

Регуляторные области промоторов генов растений и белки — регуляторы промоторной активности

А. П. Галкин, Л. Г. Лешина, Т. В. Медведева, О. В. Булко, В. П. Кухарь

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Ул. Мурманская, 1, Киев, 02094, Украина

В обзоре проведен системный анализ литературных данных о структуре и функциональном назначении проксимально расположенных специфических последовательностей ДНК (цис-элементов) в регуляторных областях растительных генов и транс-факторов белковой природы. Рассмотрены особенности взаимодействия цис- и транс-регуляторных элементов, детерминирующих видо- и органоспецифическую экспрессию генов, реакцию клеток на внешние и внутренние сигналы, адаптацию клеток к неблагоприятным факторам внешней среды и защиту растений от повреждений и болезней.

Введение. Известно, что в клетках эукариотов существует многоуровневая иерархия регуляции экспрессии генов, обусловленная компартиментализацией отдельных типов генетических детерминантов — в ядре, ядрышках, цитоплазматических органеллах (хлоропластах, митохондриях), нуклеосомной организацией хроматина (хромосом), пространственным и временным разобщением процессов транскрипции, процессинга, переноса из ядра в цитоплазму, трансляции генетической информации и посттрансляционной модификации белков. На уровень активности гена также влияют стадии клеточного цикла, функциональное состояние клетки, ткани или отдельного органа, стадии индивидуального развития организма и действия внешних индукторов на организм. Естественно, ключевым (начальным) этапом в экспрессии генов является процесс их транскрипции, включающий образование комплекса РНК-полимеразы с ДНК-матрицей, обеспечивающего перевод нуклеотидной последовательности ДНК генов в нуклеотидную последовательность РНК (мРНК, рРНК, тРНК, регуляторные РНК). Место и точность посадки РНК-полимеразы на ДНК, а также скорость процесса транскрипции определяют как специфические цис-элементы ДНК-матрицы, так и транс-регулятор-

ные факторы белковой природы, тесно взаимодействующие между собой.

В эукариотном ядре функционируют три различных класса РНК-полимераз: РНК-полимераза I транскрибирует гены рибосомных РНК (5,8S рРНК, 18S рРНК и 28S рРНК) и активна только в области ядрышка. РНК-полимераза II обеспечивает транскрипцию всех белок-кодирующих генов, размещенных в экстраядрышковом хроматине, а также малых ядерных РНК (за исключением гена *U6*). РНК-полимераза III транскрибирует гены тРНК, 5S рРНК, 7SL РНК и U6 РНК [1].

Каждый растительный ген, транскрибируемый РНК-полимеразой II, имеет 5'-фланкирующий промоторный район, необходимый для формирования мультимерного транскрипционного комплекса, куда входят участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, базальные факторы транскрипции и многочисленные регуляторные элементы, с которыми связываются регуляторные белки, называемые специфическими факторами транскрипции [2, 3]. Около 15 % генов *Arabidopsis* кодируют белки, представляющие собой более чем 1500 транскрипционных факторов, 45 % из которых специфичны для растений [4].

Для 5'-регуляторных участков генов характерны очень сложное строение и наличие большого количества регуляторных элементов. Необходимым и достаточным элементом для инициации транс-

крипции является коровый (базальный) промотор [5, 6]. Под коровым промотором понимают минимальную последовательность ДНК, необходимую для правильной инициации транскрипции гена *in vitro*. Эта последовательность охватывает область от -60 до +40 пар нуклеотидов (п. н.) от старта транскрипции. Коровый промотор также содержит ряд коротких функционально значимых мотивов размером до 5—25 п. н., способствующих образованию мультимерного транскрипционного комплекса, т. е. связыванию транскрипционных факторов с элементами инициации транскрипции [7]. Среди них наиболее полно изучены ТАТА-бокс, называемый также блоком Хогнесса, инициатор (Inr-элемент), СААТ-бокс и GC-бокс. Последовательность ТАТА(А/Т)А расположена на расстоянии от -25 до -30 п. н. от точки инициации транскрипции [8]. По наличию или отсутствию ТАТА-бокса все промоторы делятся на две группы: ТАТА-содержащие (ТАТА+) и ТАТА-несодержащие (ТАТА-) [9]. В группе ТАТА-несодержащих промоторов *Drosophila melanogaster* вблизи позиции +30 найден DPE-элемент (downstream promoter element), являющийся функциональным аналогом ТАТА-бокса. Его консенсусная последовательность имеет вид (А/Г)G(А/Т)CGTG. Она также способна влиять на работу бацилловирусного промотора в протопластах риса [10].

На расстоянии -(100—200) п. н. от точки инициации транскрипции генов обнаружен короткий нуклеотид, узнаваемый фактором Sp1 и названный GC-мотивом (GGGCGG) [11]. Предполагается, что GC-мотив, который может встречаться несколько раз по всей длине промоторной зоны, характерен для промоторных участков генов, работающих конститутивно, и его присутствие приводит к 4—10-кратному увеличению регулирующей активности промотора [12].

Еще одна последовательность ССААТ (СААТ) встречается в промоторной зоне тканеспецифических генов на расстоянии от -80 до -150 п. н., которая может действовать совместно с другими предполагаемыми консервативными мотивами, как это показано для трансгенного табака [13, 14].

Важную роль в транскрипционном контроле генов эукариотов играют удаленные регуляторные элементы (энхансеры-стимуляторы и сайленсеры — ингибиторы транскрипции), располагающиеся на расстоянии в тысячи пар нуклеотидов от старта транскрипции [6].

Существует еще множество разнообразных регуляторных районов, содержащих сайты связывания определенных транскрипционных факторов, которые, взаимодействуя между собой, способны

регулировать экспрессию генов, причем встречаемость и расположение сайтов связывания определенных транскрипционных факторов 5'-регуляторных участков генов часто отражает ткане- или стадийспецифичные особенности регуляции их экспрессии.

Элементы, регулирующие функционирование генов. В промоторных районах растений, как и у других эукариотов, типичный фактор транскрипции содержит домен для связывания с ДНК (ДНК-белковое взаимодействие), домен для образования комплексов с другими факторами или с другими молекулами этого же фактора (белково-белковое взаимодействие) и домен, ответственный собственно за активацию транскрипции (трансактиваторный домен) [15].

В свою очередь, промоторы и энхансеры содержат определенные наборы последовательностей для связывания факторов транскрипции, уникальные именно для этого энхансера или промотора. В зависимости от того, какие это наборы, на энхансере (промоторе) могут собираться комплексы факторов, обеспечивающих тканеспецифичность экспрессии гена и ответ на различные сигналы извне, такие как воздействие света, действие метаболитов, химических факторов или стрессов окружающей среды. Рассмотрим возможные формы такого взаимодействия и ответа.

Светочувствительные элементы (Light-responsive elements, LRE). У высших растений в трансформации световой энергии участвуют четыре основных комплекса: фотосистема I, фотосистема II, цитохромный и АТФ-синтазный комплексы, встроенные в липидные мембраны тилакоидов. Экспрессия многих ядерных генов эффективно регулируется на уровне транскрипции при участии специфических регуляторных белков — фоторецепторов, подразделяющихся на три класса: фитохромы, реагирующие на красный свет, белки, осуществляющие рецепцию голубого света, и белки — рецепторы ультрафиолетовых лучей. При поглощении света определенной длины волны хромофорной группой фитохромы меняют свою конформацию, переходя из неактивного состояния в активную форму, необходимую для включения светоиндуцируемых генов [16]. Различные фитохромы специфически регулируют разные группы генов на разных этапах жизни фотосинтезирующих организмов [17, 18].

Наиболее важными *цис*-последовательностями для транскрипции генов светового ответа являются: G-бокс (CACGTG) [19, 24—26], GT-1-бокс (GGTTAA) [20, 24—26], I-бокс (GATAAAGR) [30] и H-бокс ACCTA(A/C)C(A/C) [30]. G-бокс впервые

был идентифицирован как последовательность из 11 п. н. (C/AACACGTGGCA) в промоторе гена, кодирующего малую субъединицу рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы (*rbcS*) [19]. Для белка GT-1 были определены две связывающие последовательности: бокс II ($^{-151}\text{GTGTGGTTAATATG}^{-138}$) и бокс III ($^{-125}\text{ATCATTTTCACT}^{-114}$) в *rbcS-3A* гене риса, обе из которых являлись существенными для фитохромного ответа [20]. Кроме того, для GT-1-бокса показано, что те же светочувствительные элементы часто находятся в промоторах с противоположной световой активностью [21]. Интенсивность транскрипции зависит от размера промотора и взаимодействия транскрипционных факторов с транскрипционными элементами. Например, область промотора гена *rbcS-3A* томата от -374 до -205 п. н. играет основную роль в светоиндуцируемой и органоспецифической экспрессии гена, а область перед -374 регулирует экспрессию, зависящую от стадии развития листа [22, 23]. Тетрамер GT-1, связанный с минимальным (-90 п. н.) 35S промотором, содержащим активаторную последовательность -1 (activator sequence-1, as-1), регулирует транскрипцию на свету, но если GT-1 объединить с более короткой версией 35S промотора (-46 п. н.), не имеющей as-1, экспрессии не наблюдается [24]. Если же использовать искусственно синтезированные последовательности, составленные из парных комбинаций тетрамерных повторов G- и GATA-боксов или GT-1- и GATA-боксов, то они также будут функционировать как светочувствительные элементы [25, 26].

Многочисленные экспериментальные данные подтверждают гипотезу о том, что светочувствительные элементы растений являются комбинациями *cis*-регуляторных последовательностей, а их активность — это результат синергических взаимодействий между ними, их транскрипционными факторами и, в некоторых случаях, соответствующими ко-факторами [27, 28].

На сегодняшний день выделены и исследованы два транскрипционных фактора, участвующих в светостимулируемой регуляции. Это HY5 фактор из *Arabidopsis* [29] и PIF3-фактор [30], взаимодействующие с G-боксом. Показано, что под воздействием света фитохром В переходит в биологически активную форму и специфически связывается с G-боксом-связанным PIF3-фактором. Для световой индукции HY5 фактора требуется минимальный светочувствительный модуль CMA5 и нативный фрагмент размером 52 п. н. промотора *rbcS8B* табака, содержащий I- и G-боксы. Однако сам HY5 не имеет активаторного домена, в связи с чем предполагается, что его транскрипционная активность

включается через взаимодействие с другими факторами [30].

Элементы, отвечающие за метаболическое регулирование. Растительная клетка воспринимает разнообразные химические стимулы и реагирует на них. Так, изменение концентрации сахаров во флоэмном токе, олигомерные сахара и фрагменты хитина, индолилуксусная кислота, брассиностероиды и др. вызывают физиологическую реакцию растения. Ведущую роль среди этого довольно обширного списка химических веществ в регуляции роста и развития растений играют гормоны, действующие через регуляторные элементы (табл. 1).

Ауксинчувствительные элементы (Auxin-Responsive Elements, AuxREs). Ауксин — это гормон, вырабатываемый в апикальных меристемах побегов и играющий важную роль в делении и растяжении клеток, апикальном доминировании, лигнификации, расположении листьев, тропизме, ризогенезе и старении растительного организма. Воздействие на клетку ауксинами в большинстве случаев приводит к одинаковому эффекту: белок ABP1 (auxin binding protein) и система вторичных мессенджеров включают протонную помпу и уже через 2—5 мин после воздействия гормона можно обнаружить ауксинопосредованный ответ на уровне генов [31]. Если уровень ауксина в клетке ниже определенных показателей, то ауксинчувствительные элементы могут угнетать транскрипционную активность соседних или перекрывающихся транскрипционных элементов. Когда уровень ауксина повышается, то репрессия прекращается и транскрипция активируется [32]. В зависимости от природы конститутивных или связывающих AuxREs они могут потенциально участвовать в экспрессии разнообразных тканеспецифических и регулируемых развитием ответов [33].

Наиболее полно изучены ауксинчувствительные промоторы гена *PS-IAA4/5* гороха [34] и двух генов сои: *GH3* [35] и *SAUR15A* [36]. В промоторе гена *PS-IAA4/5* гороха идентифицирована последовательность (G/T)GTCCCAT [34], а в трех ауксинчувствительных элементах промотора гена *GH3* сои — TGTCTC [35]. Ауксинчувствительные элементы TGTCTC и (G/T)GTCCCAT из промотора гена *SAUR15A* и промотора гена *PS-IAA4/5* могут функционировать как составные компоненты AuxREs [32]. Причем AuxRE промотора гена *SAUR15A* содержит оба типа этих последовательностей [36]. А элемент TGTCTC из промотора гена *GH3* требует наличия близкоассоциированного конститутивного или связывающего ДНК элемента, функционирующего как AuxRE [37]. Если же эти элементы мультиплицированы и находятся в соответствующей

Таблица 1

Цис-элементы и транс-факторы, отвечающие на метаболическое регулирование экспрессии растительных генов

| Регуляция | Цис-элементы | Литературный источник | Транс-факторы | Литературный источник |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| Ауксин | TGTCTC | [35, 36] | ARF1 | [40] |
| | G/TGTCCCAT | [34, 36] | | |
| | TGACG | [42] | ASF1 | [42] |
| Гиббереллин | TAACA(A/G)A | [43] | | |
| | (C/T)CTTTT(C/T) | [43] | GAMyb | [45] |
| | TATCCAC | [43] | | |
| Абсцизовая кислота | G-бокс, (C/G/T)ACGTGGCG | [48] | ABI3, VP1 | [48] |
| | | | OSBZ8 | [51] |
| Этилен | GCC-бокс, TAAGAGCCGCC | [55] | ERF1,2,4 | [56—58] |
| | | | E4/E8BP | [61] |
| | | | OsMYBS | [66] |
| Сахара | GC-бокс, GCC(G/C)C | [65] | | |
| | G-бокс, CACGTG | [65] | | |
| | TATCCA | [65] | | |
| | (AA)TACTA(A/T)T | [69, 70] | SPF1 | [70] |
| | W-бокс, (T)TGAC(C/T) | [78] | SUSIBA2 | [68] |
| | TGGACGC | [67] | | |
| | AATAGAAAA | [69] | | |
| JA, SA, MeJA | G-бокс, CACGTG | [81] | | |
| | TGACG | [81] | | |

щей ориентации, то они могут функционировать как AuxREs даже в отсутствие связующего элемента [34—36]. Надлежащим образом расположенные и ориентированные синтетические TGTCTC ауксинчувствительные элементы более активны, чем натуральные AuxREs [38].

Транскрипционными факторами ауксинмодулированной экспрессии гена считаются семейства ARF и Aux/IAA белков [39]. Белки Aux/IAA, предположительно, регулируют транскрипцию, модулируя активность ARFs [40]. Другой AuxRE, которому уделяется много внимания, — это *ocs/as-1* элемент [41]. Активность транскрипции обеспечивается этим *цис*-действующим элементом, расположенным на участке от -63 до -83 п. н. и найденным первоначально в 35S промоторе вируса мозаики цветной капусты (CaMV). Этот элемент содержит тандемно расположенную повторяющуюся последовательность TGACG, которая связывается с ядерным белком ASF-1. Точность последовательности может существенно отклоняться у разных видов растений, но последовательность в 12 п. н. между двумя палиндромными центрами остается неизменной во всех *ocs/as-1* элементах, отвечающих на ауксин [42].

Гиббереллинчувствительные элементы (Gibberellin-Responsive Elements, GAREs). При анализе экспрессии генов, слитых с α -амилазными промоторами, которые регулируются гиббереллиновой кислотой (ГК), обнаружено наличие *цис*-активных элементов, инициирующих гиббереллинзависимую активность. Среди них TAACA(A/G)A последовательность, TATCCAC-бокс и пиримидиновый бокс (C/T)CTTTT(C/T) [43—45]. Функциональный анализ промотора гена *EPB-1* цистеиновой протеиназы показал их необходимость для гиббереллиновой индукции. В то же время синтез белка EPB-1, ответственного за деградацию белков эндосперма семян ячменя, инициируется ГК и репрессируется абсцизовой кислотой (АБК) [44].

Транс-фактором, необходимым для гиббереллиновой регуляции, был признан фактор GAMyb. Конститутивная экспрессия GAMyb в отсутствие ГК вела к трансактивации экспрессии *EPB-1* [44]. Активность транскрипционного фактора GAMyb была обнаружена и при исследовании активности репортерного *GUS* гена, лигированного с α -амилазным промотором ячменя [45].

Элементы, чувствительные к абсцизовой кислоте (Abscisic Acid-Responsive Elements, ABREs).

Воздействие АБК вызывает синтез циклической ADP-рибозы из НАД⁺ в замыкающих клетках устьиц. Этот мессенджер может активизировать Ca²⁺-каналы тонопласта, при этом ионы кальция поступают в цитоплазму из вакуолей и других внутриклеточных депо и pH цитозоля увеличивается. Все это приводит к активации протеинфосфатаз ABI1 и ABI2. Их роль заключается в дефосфорилировании гипотетического белка — репрессора АБК-сигнала. Пока репрессор фосфорилирован, он не дает проявляться дальнейшим ответам на АБК. Дефосфорилирование инактивирует репрессор, и клетка отвечает на АБК. Если протеинфосфатазы неактивны, репрессор постоянно подавляет ответ на АБК и растение становится нечувствительным к этой кислоте (ABA-insensitive, *abi*) [46].

Для процессов активации/инактивации генов в ядре клеток *Arabidopsis* важным регулятором является белок ABI3 (или его гомолог у кукурузы VP1). В аминокислотной последовательности этого белка обнаружены ДНК-связывающие участки, характерные для транскрипционных активаторов. Без ABI3 или VP1 не могут экспрессироваться гены созревания эмбриона (EM, embryo maturation), не запускается биосинтез антоцианов, не накапливаются запасные белки в семенах и т. д. [47].

В соответствующих промоторах найден достаточно консервативный мотив — G-бокс с последовательностью (C/G/T)ACGTGGCG, необходимой для связывания с этими белками [48]. Органо- и видоспецифическая активация АБК-чувствительных генов достигается лишь совместным действием нескольких *цис*-активных элементов [49]. Изолированный G-бокс не содержит активности минимального промотора. Только комплексный модуль, включающий G-бокс и связывающий элемент, функционирует как ABRE *in vivo* в растениях ячменя [50].

Одного белка ABI3 или VP1 недостаточно для активации транскрипции. Для этого необходим довольно сложный транскрипционный комплекс, в который могут входить димерные транскрипционные факторы типа «лейциновой застежки». Например, bZIP белок риса, названный OSBZ8, может быть вовлечен в регуляцию экспрессии АБК-чувствительных генов [51]. Множественные ABREs идентифицированы в 5'-фланкированном участке гена *Em* пшеницы [52] и показана их активность в присутствии VP1 транскрипционного фактора [53].

Этиленчувствительные элементы (Ethylene-Responsive Elements, EREs). Основная физиологическая реакция растения на этилен вызывает тройной ответ: 1) замедление роста в длину и утолщение проростка, 2) появление апикальной петельки

и 3) изменение ориентации проростка в пространстве. Другие известные процессы, регулируемые этиленом, — это стимулирование созревания плода, опадение листьев, прорастание семян, старение и чувствительность к стрессам, таким как поранение или атаки патогенов [54]. Впервые факторы ответа на воздействие этилена (ethylene-response factor) ERF1—4 идентифицированы в листьях табака как GCC-боксы-связывающие белки [55]. У *Arabidopsis* обнаружено небольшое генное семейство белков — рецепторов этиленового сигнала: ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 и ERS2, которые достаточно гидрофобны и входят в состав мембран. Рецепторы этилена родственны двухкомпонентным гистидинкиназам и участвуют как в процессе автофосфорилирования, так и фосфорилирования других белков. Для связывания молекулы этилена необходим атом меди, который переносится на рецептор этилена с помощью белка RAN1. Помимо этого, рецепторные белки находятся в комплексе с серин/треонинкиназой CTR1, которая, в свою очередь, негативно регулирует этиленовую реакцию, возможно, через MAP-киназный каскад. Позитивным регулятором этиленового сигнала является мембранный белок EIN2, передающий позитивный сигнал EIN3 семейству транскрипционных факторов, локализованных в ядре. EIN3 связывает промотор *ERF1* гена и активирует синтез транскрипционных факторов ERF в присутствии этилена. Транскрипционные факторы ERF1,2,4 взаимодействуют с GCC-боксом промоторов генов-мишеней и активируют их ответ на воздействие этилена [56, 57]. ERF2 и ERF4 усиливают GCC-боксы-опосредуемую транскрипцию репортерного гена в протопластах табака и предполагается, что они действуют как активаторы транскрипции, тогда как ERF3 выполняет функции репрессора [58].

В трансгенных растениях *Arabidopsis* была индуцирована экспрессия Pti4 — транскрипционного фактора томата, принадлежащего к ERF семейству. Этот транскрипционный фактор более чем в 2,5 раза повышал экспрессию 28 генов, содержащих GCC-боксы [59].

В промоторной области гена *E4* на расстоянии -161 п. н. от старта транскрипции обнаружены последовательности, требуемые для активации этиленом и регуляции созревания плода, а последовательность на расстоянии от -85 до -1 оказалась существенной для этиленчувствительной транскрипции гена, но недостаточной для проявления активности этилена в минимальном 35S промоторе. Был сделан вывод о том, что по крайней мере две *цис*-действующие последовательности (от -150 до -121 и от -40 до +65 п. н. от старта транскрипции)

требуются в качестве регуляторных элементов для этиленчувствительной регуляции *E4* гена [60]. С помощью изменения электрофоретической подвижности, футпринтерного анализа и дальнейшего клонирования был выделен ядерный белок E4/E8BP, связывающийся с 5'-фланкирующими последовательностями *E4* и *E8* генов. Проведенные опыты показали, что укороченная версия E4/E8BP-1 активирует *E4* промотор, возможно, для усиления транскрипции гена, особенно *in vivo* [61].

Исследования транскрипционных факторов EIN3 табака показало, что они регулируют тканеспецифический ответ на уровне первичного пути передачи этиленового сигнала [62].

Сахарочувствительные элементы (Sugar-Responsive Elements, SUREs). Биохимические, молекулярные и генетические эксперименты показали центральную роль сахара в контроле растительного метаболизма, роста и развития и выявили взаимодействия, интегрирующие свет, стресс, гормональные сигналы, а также координирующие углеводный и азотистый метаболизм [63]. Было сделано предположение, что белки, участвующие в переносе сахара, и некоторые внеклеточные сахаросвязывающие белки могут служить датчиками при передаче сахаропосредуемых сигналов, которые альтернативно могут быть запущены гормонами, светом и другими стимуляторами окружающей среды [64].

В промоторе рисового гена α -амилазы *Amy3* обнаружена *цис*-активная последовательность, общая для всех регулируемых сахаром промоторов, ответственная за сахароиндуцируемый ответ (sugar response sequence, SRS). Эта область содержит три существенные последовательности: G-бокс, G-бокс и TATCCA элемент, идентифицированные на расстоянии от -90 до -150 п. н. во всех промоторах α -амилазных генов [65]. TATCCA элемент найден во взаимосвязи с OsMYBS белками риса. Два этих белка, OsMYBS1 и OsMYBS2, способны трансактивировать TATCCA-содержащий промотор *in vivo*. [66]. Анализ промотора β -амилазы сладкого картофеля, индуцируемый преобразующимся в ходе метаболизма сахаром типа сахарозы, глюкозы и фруктозы, обнаружил TGGACGC элемент, важный для сахароиндуцируемой экспрессии как β -амилазного гена, так и гена спорамина [67].

Изолирован транскрипционный фактор из ячменя и очищен соответствующий белок. Транскрипционный фактор, передающий сигнал, индуцируемый сахаром (SUSIBA2-sugar signaling in barley), относится к WRKY белкам и взаимодействует с элементами W-бокса в *isol* промоторе [68].

Сахарочувствительные элементы SURE1 (AATAGAAAA) и SURE2 (AATACTAAT) найдены в

пататиновом промоторе [69]. Подобная SP8 последовательность (TACTATT) обнаружена в промоторах гена спорамина сладкого картофеля и генов β -амилазы. SP8 элемент специфично связывает белковый фактор, являющийся отрицательным регулятором, и его транскрипция подавляется сахарозой [70]. Предполагаемый гомолог SPF1, кодирующий WRKY домен транскрипционного фактора, выявлен в огурце и *Arabidopsis* [71].

Два бокса — W (реагирующий на поранение) и G (АБК-чувствительный) найдены в промоторах амилазы, чувствительных к сахару [72, 73]. Под внешним воздействием АБК обнаружено, что активируются и β -амилазный [74], и β -фазеолиновый промоторы, причем последний модулируется еще и сахарозой [75]. Эти данные показывают, что сахар, гормоны и защитные сигналы могут влиять на контроль транскрипции промоторов, активируя W- и G-боксы.

Ответ на другие гормональные вещества растений. Жасмонат (jasmonate, JA) и метилжасмонат (methyl jasmonate, MeJA) ингибируют рост проростков, прорастание пыльцевых трубок, образование каллуса, способствуют закрытию устьиц, стимулируют образование клубней и луковиц, влияют на цитоскелет, переориентируя его. Этерификация жасмоновой кислоты и метилжасмоната придает им летучесть. Предполагают, что метилжасмонат (как и этилен) через воздушную фазу способен на расстоянии воздействовать на ткани растения, информируя его о нападении патогенов [76]. Патоген или внешнее воздействие JA включает синтез *de novo* фитоалексинов [77]. В то же время жасмонат и этилен синергично активируют семейства генов *PR1* и *PR5*, кодирующих патогенсвязывающие белки [78]. Интересно, что для индукции *PDF1.2* гена требуется как интактная жасмоновая кислота, так и этиленовый сигнал, тогда как для активации других генов достаточно только воздействия какого-то одного сигнала. Это свидетельствует о комбинаторном взаимодействии этих сигналов для ко-регуляции экспрессии некоторых генов, вовлеченных в защиту растений [79].

Область JARE, чувствительная к метилжасмонату, идентифицирована в промоторе гена *vspB* сои, который был стимулирован MeJA и сахаром [80]. ДНК домен, отвечающий за подобный ответ, локализован между -535 и -585 п. н. и содержит G-бокс и C-богатый элемент. Подобные области, связанные с bZIP белком и содержащие TGACG-последовательности и G-боксы, обнаружены в промоторах липоксигеназы 1 ячменя [81] и ингибитора протеиназы картофеля *Pin2* [82]. Такие последовательности координируют активность *as1*-подо-

бных элементов и глутатион-S-трансферазного гена под воздействием ауксина, салициловой кислоты, метилжасмоната и пероксидазы [83].

Регуляция транскрипции стрессовыми факторами окружающей среды. Роль этилена, салициловой и жасмоновой кислот в ответной реакции на механическое повреждение и атаку патогенов. В результате атаки патогенов и поранения растений происходит активация гиперчувствительных механизмов длительного ответа, повышающего сопротивляемость растений. Во многих случаях системное приобретенное сопротивление растений характеризуется повышением уровня концентрации эндогенной салициловой кислоты и усиленной экспрессией генов, устойчивых к патогенам.

Недавнее изучение изменения уровня экспрессии 2375 отобранных генов под воздействием патогенов, поранения, обработки салициловой кислотой, JA и этиленом показало, что на некоторые гены воздействует только один сигнал, а на многие — два или более сигналов [84, 85]. Подобно многим другим биологическим процессам пути ответа на эти факторы в растениях сходятся в клеточных ядрах [86].

Наиболее изучены две группы *цис*-активных элементов индуцируемых патогенами промоторов: GCC-подобные элементы [87] и W-боксы (T)TG-AC(C/T) [88]. Недавно идентифицированы другие GCC-подобные элементы, названные S-боксом (AGCCACC), направляющие экспрессию элизиторов, индуцируемых грибами [89]. Синтетический промотор, содержащий четыре копии GCC-боксы, направляет индуцируемую этиленом экспрессию табака. Но для признания того факта, что транскрипция индуцируется патогенами, данных недостаточно [55]. Считается, что W-боксы содержат основные *цис*-активные элементы, отвечающие за чувствительность к патогенам многих растительных генов. Значительная активность последовательностей W-боксы и их кластеров на *PR1* субпопуляции промоторов гена показала, что W-боксы связывающие белки, WRKY факторы, являются ко-регуляторами этих генов [88]. Обнаружены и исследованы также GCC-подобные элементы и WRKY транскрипционный фактор табака, включающие экспрессию гена в ответ на поранение [91]. Несмотря на то, что механизмы SA- и JA-этиленустойчивости индуцируют экспрессию различных наборов патогенустойчивых генов, системное приобретенное сопротивление растений к различным патогенам появляется в результате координированного взаимодействия между этими ответами на внешний раздражитель [92].

Элементы, чувствительные к тепловому шо-

ку. Транскрипция генов теплового шока эукариотов инициируется под действием широкого круга неблагоприятных факторов внешней среды (температура, тяжелые металлы, детергенты, алкоголь и т. д.) Таким образом, гены теплового шока следует рассматривать как универсальную систему рецепции сигналов на неблагоприятное состояние внешней среды, оцениваемую по большому количеству параметров. В клетках, не подвергшихся стрессу, фактор теплового шока (Heat-Stress Factor, HSF) присутствует и в цитоплазме, и в ядре в виде мономера, связанного с белком Hsp70 (наиболее изученным белком теплового шока). Такой комплекс не обладает ДНК-связывающей активностью. В ответ на тепловой шок или другой стресс Hsp70 отсоединяется от связанного с ним фактора. HSF собирается в тримеры, в результате у него появляется способность связываться с ДНК промотора. После того как действие стресса заканчивается, освободившийся Hsp70 опять присоединяется к HSF, который при этом теряет ДНК-связывающую активность и все возвращается в нормальное состояние [93].

Белки теплового шока, необходимые для распознавания промотора, различаются по длине и структуре, но имеют общие особенности среди эукариотов. Все они включают N-терминальный ДНК-закрепляющий домен, гидрофобное ядро, гарантирующее точное местоположение центрального мотива спираль-поворот-спираль в *цис*-элементе устойчивости к тепловому шоку. Этот элемент содержит повторяющийся образец палиндромных последовательностей, nGAAnnTTCnnGAA [94], и играет главную роль в реакции растений томата [95] и табака [96] на тепловой шок.

Экспрессия аскорбатпероксидазного гена часто индуцируется оксидативным стрессом, стимулируя тепловой ответ, в результате чего в растении накапливаются гидроксил, супероксидные радикалы и перекись водорода. Термоиндуцибельный элемент, необходимый для *цис*-регуляции экспрессии, локализуется в TATA-боксы-проксимальной 5'-фланкирующей области генов теплового шока и имеет вид 5'-aGAAg-3'. Возникновение множественных повторов в этих генах характерно для эукариотного генома [97].

Сравнение последовательностей промоторных областей гена аскорбатпероксидазы гороха [98] и *Arabidopsis* [99] показало присутствие в них только одного участка высокой гомологии, расположенного вокруг TATA-боксы и содержащего несколько последовательностей, характеризующихся как HSE (Heat-Stress Element).

Для фактора теплового шока томата также

показано, что он частично способствует индукции экспрессии аскорбатпероксидазного гена оксидативным стрессом [100]. Для регуляции термоиндуцибельной экспрессии некоторые гены растений используют не только HSE. Так, ген теплового шока сои *Gmhspl7.3-B* регулируется классическими HSE, но полное действие промотора требует дополнительных последовательностей, расположенных выше элемента чувствительности к тепловому удару. Структурные особенности этой предполагаемой энхансерной области определяют необходимость синергического взаимодействия простых последовательностей, расположенных выше дистального хитшокового элемента промотора, HSE-подобных последовательностей и трех ССААТ-боксов в промоторных участках табака [101]. Для пшеницы и табака выявлено большое количество последовательностей, необходимых для усиления экспрессии некоторых генов теплового шока. К ним относятся ССААТ-бокс и АТ-богатые промоторные участки [102, 103]. Показано, что данные последовательности важны для эффективного связывания ТАТА-бокс-связывающих белков и/или транскрипционно связывающих белков (например, HSF). Наблюдается связывание хроматин-модифицирующих факторов для активации экспрессии генов теплового шока (например, GAGA-связывающий фактор) [104] или прикрепление к структурам хроматина, обеспечиваемое ТАТА-боксом и являющееся предпосылкой к последующей сборке базального транскрипционного комплекса. При этом «резервном» способе гены теплового шока направляют транскрипционную активность в ответ на тепловой стресс и индуцируют тримеризацию и связывание HSF с HSE последовательностью.

Элементы, чувствительные к оксидативному стрессу. Существует много доказательств того, что H_2O_2 является стрессовым сигналом для растений, инициирующим адаптивный ответ и модулирующим экспрессию антиоксидантных ферментов, разрушающих H_2O_2 [105, 106]. Анализ экспрессии генов в ответ на воздействие H_2O_2 показал, что приблизительно 1 % транскриптонов из *Arabidopsis* регулируется H_2O_2 . Некоторые промоторные элементы, такие как W-, G-, H-боксы и этиленчувствительные GCC-элементы найдены в чувствительных к стрессам участках растительных промоторов и рассматриваются как последовательности, отвечающие за H_2O_2 -чувствительность [107]. Доказано, что в *Arabidopsis* этилен, абсцизовая кислота, салициловая кислота, кальций, тепловые и окислительные факторы комбинаторно формируют защитный ответ на стрессы [108].

Элементы, чувствительные к холоду, засухе и

недостатку кислорода. Растительные клетки обладают системами осморегуляции и холодоустойчивости для предотвращения вредных последствий дегидратации и низкотемпературного воздействия в периоды осмотического и холодового стрессов. В этих случаях клетки изменяют пространственную организацию биологических мембран, в них замедляются внутриклеточные биохимические и химические реакции, меняются структура и состояние внутриклеточной воды. Следовательно, реакции устойчивости к замерзанию и засухе могут иметь некоторые общие механизмы регуляции.

Несколько холодочувствительных промоторов содержат элементы ответа на дегидратацию (dehydration response element, DRE), включающие ССGAC-мультимотив (С-повторы) [109]. 5'-участок *cor15a* гена *Arabidopsis* имеет С-повторы, элементы между -305 и +78 основными позициями, которые неактивны или очень слабо активны в большинстве тканей и органов растений, растущих при нормальной температуре, однако становятся активными в большинстве растений в ответ на понижение температуры. Недавно в *Arabidopsis* определен DRE транскрипционный активатор, названный CBF1 [110].

Мутация ядерного пентамера ССGAC из двух предполагаемых чувствительных к низким температурам элементов в 5'-проксимальной области холодочувствительного гена *BN115 Brassica napus* привела к полной потере низкотемпературного регулирования промоторной активности. Это свидетельствует о том, что ССGAC-последовательность определяет низкотемпературный ответ в *BN115* гене. В отличие от этого, мутация двух G-боксов, находящихся между этими элементами в той же самой области промотора, не изменяла экспрессии гена, индуцируемой холодом [111]. Засуха и холодовый стресс инициируют гены, которые в промоторных областях обычно содержат последовательность (T/C)ACGTGGG элементов, устойчивых к абсцизовой кислоте. Подобная корреляция наблюдается в тесно связанных *rd29A* и *rd29B* генах *Arabidopsis*. Даже при том, что эти гены близко связаны в геноме *Arabidopsis*, они различно индуцируются в условиях дегидратации, низкой температуры, высокой минерализации или обработки АБК. Считается, что промотор гена *rd29A* имеет, по крайней мере, два *цис*-активных элемента: один, вовлеченный в АБК-ассоциированный ответ на дегидратацию, и другой, индуцированный изменениями в осмотическом потенциале, а промотор гена *rd29B* содержит как минимум один *цис*-активный элемент, причастный к АБК-чувствительности [109]. В *Rab28* гене кукурузы также идентифици-

Таблица 2
Биотические регуляторы экспрессии растительных генов

| Регуляция | Цис-элементы | Литературный источник | Транс-факторы | Литературный источник |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| Патогены | GCC-подобные элементы | [87] | WRKY | [88] |
| | W-бокс, (T)TGAC(C/T) | [88] | ORCA2 | [98] |
| Поранение | W-бокс, (T)TGAC(C/T) | [91] | WIZZ | [91] |
| Тепловой шок | AT-богатые последовательности | [102, 103] | HSF | [100] |
| | ССААТ | [102, 103] | | |
| Окисление | W-бокс, (T)TGAC(C/T) | [107] | | |
| | G-бокс, CACGTG | [107] | | |
| | H-бокс, ACCTA(A/C)C(A/C) | [107] | | |
| | GCC-элемент | [107] | | |
| Холод | C-повторы, CCGAC | [109] | CBF1 | [110] |
| | (T/C)ACGTGGG | [109] | | |
| | G-бокс, CACGTG | [114] | | |
| Дегидратация | (T/C)ACGTGGG | [109] | | |
| Гипоксия | GT-мотив, (T/C)GGTTT | [116] | AtMYB2 | [117] |
| | GC-мотив, GCC(G/C) | [116] | | |

рован АБК-индуцибельный элемент в эмбрионах и вегетативных тканях, который был активирован в молодых листьях внешним воздействием осмотического стресса. Проксимальная область промотора этого гена содержит высококонсервативный AJ3RE модуль. Опыты по транзientной экспрессии в протопластах риса показали, что фрагмент из 134 п. н. (от -194 до -60), лигированный с минимальным 35S промотором, активировал АБК-зависимую экспрессию репортерного *gus* гена [112]. Таким образом, молекулярные ответы на дегидратацию и холодный стресс могут быть комплексными и стимулироваться обеими системами регулирования, при этом АБК-сигнальные пути не инициируют немедленного ответа, а играют важную роль в длительном, долговременном адаптивном ответе на холодный стресс, вызывающий дегидратацию тканей растения [113].

Ген алкогольдегидрогеназы (*Adh*) из *Arabidopsis* может быть индуцирован не только дегидратацией и холодом, но также гипоксическим стрессом. Делеционное картирование 5'-концевой области и сайт-специфический мутагенез этого гена выявили четыре области промотора, существенные для ответа на все три стрессовых состояния [114]. Общий ответ высших растений на понижение содержания кислорода является комплексным и включает в себя индукцию специфических анаэробочувствительных элементов (анаэробic responsive element, ARE). Первичная цель этого ответа — увеличение

экспрессии гена *Adh* и этанольная ферментация [115]. Наиболее существенная область для экспрессии *Adh* промотора в кукурузе в анаэробных условиях содержит последовательности, гомологичные GT-мотивам, (T/C)GGTTT- и GC-мотивам, GC-C(G/C)C [116]. С другой стороны, оба G-бокса, близкие ARE, не затрагивают экспрессии при состояниях гипоксии, но значительно индуцируются холодным и, в меньшей степени, дегидратационным стрессами [114].

Функциональные свойства ARE проанализированы в гене *Adh* кукурузы с помощью опытов по транзientной экспрессии в электропорированных протопластах кукурузы. ARE функционирует в обеих ориентациях, и действие промотора в анаэробных условиях пропорционально количеству полных ARE последовательностей, включенных в *Adh1* промотор [116]. Конститутивный промотор, взаимодействующий с транскрипционным фактором AtMYB2, способен трансактивировать *Adh1* экспрессию в *Arabidopsis* и протопластах табака в условиях низкого содержания кислорода, в то время как мутация GT-мотива промотора отменяет присоединение AtMYB2 и вызывает потерю активности *Adh1* промотора [117]. Регулирующие элементы, ответственные за реакцию на биотические факторы, сведены в табл. 2.

Регуляция органоспецифической экспрессии. *Цветок*. На ранних этапах в меристеме цветка можно обнаружить экспрессию специфических ге-

нов. Повреждение этих генов в результате мутаций приводит к замене одних органов цветка на другие и часто к нарушению в расположении органов (лепестки исчезают или превращаются в органы, напоминающие чашелистики, тычинки приобретают черты пестиков или заменяются на лепестки, а плодолистики преобразуются в чашелистики). Условно эти гены делят на три группы: А, В и С. Поэтому существующую модель развития цветка часто называют ABC-моделью. У *Arabidopsis* к генам с функцией А относится *APETALA2* (*AP2*), продукт которого является транскрипционным фактором с MADS-доменом (консервативным участком из 56 аминокислотных остатков), необходимым для связывания с ДНК и образования димеров. (Название MADS дано по первым буквам четырех очень сходных генов у различных организмов: гена *Mini-chromosome maintenance* у дрожжей, гена *Agamous* у арабидопсиса, гена *Deficiens* у львиного зева и гена *Serum response factor* у человека.) Функцию В направляют гены *APETALA3* (*AP3*) и *PISTILLATA* (*PI*). Продукты этих генов образуют гетеродимеры, способные связываться с промоторными участками ДНК. Гены *AP3* и *PI* экспрессируются в зоне, из которой возникают лепестки и тычинки. Наконец, функция С контролируется геном *AGAMOUS* (*AG*), белковый продукт которого оказался также транскрипционным фактором с MADS-доменом. Ген *AG* определяет судьбу тычинок и плодолистиков, а также отвечает за остановку роста во флоральном примордии. Эксперименты по иммунопреципитации показали, что все четыре белка способны к взаимодействию друг с другом. Однако только гомодимеры *AP3* и *AG*, а также гетеродимеры *AP3/PI* способны к закреплению с *CATG*-боксом ДНК, который имеет консенсусную последовательность $CC(A/N)_6GG$. *AP3/PI* гетеродимер и *AP3* или *AG* гомодимеры формируются только в присутствии всех соответствующих белков, и для образования ДНК-связывающих димеров им необходима L-область, состоящая из 31—35 аминокислотных остатков и следующая непосредственно за MADS-доменом [118, 119].

Семена. В инициации экспрессии генов запасных белков семян используется множество промоторных *цис*-элементов, включая RY-повторяющийся мотив (CATGCATG), AACА-мотив, проламинный бокс (TGТААAG), GCN4-мотив (TGAGTCA) и ACGT-мотив [120—122].

Промотор легумина гороха успешно направляет экспрессию химерного гена 2S альбумина в трансгенных растениях *Vicia narbonensis*. Наибольшая экспрессия химерного белка наблюдалась в семенах [123]. В 5'-фланкирующем участке легу-

минового бокса большого количества запасных белков семян обнаружена RY-повторяющаяся последовательность, состоящая из 28 п. н. [124, 125]. Во многих промоторах растений CATGCATG-мотив взаимодействует с консервативными В2 и В3 доменами ABI3 белков. Причем В2 опосредует активацию через ABRE, а В3 — через RY/G-бокс [126]. В течение позднего эмбриогенеза RY-мотив взаимодействует с FUS3 *транс*-фактором, в том числе при транскрипции генов в период созревания [127]. Мотив AACА найден в генах глютеина риса, показано его участие в контроле эндосперм-специфической экспрессии [128]. Последовательность TGТААAG, обычно называемая проламинным боксом (Р-боксом), идентифицирована в двух высококонсервативных нуклеотидных последовательностях и локализована на расстоянии -300 п. н. относительно сайта инициации транскрипции генов проламина. Эта последовательность присутствует в промоторах всех зеиновых генов кукурузы [129]. Такие *цис*-промоторные последовательности специфически связываются с *транс*-белками. AACА-мотив необходим для MYB белков [130]; Р-боксы зеиновых генов кукурузы и GCN4-мотив в генах глютеина риса связываются с белком Orape-2, одним из представителей семейства bZIP-белков [131—133].

Исследования минимального промотора (-197 п. н.) запасного белка риса *GluB-1* показали комбинаторное взаимодействие AACА, Р-боксов, GCN4 и ACGT-мотивов и их влияние на экспрессию эндосперм-специфических генов. Мультикопийность GCN4 повышала экспрессию *gus*-гена в эндосперме трансгенного риса, однако тандемные повторы других трех мотивов не влияли на транскрипцию трансгенов, но способствовали количественному регулированию *GluB-1* гена [134].

Плод. Молекулярный и генетический анализ процессов, связанных с плодообразованием, выявил множество генов, активирующихся в процессе роста и созревания растений [135]. Большое количество работ по изучению промоторных областей, специфических по отношению к созреванию плода, было выполнено на томатах [136]. Исследование органоспецифической роли промоторных областей и ДНК-белкового взаимодействия проведено в генах сериновой протеазы дыни. Химерный ген, содержащий промотор огурца, лигированный с *gus*-геном, эффективно экспрессировался, в основном, в тканях плода. Делеционный анализ показал, что позитивно регулирующая область локализована между нуклеотидами -234 и -214 относительно сайта инициации транскрипции. Последовательность размером 20 п. н., определяющая специфич-

ность к созреванию плода, содержала регуляторный энхансер. Исследования показали взаимодействие ядерных факторов с изучаемым промотором. Типичный G-блок (GACACGTGTC) не связывал специфический белок в плодах. На расстоянии между -254 и -215 обнаружены два предполагаемых *цис*-элемента: I-бокс-подобная последовательность (AGATATGATAAAA) и палиндромный TGTCACA-мотив. I-бокс-подобная последовательность функционирует как негативный регулятор, а TGTCACA мотив — как энхансерный элемент, необходимый для плодоспецифической экспрессии генов дыни [137].

Корень и клубни. Изучение корне- и клубнеспецифической экспрессии в растениях показало необходимость наличия GT-богатого участка ДНК для связывания *транс*-факторов. Так, промоторный фрагмент солеустойчивых клеток alfalfa MsPRP2 содержит консенсусные сайты, состоящие из GNGGTG- и GTGGNG-последовательностей, необходимых для связывания Alfin1 белка. Образующийся комплекс инициирует промоторную активность в корнях растений в среде с повышенным содержанием соли [138]. Фрагмент, соответствующий 5'-концевой последовательности хлоропластного гена рибосомного белка S12 (*rpS12*), проявил корнеспецифическую активность в растениях табака, а регуляторный фрагмент гена пататина *λpat122* инициировал экспрессию гена хлорамфениколацетилтрансферазы в клубнях картофеля [23].

С помощью RT-PCR анализа обнаружено, что транскрипт PmPR10-1.14 гена белой сосны присутствует только в латеральных корнях и иглах. Промотор этого гена лигирован с *gus*-геном и его экспрессию изучали в трансгенных растениях табака. Исследования показали, что промоторная область от -311 до -101 п. н. действует как энхансер, а область от -506 до -311 п. н. — как сайленсер. Более длинный промотор (1675 п. н.) эффективно направляет конститутивную экспрессию репортерного гена в корнях взрослого растения. Делеционный анализ всей промоторной последовательности выявил, что *цис*-регуляторные последовательности, необходимые для корнеспецифической экспрессии, находятся в проксимальном фрагменте от -311 до +69 п. н. [139].

Показано, что 5'-мотив CsVMV (Cassava vein mosaic virus), включающий нуклеотиды от -443 до +72 п. н., направляет строгую конститутивную экспрессию в трансгенных растениях табака. Область от -222 до -173 п. н. содержит *цис*-элемент, контролирующей тканеспецифическую активность в зеленых тканях и в корневом чехлике. Исследования выявили необходимость *as-1* элемента и

GATA-мотива, локализованного внутри упомянутой последовательности, для инициации промоторной экспрессии в этих тканях [140]. Мутации в tandemном повторе последовательности TGACG *ocs/as-1* элемента, отвечающего на ауксин, приводят к снижению экспрессии в корнях [141].

Пыльца. Изучение строения промоторов генов *LAT52*, *LAT599* помидора, кодирующих цистеинбогатые белки, показало, что они содержат модуль 30 п. н., расположенный на расстоянии от -30 до -50 п. н. от TATA-бокса и ответственный за экспрессию специфических для пыльцы генов [142]. Исследования области от -492 до -52 п. н. в промоторе *LAT52*, специфичном для пыльцы, позволили обнаружить ядерную PBI последовательность, которая необходима для связывания транскрипционного фактора. Мутация центральных GG-остатков в PRI уменьшала пыльцеспецифическую экспрессию приблизительно в 10 раз. PBI-мотив вместе с двумя другими регулирующими элементами, AGAAA и TCCACCATA, формирует сильный, специфичный для пыльцы модуль запуска транскрипции. Дальнейший мутагенез и функциональный комбинаторный анализ продемонстрировали, что PBI-AGAAA и AGAAA-TCCACCATA функциональные пары действуют как активаторы экспрессии генов, специфичные для пыльцы, в то время как PBI-TCCACCATA модуль не проявляет активности [143]. Эти данные совместно с результатами функционального анализа других пыльцезависимых промоторов предполагают взаимодействие нескольких факторов транскрипции, ответственных за пыльцезависимую экспрессию. Для выяснения функционирования *цис*-элементов и связывания их с предполагаемыми транскрипционными факторами, специфично экспрессирующимися в пыльце, требуются дополнительные исследования [144].

Цис- и транс-регуляторные элементы, детерминирующие видо- и органоспецифическую экспрессию генов, приведены в табл. 3.

Выводы. В обзоре рассмотрены данные о структуре и взаимодействии специфических *цис*-регуляторных элементов ДНК промоторов и *транс*-регуляторных факторов белковой природы. Каждый из указанных регуляторных районов промоторов содержит сайты связывания определенных транскрипционных факторов, которые, взаимодействуя с элементами промоторов, могут изменять экспрессию генов в ответ на различные биотические и абиотические факторы [18, 32, 57, 86, 90]. Помимо канонических последовательностей TATA и CAAT, в промоторах обнаружено множество других, часто повторяющихся мотивов, среди них наиболее часто встречаются G-, GT-, GCC-боксы, от наличия

Таблица 3

Цис-элементы и транс-факторы, отвечающие за органоспецифическую экспрессию растительных генов

| Регуляция | Цис-элементы | Литературный источник | Транс-факторы | Литературный источник |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Цветок | CArG-бокс, CC(A/N) ₆ GG | [119] | AP3/PI-гетеродимеры | [119] |
| | | | AP1, AG-гетеродимеры | [119] |
| Семена | RY-мотив, CATGCAG | [124, 125] | FUS3, ABI3 | [126, 127] |
| | AACA | [128] | OsMYB5 | [130] |
| | P-бокс, TGTAATG | [129] | PBF | [131—133] |
| | GCN4, TGAGTCA | [131—133] | Opaque2 | [132] |
| | ACGT | [134] | | |
| Плоды | TGTCACA | [137] | | |
| Корень | GNGGTG | [138] | Alfin1 | [138] |
| | GTGGNG | [138] | | |
| | GATA | [140] | | |
| Пыльца | TCCACCATA | [143] | | |
| | AGAAA | [143] | | |

которых зависит светоиндуцируемая, метаболическая (под влиянием АБК, этилена, сахара, жасмоновой, метилжасмоновой, салициловой кислот), биотическая (под воздействием патогенов, окисления, холода, дегидратации, гипоксии) и органоспецифическая экспрессия генов. Часто наблюдается координированная регуляция несколькими внешними факторами, действующими комбинаторно. Так, ауксин, салициловая кислота, метилжасмонат и пероксидаза координируют активность *as-1*-подобных элементов и глутатион-S-трансферазного гена [83]; этилен, абсцизовая и салициловая кислоты, а также ионы кальция комбинаторно формируют ответ на повреждения окислением в *Arabidopsis* [108]. Засуха и холодостресс инициируют работу генов, которые в промоторных областях содержат элементы, устойчивые к АБК [113]. *Adh* ген из *Arabidopsis* может быть индуцирован не только дегидратацией и холодом, а также гипоксическим стрессом [114].

Приведенные в обзоре данные о структуре и функциях элементов, регулирующих экспрессию генов, указывают на идентичность принципов активации и функционирования генов в адаптивных ответах и процессах дифференцировки клеток при всем многообразии самих регуляторных элементов и транс-факторов, кодируемых регуляторными генами. Качественный состав и количество белков, взаимодействующих с регуляторными элементами промоторов, определяются размером и нуклеотидной последовательностью цис-элементов, их расстоянием от кодирующей части гена и расстоянием

между элементами промотора, а также влиянием элементов близлежащих генов, регулирующих межгенные взаимодействия в дезоксирибонуклеопротеидном комплексе, компактно сложенном в хромосоме в виде нуклеосома-соленоидо-подобной макроструктуры с многоуровневой организацией [145]. Такая двукратно «винтообразная» суперспирализация высокополимерной ДНК (ДНП) (от 10 до 20 · 10⁶ Да) делает возможным размещение ее в границах хромосомы и взаимодействие генов, расположенных пространственно близко друг к другу в параллельных витках соленоида (но далеко отстоящих друг от друга в линейной структуре ДНК). Причем положение одних генов относительно других может меняться ввиду высокой мобильности многомерной структуры соленоида [146], обусловленной процессами репарации, амплификации и редупликации ДНК, синтезом РНК, изменением «спектра» хромосомных белков или/и их ферментативными модификациями (фосфорилированием, ацетилированием, ADP-рибозилированием) при «перепрограммировании» генома. Указанное позиционное положение генов в хромосомах клеток является, по-видимому, необходимым и для межхромосомных дистанционных взаимодействий.

В представленном обзоре мы коснулись лишь областей регуляции промоторов, проксимально расположенных по отношению к стартовой точке транскрипции, а также транс-факторов, которые в кооперации с регуляторными элементами управляют генами, детерминирующими тканевую специализацию клеток и их ответные реакции на воздей-

ствия. Вместе с тем в дистально расположенных регуляторных областях генов (находящихся на расстоянии более тысячи нуклеотидных пар от кодирующей части гена), называемых энхансерами и сайленсерами, имеются, видимо, и другие множественные элементы регуляции, которые обеспечивают (с помощью транс-факторов либо других активаторов или ингибиторов) взаимодействие этих генов с близлежащими и дистально расположенными в хромосомах (в линейном и пространственном измерении) генами, а также с генами других хромосом.

Воздействие внешних факторов и факторов внутренней среды индуцирует (или, напротив, ингибирует) экспрессию генов путем стимуляции синтеза или активации регуляторных белков (ингибиторов, активаторов), обладающих средством к регуляторным элементам промоторов, что приводит к формированию специфичных для каждого случая комплексов между соответствующими последовательностями нуклеотидов регуляторных элементов промоторов с регуляторными белками по принципу белково-нуклеинового и белково-белкового узнавания. Эти процессы обеспечивают высокую точность посадки РНК-полимеразы и скорость процесса транскрипции.

Несомненно, дальнейшее накопление знаний в этой области позволит глубже понять и механизмы ответных реакций на экстремальные воздействия, и механизмы дифференциации и дедифференциации клеток высших организмов, а также найти подходы к управлению этими процессами. В частности, знания о структуре и функциях регуляторных элементов промоторов генов растений могут быть использованы для конструирования химерных или синтетических сильных органоспецифических промоторов из элементов сильных конститутивных промоторов и элементов слабых или умеренной силы промоторов, определяющих органоспецифическую особенность промоторов.

A. P. Galkin, L. G. Liozhina, T. V. Medvedeva, O. V. Bulko, V. P. Kukhar

Regulatory regions of plant genes promoters and proteins-regulators of promotive activity

Summary

A system analysis of the literary data concerning functionality of specific DNA sequences (cys-elements) proximally located in the regulator areas of plant genes and protein trans-factors has been presented in the review. The peculiarities of interaction between cys- and trans-regulatory elements determining species- or organ-specific expression of the genes, cell reaction on external and internal signals, cell adaptation to negative environmental factors, and plants protection from damage and diseases have been reviewed.

A. P. Gal'kin, L. G. L'iozhina, T. V. Medvedeva, O. V. Bulko, V. P. Kukhar

Регуляторні ділянки промоторів рослин та білки — регулятори промоторної активності

Резюме

В огляді системно проаналізовано літературні дані про структуру та функціональне призначення проксимально розташованих специфічних послідовностей ДНК (цис-елементів) у регуляторних областях рослинних генів і транс-факторів білкової природи. Розглянуто особливості взаємодії цис- і транс-регуляторних елементів, які детермінують видо- і органоспецифічну експресію генів, реакцію клітин на зовнішні і внутрішні сигнали, їхню адаптацію до несприятливих факторів довкілля і захист рослин від пошкодження та хвороб.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Spector D. L. Macromolecular domains within the cell nucleus // *Annu. Rev. Cell. Biol.*—1993.—9.—P. 265—315.
2. Roeder R. G. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II // *Trends Biochem. Sci.*—1996.—21.—P. 327—335.
3. Mueller C. Transcription factors: global and detailed views // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2001.—11.—P. 26—32.
4. Riechmann J. L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O. J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J. Z., Ghandehari D., Sherman B. K., Yu G. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes // *Science*.—2000.—290.—P. 2105—2110.
5. Guilfoyle T. The structure of plant gene promoters // *Genet. Eng. Principles and Meth.*—1997.—19.—P. 15—47.
6. Лурузян Э. С. Основы генетической инженерии растений.—М.: Наука, 1988.—304 с.
7. Zavel L., Reinberg D. Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes // *Annu. Rev. Biochem.*—1995.—64.—P. 533—561.
8. Singer V. L., Wobbe C. R., Struhl K. A wide variety of DNA sequences can functionally replace yeast TATA element for transcriptional activation // *Genes Develop.*—1990.—4.—P. 636—645.
9. Martinez E., Chiang C. M., Ge H., Roeder R. G. TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter // *EMBO J.*—1994.—13.—P. 3115—3126.
10. He X., Futterer J., Hohn T. Contribution of downstream promoter elements to transcriptional regulation of the rice tungro bacilliform virus promoter // *Nucl. Acids Res.*—2002.—30.—P. 497—506.
11. Dynan W. S., Sazer S., Tjian R., Schimke R. T. Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter // *Nature*.—1986.—319.—P. 246—248.
12. Nielsen S. J., Praestegaard M., Jorgensen H. F., Clark B. F. Different Sp1 family members differentially affect transcription from the human elongation factor 1 A-1 gene promoter // *Biochem. J.*—1998.—333.—P. 511—517.
13. Gelinas R., Endlich B., Pfeiffer C., Yagi M., Stamatoyannopoulos G. G-substitution to A-substitution in the distal CCAAT box of the gamma-globin gene in Greek hereditary persistence of fetal hemoglobin // *Nature*.—1985.—313.—P. 323—325.
14. Rieping M., Schoffl F. Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced

- expression of chimeric heat-shock genes in transgenic tobacco // *Mol. and Gen. Genet.*—1992.—231.—P. 226—232.
15. Katagiri F., Chua N. H. Plant transcription factors: present knowledge and future challenges // *Trends Genet.*—1992.—8.—P. 22—27.
 16. Климов В. В. Фотосинтез и биосфера // Соросовский образовательный журнал.—1996.—8.—С. 6—13.
 17. Fankhauser C., Chory J. Light control of plant development // *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.*—1997.—13.—С. 203—229.
 18. Kuno N., Furuya M. Phytochrome regulation of nuclear gene expression in plants // *Semin. Cell Develop. Biol.*—2000.—6.—P. 485—493.
 19. Giliano G., Pichersky E., Malik V. S., Timko M. P., Scolnik P. A., Cashmore A. R. An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of plant light-regulated gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85.—P. 7089—7093.
 20. Kuhlmeier C., Cuzzo M., Green P., Goyvaerts E., Ward K., Chua N.-H. Localization and conditional redundancy of regulatory elements in *rbcS-3A*, a pea gene encoding the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85.—P. 4662—4666.
 21. Arguello-Astorga G. R., Herrera-Estrella L. R. Ancestral multipartite units in light-responsive plant promoters have structural features correlating with specific phototransduction pathways // *Plant Physiol.*—1996.—112.—P. 1151—1166.
 22. Takashi U., Pichersky E., Veddals M., Cashmore A. R. Level of expression of the tomato *rbcS-3A* gene as modulated by a far upstream promoter element in a developmentally regulated manner // *Plant Cell.*—1989.—1.—P. 217—227.
 23. Льюшина Л. Г., Медведова Т. В., Булко О. В., Галкин А. П., Кухар П. В. Органоспецифічна та світлозалежна експресія генів у трансгенних рослинах: одержання та клонування корене-, бульбо- та листспецифічних промоторів // Біополімери і клітина.—2003.—19, № 2.—С. 169—178.
 24. Gilmartin P. M., Sarokin L., Memelink J., Chua N.-H. Molecular light switches for plant genes // *Plant Cell.*—1990.—2.—P. 369—378.
 25. Puente P., Wei N., Deng X. W. Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis* // *EMBO J.*—1996.—15.—P. 3732—3743.
 26. Chattopadhyay S., Puente P., Deng X. W., Wei N. Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis* // *Plant J.*—1998.—15.—P. 9—77.
 27. Gilmartin P. M., Memelink J., Hiratsuka K., Kay S. A., Chua N.-H. Characterization of gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element // *Plant Cell.*—1992.—4.—P. 839—849.
 28. Kusnetsov V., Bolle C., Lubberstedt T., Sopory S., Herrmann R. G., Zhou D.-X. Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors // *Trends Plant Sci.*—1999.—4.—P. 210—214.
 29. Chattopadhyay S., Ang L.-H., Puente P., Deng X.-W., Wei N. *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 673—684.
 30. Martinez-Hernandez A., Lopez-Ochoa L., Arguello-Astorga G., Herrera-Estrella L. Functional properties and regulatory complexity of a minimal RBCS light-responsive unit activated by phytochrome, cryptochrome, and plastid signals // *Plant Physiol.*—2002.—128.—P. 1223—1233.
 31. Abel S., Ballas N., Wong M., Theologis A. DNA elements responsive to auxin // *Bioessays.*—1996.—18.—P. 647—654.
 32. Guilfoyle T., Hagen G., Ulmasov T., Murfett J. How does auxin turn on genes? // *Plant Physiol.*—1998.—118.—P. 341—347.
 33. Hagen G., Guilfoyle T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors // *Plant Mol. Biol.*—2002.—49.—P. 373—385.
 34. Ballas N., Wong L. M., Ke M., Theologis A. Two auxin-responsive domains interact positively to induce expression of the early indoleacetic acid-inducible gene PS-IAA4/5 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 3483—3487.
 35. Liu Z. B., Ulmasov T., Shi X., Hagen G., Guilfoyle T. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements // *Plant Cell.*—1994.—6.—P. 645—657.
 36. Xu N., Hagen G., Guilfoyle T. J. Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter // *Plant Sci.*—1997.—126.—P. 193—201.
 37. Ulmasov T., Liu Z.-B., Hagen G., Guilfoyle T. J. Composite structure of auxin responsive elements // *Plant Cell.*—1995.—7.—P. 1611—1623.
 38. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // *Plant Cell.*—1997.—9.—P. 1963—1971.
 39. Liscum E., Reed J. W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development // *Plant Mol. Biol.*—2002.—49.—P. 387—400.
 40. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. J. ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements // *Science.*—1997.—276.—P. 1865—1868.
 41. Ellis J. G., Tokuhisa J. G., Llewellyn D. J., Bouchez D., Singh K., Dennis E. S., Peacock W. J. Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? // *Plant J.*—1993.—4.—P. 433—443.
 42. Krawczyk S., Thurow C., Niggeweg R., Gatz C. Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential // *Nucl. Acids Res.*—2002.—30.—P. 775—781.
 43. Skriver K., Olsen F. L., Rogers J. C., Mundy J. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 7266—7270.
 44. Cercos M., Gomez-Cadenas A., Ho T. H. D. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid // *Plant J.*—1999.—19.—P. 107—118.
 45. Gubler F., Kalla R., Roberts J. K., Jacobsen J. V. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter // *Plant Cell.*—1995.—7.—P. 1879—1891.
 46. Tang Z., Daryl A. S., Morishige T., Mullet J. E. Homeo-domain leucine zipper proteins bind to the phosphate response domain of the soybean VspB tripartite promoter // *Plant Physiol.*—2001.—125.—P. 797—809.
 47. Parcy F., Valon C., Raynal M., Gaubier-Comella P., Delseny M., Giraudat J. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the AB13 locus and of endogenous abscisic acid // *Plant Cell.*—1994.—6.—P. 1567—1582.
 48. Hattori T., Terada T., Hamasuna S. Regulation of the Osem gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1 // *Plant J.*—1995.—7.—P. 913—925.
 49. Busk P. K., Pages M. Regulation of abscisic acid-induced transcription // *Plant Mol. Biol.*—1998.—37.—P. 425—435.

50. Shen Q., Zhang P., Ho T. H. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley // *Plant Cell*.—1996.—8.—P. 1107—1119.
51. Nakagawa H., Ohmiya K., Hattori T. A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid // *Plant J*.—1996.—9.—P. 217—227.
52. Marcotte W. R., Russell S. H., Quatrano R. S. Abscisic acid-responsive sequences from the *em* gene of wheat // *Plant Cell*.—1989.—1.—P. 969—976.
53. McCarty D. R., Hattori T., Carson C. B., Vasil V., Lazar M., Vasil I. K. The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator // *Cell*.—1991.—66.—P. 895—905.
54. Bleeker A. B., Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants // *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.*—2000.—16.—P. 1—18.
55. Ohme-Takagi M., Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element // *Plant Cell*.—1995.—7.—P. 173—182.
56. Kevin L.-C., Wang Hai Li, Joseph R., Ecker Morita A., Umemura T. Ethylene biosynthesis and signaling networks // *Plant Cell*.—2002.—14.—P. 131—151.
57. Deikman J. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription // *Physiol. Plant*.—1997.—100.—P. 561—566.
58. Ohta M., Ohme-Takagi M., Shinshi H. Three ethylene-responsive transcriptional factors in tobacco with distinct trans-activation functions // *Plant J*.—2000.—22.—P. 29—38.
59. Wu K., Tian L., Hollingworth J., Brown D. C., Mik B. Functional analysis of tomato *Pti4* in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*.—2002.—128.—P. 30—37.
60. Xu R., Goldman S., Coupe S., Deikman J. Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative *cis* elements // *Plant Mol. Biol.*—1996.—31.—P. 1117—1127.
61. Coupe S. A., Deikman J. Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes // *Plant J*.—1997.—11.—P. 1207—1218.
62. Rieu A., Mariani C., Weterings K. Expression analysis of five tobacco EIN3 family members in relation to tissue-specific ethylene responses // *J. Exp. Bot.*—2003.—54.—P. 2239—2244.
63. Gazzarrini S., McCourt P. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2001.—4.—P. 387—391.
64. Sheen J., Zhou L., Jang J. C. Sugars as signalling molecules // *Curr. Opin. Plant Biol.*—1999.—2.—P. 410—418.
65. Lu C. A., Lim E.-K., Yu S.-M. Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 10120—10131.
66. Lu C. A., Ho T. H., Ho S. L., Yu S. M. Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression // *Plant Cell*.—2002.—14.—P. 1963—1980.
67. Maeo K., Tomiya T., Hayashi K., Akaike M., Morikami A., Ishiguro S., Nakamura K. Sugar-responsive elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato // *Plant Mol. Biol.*—2001.—46.—P. 627—637.
68. Sun C., Palmqvist S., Olsson H., Boren M., Ahlandsberg S., Jansson C. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *isol* promoter // *Plant Cell*.—2003.—15.—P. 2076—2092.
69. Grierson C., Du J. S., Zabala M. T., Beggs K., Smith C., Holdsworth M., Bevan M. Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and RT developmental regulation of a potato tuber storage protein gene // *Plant J*.—1994.—5.—P. 815—826.
70. Ishiguro S., Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato // *Mol. and Gen. Genet.*—1994.—28.—P. 563—571.
71. Kim D. J., Smith S. M., Leaver C. J. A cDNA encoding a putative SPF1-type DNA-binding protein from cucumber // *Gene*.—1997.—185.—P. 265—269.
72. Rushton P. J., Macdonald H., Huttly A. K., Lazarus C. M., Hooley R. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *cis*-element in the promoters of alpha-Amy2 genes // *Plant Mol. Biol.*—1995.—29.—P. 691—702.
73. Pla M., Vilardeell J., Guiltinan M. J., Marcotte W. R., Niogret M. F., Quatrano R. S., Pages M. The *cis*-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28* // *Plant Mol. Biol.*—1993.—21.—P. 259—266.
74. Ohto M., Nakamura-Kito K., Nakamura K. Induction of expression of genes coding for sporamin and β -amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato // *Plant Physiol*.—1992.—99.—P. 422—427.
75. Bustos M. M., Iyer M., Gagliardi S. J. Induction of a β -phaseolin promoter by exogenous abscisic acid in tobacco: developmental regulation and modulation by external sucrose and Ca^{2+} ions // *Plant Mol. Biol.*—1998.—37.—P. 265—274.
76. Creelman R. A., Mullet J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*—1997.—48.—P. 355—381.
77. Bleichert S., Brodschelm W., Holder S., Kammerer L., Kutchan T. M., Mueller M. J., Xia Z. Q., Zenk, M. H. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1995.—92.—P. 4099—4105.
78. Xu Y., Chang P. F. L., Liu D., Narasimhan M. L., Raghothama M. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate // *Plant Cell*.—1994.—6.—P. 1077—1085.
79. Brown R. L., Kazan K., McGrath K. C., Maclean D. J., Manners J. M. A Role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis* // *Plant Physiol*.—2003.—132.—P. 1020—1032.
80. Mason H. S., DeWald D. B., Mullet J. E. Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter // *Plant Cell*.—1993.—5.—P. 241—251.
81. Rouster J., Leah R., Mundy J., Cameron-Mills V. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain // *Plant J*.—1997.—11.—P. 513—523.
82. Kim S.-R., Choi J.-L., Costa M. A., An G. Identification of G-box sequence as an essential element for methyl-jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter // *Plant Physiol*.—1992.—99.—P. 627—631.
83. Xiang C., Miao Z.-H., Lam E. Coordinated activation of as-1 type elements and tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide // *Plant Mol. Biol.*—1996.—32.—P. 415—426.
84. Schenk P. M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C., Manners J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2000.—97.—P. 11655—11660.
85. Penninckx I. A., Thomma B. P., Buchala A., Metraux J.-P., Broekaert W. F. Concomitant activation of jasmonate and

- ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis* // *Plant Cell*.—1998.—10.—P. 2103—2114
86. Rushton P. J., Somssich I. E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens // *Curr. Opin. Plant Biol.*—1998.—1.—P. 311—315.
 87. Ohme-Tagaki M., Suzuki K., Shinshi H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes // *Plant Cell Physiol.*—2000.—41.—P. 1187—1192.
 88. Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S., Somssich I. E. The WRKY superfamily of plant transcription factors // *Trends Plant Sci.*—2000.—5.—P. 199—206.
 89. Kirsch C., Takamiya-Wik M., Schmelzer E., Hahlbrock K., Somssich I. E. A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley ELI7 gene family members by fungal elicitor or pathogen infection // *Mol. Plant Pathol.*—2000.—1.—P. 243—251
 90. Rolland F., Moore B., Sheen J. Sugar sensing and signalling in plants // *Plant Cell*.—2002.—Suppl.—P. 185—205.
 91. Hara K., Yagi M., Kusano T., Sano H. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor on wounding // *Mol. and Gen. Genet.*—2000.—263.—P. 30—37.
 92. Campbell E. J., Schenk P. M., Kazan K., Penninckx I. A. M. A., Anderson J. P., Maclean D. J., Cammue B. P. A., Ebert P. R., Manners J. M. Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—2003.—133.—P. 1272—1284.
 93. Morimoto R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // *Genes Develop.*—1998.—12.—P. 3788—3796.
 94. Nover L., Scharf K. D. Heat stress proteins and transcription factors // *Cell Mol. Life Sci.*—1997.—53.—P. 80—103.
 95. Scharf K. D., Rose S., Zott W., Schoffl F., Nover L., Schoffl F. Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF // *EMBO J.*—1990.—9.—P. 4495—4501.
 96. Schoffl F., Rieping M., Baumann G., Bevan M., Angermuller S. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco // *Mol. and Gen. Genet.*—1989.—217.—P. 246—253.
 97. Schoffl F., Prandl R., Reindl A. Regulation of the heat-shock response // *Plant Physiol.*—1998.—117.—P. 1135—1141.
 98. Mittler R., Zilinskas B. A. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 21802—21807.
 99. Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N. Genomic DNA structure of a gene encoding cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.*—1993.—315.—P. 313—317.
 100. Storozhenko S., De Pauw P., Van Montagu M., Inze D., Kushnir S. The heat-shock element is a functional component of the *Arabidopsis* APX1 gene promoter // *Plant Physiol.*—1998.—118.—P. 1005—1014.
 101. Rieping M., Schoffl F. Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco // *Mol. and Gen. Genet.*—1992.—231.—P. 226—232.
 102. Czarnecka E., Key J. L., Gurley W. B. Regulatory domains of the Gmhspl7.5-E heat shock promoter of soybean: a mutational analysis // *Mol. Cell. Biol.*—1989.—9.—P. 3457—3463.
 103. Schoffl F., Schroder G., Kliem M., Rieping M. A SAR sequence containing 395 bp fragment mediates enhanced, gene-dosage-correlated expression of a chimaeric heat shock gene in transgenic tobacco plants // *Transgen. Res.*—1993.—2.—P. 93—100.
 104. Tsukijama T., Becker P. B., Wu C. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor // *Nature*.—1994.—367.—P. 525—532
 105. Neill S., Radhika Desikan R., Hancock J. Hydrogen peroxide signalling // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2002.—5.—P. 363—465.
 106. Baxter-Burrell A., Yang Z., Springer P. S., Bailey-Serres J. RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance // *Science*.—2002.—296.—P. 2026—2028.
 107. Vranova E., Inze D., Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress // *J. Exp. Bot.*—2002.—53.—P. 1227—1236.
 108. Larkindale J., Knight M. R. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid // *Plant Physiol.*—2002.—128.—P. 682—695.
 109. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress // *Plant Cell*.—1994.—6.—P. 251—264.
 110. Stockinger E. J., Gilmour S. J., Thomashow M. F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1997.—94.—P. 1035—1040.
 111. Jiang C., Yu B., Singh J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus* // *Plant Mol. Biol.*—1996.—30.—P. 679—684.
 112. Pla M., Vilardell J., Gultinan M. J., Marcotte W. R., Niogret M. F., Quatrano R. S., Pages M. The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28* // *Plant Mol. Biol.*—1993.—21.—P. 259—266.
 113. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways // *Curr. Opin. Plant Biol.*—2000.—3.—P. 217—223.
 114. Dolferus R., Jacobs M., Peacock W. J., Dennis E. S. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis* *Adh* gene // *Plant Physiol.*—1994.—105.—P. 1075—1087.
 115. Dolferus R., Klok E. J., Ismond K., Delessert C., Wilson S., Good A., Peacock J., Dennis L. Molecular basis of the anaerobic response in plants // *IUBMB Life*.—2001.—51.—P. 79—82.
 116. Olive M. R., Walker J. C., Singh K., Dennis E. S., Peacock W. J. Functional properties of the anaerobic responsive element of the maize *Adh1* gene // *Plant Mol. Biol.*—1990.—15.—P. 593—604.
 117. Hoeren F. U., Dolferus R., Wu Y., Peacock W. J., Dennis E. S. Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen // *Genetics*.—1998.—149.—P. 479—490.
 118. Yanofsky M. F. Regulation of *Arabidopsis* flower development // *Plant Cell*.—1993.—5.—P. 1183—1193.
 119. Krizek B. A., Meyerowitz E. M., Riechmann J. L. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADs domain homeotic proteins

- APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 04793—04798.
- Bevan M., Colot V., Hammond-Kosack M., Holdsworth M., Torres de Zabala M., Smith C., Grierson C., Beggs K. Transcriptional control of plant storage protein genes // Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.—1993.—342.—P. 209—215.
- Thomas M. S. Gene expression during embryogenesis and germination: an overview // Plant Cell.—1993.—5.—P. 1401—1410.
- McCarty D. R. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.—1995.—46.—P. 71—93.
- Waddell D. R., Saabach I., Pickardt T., Machemehl F., Hillmer S., Schieder O., Muntz K. Seed-specific expression of the sulfur-rich Brazil nut 2S albumin in transgenic *Vicia narbonensis* plants // J. Cell. Biochem.—1994.—18.—P. 108—110.
- Dickinson C. D., Evans R. P., Nielsen N. C. RY repeats are conserved in the 5' flanking region of legume seed-protein genes // Nucl. Acids Res.—1988.—16.—P. 183—197.
- Lelievre J. M., Oliveira L. O., Nielsen N. C. 5'-CATGCATG-3' elements modulate the expression of glycinin genes // Plant Physiol.—1992.—98.—P. 387—391.
- Ezcurra I., Wycliffe P., Nehlin L., Ellerstrom M., Rask L. Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABR, whereas B3 interacts with an RY/G-box // Plant J.—2000.—24.—P. 57—66.
- Reidt W., Wohlfarth T., Ellerstrom M., Czihal A., Tewes A., Ezcurra I., Rask L., Baumlein H. Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product // Plant J.—2000.—1.—P. 401—408.
- Washida H., Wu C. Y., Suzuki A., Yamanouchi U., Akihama T., Harada K., Takaiwa F. Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1 // Plant Mol. Biol.—1999.—40.—P. 1—12.
- Thompson G. A., Larkins B. A. Structural elements regulating zein gene expression // Bioessays.—1989.—10.—P. 108—112.
- Suzuki A., Wu C. Y., Washida H., Takaiwa F. Rice MYB protein OSMYB5 specifically binds to the AACA motif conserved among promoters of genes for storage protein glutelin // Plant Cell Physiol.—1998.—39.—P. 555—559.
- Vicente-Carbajosa J., Moose S. P., Parsons R. L., Schmidt R. A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 7685—7690.
- Albani D., Hammond-Kosack M. C., Smith C., Conlan S., Colot V., Holdsworth M., Bevan M. W. The wheat transcriptional activator SPA: a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamins genes // Plant Cell.—1997.—9.—P. 171—184.
133. Wu C. Y., Suzuki A., Washida H., Takaiwa F. The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants // Plant J.—1998.—14.—P. 673—683.
134. Wu C., Washida H., Onodera Y., Harada K., Takaiwa F. Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression // Plant J.—2000.—23.—P. 415—421.
135. Giovannoni J. Molecular biology of fruit maturation and ripening // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.—2001.—52.—P. 725—749.
136. Nicholson F. J., Smith C. J. S., Schuch W., Bird C. R., Grierson D. High levels of ripening-specific reported gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions // Plant Mol. Biol.—1995.—28.—P. 423—435.
137. Yamagata H., Yonesu K., Hirata A., Aizono Y. TGTCACA motif is a novel cis-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the cucumis gene // J. Biol. Chem.—2002.—277.—P. 11582—11590.
138. Bastola D. R., Peth V. V., Winicov I. Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible MsPRP2 gene // Plant Mol. Biol.—1998.—38.—P. 1123—1135.
139. Liu J.-J., Ekramoddoullah A. K. M. Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco // Plant Mol. Biol.—2003.—52.—P. 103—120.
140. Verdagner B., Kochko A., Fux C. I., Beachy R. N., Fauquet C. Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter // Plant Mol. Biol.—1998.—37.—P. 1055—1067.
141. Lam E., Benfey P. N., Gilmartin P. M., Fang R.-X., Chua N.-H. Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 7890—7894.
142. Eyal Y., Curie C., McCormick S. Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes // Plant Cell.—1995.—7.—P. 373—384.
143. Bate N., Twell D. Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements // Plant Mol. Biol.—1998.—37.—P. 859—869.
144. Kobayashi A., Sakamoto A., Kubo K., Rybka Z., Kanno Y., Takatsuji H. Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in petunia // Plant J.—1998.—13.—P. 571—576.
145. Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия.—М.: Наука, 1989.—254 с.
146. Глазко В. И., Глазко Г. В. Введение в генетику. Биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, протеомика, метаболика.—Киев: КВІІІ, 2003.—639 с.

УДК 577.214.625

Надійшла до редакції 14.04.04