательности которой в мРНК блокированы комплементарным ас-транскриптом, подавляется почти полностью. Специфичность ингибиторного эффекта асРНК по отношению к определенной первичной структуре подтверждается тем, что в использованной системе на уровень синтеза щелочной фосфатазы, транслируемой на другой мРНК, анти-*lacZ*-конструкции влияния не оказывали.

Зависимость ингибиторного эффекта ас-транскриптов от длины их молекул изучали в другой работе [31] на модели того же гена. Экспериментальная система включала ряд плазмид, содержащих разные участки кодирующей области *lacZ*-гена *E. coli*, встроенные в ас-ориентации под контроль оператора и промотора фага λ . Регуляция продукции асРНК, как и в предыдущей работе [30], обеспечивалась другой плазмидой, синтезирующей термолabileльный репрессор.

Плазида *pRK6* содержала вставку длиной 2990 п. о., комплементарную почти всей кодирующей области *lacZ*-гена, за исключением 22 п. о., кодирующих N-конец фермента, и 48 п. о., кодирующих его C-конец [31]. Плазида *pRK7* была получена из предыдущей и содержала 815 п. о. с N-кодирующего конца. Плазида *pRK8* включала только 367 п. о. из участка плазмиды *pRK6*, кодирующего карбоксильный конец полипептидной цепи. Эксперименты проводили на культуре *E. coli*, содержащей плазмиду *pRLC2833* со вставкой *lacZ*-гена.

В условиях, способствующих транскрипции мРНК фермента и его асРНК, в присутствии плазмиды *pRK6* активность β -галактозидазы составляла 20 % уровня ее активности в контрольной культуре, не содержащей плазмиды с ас-информацией. В культурах, несущих плазмиды *pRK7* и *pRK8*, эти показатели составляли 43 и 75 % соответственно. При этом авторы особо отмечают, что, хотя копияность плазмид для каждого из бактериальных штаммов была сравнима, они не могут исключить возможности того, что вариации в уровнях β -галактозидазы для каждого из четырех штаммов объясняются, по крайней мере частично, различиями в количестве плазмидных копий среди этих штаммов.

Полученные результаты свидетельствуют, что более длинные ас-транскрипты эффективнее блокируют синтез β -галактозидазы, хотя остается неясным, какие их участки в большей степени ответственны за проявление ингибиторного эффекта. В большинстве исследований по ас-ингибированию непереносимое условие эффекта составляло наличие комплементарности асРНК участку связывания с рибосомой мРНК-мишени. В данной же работе ни один из трех ас-транскриптов не содержал такого участка, поэтому механизм их ингибиторного действия объясняется не предотвращением связывания мРНК с рибосомой, а блокированием процесса элонгации полипептидной цепи как следствием образования РНК : РНК-дуплекса.

Логика дискуссии подсказывает предположение, что, если бы авторы сконструировали систему, продуцирующую асРНК, комплементарную 5'-концу мРНК β -галактозидазы с перекрытием последовательности Шайн — Дальгарно и иницирующего кодона, можно было бы ожидать большего ингибирующего эффекта при меньшей длине ас-транскрипта. Однако правомочность стратегии блока трансляции, основанной на использовании асРНК, комплементарных 5'-концу определенной мРНК, подвергается сомнению на том основании, что в случае полицистронных матриц эффект ингибирования не будет распространяться на рамки считывания, выходящие за пределы РНК : РНК-гибридных участков. Данное обстоятельство, по мнению авторов, диктует необхо-

димось конструирования систем, продуцирующих протяженные ас-транскрипты, комплементарные только кодирующим последовательностям мРНК. Обсуждается и еще один аргумент в пользу более длинных асРНК. Согласно одному из представлений о механизме действия асРНК, дуплексы последних с мРНК подвергаются быстрой деградации в клетке, что предотвращает синтез полипептида. Отсюда более длинные РНК:РНК-гибриды должны представлять собой более уязвимые мишени для деградирующих ферментов, что обеспечит надежное ингибирование нежелательной экспрессии.

Возможность ас-регуляции *lacZ*-гена *E. coli* была продемонстрирована также в клетках эукариот [32]. Из гибридной плазмиды *pSH110*, содержащей ген β -галактозидазы, был выделен его 5'-фрагмент длиной 2566 п. о., включая иницирующий кодон, и встроен в ту же плазмиду в обратной ориентации. При последующей совместной трансфекции (в соотношении 1:1) этими плазидами культуры мышечных фибробластов наблюдали 10-кратное снижение β -галактозидазной активности в сравнении с культурами, не имевшими плазмид с ас-вставками. В отличие от других подобных исследований в данной работе не отмечено усиления ингибирующего эффекта в ответ на увеличение числа вводимых ас-плазмид. При добавлении в трансфекционную смесь третьей плазмиды, содержащей ген фосфотрансферазы, наблюдалось ингибирование экспрессии только β -галактозидазного гена, фосфотрансферазная активность оставалась неизменной, что пополняет сведения о высокой специфичности действия асРНК.

Вряд ли правомочно сравнение результатов данной работы с цитированной выше [31] ввиду большого различия клеток-хозяев, однако можно предположить, что более выраженный эффект ингибирования того же гена [32] обусловлен наличием в ас-транскриптах 5'-области, перекрывающей сайт инициации трансляции *lacZ* мРНК.

Таким образом, рассмотренные публикации свидетельствуют о том, что в природе существует механизм регуляции генной экспрессии, исполнительным звеном которого являются малые РНК-транскрипты, комплементарные определенным мРНК, а данные экспериментов подтверждают возможность эффективного их использования в искусственных системах ингибирования экспрессии определенных генов.

Краткое заключение по рассмотренным публикациям можно изложить в нескольких пунктах.

1. Основанное на спаривании комплементарных участков ингибиторное действие асРНК носит характер высокой специфичности.
2. Высокая специфичность дает возможность выключать экспрессию отдельных генов, что позволяет в принципе получать аналоги генных мутаций как у прокариот, так и у высших организмов.
3. Путем подбора подходящих промоторных последовательностей возможно создание систем, продуцирующих ас-транскрипты как в конститутивном, так и индуцибельном, управляемом режиме.
4. Четкое ограничение области реального применения ас-регуляции в настоящее время не представляется осуществимым, однако задачу выведения сингенных животных (либо регенерации растений из протопластов), несущих в себе ас-систему «молекулярного иммунитета» против неопределенно широкого круга вирусов, в свете существующих данных уже сейчас можно рассматривать оптимистично.
5. Аппарат ас-ингибиторов применим также в изучении функций неизвестных генов, репрессии «вредных», а также для регуляции генов, определяющих дифференцировку и развитие.
6. Существующая пока неоднозначность в выборе конкретного участка мРНК, определяющего наибольшую ее уязвимость для ингибирования, диктует необходимость в каждом конкретном случае подбирать оптимальные детали ас-конструкции.
7. Основанные на экспериментальном материале, сформировались представления о механизме ас-репрессии, которые в общем виде сводятся к следующему. Образуя дуплексный гибрид с мРНК, асРНК

предотвращает ее транспорт в цитоплазму и дальнейшую трансляцию. Альтернативно, дуплексы не в состоянии связаться с рибосомой, что также исключает трансляцию. Обсуждается и возможность быстрой дегградации двуниевых гибридов в цитоплазме под действием нуклеаз.

Авторы цитированных в обзоре работ с разных позиций обсуждают всевозможные детали предполагаемых механизмов ас-регуляции, вопросы образования и стабильности РНК:РНК-дуплексов, смысл и значение отмеченной в большинстве экспериментов остаточной активности репрессированных генов и другие аспекты проблемы. Разнообразие эффектов и некоторая неоднозначность их толкований свидетельствуют о недостатке фактического экспериментального материала для четких и конкретных формулировок. Однако, судя по интенсивности накопления новых публикаций, недостающие сведения по механизму ас-репрессии вскоре будут получены.

ANTISENSE RNAs: A NOVEL MECHANISM FOR THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

A. D. Shved, S. B. Zolotukhin, G. Kh. Matsuka

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The data on natural mechanisms for antisense regulation of gene expression are summarized. The examples of experimentally tested regulatory activities of various antisense RNAs are also reviewed.

1. Simons R. W., Kleckner N. Translational control of *IS10* transposition // Cell.— 1983.—34, N 3.— P. 683—691.
2. Cesarini G., Banner D. W. Regulation of plasmid copy number by complementary RNAs // Trends Biochem. Sci.— 1985.— 10, N 8.— P. 303—306.
3. Inhibition of *ColEI* RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA / J. I. Tomizawa, T. Itoh, G. Selzer, T. Som // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 3.— P. 1421—1425.
4. Tomizawa J.-I. Control of *ColEI* plasmid replication: initial interaction of RNAI and the primer transcript is reversible // Cell.— 1985.— 40, N 3.— P. 527—535.
5. Tomizawa J.-I., Som T. Control of *ColEI* plasmid replication: enhancement of binding of RNAI to the primer transcript by the *Rom* protein // Ibid.— 1984.— 38, N 3.— P. 871—878.
6. Light J., Molin S. The sites of action of the two copy number control functions of plasmid *R1* // Mol. and Gen. Genet.— 1982.— 187, N 3.— P. 486—493.
7. Light J., Molin S. Post-transcriptional control of expression of the *repA* gene of plasmid *R1* mediated by a small RNA molecule // EMBO J.— 1983.— 2, N 1.— P. 93—98.
8. *IncF11* plasmid incompatibility product and its target are both RNA transcripts / D. D. Womble, X. Dong, R. P. Wu et al. // J. Bacteriol.— 1984.— 160, N 1.— P. 28—35.
9. Kunur C. C., Novick R. P. Plasmid *μ 1181* replication is regulated by two counter-transcripts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 3.— P. 638—642.
10. Hoopes B. C., McClure W. R. A *cII*-dependent promoter is located within the *Q* gene of bacteriophage λ // Ibid.— N 10.— P. 3134—3138.
11. Rezaian M. A., Symons R. H. Anti-sense regions in satellite RNA of cucumber mosaic virus form stable complexes with the viral coat protein gene // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 8.— P. 3229—3239.
12. Spenu A., Krause E., Dobberstein B. Translation efficiency of zein mRNA is reduced by hybrid formation between the 5'- and 3'-untranslated region // EMBO J.— 1985.— 4, N 9.— P. 2153—2158.
13. Izant J. G., Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis // Cell.— 1984.— 36, N 4.— P. 1007—1015.
14. Izant J. G., Weintraub H. Constitutive and conditional suppression of exogenous genes by anti-sense RNA // Science.— 1985.— 229, N 4711.— P. 345—352.
15. McGarry T. J., Lindquist S. Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible anti-sense RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— 83, N 2.— P. 399—403.
16. Kim S. K., Wold B. J. Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of anti-sense RNA // Cell.— 1985.— 42, N 1.— P. 129—138.
17. Harland R., Weintraub H. Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by anti-sense RNA // J. Cell. Biol.— 1985.— 101, N 3.— P. 1094—1100.

18. Melton D. A. Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation *in vivo* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 1.— P. 144—148.
19. Molecular genetics of Krüppel, a gene required for segmentation of the Drosophila embryo // A. Preiss, U. B. Rosenberg, A. Kienlin et al. // Nature.—1985.—313, N 5997.— P. 27—32.
20. Production of phenocopies by Krüppel anti-sense RNA injection into Drosophila embryos / U. B. Rosenberg, A. Preiss, E. Seifert et al. // Ibid.—N 6004.— P. 703—706.
21. Phenocopy of discoidin 1-minus mutants by anti-sense transformation in dictyostelium / T. E. Crowley, W. Nellen, R. H. Gamer, R. A. Firtel // Cell.—1986.—43, N 3.— P. 633—641.
22. Mizuno T., Wurtzel E. T., Inouye M. Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the *envZ* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 22.— P. 13692—13698.
23. Primary structure of the *ompF* gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12 / M. Inokuchi, N. Mutch, S. Matsuyama, S. Mizushima // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 21.— P. 6957—6968.
24. Mizuno T., Chou M.-J., Inouye M. A comparative study on the genes for three proteins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 11.— P. 6932—6940.
25. Mizuno T., Chou M.-J., Inouye M. Regulation of gene expression by small RNA transcript (micRNA) in *Escherichia coli* K-12 // Proc. Jap. Acad. Sci.—1983.—59, N 10.— P. 335—338.
26. Mizuno T., Chou M.-J., Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 7.— P. 1966—1970.
27. Coleman J., Green P. J., Inouye M. The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes // Cell.—1984.—37, N 2.— P. 429—436.
28. A novel immune system against bacteriophage infection using complementary RNA (micRNA) / J. Coleman, A. Hirashima, Y. Inokuchi et al. // Nature.—1985.—315, N 6020.— P. 601—603.
29. Farnham P. J., Abrams J. M., Schinke R. T. Opposite-strand RNAs from the 5'-flanking region of the mouse dihydrofolate reductase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 12.— P. 3978—3982.
30. Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules / S. Pestka, B. L. Daugherty, V. Jung et al. // Ibid.—1984.—81, N 23.— P. 7525—7528.
31. Ellison M. J., Kelleher R. J., Rich A. Thermal regulation of β -galactosidase synthesis using anti-sense RNA directed against the coding portion of the mRNA // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 16.— P. 9085—9087.
32. Rubenstein J. L. R., Nicolas J.-F., Jacob F. L'ARN non sense (nsARN) : un outil pour inactiver spécifiquement l'expression d'un gene donne *in vivo* // C. r. Acad. sci. C.—1984.—299, N 8.— P. 271—274.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 11.03.86