

УДК 578.286

І.В. КРУЛЬКО, Д.О. УСТЬЯНЕНКО, В.П. ПОЛІЩУК

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

E-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

РОЛЬ siRNA ТА miRNA У ПРОЦЕСАХ РНК-ЗАЛЕЖНОГО «МОВЧАННЯ» ГЕНІВ ПРИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЯХ



Явище РНК-індукованого «мовчання» генів є висококонсервативним механізмом серед еукаріотичних організмів. Декілька класів малих РНК (siRNA та miRNA) довжиною 21–25 нуклеотидів, що відіграють істотну роль у процесах розвитку організму, виявились важливими компонентами антивірусного захисту тварин і рослин. Даний огляд коротко описує основні етапи механізму «мовчання» генів, особливості антивірусного «мовчання» РНК у рослин, безхребетних, ссавців, шляхи супресії РНК-інтерференції вірусами, а також можливі підходи до використання згаданого феномену для боротьби з вірусними інфекціями.

© І.В. КРУЛЬКО, Д.О. УСТЬЯНЕНКО, В.П. ПОЛІЩУК, 2009

Вступ. У 1990 р. дві незалежні групи вчених з метою посилити фіолетове забарвлення квіток петунії додатково експресували у рослинах фермент синтетази, що приймає участь у синтезі пігменту, проте замість очікуваного кольору одержані квітки виявились абсолютно білими [1, 2]. Даний феномен отримав назву «косупресії», зважаючи на той факт, що транскрипція як трансгена, так і ендогенної послідовності була блокована.

Приблизно в той самий час молекулярні механізми схожого явища були вивчені на моделі *Caenorhabditis elegans* [3–5]. У *Caenorhabditis elegans* вперше Амброс та його колеги у 1993 р. відкрили малу РНК довжиною 22 нт – miRNA *lin-4* і показали, що мутації у нуклеотидній послідовності *lin-4* гальмували процес розвитку тварин таким же чином, як і мутації в блокувальному гені *lin-14*. Враховуючи той факт, що РНК *lin-4* могла комплементарно приєднуватись до транскрипту *lin-14*, була висунута ідея, що *lin-4* регулює РНК *lin-14* за допомогою РНК-РНК взаємодії з нетранслюючим 3'-кінцем останньої [6].

Подальші дослідження призвели до висновків, що «*lin-4* є представником широкого класу регуляторних генів, які кодують антисенсові РНК-продукти» [6]. Вони були названі класом риборегуляторів. Через три роки після перших відомостей про «мовчання» РНК у рослин [7] та за два роки до відкриття РНК-інтерференції у нематод була відкрита miRNA *lin-4*. На квітень 2006 р. база даних miRNAs містила 1650 різних miRNA генів, включаючи 227 генів людини та 21 вірус людини [8].

РНК інтерференція була також відкрита в клітинах людини [16], а у 2002 р. показаний зв'язок даного механізму із виникненням злоякісних пухлин у людини [17].

До кінця 2002 р. явище мовчання РНК дослідили у широкого спектра еукаріот. Воно отримало назву посттранскрипційного мовчання генів (ПТМГ) (англ. – post transcriptional gene silencing), косупресії (англ. – co-suppression) [18] та РНК-індукованої стійкості рослин до вірусів [19], РНК-інтерференції (англ. – RNA-interference) у тварин [20], «мовчання» або пригнічення генів (англ. – quelling) у грибів та водоростей [21]. Усі названі процеси мають один базовий механізм, проте різні мішені дії.

Сьогодні найкраще вивченими та описаними класами малих регуляторних РНК є siRNA

та miRNA, проте на даному етапі досліджень виділяють також підкласи siRNA (ta-si RNA, ga-si RNA, nat-si RNA [22]) та навіть окремі класи малих РНК, таких як tnc RNA та pi RNA (таблиця).

Механізм дії. Явище «мовчання» генів має механізм дії, що є подібним для організмів різних таксономічних груп – рослин, тварин, людини.

В основі процесу «мовчання» РНК лежить формування siRNAs та miRNAs з дволанцюгової РНК, що утворена з ендогенних транскриптів або длРНК екзогенного походження (рис. 2). ПТМГ з утворенням siRNA відбувається виключно у цитоплазмі, а процес утворення miRNAs також проходить як в ядрі [23].

Формування siRNA. Механізм ПТМГ включає такі стадії, як ініціація та встановлення процесу мовчання, а також поширення сигналу [24]. На стадії ініціації ключову роль грає формування дволанцюгової форми РНК. Така РНК може бути синтезована вірусним реплікативним апаратом, клітинною РНК-залежною РНК-полімеразою, що наявна в рослинних клітинах, або з РНК-шпильки, утвореної з двосторонньо-спрямованого трансгена або в результаті антисенсової стратегії клонування. ДлРНК пізнається та розрізається білком Dicer, що входить до III класу родини білків РНКазиди III та містить N-кінцевий DEXH домен РНК хелікази/АТФ-ази, два домени РНКазиди III (англ. – endoND) та длРНК-зв'язуючий домен (англ. – dsRBD). Більшість білків Dicer містять РНК-зв'язуючий PAZ-домен [25].

Кількість генів Dicer в різних організмах значно варіює. Наприклад, клітини *C. elegans* кодують тільки один білок Dicer [26, 27]. Клітини *Neurospora crassa* кодують два білки Dicer, які є поліфункціональними [28], в той час як обидва білки Dicer у *D. melanogaster* (Dcr1 та Dcr2) мають чітко визначені функції. Генотипом *A. thaliana* кодує чотири білки – гомологи Dicer (DCL): DCL1 приймає участь у процесінгу попередників miRNAs [29, 30], DCL2 та DCL4 необхідні для розрізання вірус-специфічних длРНК [31, 32], а DCL3 розрізає длРНК ендогенного походження [33].

Базуючись на структурному та біохімічному порівнянні ферменту РНКазиди III *Aquifex aeolicus*, залишків каталітичних доменів РНКазиди III *E. coli* та Dicer людини [34], можна припустити,

2006 р.

Li Q. et al. – малі длРНК індують експресію генів [9]

2006 р.

Fire A., Mello C. – Нобелівська премія за винайдення механізму РНК-інтерференції [10]

2003 р.

Song L. et al. – siRNAs можуть бути використані у терапевтичних цілях [11]

2001 р.

Tuschl et al. – вперше описали механізм РНК-інтерференції у ссавців [12]

2000 р.

Zamore P. et al. – в клітинах дрозофіли длРНК нарізається Dicer на фрагменти 21–23 нт [13]

1998 р.

Fire A. et al. – вперше описана РНК-інтерференція у *C. elegans* [14]

1995 р.

Guo S., Kemphues K. – сенсова РНК так само ефективна, як антисенсова для інгібування експресії генів в нематодах [15]

Рис. 1. Історичні віхи в галузі РНК-інтерференції

що молекули Dicer мають один ідентичний центр процесінгу РНК, який, будучи активованим, здатен розрізати один з ланцюгів длРНК (рис. 3).

Перший домен РНКазиди Dicer розрізає один ланцюг длРНК, що несе 3-гідроксильну групу приблизно в 21-му нуклеотиді від кінця РНК. В поєднанні з PAZ-доменом він, імовірно, є відповідальним за визначення відстані від кінця РНК до сайту розрізання [36]. PAZ-домен також приймає участь у розпізнаванні РНК-субстрату [37–39]. Аналогічно відбувається розрізання іншого ланцюга длРНК доменом RPIIb за 21–24 нт від місця розрізання доменом РНКазиди RPIIa, що в результаті призво-

Класи малих регуляторних РНК, що експресуються різними організмами

Клас малих РНК	Організм	Характеристика
Мікро РНК (micro RNA) *	Рослини Дрозофіла Нематоди Ссавці Людина	Клас малих РНК розміром 19–25 нт, що кодуються геномами більшості вивчених багатоклітинних організмів, а також вірусів. Призводять до блокування транскрипції та трансляції клітинних або вірусних генів. Функції приймають участь у онтогенезі, захисні функції
Малі інтерферуючі РНК (siRNA) *	Рослини Дрозофіла Нематоди Ссавці Людина	Клас длРНК розміром 21–22 нт, що походять з довгих молекул длРНК. siRNA призводять до супресії активності генів шляхом розрізання мРНК з комплементарними нуклеотидними послідовностями або регулюванням модифікацій комплементарної послідовності ДНК. Основна функція – захисна
ta-si RNA	Рослини Інші – ?	Клас малих РНК, що експресуються з некодуючих ділянок генів та викликають розрізання специфічних РНК. З одного гена TAS утворюється декілька ta-si RNAs, які супресують різні класи генів
nat-si RNA	Рослини Інші – ?	Клас малих РНК, що утворюється з частково комплементарних транскриптів гена SR05, який експресується у відповідь на сольовий стрес
ra-si RNA	Рослини Інші – ?	Клас малих РНК розміром 24 нт – регулятори метилювання ДНК та гістонів у певних ретроелементів та транспозонів
Маленькі некодуючі РНК (tnc RNA)	Нематоди Інші – ?	Клас малих РНК розміром 20–22 нт. Еволюційно неконсервативні. Формуються без утворення шпильки. Функція невідома
Маленькі модулюючі РНК (smRNA)	Ссавці Інші – ?	Клас малих длРНК. Регулюють експресію нейрон-специфічних генів лише у зрілих нейронах
PIWI-РНК (pi-RNA)	Дрозофіла Ссавці Інші – ?	Клас малих РНК, що експресуються з різних ділянок геному. Формуються без утворення шпильки. 5' та 3'-кінці – модифіковані. Функція – контроль транспозонів

* Основні класи малих РНК.

дить до формування продуктів з характерними кінцевими надлишковостями на 3'-кінцях длРНК – малих інтерферуючих РНК (англ. – small interfering RNAs (siRNA)) [33].

Наступним етапом є фаза встановлення мовчання РНК, яка розпочинається з моменту, коли siRNA, утворені Dicer, зв'язуються з комплексом білків, що має назву «комплекс мовчання, індукований РНК» (англ. – RNA-induced silencing complex (RISC)). При з'єднанні з siRNAs RISC переходить з неактивної форми у функціональну та призводить до розкручування дволанцюгових siRNA, їх приєднання до мРНК з комплементарною послідовністю та розрізання останньої.

Один з головних компонентів білкового комплексу належить до родини білків Argonaute та має назву AGO. Це білок з молекулярною масою близько 130 кДа, що містить такі домени,

як PAZ та PIWI [40]. На сьогодні описано три основні класи білків AGO, виходячи з їх амінокислотних послідовностей: підродина Argonaute, підродина Piwi та *C. elegans*-специфічна підродина [41]. У *A. thaliana* було знайдено 10 білків AGO [42], в той час як у *D. melanogaster* на сьогодні їх відомо 5, а у людини – 8. У *A. thaliana* білок AGO1 та близькоспоріднений з ним білок AGO10 відомі ще як PINHEAD/ZWILLE (PNH/ZLL), необхідні для розвитку та розмежування органів рослин за допомогою формування miRNAs [43, 44]. Мутанти *ago1* мають дефекти апікальних меристем та меристемної тканини кореня, подібні до таких, що спостерігаються у *pnh (ago10)* мутантів. Було встановлено, що в *ago1* мутантах AGO10 може замінити AGO1 в miRNA-індукованій регуляції детермінанти полярності листків PHABULOSA (PHB) [44].

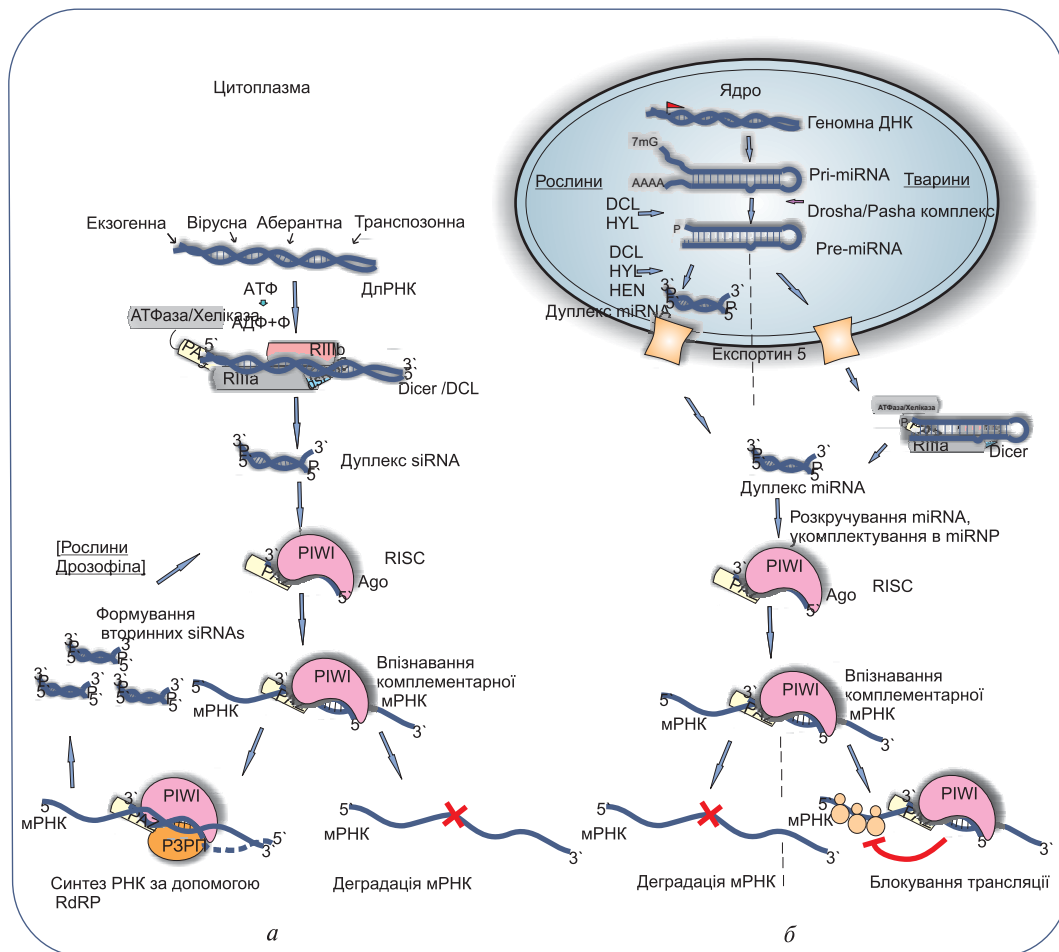


Рис. 2. Механізми «мовчання» генів, основані на формуванні siRNAs (а) та miRNAs (б)

Центральний домен PAZ білка AGO складається з 5–6 β -складок, які на одному з кінців мають α -спіралі [45]. PAZ-домен білка AGO виступає РНК-зв'язуючим фактором, що специфічно впізнає кінцеві надлишковості на 3'-кінцях siRNAs. Хеліказ, яка також входить до складу RISC, призводить до розкручування siRNA так, що зв'язаним з комплексом RISC залишається тільки один ланцюг siRNA [46].

Дані рентгеноструктурного аналізу домену PIWI археобактеріального білка AGO показали чітку подібність до білків родини РНКазиди Н [47]. PIWI домен розпізнає 5-фосфатні залишки siRNA подібно тому, як РНКазиди Н розрізає ланцюг РНК у РНК/ДНК дуплексах, і PIWI здатен розрізати РНК у РНК/siRNAs комплексах.

Таким чином, після того, як приєднаним до комплексу RISC залишається тільки один лан-

цюг siRNA, він комплементарно зв'язується з ділянкою мРНК, а домен PIWI білка AGO розрізає мРНК приблизно в середині ділянки, до якої приєднується siRNA. Специфічність siRNA-мРНК взаємодії є високою, і часто розбіжність навіть у одному нуклеотиді може різко інгібувати процес «мовчання» генів [48]. Активація мовчання РНК спочатку відбувається на рівні однієї клітини, після чого розповсюджується навколо зони ініціації, що відповідає приблизно 10–15 сусіднім клітинам. Первинні siRNA дифундують з цих клітин і надалі, викликаючи синтез так званих вторинних малих РНК (рис. 2). Ці вторинні siRNA здатні рухатись в сусідні клітини та викликати системне «мовчання» за рахунок подальшої ампліфікації [49].

В тваринних клітинах наявність длРНК не завжди запускає механізм мовчання генів, як

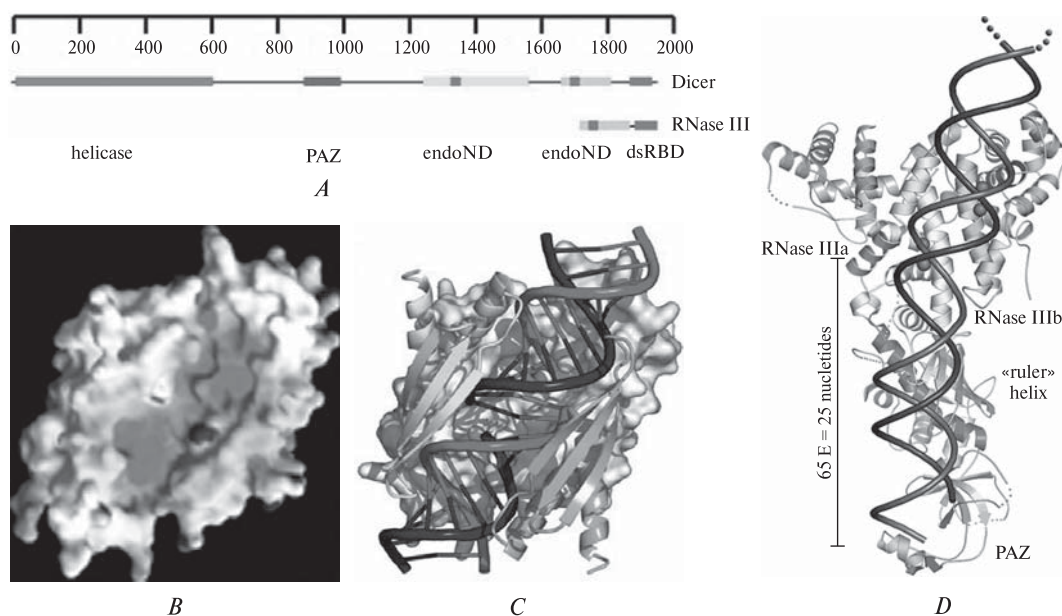


Рис. 3. Особливості структур РНКазі III та Dicer [35, 36]: *A* – структура доменів РНКазі III *Aquifex aeolicus* (Aa-RNase III, SWISS-PROT O67082) та Dicer *Homo sapiens* (Hs-Dicer, SWISS-PROT Q9UPY3), шкала відображає довжину поліпептидного ланцюга; *B* – зображення поверхні димера endoND; *C* – схематичне зображення комплексу Aa-RNase III з дЛРНК. Дві молекули endoND зображені на задньому плані рисунка; *D* – формування комплексу дЛРНК та білка Dicer (RNase IIIa та RNase IIIb відповідають доменам endoND)

це описано для рослинних клітин. В клітинах тварин при появі дЛРНК, як правило, включається механізм неспецифічного нокдауну генів та загибель клітини [50]. Така генералізована відповідь може бути викликана активацією РНКаз [51] або синтезом інтерферона [52].

Формування miRNAs. miRNAs, знайдені в геномі рослин, тварин та людини в залежності від свого розташування, можуть бути поділені на такі категорії: 1) екзонні miRNA (наприклад, miR-21 [53], miR-155 [54], кластер miR-23a-27a-24-2 [55]); 2) інтронні miRNA (наприклад, кластер miR-15a-16-1 в некодуєчій ділянці гена DLEU2 ссавців [55]).

Крім того, існує група РНК, змішаних за походженням. Їх послідовність в геномі розташована як у ділянці екзону, так і інтрону. Одним із прикладів є miRNA людини – has-miR-20a, що згідно з базою даних miRBase походить з екзону 2, а також з інтронів 5 та 8 транскриптів C13orf25 [56].

Першим етапом формування miRNA у ядрі є транскрипція miRNA за допомогою РНК-полімерази II та формування початкових транс-

криптів у вигляді шпильки, що складається приблизно з 70 нуклеотидів – pri-miRNA (від англ. primary – первинна). У рослин довгий первинний транскрипт розрізається ферментом DCL1 [57] для формування шпильки, що є менша за розміром та несе дві нуклеотидні 3'-кінцеві надлишковості на 3'-кінці – pre-miRNA (від англ. precursor miRNA – попередник miRNA), які потім знову розрізаються DCL1 та формують miRNA.

Дозрівання таких РНК-дуплексів потребує взаємодії DCL1 з білком HYL1, необхідним для зв'язування з РНК [58]. Кожен з ланцюгів дуплекса на 2-гідроксильній групі рибози 3'-кінця підлягає метилюванню метилазою HEN. Після необхідних модифікацій дуплекс потрапляє в цитоплазму за допомогою транспортного білка HASTY (HST) [59].

У тварин pri-miRNA розрізається білками Drosha (*D. melanogaster*) та Pasha (ссавці, людина), формуючи pre-miRNA, яка потрапляє у цитоплазму за допомогою експорину-5 [60]. У цитоплазмі pre-miRNA розпізнається та нарізається Dicer з подальшим формуванням miRNA

[61]. Як в рослинних, так і в тваринних клітинах дуплекси miRNA зв'язуються з RISC, формуючи рибонуклеопротеїновий комплекс miRNP [62]. За аналогією з процесом «мовчання» генів за допомогою siRNA відбувається розкручування дуплексу та комплементарне приєднання до РНК-мішені.

Тваринні miRNA приєднуються до декількох, імовірно частково комплементарних ділянок на 3'- та 5'-кінцях РНК та блокують процес трансляції, в той час як рослинні miRNA в основному зв'язуються зі специфічними кодуєчими білок-послідовностями РНК та викликають їх розривання [63]. 5'-фрагмент РНК, який утворюється після розривання останньої, підлягає деградації в екзосомах — тільцях Р [64], а 3'-кінець РНК розрізається екзонуклеазою XRN4 [65].

Антивірусне «мовчання» генів у рослин. Перші припущення, що «мовчання» РНК є ефективним захисним механізмом проти вірусних інфекцій у рослин, з'явилися із відкриттям того факту, що рослинні віруси ініціюють процес «мовчання» ендегенних мРНК завдяки наявності гомологічних послідовностей. Наприклад, мРНК гена фітоенової десатурази [66] підлягала процесу «мовчання» під час реплікації вірусу тютюнової мозаїки (TMV), який в своєму геномі мав послідовність рослинного гена [67]. Це призвело до формування нового поняття у рослинній вірусології — «вірус-індуковане мовчання генів» (VIGS).

Феномен «одужання» в подальшому продемонстрував, що віруси рослин підлягають «мовчанню» генів: трансгенні рослини, що були трансформовані білком оболонки (СР) вірусу гравіровки тютюну (TEV) та інфіковані даним вірусом, проявили симптоми на інкульованих листках, проте нові листки на рослинах тютюну вже не мали вірусних симптомів, а рослини набули стійкості до суперінфекції TEV [68]. Дана резистентність була асоційована з повною деградацією як мРНК СР TEV, так і РНК трансгена.

Справжнім доказом того, що «мовчання» генів є важливим механізмом захисту рослин від вірусів, стало відкриття того, що siRNA, отримані в результаті «мовчання» вірусної РНК, під час інфекції накопичуються в рослинах у великій кількості.

Кількість генів, що кодують miRNA, у різних видів рослин [69] (* — рослини з повністю секвенованим геномом)

<i>Arabidopsis thaliana</i> *	117
<i>Oryza sativa</i> *	178
<i>Populus trichocarpa</i> *	213
<i>Zea mays</i>	97
<i>Sorghum bicolor</i>	72
<i>Glycine max</i>	22
<i>Medicago truncatula</i>	16
<i>Saccharum officinarum</i>	16

Антивірусне «мовчання» генів у безхребетних. Комахи. Процес «мовчання» РНК був описаний і для багатьох видів членистоногих, включаючи дрозофіл [70] і комарів [71]. Перші спостереження цього явища у комах датуються 2002 р. — на клітинах *Drosophila* S2, інфікованих вірусом Flock House родини *Nodaviridae*. Li et al. [72] спостерігали накопичення siRNA в інфікованих клітинах, а також підсилене накопичення вірусу в клітинах, що містили мутації у гені *ago2*.

Вірус-індуковане «мовчання» генів спостерігалось у шовкопряда *Bombyx mori*, у якого трансляція фактора транскрипції Broad-Complex (BR-C) пригнічувалась інфекцією рекомбінантного альфа-вірусу Sindbis, що експресував РНК, антисенсову до BR-C [73]. Roignant et al. [74] довели, що у *Drosophila* не відбувається розповсюдження процесу «мовчання» по організму, а даний процес залишається обмеженим лише до тих клітин, де він виник. «Мовчання» РНК, спрямоване проти ендегенних та екзогенних нуклеотидних послідовностей, дуже подібне тому, що діє проти екзогенних патогенів. Однак наявність механізму «мовчання» РНК чужорідних вірусних послідовностей у комах ще не доведена.

Нематоди. На відміну від дрозофіли процес «мовчання» генів у нематод є мобільним і розповсюджується по цілому організму [75]. Fire et al. [76] показали, що ін'єкції длРНК у тіло або гонади молодих особин *C. elegans* призводили до генно-специфічної інтерференції в соматичних тканинах. Геном *C. elegans* містить два гени RdRP, *ego-1* та *rif-1*, необхідні для «мовчання» РНК в зародках та соматичних тканинах [77, 78]. Нещодавно було показано, що більшість з siRNA, утворених під час процесу «мовчання» генів у нематод, складали вторинні siRNA — тобто такі, що були утворені з

длРНК, синтезованої після першого раунду «мовчання» [79]. У нематод «мовчання» РНК відіграє значну роль при захисті геному від транспозонів [80], проте інтерес викликає питання можливості використання РНК-інтерференції як антивірусного явища. Так, було показано, що реплікація вірусу везикулярного стоматиту (VSV) була підсилена у нематод, мутантних за комплексом *rde-4-rde-1*. Також зазначено, що розвиток інфекції підсилюється у нематод, які мали мутації у генах *rrf-3* та *eri-1* – двох негативних регуляторів інтерференції. Lu et al. [81] показали неможливість реплікації вірусу Flock House у видах *C. elegans*, що несуть інтегрований трансген, кодуєючий повнорозмірну РНК вірусу. Антивірусна відповідь потребувала активності RdRP та могла бути пригнічена вірус-кодуєчим білком B2 [82].

Антивірусне «мовчання» генів у ссавців. Tusch et al. [83] спробували ідентифікувати siRNA у клітинах тварин, інфікованих різними вірусами. Вони не знайшли ані вірусних siRNA, ані малих ендогенних РНК, отриманих з транспозонних елементів. Це призвело до припущення, що на відміну від рослин, комах та нематод транспозони ссавців не підлягають супресії за допомогою siRNA. Однак вони ідентифікували малі РНК, що існували у вигляді шпильок і в свою чергу могли ініціювати РНК-інтерференцію.

Lecellier et al. [84] перші продемонстрували, що miRNA ссавців *mir-32* зупиняє акумуляцію пінного вірусу приматів I типу (PFV-1) у клітинах людини. Клітинні лінії, які експресують вірусний білок Tas, що перешкоджає механізму РНК-залежного «мовчання» генів, накопичують велику кількість вірусу. Мутації у нуклеотидній послідовності зазначеного вірусного білка призводили до втрати вірусом здатності реплікуватися та накопичуватися у клітинах. Доведено, що Tas є неспецифічним блокатором процесу мовчання генів і що клітини, які не експресують даний супресор, мають підвищену активність miRNA – *mir32*. Ці дослідження доводять антивірусну роль miRNA, а також демонструють супресорну дію вірусного білка.

В ході досліджень були відкриті miRNA людини, що експресуються у відповідь на інфекцію, викликану вірусом грипу, та приймають

участь у блокуванні генів, критичних для патогенезу та тропізму вірусу грипу типу А/Н5N1. У людини дві miRNA, *mir-507* та *mir-136*, мають сайти зв'язування з генами вірусної полімерази та гемаглютиніну [85]. Додатковим доказом того, що синтезовані miRNA виконують антивірусну функцію, є той факт, що *mir-136* експресується виключно у легенях [86]. Цікавим фактом стало те, що miRNA до полімерази мишачого штаму були відсутні в геномі курчати, хоча велика кількість miRNA людини (160 з 336 miRNA) мають гомологи у пташиному геномі [87].

Супресія «мовчання» генів вірусами. Враховуючи той факт, що більшість живих організмів використовує «мовчання» генів як ефективний засіб боротьби з вірусними інфекціями, можна припустити, що за таких умов вірус не міг би реплікуватися ефективно, проте у відповідь на захисні реакції організму віруси використовують механізми, які б дозволяли їм уникати згубної дії явища «мовчання». В основному це досягається шляхом синтезу вірусних білків, які здатні блокувати певні стадії процесу «мовчання» РНК. Спостереження за симптомами, викликаними на рослині одним вірусом та декількома неспорідненими вірусами одночасно, призвело до розуміння питання супресії «мовчання» генів. Потівірус Y-вірус картоплі (PVY) значно підсилює реплікацію X-вірусу картоплі (PVX) при змішаній інфекції. Цей факт дозволяє припустити, що PVY має механізм супресії захисної дії хазяїна. На сьогодні вже відомо, що білком, який відповідає за даний ефект у потівірусів, виступає HC-Pro-допоміжний компонент – протеїназа, яка була здатна призводити до супресії «мовчання» репортерного гена зеленого флюоресціюючого білка (GFP) в трансгенних рослинах [88]. Подальші спостереження показали, що явище гальмування або супресії «мовчання» генів є загальною властивістю якщо не для всіх, то для більшості вірусів рослин [89]. Цікавим фактом є те, що білки, які відповідають за даний феномен, у різних вірусів абсолютно різні за амінокислотною послідовністю та структурою і кодуються як ДНК-, так і РНК-вмісними вірусами [90]. Вірогідно, це пов'язано з існуванням великої кількості мішеней для цих білків, про що також свідчить той факт, що вірусні суп-

ресори «мовчання» генів діють на різних стадіях описаного процесу деградації РНК. Найбільш вивченим вірусним супресором у рослин є білок р19, що експресується представниками роду *Tombusvirus*. В результаті досліджень показано, що білок р19 вірусу кільцевої плямистості одонтогლოსуму (ORSV) здатен приєднуватися тільки до дволанцюгових РНК довжиною 21 пнт з 3'-кінцевими надлишковостями, тобто до таких малих РНК, що мають всі характеристики siRNA. Більше того, р19 вірусу кушистості верхівок томатів, близькоспорідненому до ORSV, підлягає ко-імунопреципітації з siRNA [91]. Кристалографічні дані білка р19 вказують на те, що томбусвірусний супресор діє за принципом клешнів, які «охоплюють» siRNA, специфічно ідентифікуючи дуплекс РНК незалежно від нуклеотидних послідовностей [92]. Таким чином, siRNA не підлягають розкручуванню та зв'язуванню з комплексом RISC. Приблизно таким же чином діє супресор В2 вірусу тварин Flock House, охоплюючи та блокуючи молекули дволанцюгових РНК, які утворюються при реплікації геномної РНК вірусу [93]. Білки NS1 вірусу грипу та Е3L вірусу віспавакцини є також супресорами мовчання та діють шляхом зв'язування дволанцюгових РНК [94].

РНК-інтерференція як метод антивірусного захисту. Процес РНК-інтерференції, або «мовчання» генів, може бути ефективно використаний для супресії реплікації вірусів шляхом пригнічення вірусних або господарських генів, необхідних для реплікації вірусу. Супресія таких вірусних генів, як вірусна полімераза, регулятори транскрипції вірусних генів або пригнічення вірусних генів, що є активними на ранніх стадіях вірусної інфекції, є дуже перспективною при антивірусній терапії. На сьогодні дослідження *in vitro* показують безумовну ефективність РНК-інтерференції при супресії будь-якого виду вірусу незалежно від типу нуклеїнової кислоти вірусу.

Нині ведеться активний пошук різних варіантів отримання трансгенних рослин, резистентних до вірусів. Так, була отримана РНК-індукована резистентність у рослин картоплі до PVY за допомогою трансформації рослин геном вірусної реплікази *Nib* [95]. Рослини *Nicotiana benthamiana* показали високий рівень стій-

кості до вірусу шарки сливи після трансформації геном *Nib* [96]. Трансгенний клон європейської сливи був високорезистентним до хвороби шарки внаслідок трансформації геном білка оболонки вірусу віспи сливи [97]. «Мовчання» РНК послідовності Р1/НС-Pro в трансгенних рослинах сливи призводило до передбачуваної стійкості до вірусу шарки сливи [98].

На сьогодні вже розроблені підходи по використанню механізму РНК-інтерференції для антивірусної терапії, спрямованої проти найважливіших збудників вірусних хвороб людини, таких як вірус імунодефіциту людини (HIV), вірус гепатиту В (HBV), вірус гепатиту С (HCV) та вірус грипу. Jacques et al. показали siRNA-опосередковане гальмування ранніх та пізніх етапів у реплікації HIV, що унеможливило синтез комплементарної ДНК з РНК-матриці вірусу. Зараз виділені декілька вірусних послідовностей-мішеней, що атакуються специфічними до них siRNA: *Gag* [99] та *Env* [100], ген зворотної транскриптази *Pol* [99], гени, що кодуєть регуляторні білки – *Tat*, *Rev*, *Nef* та *Vif* [101].

Декілька ділянок геному HCV, включаючи 5'UTR та кодуєчі ділянки *Core*, *NS3*, *NS4B* та *NS5B*, є чутливими до дії siRNA [102]. Терапевтичний потенціал механізму «мовчання» РНК був надалі вивчений у системі *in vivo*.

Wu et al. [103] показали ефективність siRNAs проти вірусу грипу. siRNA специфічно супресували консервативні ділянки вірусних генів нуклеокапсиду та полімерази. В ході досліджень доведено, що активність вірусу значно зменшувалась як в системі *in vitro*, так і *in vivo*.

Використання процесу «мовчання» генів для захисту від вірусних інфекцій було показано також і для ДНК-вмісних вірусів. Зокрема, для HBV декілька сайтів геному використовуються як мішені для зазначеного механізму [104].

Процес РНК-залежного антивірусного «мовчання» генів активно тестується і для коронавірусів у зв'язку з відсутністю ефективних методів лікування або вакцин. Дослідження *in vitro* та *in vivo* показали ефективність використання синтетичних малих РНК з метою супресії 3'UTR, генів неструктурних та структурних білків коронавірусу, що викликає тяжкий гострий респіраторний синдром (SARS-CoV) [105]. Значного інгібування розвитку вірусного

захворювання вдалось досягти шляхом трансформації з використанням висококонсервативних ділянок вірусного геному. Нещодавні дослідження показали, що ділянка, яка є консервативною для ряду флавівірусів, призводила до «мовчання» як вірусу японського енцефаліту, так і вірусу Західного Нілу [106]. На системі «вірус – рослина» отримані рослини, які в геномі мають два або три трансгени вірусного походження і призводять до «мовчання» цих же генів у вірусному геномі.

Висновки. Явище «мовчання РНК» є висококонсервативним механізмом у представників як тваринного, так і рослинного світу та відіграє значну роль у процесах розвитку організму та антивірусного захисту. В основі механізму лежить пізнавання комплексами клітинних білків дволанцюгової РНК екзогенного або ендогенного походження та нарізання на siRNA або miRNA. Один з ланцюгів даних дуплексів комплементарно зв'язується з РНК-мішенню, яка розрізається білками RISC.

Процес РНК-інтерференції, або «мовчання» генів, може бути ефективно використаний для супресії реплікації вірусів шляхом пригнічення вірусних або господарських генів, необхідних для реплікації вірусу. На сьогодні вже розроблені підходи по використанню механізму «мовчання» РНК для антивірусної терапії, спрямованої проти найважливіших збудників вірусних хвороб. Цей феномен може бути ініційованим при використанні siRNAs *in vitro* та *in vivo*, шляхом експресії мРНК з трансгену. Мовчання РНК нині активно використовується для отримання трансгенних рослин, стійких до патогенів вірусної етіології, а також має значну перспективність при використанні для боротьби з вірусними інфекціями людини та тварин.

I. Krulko, D. Ustyanyenko, V. Polischuk

ROLE OF siRNAs AND miRNAs IN THE PROCESSES OF RNA-MEDIATED GENE SILENCING DURING VIRAL INFECTIONS

Phenomenon of RNA-induced gene silencing is a highly conservative mechanism among eukaryotic organisms. Several classes of small RNAs (siRNAs and miRNAs) 21–25 nt in length, which play a significant role in the processes of development of an organism, occurred important components of antiviral defence in animals and plants. This review shortly describes the main stages of gene

silencing mechanism, features of antiviral RNA silencing in plants, invertebrates, mammals, ways of suppression of RNA-interference by viruses, as well as possible approaches of utilization of abovementioned phenomenon for struggling against viral infections.

I.V. Krulko, D.A. Ustyanyenko, V.P. Polischuk

РОЛЬ siRNA И miRNA В ПРОЦЕССАХ РНК-ЗАВИСИМОГО «МОЛЧАНИЯ» ГЕНОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Явление РНК-индуцированного «молчания» генов является высококонсервативным механизмом среди эукариотических организмов. Несколько классов малых РНК (siRNA и miRNA) длиной 21–25 нт, которые играют существенную роль в процессах развития организма, оказались важными компонентами антивирусной защиты животных и растений. Настоящий обзор кратко описывает основные этапы механизма «молчания» генов, особенности антивирусного «молчания» РНК у растений, беспозвоночных, млекопитающих, пути супресии РНК-интерференции вирусами, а также возможные подходы по использованию упомянутого феномена для борьбы с вирусными инфекциями.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.* Introduction of a chimeric calzone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *Plant Cell.* – 1990. – **2.** – P. 279–289.
2. *Van der Krol A.R. et al.* Functional analysis of the cellular RNA-directed RNA polymerase // *Plant Cell.* – 1990. – **2.** – P. 291–295.
3. *Guo S., Kemphues K.J.* Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Serine kinase that is asymmetrically distributed // *Cell.* – 1995. – **81.** – P. 611–620.
4. *Fire A. et al.* Potent and specific genetic interference by double stranded RBA in *C. elegance* // *Nature.* – 1998. – **391.** – P. 806–811.
5. *Elbashir S. et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs // *Methods.* – 2002. – **26.** – P. 199–213.
6. *Vella M.C., Slack F.J. C. elegans* microRNAs // *WormBook.* – 2005. – **21.** – P. 1–9.
7. *Wilson T. et al.* Strategies to protect crop plants against viruses : Pathogen derived resistance blossoms // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1993. – **90.** – P. 3134–3141.
8. *Chiromatzo T. et al* miRNAPath: a database of miRNAs, target genes and metabolic pathways // *Genet. Mol. Res.* – 2007. – **6(4).** – P. 859–865.
9. *Li Q. et al.* Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103(46).** – P. 17337–17342.
10. *Fire A. et al.* Potent and specific genetic interference by

- double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 1998. — **391**(6669). — P. 806–811.
11. Song L. et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminate hepatitis // Nat. Med. — 2003. — **3**. — P. 347–351.
 12. Elbashir S., Tusch T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells // Nature. — 2001. — **411**(6836). — P. 494–498.
 13. Zamore P. et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals // Cell. — 2000. — **101**(1). — P. 25–33.
 14. Fire A., Melo C. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html
 15. Guo S., Kemphues K. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed // Cell. — 1995. — **81**(4). — P. 611–620.
 16. Zeng Y. et al. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm // RNA. — 2002. — **8**. — P. 855–860.
 17. Gartel A. et al. RNA interference in cancer // Biomol. Eng. — 2006. — **23**(1). — P. 17–34.
 18. Jorgensen R. et al. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states // Science. — 1995. — **268**(5211). — P. 686–691.
 19. Lomonosoff G.P. et al. Pathogen-derived resistance to plant viruses // Ann. Rev. Phytophthol. — 1995. — **33**. — P. 323–343.
 20. Zamore D., Tomari Y. Perspective: machines for RNAi // Genes and Developm. — 2005. — **19**. — P. 517–529.
 21. Rickford A. et al. Quelling in *Neurospora crassa* // Adv. Genet. — 2002. — **46**. — P. 277–303.
 22. Borsani O. et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis* // Cell. — 2005. — **123**. — P. 1279.
 23. Lund E. et al. Nuclear export of micro RNA precursors // Science. — 2004. — **2**(303). — P. 95–98.
 24. Mlotshwa S. et al. RNA silencing and the mobile silencing signal // Plant Cell. — 2002. — **14**. — P. 289–301.
 25. Noah C., Welker N. Genes misregulated in *C. elegans* deficient in Dicer, RDE-4, or RDE-1 are enriched for innate immunity genes // RNA. — 2007. — **13**. — P. 1090–1102.
 26. Ketting R.F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* // Genes and Developm. — 2001. — **15**(20). — P. 2654–2659.
 27. Ketting R.F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* // Genes and Developm. — 2001. — **15**. — P. 2654–2659.
 28. Catalanotto C. et al. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa* // Mol. and Cell. Biol. — 2004. — **24**. — P. 2536–2545.
 29. Zhixin X. et al. Dicer-like 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2005. — **102**(36). — P. 12984–12989.
 30. Comella P. et al. Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in *Arabidopsis* // Nucl. Acids Res. — 2007. — **14**. — P. 345–349.
 31. Xiang L. et al. Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes // RNA. — 2006. — **12**. — P. 1514–1520.
 32. Du Q. et al. DCL4 targets Cucumber mosaic virus satellite RNA at novel secondary structures // J. Virol. — 2007. — **81**(17). — P. 9142–9151.
 33. Xie Z. et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants // PLoS Biol. — 2004. — **2**. — P. 102–104.
 34. Zhang I., Kolb F.A. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III // Cell. — 2004. — **118**. — P. 57–68.
 35. Gan J. et al. The mechanism of Double-stranded RNA processing by ribonuclease III : How Dicer dices // Cell. — 2006. — **124**. — P. 355–399.
 36. Ian J., MacRae J. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer // Science. — 2006. — **13**(311). — P. 195–198.
 37. Ungel A. et al. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain // Nature (London). — 2003. — **426**. — P. 465–460.
 38. Song J. et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes // Nat. Struct. Biol. — 2003. — **10**. — P. 1026–1032.
 39. Yan K. et al. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain // Nature (London). — 2003. — **426**. — P. 468–474.
 40. Song J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity // Science. — 2004. — **3**(305). — P. 5689–5696.
 41. Yigit E. et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute subfamily reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi // Cell. — 2003. — **127**. — P. 747–757.
 42. Bentwich I. et al. The expression of Argonaute 2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts // Nat. Genet. — 2005. — **37**. — P. 766–771.
 43. Bhattacharya T. et al. Argonaute and company: sailing against the wind // Cell. — 2007. — **128**. — P. 322–328.
 44. McConnell S. et al. Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots // Nature. — 2001. — **411**. — P. 709–713.
 45. Soon J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC Slicer activity // Science. — 2004. — **305**. — P. 925–929.
 46. Meister G., Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by dou-

- ble stranded RNA // Nature. — 2004. — **431**. — P. 343–349.
47. Hall T.M. et al. Structure and function of Argonaute proteins // Structure. — 2005. — **13**(10). — P. 1403–1408.
 48. Dykxhroon D. et al. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs // Gene therapy. — 2006. — **1**. — P. 12–16.
 49. Sijen S. et al. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class // Science. — 2007. — **315**(5809). — P. 244–247.
 50. Diallo L. et al. Endogenous dsRNAs can induce complete gene silencing in mammalian cells and primary cultures // Oligonucleotides. — 2003. — **13**(5). — P. 381–392.
 51. Matsumoto S. et al. Analysis of dsRNA-induced apoptosis pathways using IFN response-noninducible siRNA expression vector library // J. Biol. Chem. — 2005. — **14**. — P. 546–548.
 52. Zuniga L. et al. Production of interferon-alpha induced by dsRNA in human peripheral blood mononuclear cell cultures: role of priming by dsRNA-induced interferons-gamma and -beta // J. Interferon. Res. — 1989. — **9**(4). — P. 445–456.
 53. Asangani I. et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer // Oncogene. — 2007. — **10**. — P. 1038–1043.
 54. Peggy S. et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2005. — **102**(10). — P. 3627–3632.
 55. Saini H.K. et al. Genomic analysis of human microRNA transcripts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2007. — **104**(45). — P. 17719–17724.
 56. Narry K. et al. Genomics of micro RNA // Trends Genet. — 2006. — **22**(3). — P. 165–171.
 57. Шурина Т.В., Бобровская М.Т., Козлов Э.А. МикроРНК: от фундаментальных исследований до их приложения // Биополимеры и клетка. — 2007. — **23**, № 6. — С. 467–482.
 58. Akihiro M. et al. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. — 2005. — **57**(2). — P. 173–188.
 59. Krista M. et al. BollmanHASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis // Development. — 2003. — **130**. — P. 1493–1504.
 60. Narry K. et al. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export // Trends Cell Biol. — 2005. — **14**(4). — P. 156–159.
 61. Carrington A. et al. Role of microRNAs in plant and animal development // Science. — 2003. — **17**. — P. 336–339.
 62. Schwarz D., Zamore P. Why do miRNAs live in the miRNP? // Genes and Developm. — 2002. — **16**(9). — P. 1025–1031.
 63. Vasquez F. et al. Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways // Trends Plant Sci. — 2004. — **11**(9). — P. 460–468.
 64. Dykxhroon D. et al. P-bodies and RNAi: the missing link? // J. RNAi and Gene Silenc. — 2006. — **2**(1). — P. 105–106.
 65. Gazzani S. et al. Arabidopsis XRN4 degrades aberrant RNA that initiates posttranscriptional gene silencing // Cell and Dev. Biol. — 2006. — **13**(4). — P. 164–167.
 66. Goodwin T. et al. The biochemistry of the carotenoids // Plants. — 1980. — **1**. — P. 377–380.
 67. Kumagai S. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1995. — **92**. — P. 1679–1683.
 68. Lindbo J., Dougherty W. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts // Virology. — 1992. — **189**. — P. 725–733.
 69. Griffiths-Jones S. et al. miRBase: microRNA sequence, targets and gene nomenclature // Nucl. Acids Res. — 2006. — **34**. — P. 140–144.
 70. Clemens J. et al. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — **97**(12). — P. 6499–6503.
 71. Sanches-Varqas I. et al. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes // Virus Res. — 2004. — **102**(1). — P. 65–74.
 72. Li H. et al. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus // Science. — 2002. — **296**(5571). — P. 1319–1321.
 73. Uhlirova M. et al. Use of Sindbis virus-mediated RNA-interference to demonstrate a conserved role of broad-complex in insect metamorphosis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2003. — **100**(26). — P. 15607–15612.
 74. Roignant J. et al. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila* // RNA. — 2003. — **9**. — P. 299–308.
 75. Winston W. et al. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1 // Science. — 2002. — **10**. — P. 1126–1132.
 76. Fire A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 1998. — **391**. — P. 806–811.
 77. Makeyev E., Bamford D. Cellular RNA-Dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes // Mol. Cell. — 2001. — **10**(6). — P. 1417–1427.
 78. Grishok A. et al. Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans* // Genes and Developm. — 2005. — **19**. — P. 683–696.

79. *Cogoni C., Macino G.* Post transcriptional gene silencing across kingdoms. Current opinion in genetics and development. – 2000. – **10** (6). – P. 638–643.
80. *Pak J., Fire A.* Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans* // Science. – 2007. – **12**. – P. 241–244.
81. *Lu R. et al.* Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. – 2005. – **436**(7053). – P. 1040–1043.
82. *Ketting R. et al.* Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD // Cell. – 1999. – **99**(2). – P. 133–141.
83. *Tusch T., Borkhardt A.* Small interfering RNAs // Mol. Intervent. – 2002. – **2**. – P. 158–167.
84. *Lecellier C., Dunoyer P. et al.* A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells // Science. – 2005. – **308**. – P. 557–560.
85. *Scaria V. et al.* Host-virus interaction: a new role for miRNAs // Retrovirology. – 2006. – **3**(68). – P. 776.
86. *Williams A., Moschos S. et al.* Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development // Dev. Dyn. – 2007. – **236**. – P. 572–580.
87. *Fu H., Tie Y., Xu C.* Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method // FEBS Lett. – 2005. – **579** (17). – P. 3849–3854.
88. *Gammelgard J. et al.* Potyvirus-induced gene silencing: the dynamic process of systemic silencing and silencing suppression // J. Gen. Virol. – 2007. – **88**. – P. 2337–2346.
89. *Roth B. et al.* Plant viral suppressors of RNA silencing // Virus Res. – 2004. – **102**. – P. 97–108.
90. *Anandalakshmi R. et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – **95**(22). – P. 13079–13084.
91. *Dunoyer P. et al.* Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing // Plant Cell. – 2004. – **16**. – P. 1235–1250.
92. *Park J. et al.* The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein // Virology. – 2004. – **323**(1). – P. 49–58.
93. *Linquel A. et al.* The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition // EMBO Rep. – 2005. – **6**(12). – P. 1149–1155.
94. *Delgado O. et al.* Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants // J. General Virol. – 2004. – **85**(4). – P. 993–999.
95. *Schubert J., Matousek J., Mattern D.* Pathogen-derived resistance in potato to Potato virus Y-aspects of stability and biosafety under field conditions // Virus Res. – 2004. – **100**(1). – P. 41–50.
96. *Wittner A. et al.* *N. benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection // Virus Res. – 1998. – **34**. – P. 97–103.
97. *Scorza R. et al.* Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic *European plum* containing the plum pox virus coat protein gene // Transgenic Res. – 2001. – **10**(3). – P. 201–209.
98. *Di Nicola-Negri E. et al.* Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus // Transgenic Res. – 2005. – **14**(6). – P. 989–994.
99. *Cave E. et al.* Silencing of HIV-1 subtype C primary isolates by expressed small hairpin RNAs targeted to gag.AIDS // Res. Hum. Retrovirus. – 2006. – **22**(5). – P. 401–410.
100. *Brake O. et al.* Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach // Mol. Ther. – 2006. – **14**(6). – P. 883–892.
101. *Bennasser Y., Le S., Yeung M., Jeang K.* HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets // Retrovirology. – 2004. – **1**. – P. 43–47.
102. *Volarevic M. et al.* Potential role of RNAi in the treatment of HCV infection // Exp. Rev. antiinfect. Ther. – 2007. – **5**(5). – P. 823–831.
103. *Wu Y. et al.* Inhibition of highly pathogenic avian H5N1 influenza virus replication by RNA oligonucleotides targeting NS1 gene // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – **365**(2). – P. 369–374.
104. *Kayhan H. et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by shRNAs in stably HBV expressed HEPG2 2.2.15 cell lines // Arch. Virol. – 2007. – **152**(5). – P. 871–879.
105. *Wu C., Chang Y.* Antiviral applications of RNAi for coronavirus // Exp. Opin. Investig. Drugs. – 2006. – **15**(2). – P. 89–97.
106. *Kumar P. et al.* A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses // PLoS Med. – 2006. – **3**(4). – P. 36–45.

Надійшла 22.02.08

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ПТМГ – посттранскрипційне «мовчання» генів длРНК – дволанцюгова РНК
 нт – нуклеотид (и)
 siRNA (small interfering RNA) – малі інтерферуючі РНК
 RISC (RNA-induced silencing complex) – РНК-індукований комплекс «мовчання»
 miRNA (micro RNA) – мікроРНК
 RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) – РНК-залежна РНК-полімераза
 TMV (tobacco mosaic virus) – вірус тютюнової мозаїки
 VIGS (Virus induced gene silencing) – вірус-індуковане мовчання генів
 CP (coat protein) – білок оболонки

TEV (tobacco etch virus) – вірус гравіровки тютюну
VSV (vesicular stomatitis virus) – вірус везикулярного
стоматиту
PFV-1 (primate foamy virus 1) – пінний вірус приматів
1 типу
GFP (green fluorescent protein) – зелений флюоресцію-
ючий білок
EBV (Epstein-Barr virus) – вірус Епштейна–Барр
PVY (potato virus Y) – Y-вірус картоплі
PVX (potato virus X) – X-вірус картоплі
ORSV (Odontoglossum rings pot virus) – вірус кільцевої
плямистості одонтогლოსуму
HIV (Human immunodeficiency virus) – вірус імуноде-
фіциту людини
HBV (Hepatitis B virus) – вірус гепатиту В

HCV (Hepatitis C virus) – вірус гепатиту С
SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome –
Coronavirus) – коронавірус, що викликає тяжкий гос-
трий респіраторний синдром
CMV (Cucumber mosaic virus) – вірус мозаїки огірка
ZYMV (Zucchini mosaic virus) – вірус жовтої мозаїки
цукіні
WMV-2 (Watermelon mosaic virus-2) – вірус мозаїки ка-
вуна 2
TSWV (Tomato wilt spot virus) – вірус плямистого зів'я-
нення томатів
TCSV (Tomato chlorotic spot virus) – вірус хлоротичної
плямистості томатів
PRSV (Peanut ring spot virus) – вірус кільцевої плямис-
тості земляного гороху