

Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Молекулярно-генетический контроль проведения и реализации сигналов ауксинов

В. А. Цыганкова, Л. А. Галкина, Л. И. Мусатенко, К. М. Сытник

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

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины
Ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина

*Представлены данные о регуляторных компонентах сигнального пути индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в клетках растений: мембранных белках-рецепторах, воспринимающих экзогенные сигналы ИУК, системе вторичных мессенджеров (сАМР, сGMP, инозитолтрифосфат и диацилглицерол, цитоплазматический кальций, «сенсорный» белок Ca^{2+} сигналов — кальмодулин), опосредующих передачу сигналов ИУК с рецепторов на эффекторы (ферменты), катализирующие процессы внутриклеточного метаболизма. Дан перечень идентифицированных в последние годы генов, детерминирующих синтез белков, участвующих в проведении сигналов ИУК у *Arabidopsis*: ген *ABP1*, кодирующий мембранный белок — рецептор ИУК; *AtCP1* и *AtCBL1* гены, кодирующие «сенсорные» белки Ca^{2+} ; многочисленные семейства *MDR* генов мембранных белков, участвующих в активном АТФ-зависимом транспорте протонной формы ИУК через мембраны клеток, *PIN* генов белков, контролирующих пассивный полярный внутри- и межклеточный транспорт анионной формы ИУК, *ARG1* и *RCN1* генов белков, ответственных за передачу гравитропических сигналов и регулирующих полярный транспорт анионной формы ИУК через мембраны специализированных гравиточувствительных клеток — статолитов, *VTI* генов *SNARE* белков, участвующих в везикулярном внутриклеточном транспорте ИУК, и *AtMRP5* гена белка — транспортера конъюгированных форм ИУК; *ARF* гены ауксин-активируемых трансфакторов, контролирующих экспрессию ранних ауксин-регулируемых *Aux/IAA*, *SAUR*, *GH3* и *ACS* генов, а также многочисленные семейства *SKP1*, *RBX1*, *ATCUL1*, *ASK1*, *ASK2*, *AXR1*, *ECR1*, *RCE1*, *ENR2p*, *Cdc4p*, *Cdc53p*, *Scp1p*, *TIR1* генов белков (членов убиквитин-протеинлигазного комплекса) и *CSN* генов белков (членов мультисубъединичного белкового регуляторного комплекса *COP9* сигнасомы) — компонентов убиквитин/протеасомо-опосредованного пути деградации *Aux/IAA* белков, ингибирующих проведение сигналов ауксина. Рассмотрена гипотетическая модель регуляции ИУК экспрессии генов.*

Ключевые слова: рецепторы индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), вторичные мессенджеры ИУК, белки — транспортеры ИУК, ауксин-регулируемые гены, убиквитин-протеасомный путь деградации белков — репрессоров ИУК.

Введение. На протяжении последних десятилетий значительный прогресс в области фундаментальных исследований путей биосинтеза фитогормонов

и молекулярных механизмов их действия достигнут благодаря применению физико-химических методов с использованием в качестве стандартов экзогенных фитогормонов, меченных радиоизотопами (2H , ^{13}C или ^{15}N), а также методов молекулярной

© В. А. ЦЫГАНКОВА, Л. А. ГАЛКИНА, Л. И. МУСАТЕНКО,
К. М. СЫТНИК, 2005

генетики, при помощи которых проводятся идентификация мутантных генов, их клонирование и последующее изучение продуктов экспрессии этих генов — регуляторных белков, участвующих в передаче сигналов различных классов фитогормонов.

В настоящее время наиболее изучены молекулярные механизмы регуляторного действия пяти основных классов фитогормонов: ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, этилена и абсцизовой кислоты. Перспективными являются исследования и других идентифицированных в последние годы гормоноподобных регуляторов роста растений — жасмонатов и брассиностероидов. Несомненно, значительный интерес представляет также выяснение молекулярных механизмов взаимодействия между разными классами фитогормонов, формирующих у растений эндогенную интегрированную регуляторную фитогормональную систему, в пользу существования которой свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные как об узкоспецифическом, так и о каскадном действии фитогормонов (когда один гормон индуцирует синтез другого гормона, оказывающего специфический физиологический эффект) [1, 2].

Подтверждением данного факта являются результаты многочисленных исследований, в ходе которых, например, выявлено, что усиление роста адвентивных корней под влиянием ауксина и цитокинина вызвано индукцией синтеза в клетках 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтетазы, причастной к биосинтезу этилена, который и проявляет такой характерный для него физиологический эффект [3, 4]; индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и цитокинины подавляют синтез друг друга, в то время как ИУК стимулирует синтез этилена [1]; ауксин индуцирует посттрансляционный процессинг О-ксилотрансферазы, фермента, ограничивающего синтез цитокининов [5]; продукты экспрессии *rol* генов *Agrobacterium rhizogenes* изменяют метаболизм гиббереллинов, блокируя активность гиббереллин-оксидазы [5, 6]. Таким образом, без учета взаимовлияния фитогормонов однозначно решать вопрос о специфичности их действия очень сложно.

На основании результатов теоретических и практических достижений в области фитогормонологии сформулирована общая для всех классов фитогормонов концепция об эволюционно сформированных механизмах их молекулярного действия: выполняя роль химических мессенджеров, фито-

гормоны на протяжении всего онтогенеза участвуют в системном контроле роста организмов (увеличении их размеров и усложнении выполняемых ими функций); их регуляторное действие проявляется в образовании гормоно-рецепторных комплексов (т. е. посредством связывания со стереоспецифическими сайтами-рецепторами на мембране) с дальнейшей активацией одного или более внутриклеточных вторичных мессенджеров и последующей регуляцией процессов транскрипции, трансляции или посттрансляционных модификаций продуктов экспрессии генов [6—8].

Настоящий обзор является продолжением обзора [9] (посвященного генам биосинтеза ауксинов и ауксин-регулируемых генов, контролирующих деление и растяжение клеток). В нем проанализированы данные литературы о молекулярных механизмах действия ауксинов, начиная с этапа их взаимодействия с белками-рецепторами и последующей регуляции проведения сигналов с участием вторичных мессенджеров к специфическим генам, контролируемым ауксинами.

Рецепторы ауксина и их внутриклеточная и внутриклеточная локализация. Согласно существующей в настоящее время в физиологии растений фитогормональной концепции, в тканях растений присутствует один или несколько стереоспецифических рецепторов, формирующих характерный ответ клеток на действие определенного гормона. Рецептор является специфическим клеточным сайтом, с которым связываются лиганды (гормоны и др. химические соединения) и который определяет соответствующую ответную реакцию клетки на конкретный химический сигнал. Рецепторы растительных гормонов идентифицированы для всех известных регуляторов роста растений [8, 10], они обычно локализируются в тканях-мишенях, обладающих дифференцированной чувствительностью к действию гормонов, и по своей химической природе в основном являются гликопротеинами [11].

Наиболее охарактеризованным фитогормональным рецептором ауксинов является гликопротеин ABP1 (auxin binding protein), впервые идентифицированный у кукурузы (*Zea mays*) [12, 13]. В соответствии с результатами SDS гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выяснено, что ABP1 — это полипептид с молекулярной массой (м. м.) 22 кДа, являющийся конканавалин А-связывающим гликопротеином [14—16].

Методом клонирования кДНК белка АВР1 получены данные о его локализации в эндоплазматическом ретикулуме (ER) [13, 16, 17]. С помощью анализа аминокислотных последовательностей АВР1 обнаружено присутствие у данного гликопротеина ER-специфического сигнального (ER targeting signal) карбокситерминального (С-терминального) KDEL домена (содержащего Lys, Asp, Glu и Leu последовательность аминокислот), являющегося сайтом связывания ауксина.

Существуют также многочисленные сведения о локализации гликопротеина АВР1 на поверхности плазматической мембраны (PM) и опосредовании им сигналов ауксина [16—18]; к ним относятся, например, данные об электрофизиологических реакциях, возникающих в обработанных ауксином PM протопластов табака, кукурузы и пшеницы [19]; результаты иммунологического анализа, показывающего, что индуцируемая ауксином гиперполяризация PM ингибируется антителами к АВР1, а также данные исследований трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*), экспрессирующих АВР1 под контролем индуцируемого тетрациклином промотора, у которых специфические ростовые реакции модулируются ауксин-зависимым образом [13].

Получены также сведения о том, что воздействие ауксина на АВР1 рецептор в элонгирующих устьичных клетках фасоли и орхидеи (*Paphiopedilum tonsum*) приводит к изменению pH цитоплазмы и к стимуляции работы K^+ каналов — физиологических процессов, имеющих существенное значение для роста coleoptilya и гравитропизма [13, 20, 21].

Установлено, что в восприятии сигналов ауксина от рецептора АВР1 участвует фермент фосфолипаза PLA_2 . Как показано, антитела к АВР1 подавляют активацию ауксином PLA_2 в мембранах. Это свидетельствует в пользу того, что АВР1 передает сигналы ауксина на упомянутый мембранный фермент [22]. Активация PLA_2 (относящаяся к ранним реакциям клеток на сигнал ауксина) приводит к образованию жирных кислот и лизофосфолипидов, активирующих протеинкиназы и участвующих в фосфорилировании белков, в том числе H^+ -АТФазы, вызывающей подкисление клеточной стенки и последующее ее растяжение.

Эксперименты по трансформации растений геном АВР1, усиливающей зависимый от ауксина рост клеток, а также данные о том, что мутация по

гену АВР1 у *Arabidopsis thaliana* является летальной на глобулярной стадии развития зародыша, подтверждают важную роль гликопротеина АВР1 в регуляции роста и развития растений [22].

Кроме мажорного АВР1 гликопротеина, из coleoptilya и мезокотилей однодольных растений (кукурузы, пшеницы, овса) электрофоретически выделены и очищены с помощью ВЭЖХ два других также высокогликозилированных полипептида с м. м. 21 (мажорный) и 20 (минорный) кДа [23—25]. Установлено, что в течение развития растения прослеживается закономерность: с увеличением в размерах coleoptilya и мезокотилей способность связывать ауксин и проявление ответной реакции (элонгации) на этот фитогормон параллельно снижаются [15, 26].

Дифференцированная внутритканевая и внутриклеточная локализация рецепторов ауксина исследована у представителей семейства двудольных. Например, в суспензионных и каллусных культурах клеток табака обнаружены мембранные и цитоплазматические рецепторы, проявляющие специфичность к связыванию ИУК и не обладающие таковой к синтетическому ауксину 2,4-дихлорофеноксисукусной кислоте (2,4-Д): в каллусе, выращиваемом на среде с ИУК и кинетином, образовывалось значительное количество корней, тогда как в культивируемых каллусных клетках в присутствии 2,4-Д формирования корней не происходило [14, 27, 28].

В других экспериментах показано, что у гороха индуцируемая ауксином N-ацил-аспартатсинтетаза синтезируется не только в растущих тканях, но и в неэлонгирующих и не реагирующих на действие ауксина зрелых зонах, рост которых ограничивается сформировавшейся клеточной стенкой [29]. Аналогично обнаружено [30], что ауксин индуцирует синтез идентичных видов мРНК как в элонгирующих (апикальных), так и в неэлонгирующих (базальных) участках гипокотилея сои. Таким образом, доказано, что некоторые ауксин-регулируемые изменения в экспрессии генов являются общими для органов с различными ответными ростовыми реакциями.

Известны эндогенные модуляторы ауксин-связывающих сайтов, играющие важную роль в регуляции роста. К ним относятся выявленные, в частности, у кукурузы бензоксазолиноны и обнаруженный в PM однодольных и двудольных растений грибной токсин фузикокин. Показано, что много-

кратное увеличение количества микросомных флуоресцентно-связывающих сайтов наблюдается при обработке колеоптилей кукурузы в течение 10—90 мин ИУК в концентрации 1—10 мкМ [31—33].

Получены данные, свидетельствующие о том, что существует временная регуляция синтеза белков — рецепторов растений. Например, временное усиление синтеза ИУК-связывающих рецепторов отмечено в клетках корней пшеницы при их инкубации в течение 1 ч в 0,68 мкМ растворе ИУК [34] и в мембранах клеток клубней артишока при их 24-ч инкубации в 1 мкМ растворе 2,4-Д [35].

Вторичные мессенджеры фитогормонов. За научное открытие, касающееся того, что гормоны катализируют различные ферментативные процессы внутри клеток-мишеней посредством вторичных мессенджеров, Е. В. Сазерлэнд удостоен Нобелевской премии за 1971 г. В настоящее время общепризнано, что вторичными мессенджерами гормонов растений и животных являются сАМР и сGMP. При воздействии гормона на рецептор активируется фермент аденилатциклаза, расположенная на мембране и участвующая в синтезе сАМР из АТР. Затем сАМР поступает в цитоплазму и активирует различные протеинкиназы, которые, в свою очередь, могут активировать специфические ферменты клетки, фосфорилируя их [6].

Ко вторичным мессенджерам гормонов растений относится также инозитолтрифосфатная система [6, 36]. Воздействие гормона на рецептор вызывает активацию фосфолипазы С, гидролизующей фосфоинозитол-4,5-бисфосфат. В результате гидролиза этого компонента мембраны в цитоплазму поступают два вторичных мессенджера: инозитолтрифосфат и диацилглицерол. Последний активирует протеинкиназу С, выполняющую ведущую роль в регуляции широкого круга процессов через селективное фосфорилирование ферментов.

Универсальным регулятором многочисленных гормональных сигналов является цитоплазматический кальций [37]. Инозитолтрифосфат стимулирует открытие кальциевых каналов в мембране и соответственно координирует одновременное высвобождение вторичных мессенджеров из мембраны, необходимых для активации протеинкиназы [36]. Возрастание у растений уровня кальция в цитоплазме может также быть результатом действия сигналов окружающей среды: стресса, света, холода, физической или электрической стимуляции, а также гормонов [38]. Кальций оказывает

значительный эффект на структурную организацию, например, тубулина в микротрубочках, на изменение проницаемости мембран, влияет на активность фермента протеинкиназы, регулирует цитокinesis. Многие физиологические ответные реакции клеток на воздействие света (в частности, функционирование фитохрома у растений) формируются с участием ионов Ca^{2+} [39, 40]. Наиболее значительная роль в регулируемых гормонами процессах принадлежит кальцию: экзогенный Ca^{2+} может усиливать эффекты каждого из пяти фитогормонов [41], существуют также данные о том, что Ca^{2+} является вторичным мессенджером ауксина [42].

Обнаружено, что Ca^{2+} проявляет функции вторичного мессенджера в передаче сигналов в ответ на осмотический и другие виды стрессов [43]. Специфическими рецепторами ионов Ca^{2+} , проводящими универсальные сигналы кальция в виде специфической информации внутри клеток, являются разнообразные Ca^{2+} -связывающие белки (содержащие различные EF-hand домены, обеспечивающие связывание Ca^{2+}), претерпевающие значительные конформационные изменения при его присоединении. У высших растений белки различных семейств, такие как кальмодулин и родственные ему белки, выполняют роль Ca^{2+} «сенсоров» в ответ на осмотический стресс, являясь связующим звеном между кальцием и зависимыми от него ферментами: аденилатциклазами, фосфоорилазами, НАД киназами, фосфолипазами и фосфодиэстеразами, и, следовательно, называются регуляторными или «сенсорными» белками сигналов Ca^{2+} [44, 45].

Например, у *Arabidopsis* идентифицирован ген *AtCPI1*, кодирующий аналогичный кальмодулину белок, экспрессия которого индуцируется NaCl [46], а также изолированы два гена, кодирующих Ca^{2+} «сенсоры», подобные кальциунерину В — регуляторной субъединице фосфатазы млекопитающих [47]. Показано, что экспрессия одного из них — гена *AtCBL1* — значительно усиливается в ответ на различные стрессы, включая засуху, повреждение и низкие температуры. Более того, у *Arabidopsis* изолированы гены, кодирующие группу протеинкиназ и взаимодействующие с *AtCBL1* белком Ca^{2+} -зависимым образом [48]. Обнаружено, что ген, названный *SOS3* (salt overly sensitive 3), кодирует субъединицу кальциунерина у *Arabidopsis* [49]. Белки, кодируемые *SOS3* геном, формируют

толерантность растений к повышенным концентрациям соли, однако их экспрессия не меняется при стрессовых условиях. Выяснено, что кальмодулины и кальциунерины могут регулировать функции большинства фитогормонов [50, 51], однако они не являются вторичными мессенджерами, поскольку их концентрация в цитоплазме клеток-мишеней не изменяется под действием фитогормонов.

Противоположные кальмодулинам функции выполняют некоторые Ca^{2+} -связывающие белки, проявляющие незначительные конформационные изменения при соединении с кальцием; эти белки могут быть ответственными за структурную и буферную стабильность внутриклеточного Ca^{2+} . Например, S100D белок (кальбидин D9k) относят к структурным или буферным белкам [52, 53].

Пространственная и временная регуляция концентрации кальция в клетках растений зависит также от координированного взаимодействия кальциевых каналов и активных транспортеров кальция, локализованных в различных мембранах органелл. С помощью генетических и биохимических методов идентифицированы различные Ca^{2+} насосы у мутантных линий (K616) грибов (подобные Ca^{2+} -АТРазам растений) и выяснены их регуляторные и каталитические функции [54].

Растительные Ca^{2+} -АТРазы подразделяют на два основных типа [54]: например, AtECA1 является одним из четырех обнаруженных в настоящее время членов Ca^{2+} -АТРаз мембран ER у *Arabidopsis* II-A типа, в то время как AtACA2 — одним из семи идентифицированных на сегодняшний день членов Ca^{2+} -АТРаз II-B типа, присутствующих в РМ, мембранах ER и вакуолей, и имеющих регуляторный аминоктерминальный (N-терминальный) домен. Регуляторные домены Ca^{2+} -АТРаз выполняют многочисленные функции, включая аутоингибирование, связывание кальмодулина, и являются сайтами модификаций в реакциях фосфорилирования. Эти домены, однако, значительно отличаются у различных Ca^{2+} -АТРаз II-B типа, что свидетельствует об их дифференцированной регуляции.

Изучена роль ионов Ca^{2+} в регуляции ростовых процессов у кукурузы. В плазмалемме клеток coleoptилей проростков обнаружено наличие ИУК-чувствительных Ca^{2+} каналов. Показано, что увеличение проницаемости мембраны для ионов Na^+ вызвано влиянием ИУК на активность Ca^{2+} каналов, способных в отсутствие ионов Ca^{2+} в инкубационной среде пропускать ионы Na^+ [55, 56].

Гены белков — транспортеров ауксинов. К генам мембранных белков, участвующих во внутриклеточном и межклеточном транспорте ауксина, относится многочисленное семейство MDR (multi-drug resistance) генов, первоначально идентифицированных у *Arabidopsis* [57, 58]. MDR транспортеры являются подгруппой многочисленного класса АТФ-связывающих кассетных (ATP-binding cassette) ABC белков-транспортеров, или ABC-АТРаз (обнаруженных также у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и млекопитающих), переносящих через мембраны различные субстраты [57, 59—63]: неорганические анионы, пептиды, липиды, хелаты тяжелых металлов и разнообразные фармакологически активные вещества. Получены также данные об участии MDR белков в иммунных реакциях и в апоптозе [64, 65]. Мутации генов мембранных ABC белков-транспортеров у людей и животных приводят к разнообразным неизлечимым заболеваниям, а гиперэкспрессия ABC генов — к синдрому устойчивости к лекарственным препаратам (multi-drug resistance syndrome) [57, 66].

Первыми клонированными растительными генами ABC белков являются гены MDR и AtPGP1 (аллельный AtMDR1) у *Arabidopsis*; в настоящее время клонированы и многие другие гены мембранных ABC белков-транспортеров из разнообразных растений [57, 58, 67]. Исследования функций одного из MDR-подобных генов — AtPGP1 (*A. thaliana* P-glycoprotein1) показали, что гиперэкспрессия этого гена вызывает удлинение гипокотилей у проростков, растущих при слабом, неярком освещении; в то же время антисмысловая косупрессия AtPGP1 гена фенотипически проявляется в сокращении длины гипокотилей у проростков, растущих в этих же условиях [68, 69]. На основании данных наблюдений сделано предположение о том, что белок AtPGP1 транспортирует в базипетальном направлении регуляторные молекулы ИУК из мест ее биосинтеза, т. е. из верхушки побега, где экспрессия AtPGP1 гена достигает наивысшего уровня. Выяснено также, что белки MDR участвуют в транспорте и других фитогормонов (например, гиббереллинов и брассиностероидов) [68].

У *Arabidopsis* гены AtMDR1 и AtPGP1 играют важную роль в контроле роста как на ювенильной, так и зрелой стадиях развития, участвуя в переносе и распределении гормона ауксина. По данным блот-анализа мРНК, экспрессия гена AtMDR1 наблюдается в проростках, корнях, розеточных лис-

тьях, цветках и в апикальных меристемах побегов перед процессом образования стрелки [57]. Результаты такого же анализа, проведенного на трансгенных растениях, несущих верхнерегуляторную (*upstream*) последовательность (4 тыс. н.) гена *AtMDR1*, слитую с репортерным геном β -глюкуронидазы (*GUS*), и помещенных под ауксин-индуцируемый промотор, свидетельствуют о том, что экзогенная ИУК индуцирует экспрессию *AtMDR1* гена, достигающую наиболее высокого уровня в апикальной меристеме и молодых листьях проростков. Это является доказательством того факта, что экспрессия гена *AtMDR1* строго контролируется ауксином [57, 70, 71].

Данные генетического анализа *atmdr1* и *atmdr1atpgp1* мутантных проростков подтвердили, что белки *AtMDR1* и *AtPGP1* регулируют гомеостаз ауксина, участвуя в его распределении во всех тканях и органах растений. Например, обнаружено, что в результате мутаций гена *AtMDR1* нарушается отток ауксина из мест его биосинтеза — апикальных меристем семядолей, черешков и молодых листьев проростков и его концентрация в этих тканях возрастает выше нормы [57, 69]. Аккумуляция ауксина в этих органах является причиной их эпинастического фенотипа, а у взрослых растений повышенные концентрации ауксина вызывают снижение фертильности из-за нарушения попадания пыльцы на рыльце пестика вследствие гиперэлонгации тычинок [72—75]. В то же время мутации *AtMDR1* и *AtPGP1* генов нарушают базипетальное перемещение ауксина в другие ткани и органы, что морфологически проявляется в уменьшении апикального доминирования (явления, при котором базипетально движущийся ауксин подавляет рост базальных латеральных почек). Подобные фенотипы характерны для мутантных ауксин-резистентных *axr1* аллелей растений [76].

В экспериментах с использованием радиоактивно меченного ингибитора транспорта ауксина — 1-нафтилфталамовой кислоты (^3H -NPA) выявлена высокая степень специфичности связывания ^3H -NPA с фракцией очищенных белков *AtNPA1* и *AtPGP1* [77, 78], на основании чего сделан вывод о том, что *AtMDR1* и *AtPGP1* гены *Arabidopsis* кодируют ауксин- и NPA-связующие белки, регулирующие распределение ауксина в процессе роста и развития растений.

Модуляторами транспорта ауксина у растений являются флавоноиды. В частности, показано, что

в гипокотилиях тыквы кверцетин и кемпферол выражено ингибируют активность MDR белков, участвующих в перемещении ИУК и NPA через РМ клеток [57, 79]. Результаты исследований мутантных по биосинтезу фенилпропаноидов растений *Arabidopsis* также свидетельствуют о регулирующем влиянии эндогенных флавоноидов на тканеспецифическое распределение ауксина [77—81].

Детальные генетические и биохимические исследования показали, что, кроме MDR-подобных транспортеров, участвующих в активном АТФ-движущем транспорте ауксина, существуют и другие белки, осуществляющие энергетически пассивный транспорт ИУК [57]. Установлено, что преобладающая в системе клеточных стенок (апопластах) протонная форма ауксина является электрически нейтральной, из-за чего для ее перемещения необходим активный транспорт с участием MDR белков. В то же время энергетический потенциал анионной формы ИУК (преобладающей при нейтральном рН цитоплазмы) намного выше внутри клетки, чем снаружи, поэтому полярный транспорт анионной формы ауксина из мест его биосинтеза в соответствующие органы и ткани может осуществляться пассивно через PIN каналы, расположенные в специализированных клетках стебля [79, 82, 83].

К семейству *PIN* генов, кодирующих белки, участвующие в полярном транспорте ауксина [84—86], относится ген, имеющий несколько названий (*EIR1*, *PIN1*, *AGR1/AtPIN2*, *WAV6*), поскольку он идентифицирован независимо у разных мутантов с нарушенным гравитропизмом корней: *agr1* (agravitropic), *wav6* (wavy6) и этилен-нечувствительных мутантов *eir1* (ethylene insensitive root1) [87, 88]. *EIR1* ген — член мультигенного семейства у *Arabidopsis*. В геноме этого растения выявлены гены со значительной степенью гомологии к гену *EIR1*, имеющие различные гомологичные экспрессирующиеся tags последовательности (ESTs) и две подобные открытые рамки считывания (open reading frames — ORF) [89]. Родственные последовательности генов *AEH1* и *AEH2* (гомологичные таковым *EIR1* гена) обнаружены в клонах T26j12 и МКQ4 1-й и 5-й хромосом соответственно. Последовательности, подобные последовательностям гена *EST* и комплементарные корнеспецифическим кДНК генов *AEH1*, *AEH2* и *REH1 Arabidopsis*, обнаружены также у риса, что свидетельствует о принадлежности *EIR1* и его гомологов к семейству генов, универсальных для всех высших растений [86].

При изучении *eir1-3* мутантов обнаружено существенное ограничение экспрессии гена *EIR1* в корнях; при этом наблюдался агравитропический рост не только корней, но и других органов растения. Как выяснилось, *EIR1* ген кодирует белок с м. м. 69 кДа, в составе которого обнаружены 10 трансмембранных (ТМ) доменов; данный белок имеет последовательности, на 35—40 % гомологичные бактериальным мембранным белкам, участвующим в переносе различных молекул через РМ, что свидетельствует о выполнении *EIR1* белком транспортной функции [85, 86]. При изучении *eir1* мутантного фенотипа установлено, что ген *EIR1* участвует в транспорте ауксина. Устойчивые к воздействию этилена *eir1* растения не проявляли чувствительности к ингибитору ауксинового транспорта — 2,3,5-трийодбензойной кислоте (ТИБА).

Участие *EIR1* в специфическом распределении ауксина в корнях изучали, анализируя экспрессию регулируемого ауксином гена *AtIAA2* с помощью конструкции, содержащей репортерный *PtGA4::GUS* ген, экспрессирующий β -глюкуронидазу под контролем промотора *AtIAA2* гена [86, 89]. Под воздействием эндогенного ауксина и гравистимуляции экспрессию гена *AtIAA2* индуцировали в течение нескольких минут, она наблюдалась строго в меристеме корней диких типов растений. В первичных корнях диких типов наблюдалось асимметрическое *GUS*-окрашивание в зонах элонгации и дифференциации, в то время как на экспрессию репортерного *PtGA4::GUS* гена в *eir1-3* мутантах не влияли гравистимулы и она оставалась ограниченной в верхушке корней. При добавлении в среду экзогенного ауксина нафтил-1-уксусной кислоты (НУК) происходила индукция экспрессии репортерного гена в меристеме и в зоне элонгации верхушек корней как диких видов, так и *eir1-3* мутантов, сохраняющих свою способность отвечать на воздействие экзогенных ауксинов. Обнаружено, что корни у *eir1* мутантов были менее чувствительными к этилену и проявляли устойчивость к синтетическим ингибиторам транспорта ауксинов [85, 86]. Например, обработка ТИБА *eir1* мутантов не влияла на экспрессию гена *AtIAA2*, тогда как у диких типов растений редуцировала экспрессию гена *AtIAA2*.

Сниженная чувствительность *eir1* мутантов к этилену, а также к ингибиторам ауксинового транспорта ТИБА и NPA свидетельствует о существовании общих сигнальных компонентов ауксина и

этилена [86]. Фенотип этих мутантов аналогичен таковому *hls1* (*hookless1*) мутантов *Arabidopsis* [90]. Поскольку ген *HLS1* контролирует рост апикальной зоны гипокотыля, у *hls1* мутантов отсутствует способность к изгибанию верхушки гипокотыля при прорастании. Экспрессия *HLS1* индуцируется при обработке растений этиленом, вызывающим элонгацию клеток, и репрессируется ингибитором транспорта ауксина NPA. Проростки диких типов растений, выращенные в присутствии NPA, имеют такой же фенотип, что и *hls1* мутанты. Следовательно, ингибиторы транспорта ауксина вызывают у растений реакцию, подобную нарушенной реакции апекса *hls1* мутантов на воздействие этилена. В корнях *eir1* мутантов, аналогично апексам мутантов *hls1*, не отмечен гравитропический эффект под действием как экзогенного, так и эндогенного этилена, а также агравитропический эффект при влиянии ингибиторов транспорта ауксина. Эта перекрестная устойчивость к этилену и ингибиторам транспорта ауксина возникает вследствие мутаций, вызывающих дефектные ответные реакции на ауксин и этилен, и объясняет взаимосвязь между действием ауксина и этилена. Проведенные наблюдения приводят к выводу о том, что этилен-регулируемые гены могут контролировать дифференцированный рост клеток, регулируя распределение ауксина и его активность [90, 91].

Сведения об участии гена *EIR1* в транспорте ауксина получены также в экспериментах с *alf1* (*altered lateral root*) и *pin1* мутантами *Arabidopsis*, у которых высокие эндогенные уровни ауксина способствовали снижению элонгации латеральных корней [92]. У двойных *eir1 alf1* мутантов *eir1* мутации полностью восстанавливали элонгацию и агравитропизм корней, нарушенных вследствие *alf1* мутаций. При исследовании функции *PIN1* гена у *pin1* мутантов обнаружено отсутствие инициации закладки цветочных почек. Очевидно, этот дефект ассоциирован с сокращенным полярным транспортом ауксина, что свидетельствует о необходимости гена *PIN1* для такого процесса [85]. Идентифицирован и клонирован также *PIN2* ген, кодирующий белок, на 64 % идентичный белку, кодируемому *PIN1* геном [88]. У мутантных *pin2* линий, мутагенизированных *En-1* транспозоном кукурузы, выявлены дефекты в гравитропизме корней, аналогичные таковым у *eir1* мутантов. Методом реакции комплементации между *pin2* и *wav6-52* мутациями (по аллелям *eir1* и *agr1*) показано,

что эти мутанты являются аллельными, а секвенирование последовательностей подтвердило, что *PIN2* является тем же геном, что и гены *EIR1*, *WAV6*, *AGR1*.

Важную роль в опосредовании полярного транспорта ауксина через РМ клеток определенных тканей *Arabidopsis* играет *AUX1* ген, кодирующий белок, идентичный по составу входящих в него 485 аминокислотных остатков пермеазам бактерий, дрожжей и многих растений [93, 94]. Присутствие 10 мембрано-связывающих сайтов свидетельствует о мембранной локализации белка *AUX1*. Получены данные о том, что этот белок, образуя комплекс с протонами ИУК, участвует в ее транспорте через мембраны, который осуществляется с помощью протонной помпы — АТРазы.

Присутствие белка *AUX1* обнаружено в протофлоэме, центральной и латеральной частях корневого чехлика, а также в элонгирующих эпидермальных зонах корней [93, 94]. Мутации *AUX1* гена у растений фенотипически подобны таковым генов *AtPIN3* и *AGR1/AtPIN2* (с нарушенным гравитропизмом корней) [95] и проявляются в избирательной нечувствительности растений к ауксинам ИУК и 2,4-Д и в то же время чувствительных к НУК (последний факт предположительно объясняется тем, что белок *AUX1* не участвует в проведении НУК через мембраны) [86, 94]. Сравнительный анализ функций *AUX1*, *AGR1/AtPIN2* и *AtPIN3* белков показал, что *AtPIN3* регулирует перемещение ауксина через мембраны клеток апикальных зон корневого чехлика, тогда как белки *AUX1* и *AGR1/AtPIN2* ответственны за базипетальный транспорт ауксина из корневого чехлика к элонгирующим зонам органов растений [94—96].

Методами генетического и молекулярно-биологического анализа выделен и клонирован ген *ARG1* (altered response to gravity), регулирующий активность *PIN* и *AUX1* белков, участвующих в полярном транспорте ауксина [93]. Установлено, что *ARG1* ген кодирует белок, локализованный в базальных периферических мембранах специализированных гравичувствительных эпидермальных и кортикальных клеток (статоцитов, содержащих статолиты — амилопласты) элонгирующих зон корней (центральной части корневого чехлика) и побегов (колеоптилей, гипокотилей и междоузлий) [97]. Перемещение и седиментация амилопластов активируют асимметрическое перераспределение ауксина через мембраны растущих органов расте-

ния, при этом в апикальных зонах корней аккумулируются высокие концентрации ауксина, вследствие чего происходят торможение растяжения клеток корней и в то же время усиление элонгации клеток побегов [98]. Эти процессы вызывают гравитропический дифференцированный рост органов: корней — по направлению вниз, а побегов — вверх. Установлено, что седиментация амилопластов осуществляется внутри сети актиновых филаментов, густо переплетающих кортикальный ER и прикрепленных своими концами к РМ [99]. Предполагается, что перестройка цитоскелета и ER, происходящая под влиянием механических воздействий, стимулирует передачу гравитропических сигналов посредством регуляции активности мембранных каналов [100]. В соответствии с данным предположением, к ответным реакциям клетки на гравистимуляцию относятся: транзитные изменения в потоке ионов Ca^{2+} и сдвиг значений pH среды цитоплазмы в щелочную сторону [99—103].

Как выяснено, основную роль в регуляции указанных выше реакций клеток растений в ответ на гравитропические сигналы выполняет кодируемый *ARG1* геном DnaJ-подобный белок, ассоциированный с РМ, INCEPT белками цитоскелета (cytoskeleton-interacting proteins), с мембранами ER и trans-Гольджи сети (TGN), имеющий консервативный J домен, располагающийся на N-конце и граничащий с гидрофобным и C-терминальным спиралевидно-закрученными участками [93, 101]. DnaJ-подобные белки широко распространены также у *Escherichia coli*, дрожжей и человека. Как установлено, присутствующий у этих белков внутри J домена консервативный трипептид HPD необходим для усиления АТРазной активности молекулы белка шаперона Hsp70 (и его гомологов), с которым взаимодействуют DnaJ-подобные белки [104]. Среди многочисленных внутриклеточных функций, выполняемых DnaJ-подобными белками совместно с Hsp70s и другими белками теплового шока у разных организмов, наиболее важными являются: индукция сворачивания белков в ответ на тепловой стресс у *E. coli* [104]; участие присутствующих у дрожжей DnaJ-подобных Ydj1p/Mas5p белков в транспорте разнообразных белков в ER и митохондрии [105]; взаимодействие DnaJ-подобных белков ауксилинов (найденных у дрожжей и млекопитающих) с шапероном Hsc70 с последующим разрушением клатриновой оболочки везикул в период эндоцитоза [106]; стимуляция Hsc70 шапе-

роном высвобождения из эндоцитозных везикул ассоциированного с мембраной транспортного белка кинезина (содержащего J домен в областях tandemных повторов), регулирующего движение аксоновых органелл у кальмара [107].

Несмотря на то, что DnaJ-подобные белки присутствуют во всех таксономических группах низших и высших организмов, гомологи ARG1 выявлены в настоящее время только у нематод и растений [93, 101]. Как установлено, у последних эти белки выполняют специализированные регуляторные функции, заключающиеся: 1) в контроле полярного распределения специфических мембранных белков в клеточной пластинке делящихся клеток в период цитокинеза; 2) в регуляции передвижения эндоцитозных везикул (синтезируемых в ER или TGN), содержащих белки-транспортеры ауксина (например, белки AtPIN1 и AGR/AtPIN2 у *Arabidopsis*) или H^+ -АТФазы плазматических мембран между внутриклеточными компартментами и РМ и 3) в передаче ранних гравитропических сигналов внутри статочитов [93, 108—110].

Подробно изучена роль белка ARG1 в контроле гравитропизма у *Arabidopsis*: выяснено, что он влияет на «подщелачивание» цитоплазмы (увеличивая величину ее pH с 7,2 до 7,5) и в то же время снижает pH в апопластах, в результате чего создаются условия для нормального гравитропизма корней (т. е. установление различного градиента концентрации ионов H^+ , необходимого для полярного транспорта анионной формы ИУК) [102, 103, 111]. Обнаружено, что в статочитах корней и гипокотилей *arg1-2* мутантных растений pH цитоплазмы в ответ на гравистимуляцию (рис. 1) не увеличивается, вследствие чего в клетках корневых чехликов вертикально растущих корней *arg1-2* мутантов аккумулируется более высокий уровень ауксинов (чем у нормальных растений) и нарушается полярный транспорт ауксинов через мембраны мутантных клеток, что в свою очередь является причиной прекращения базипетального оттока ауксина из клеток корневого чехлика в зоны элонгации [93]. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что ARG1 участвует в передаче гравитропических сигналов в статочитах, где вызывает изменения pH и распределение ауксина.

Известны факты в пользу того, что полярный транспорт ауксина может регулироваться через фосфорилирование белков [112]. Выяснено, что контролирует этот процесс гетеротримерный белок

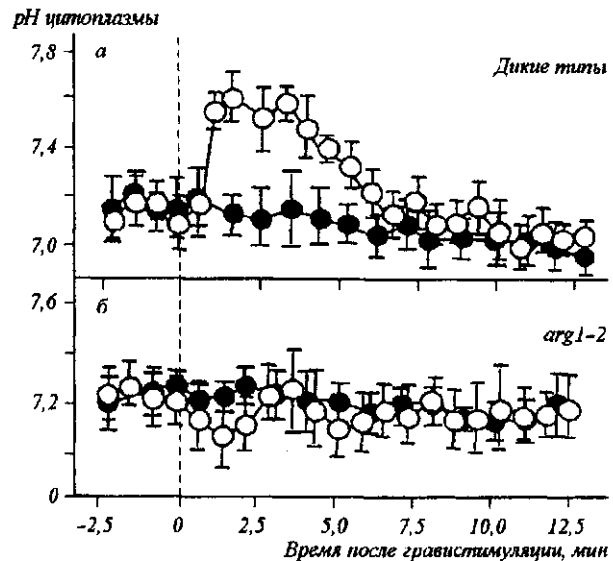


Рис. 1. Изменение значения pH цитоплазмы в гравичувствительных клетках (статочитах) корней диких типов и *arg1-2* мутантных растений *Arabidopsis* [93]: а — дикие типы растений (эко-тип Васильевская); б — *arg1-2* мутантные растения. Значение pH цитоплазмы обозначено: черными кружками — у контрольных (негравистимулированных) растений; белыми — у гравистимулированных растений

фосфатаза 2А (PP2A), представляющая собой регуляторный комплекс, состоящий из каталитической С и регуляторных А и В субъединиц, модулирующих энзиматическую активность PP2A и опосредующих ее взаимодействие с другими белками [113, 114]. Биохимические и фармакологические исследования подтверждают значительную роль PP2A в опосредовании ответных реакций растений на действие фитогормонов, патогенов и низких температур; установлено, что PP2A причастна к регуляции множества физиологических процессов, в частности, регуляции активности ионных каналов устьичных клеток, к контролю деления и растяжения клеток и морфогенезу растения в целом [115, 116].

С помощью молекулярно-генетических методов установлено, что геном *Arabidopsis* насчитывает около 255 гетеротримерных изоформ PP2A; идентифицированы гены, кодирующие пять каталитических С субъединиц, а также три А и 17 В регуляторных субъединиц [113]. Высокий уровень экспрессии репортерных генов под промоторами четырех из этих генов отмечен в проростках, листьях и флоральных органах трансформированных растений [116].

До настоящего времени изолированы лишь две мутантные линии *Arabidopsis* — *rcn1* (roots curl in

naphthylphthalamic acid1) и *ton2/fass/gordo* [115—117]. Выяснено, что ген *RCN1* кодирует A1 или α изоформу регуляторной субъединицы А, тогда как ген *TON2/FASS/GORDO* — В субъединицу. У *ton2/fass/gordo* мутантов нарушен морфогенез, наблюдается дезорганизация микротрубочек в клетках, усиливается синтез этилена и возрастает концентрация ауксина [115], в то время как мутация *rcn1* вызывает дифференцированные дефектные физиологические реакции, включая нарушения процессов растяжения клеток, полярного транспорта ауксина, гравитропизма корней и побегов, усиление биосинтеза этилена, а также нечувствительность растений к фитогормону абсцизовой кислоте. Повышенная аккумуляция ауксина в гипокотиле у *rcn1* мутантов (вследствие нарушения его транспортирования в корни) усиливает их восприимчивость к ингибитору транспорта ауксина — NPA, обработка которой приводит к агравитропизму (гиперизгибанию) корней данных растений [112, 116, 117]. С другой стороны, показано, что экзогенная обработка диких типов растений низкими дозами ингибитора фосфатазы PP2A вызывает у них фенотипические черты, характерные для *rcn1* мутантных растений [114, 116].

В работе [112] мутантный ген *rcn1* вводили в Т-ДНК (transferred-DNA) и клонировали фланкирующие последовательности, обеспечивающие встраивание Т-ДНК в геном. Анализ кДНК гена *RCN1* трансформированных растений показал, что инсерция Т-ДНК с геном *rcn1* разрушает ген регуляторной субъединицы А протеинфосфатазы 2А (PP2A-A), субстратом-мишенью для которой могут быть PIN транспортеры. Ген *RCN1* конвертирует мутантные фенотипы *rcn1 Arabidopsis* и температурочувствительный *tpd3-1* (вызванный мутацией *pp2a-a*) *S. cerevisiae* в нормальные фенотипы. Эти результаты подтверждают тот факт, что PP2A-A выполняет регуляторную функцию в транспорте ауксина.

Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что, кроме описанных выше двух видов внутри- и межклеточного транспорта ауксина — активного АТФ-направляемого транспорта ИУК (осуществляемого семейством MDR белков) и энергетически пассивного полярного транспорта ИУК (с участием белков PIN), у растений и грибов существует также везикулярный внутриклеточный транспорт ауксина, в результате исследования механизмов которого обнаружено

многочисленное семейство VTI генов SNAREs белков-рецепторов (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptors), участвующих в переносе ауксина к органеллам, образованным эндомембранной системой (ER, TGN, превакзолярному компартменту (PVC), вакуоле и эндосомам) [118].

В соответствии с их дифференцированной локализацией и функциями, SNAREs подразделяются на две группы — везикулярные (v-SNAREs) [119] и локализованные в мембранах-мишенях (t-SNAREs, имеющие спиралевидно-скрученные домены, необходимые для взаимодействия с белками v-SNAREs) [120]. Обнаружено, что каждые три мембранных t-SNAREs рецептора формируют cis-SNAREs комплекс, распознающийся одним везикулярным рецептором v-SNARE, позволяющим их спиралевидно-скрученным доменам формировать четыре спиральных пучка. Образование такого комплекса способствует слиянию везикулярных мембран и мембран-мишеней, в результате чего транспортируемый с помощью SNAREs ауксин проникает в компартменты-мишени и далее этот комплекс диссоциирует (выяснено, что для такого энергетически затратного процесса необходимо присутствие растворимых NSF и α -SNAP белков), а восстановленные v-SNAREs возвращаются в исходные компартменты.

У *Arabidopsis* методами генетического и молекулярно-биологического анализа идентифицировано свыше 55 SNAREs, кодируемых мультигенным семейством, что свидетельствует о существовании комплексной эндомембранной системы у растений [118, 121—123]. В настоящее время наиболее изучено и охарактеризовано семейство VTI генов, состоящее из трех близкородственных членов: *VTI11*, *VTI12* и *VTI13*; высокий уровень их экспрессии наблюдается во всех органах [118]. Выяснено, что *VTI11* и *VTI12* идентичны между собой на 60 % и на 25 % — с Vtilp белками дрожжей, аналогичными белкам Vtila, присутствующим у млекопитающих [121].

С помощью генно-инженерных методов установлено, что белки *VTI11* и *VTI12* транспортируют везикулы, содержащие разнообразные белки, по разным путям. Например, показано, что при трансформации *vtil* температурочувствительных и нулевых мутантных *vtil* аллелей дрожжей (комплементарных *VTI11* и *VTI12* аллелям растений) *VTI11* геном у них подавляются фенотипические ростовые

дефекты, вызванные нарушением транспорта белков по СРУ пути (через PVC), в то время как трансформация этих мутантов *VT112* геном приводит к восстановлению транспорта белков API типа из цитоплазмы в вакуоль (по Cyt пути) и через аппарат Гольджи (по ALP пути) [118, 124]. Согласно результатам исследований, белок *VT111* функционирует как v-SNARE: локализуясь в мембранах TGN, этот белок образует комплексы с ELP рецепторным белком, специфически связывающие транспортирующиеся из вакуолей белки; в случае его локализации в мембранах PVC белок *VT111* образует комплексы с группами *SYP2* и *SYP5* белков-синтаксинов, проявляющих специфичность во взаимодействии с белками NTPP типа, везикулярно транспортирующимися из TGN в PVC [123—126].

Генетический анализ мутантных по *VT111* и *VT112* генам *Arabidopsis* подтвердил их дифференцированную регуляторную роль. Показано, что у *vtil2* мутантов, выращенных на среде с высоким уровнем питательных веществ, наблюдается нормальный фенотип, а у мутантных растений, растущих на бедных питательными веществами средах, ускоряется старение, что свидетельствует о важной роли *VT112* в аутофагии растений [118, 127]. Мутации *VT111* гена идентифицированы у *zig* мутантов с выраженным нарушением гравитропизма побегов (подобный фенотип имеют *pin3* мутанты) [95]; как показано, *vtil1 zig* мутанты имеют дефектную морфологию сосудистых тканей и у них нарушен транспорт ауксина [128]. Гистологическими исследованиями выявлено, что в эндодермальных клетках *zig* мутантов не наблюдается седиментации амилопластов, действующих как статолиты у диких типов и *vtil2* мутантных растений [118].

Установлено, что *VT111* кодирует ZIG/SGR4-SNARE белок, мутации которого вызывают дефекты в гравитропизме побегов [129]. Кроме того, выяснено, что кодируемые *VT111* и *VT112* генами белки способны заменять один другого при формировании SNAREs комплексов, а перекрестные *zig vtil2* и *vtil1 vtil2* мутации подобны летальным для зародыша *vcl1* (*vacuoleless1*) мутациям, при которых его развитие останавливается на стадии торпеды [130]. Определено, что у *Arabidopsis* ген *VCL1* кодирует белок — гомолог *Vps16p* белка дрожжей — компонента VPS комплекса класса C, регулирующего транспорт белков из аппарата Гольджи в вакуоль. У дрожжей VPS комплекс класса C

опосредует вхождение *trans*-SNARE белков в *Vti1p-Vam7—Vam3* комплекс [131]. У *Arabidopsis* членами *VCL1* комплекса являются белки-синтаксины *SYP2* типа, взаимодействующие с белками, кодируемыми *VT111* геном [122, 123, 125, 132]. Исходя из этого предполагается, что при двойных *vtil1 vtil2* мутациях изменяется везикулярный транспорт ауксина и других белков из-за нарушения образования *VCL1* комплекса, что и является причиной гибели зародыша на той же стадии развития, что и у *vcl1* мутантов [118]. Результаты данных исследований, несомненно, свидетельствуют о ключевой роли *VT111* гена, кодирующего ZIG/SGR4-SNARE белок, в регуляции внутриклеточного везикулярного транспорта ауксина.

К настоящему времени получены также данные, доказывающие существование белков — переносчиков конъюгатов ауксинов, являющихся запасным фондом ИУК. Например, выяснено, что в транспорте конъюгированных форм ИУК участвует белок-транспортер *AtMRP5* [133], хотя, как известно, свободная ИУК (образующаяся при участии *ILR1*, *IAR1*, *IAR3* гидролаз) [134, 135] намного чаще, чем ее конъюгаты, транспортируется из клеток гипокотыля в другие ткани у *Arabidopsis* [57, 62].

Гены, регулируемые ауксином. Большое количество регулируемых ауксином семейств генов *Aux/IAA*, *SAUR* (small auxin up RNA) и *GH3* изолировано из элонгирующих зон этиолированных гипокотилей или эпикотилей гороха (например, гены *PS-IAA4/5*, *PS/IAA6* и *SAUR*), сои (в частности, *GmAux22*, *GmAux28* и *GH3-1* гены), кукурузы (например, *ZmSAUR2* ген), фасоли, табака, томата и *Arabidopsis* (более 20 *Aux/IAA* генов и свыше 70 *AtSAUR* гомологов) [136—143]. Семейство генов *Aux/IAA* обнаружено также у однодольных и голосеменных растений [139]. Кроме того, существуют сведения о регулирующем влиянии ауксина на экспрессию семейства *ACS* генов, кодирующих синтетазу l-аминоциклопропан-l-карбоновой кислоты — ключевого фермента синтеза этилена, семейства генов *NAC-1* и глутатион-S-трансферазы [22, 25, 136, 144].

Показано, что ауксин специфически индуцирует экспрессию *Aux/IAA*, *SAUR*, *GH3* и *ACS* генов в течение нескольких минут в отсутствие биосинтеза белков *de novo*, на основании чего эти гены относят к ранним или первично регулируемым ауксином генам [139—143]. Индукция экспрессии

Aux/IAA, *SAUR*, *GH3* и *ACS* генов ауксином наблюдается также в присутствии ингибитора синтеза белка — циклогексимида (СНХ), что свидетельствует о способности ауксина дерепрессировать транскрипцию или регулировать синтез мРНК [136—139, 144].

Семейство генов *Aux/IAA* наиболее охарактеризовано у *Arabidopsis*. Некоторые гены (например, *CS-IAA1*, *CS-IAA2* и *CS-IAA3*) клонированы; как выяснено, амплифицированные области кДНК данных генов кодируют аминокислотные последовательности, идентичные таковым, присутствующим у белков, кодируемых геном *IAA22* сои (на 47 %), *IAA9* и *IAA4* генами *Arabidopsis* (на 51 и 59 % соответственно) [137]. Ауксин-регулируемые гены, как установлено, имеют тканеспецифическую направленность экспрессии, что указывает на разнообразие ауксиновых ответов в различных тканях.

С использованием методов генетического анализа показано, что семидоминантные мутации ауксин-регулируемых генов *SHY2/IAA3*, *AXR2/IAA7*, *AXR3/IAA17*, *MSG2/IAA19*, *IAR2/IAA28*, *SLR/IAA14*, кодирующих представителей семейства белков *Aux/IAA* у *Arabidopsis*, вызывают плейотропные фенотипы, подобные мутантным по сигнальным компонентам ауксина растениям и проявляющиеся в заметном аграмитропическом росте латеральных корней и образовании листьев в темноте, [138, 143, 145—148], что указывает на кодирование этими генами белков, регулирующих проведение сигналов ауксина.

Семидоминантные *shy2* (*short hypocotyl2*) мутантные проростки *Arabidopsis* (аккумулирующие более высокие уровни *SHY2/IAA3* белков по сравнению с дикими типами растений) первоначально исследовали для поиска супрессоров фитохром-дефицитных *hy2* и *phyB* мутантов (фенотипически характеризующихся удлиненным гипокотилем) [143, 149, 150]. Выяснено, что *shy2-2* проростки, растущие как при освещении, так и в темноте, представляют собой раннецветущие растения с короткими гипокотилеми, увеличенными семядолями, гиперскрученными листьями, короткими неразвитыми латеральными корнями и более слабым по сравнению с дикими типами растений гравитропизмом корней.

Сравнительный анализ экспрессии *SHY2/IAA3* генов у растущих в темноте и на свету проростков, проведенный с помощью генно-инженерных методов, показал, что у трансформированных *shy2-2*

мутантов *Arabidopsis* высокие уровни генетической конструкции экспрессии *P_{SHY2/IAA3}::GUS* (содержащей репортерный *GUS* ген β -глюкуронидазы *E. coli* под промотором ауксин-регулируемого *SHY2/IAA3* гена) наблюдались в гипокотильях и семядолях молодых и в листьях старых растущих в темноте растений, в то же время у растущих на свету растений уровни экспрессии *P_{SHY2/IAA3}::GUS* в аналогичных органах были более низкими. Это свидетельствует в пользу того, что свет репрессирует экспрессию *SHY2/IAA3* гена [143]. Доказательством этого факта являются также результаты перекрестной блот-гибридизации мРНК *SHY2/IAA3* и *CAB* генов с кДНК и рДНК пробами, указывающие на снижении уровней *SHY2/IAA3* мРНК, а также на усиление экспрессии *CAB* гена (кодирующего хлорофилл-а/б-связывающий белок) у растущих при освещении растений. Противоположные данные получены для этиолированных (растущих в темноте) растений, у которых повышенная аккумуляция *SHY2/IAA3* мРНК наблюдалась в листьях, стеблях, цветках и в то же время достигала весьма незначительного уровня в корнях (это явление, возможно, объясняется тем, что *SHY2/IAA3* регулирует рост корней косвенно, ингибируя полярный транспорт ауксина из побегов в корни и нарушая их гравитропизм) [143].

Высказано предположение о том, что фенотип *shy2-2* мутантов (гиперэкспрессирующих *SHY2/IAA3* ген) может проявляться вследствие изменения ауксин-регулируемой экспрессии генов, доказательством чего служат данные блот-анализа РНК, показавшие, что у *shy2-2* и подобных им фенотипически *shy2-24* мутантов при обработке ауксином не отмечено увеличения уровней мРНК 42 из 74 первично регулируемых ауксином генов *Aux/IAA*, *SAUR*, *GH3* и *ACS*, экспрессия которых у диких типов растений повышается в 2,5 раза после индукции ауксином (рис. 2, 3), а также не происходит снижения уровней мРНК 14 из 26 генов (их экспрессия репрессируется под влиянием ауксина в 2,5 раза у диких типов проростков *Arabidopsis*) [143]. Результаты этих исследований подтвердили, что ген *SHY2/IAA3* является негативным регулятором проведения сигналов ауксина, ингибируя транскрипцию первично регулируемых ауксином генов.

Кроме того, установлено, что *SHY2/IAA3* ген репрессирует большое количество других как регулируемых, так и нерегулируемых ауксином генов.

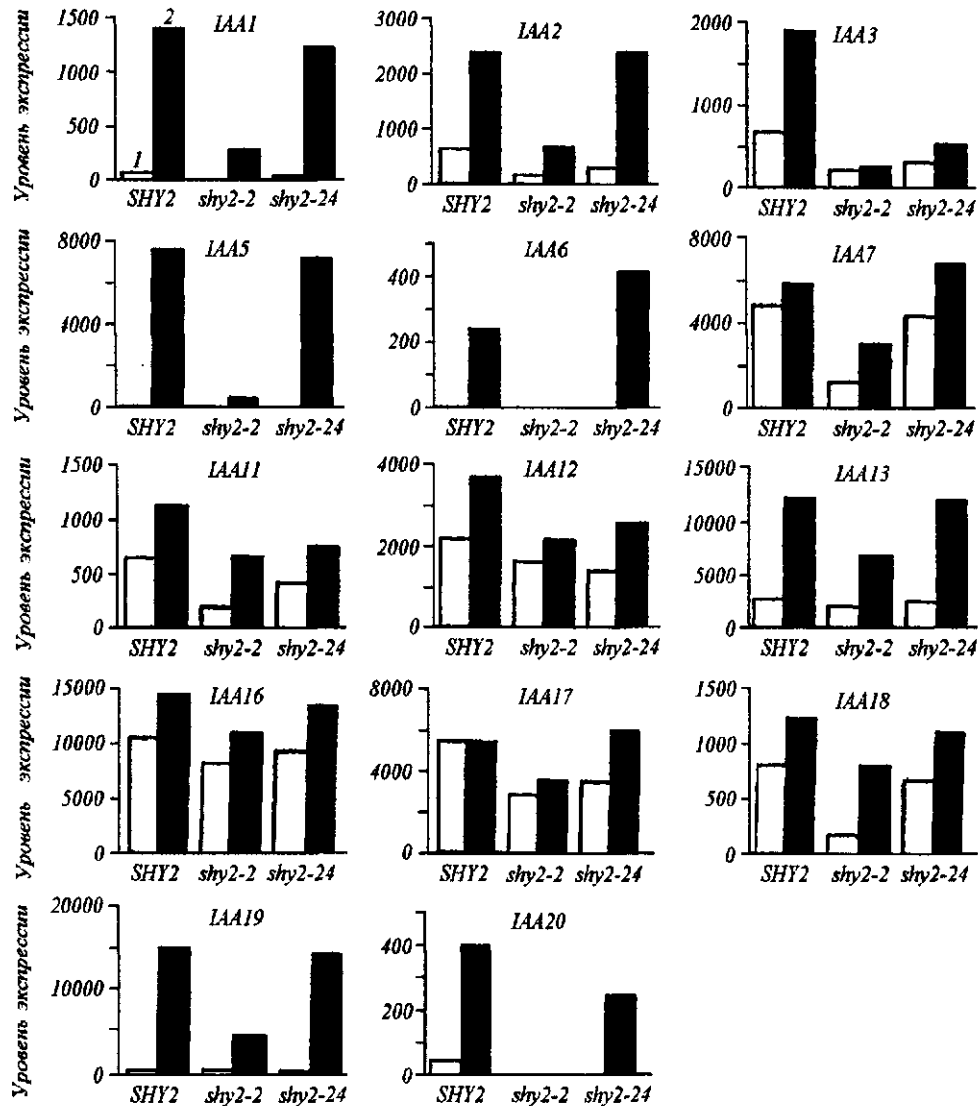


Рис. 2. Уровни экспрессии генов *Aux/IAA* у шестидневных выращенных на свету проростков *Arabidopsis* дикого типа *SHY2* и мутантов *shy2-2* и *shy2-24*: 1 — необработанные ИУК, 2 — обработанные в течение 2 ч 20 мкМ раствором ИУК растения [143]. Методики определения уровней экспрессии генов приведены в цитируемой работе [143]

Например, получены данные о снижении у *shy2-2* мутантов (по сравнению с дикими типами растений) уровня экспрессии генов протеинкиназ (которые, как предполагается, участвуют в *SHY2/IAA3*-опосредованном ингибировании экспрессии ряда ауксин-регулируемых генов); генов различных метаболических ферментов, таких как цитохром P450 и тирозинаминотрансфераз (гомологичных белку, кодируемому *ROOT* геном), участвующих либо в биосинтезе, либо в разрушении ауксина и других сигнальных молекул [151, 152]; генов биосинтетических или гидролитических ферментов, модифицирующих клеточную стенку в период роста клеток растяжением (например, β -1,3-глюканазы 2, эндоксилоглюкантрансферазы, подобного экстенси-

ну белка) [9, 153], о нарушении экспрессии которых свидетельствуют короткие гипокотили и скрученные листья у *shy2-2* мутантов; многочисленных семейств генов ряда транскрипционных факторов (например, ethylene-responsive element binding factor1), кальмодулин-подобного и ассоциированного с кальмодулином белков, мембранных белков-транспортеров, регулирующих работу ионных каналов и многих других идентифицированных в настоящее время генов, подробный список которых приведен в обзоре [143].

В соответствии с данными генетического анализа, в репрессии первично индуцируемых ауксином генов наряду с *SHY2/IAA3* геном участвуют также гены *IAA28* и *AXR2/IAA7*, являющиеся вто-

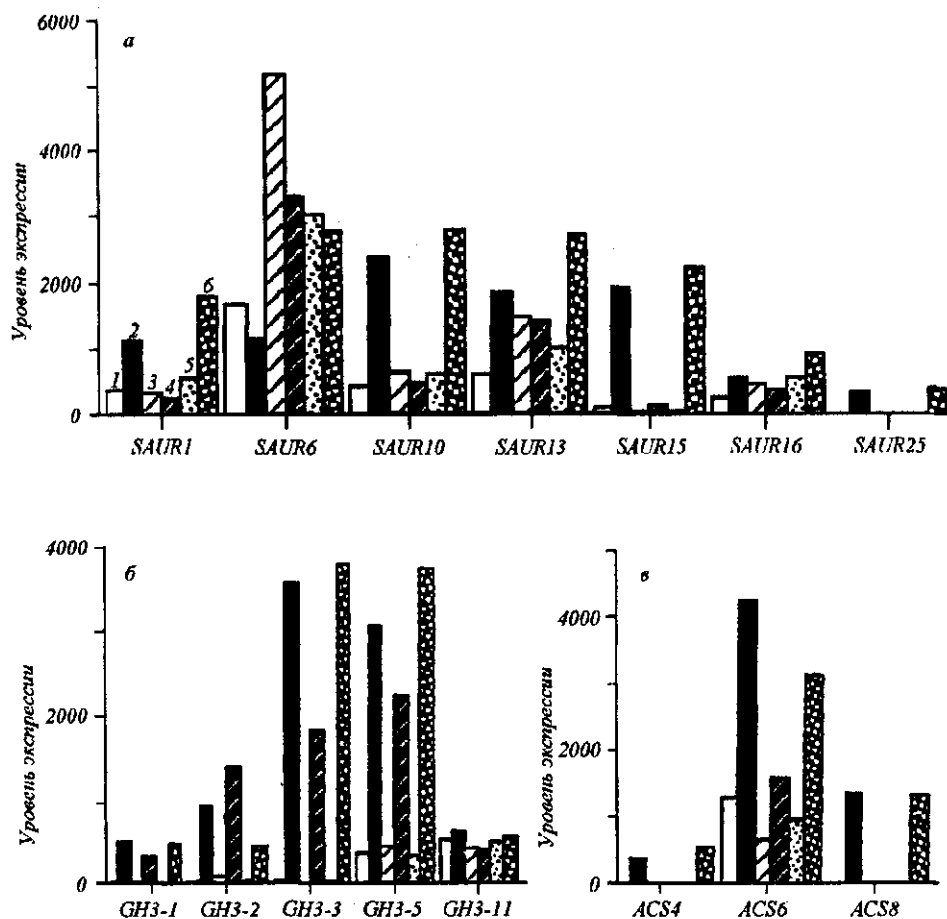


Рис. 3. Уровни экспрессии генов SAUR (а), GH3 (б) и ACS (в) у шестидневных выращенных на свету проростков *Arabidopsis* дикого типа SHY2 и мутантов *shy2-2* и *shy2-24*, не-обработанных ИУК (1, 3, 5) и обработанных в течение 2 ч 20 мкМ раствором ИУК (2, 4, 6) [143]. Методики определения уровней экспрессии генов приведены в цитируемой работе [143]

рично регулируемыми ауксином генами. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что у мутантных *axr2/iaa7* и *iaa28* растений (с эктопической гиперэкспрессией *AXR2/IAA7* и *IAA28* генов) экспрессия *BA::GUS* генетической конструкции (содержащей репортерный ген *GUS* под ауксин-регулируемым промотором, образованным ауксин-регулируемыми доменами А и В (AuxRD А и AuxRD В), изолированными из ранне-индуцируемого ауксином *PS-IAA4/5* гена гороха) ингибируется как при обработке ауксином, так и в его отсутствие [143, 154–157].

Как показал анализ морфологии семидоминантных *axr2-1* мутантных растений (аккумулирующих высокие уровни *AXR2/IAA7* белков), у растущих в темноте растений наблюдается нечувствительный к ауксину аgravитропический рост корней и побегов, короткий гипокотиль, стебель и листья [147], тогда как растущие на свету *axr2-1* мутанты имеют более удлиненный гипокотиль, чем дикие типы растений, что свидетельствует о контроле

AXR2/IAA7 геном развития проростков, растущих при освещении, и о необходимости его активации для индуцирования морфологических ответов, происходящих под влиянием света. С помощью блот-анализа мРНК выяснено, что *axr2-1* мутанты имеют редуцированную экспрессию некоторых *Aux/IAA* генов — *SHY2/IAA3*, *IAA5*, *SAUR-AC1* и *AXR2/IAA7*. Это свидетельствует в пользу того, что ген *AXR2/IAA7* репрессирует свою собственную экспрессию и экспрессию вышеуказанных генов [138, 143].

Высказано предположение о ведущей роли в регуляторном каскаде гена *SHY2/IAA3* по отношению к *AXR2/IAA7* гену. Подтверждением этого являются данные о том, что ауксин индуцирует экспрессию *SHY2/IAA3* гена в течение 1 мин, а экспрессию *AXR2/IAA7* гена — более медленно. Это доказывает, что *SHY2/IAA3* ген принадлежит к первично регулируемым ауксином генам, тогда как *AXR2/IAA7* — ко вторично регулируемым генам [138].

Противоположную белкам SHY2/IAA3, IAA28 и AXR2/IAA7 функцию выполняет AXR3/IAA17 белок. Мутации гена *axr3-1* (проявляющиеся в эктопической гиперэкспрессии AXR3/IAA17 гена), как установлено, индуцируют функцию ауксин-индуцируемого промотора SAUR-AC1 гена в сосудистых тканях корней *Arabidopsis*, из чего следует, что ген AXR3/IAA17 является активатором ауксин-регулируемых генов [143, 145, 148, 154].

Тканеспецифичность экспрессии *Aux/IAA* генов изучена в мутагенизированных этанометилсульфонатом *age* популяциях *Arabidopsis*, трансформированных BA::GUS генетической конструкцией (см. выше) [154—156]. При трансформации данной генетической конструкцией *age1* мутантных растений (дефектных по опосредованной ауксином GUS экспрессии), наблюдалась стойкая экспрессия GUS гена в корнях при экзогенном воздействии ауксина (т. е. 2—15-кратная ауксин-опосредованная стимуляция экспрессии GUS гена в элонгирующей зоне корней). При последующем анализе обнаружен высокий уровень активности GUS гена в элонгирующей зоне корней мутантной *age1* линии, трансформированной BA::GUS конструкцией, в ответ на применение 10^{-8} М раствора ИУК по сравнению с трансформированными BA::GUS вектором дикими типами растений. Тканеспецифическое повышение чувствительности к ауксину сопровождалось высоким уровнем активности GUS гена и в других органах мутантных проростков.

При исследовании активности гена GUS в элонгирующей зоне корней BA::GUS трансформированных *age2* мутантов установлено, что уровень экспрессии этого гена был адекватным таковому в растениях дикого типа, обработанных раствором ИУК в концентрации 10^{-8} или 10^{-7} М, а повышение уровня активности GUS гена в сосудистых тканях апикальных зон корней и гипокоты не зависело от воздействия ауксина. Сравнительное исследование влияния *age1* и *age2* мутаций на экспрессию ранних ауксин-регулируемых генов IAA1, IAA4 и IAA5 показало, что в *age1* проростках уровень транскрипции данных генов возрастал после действия ауксина, однако не достигал такого значения, как у диких типов растений, тогда как *age2* мутанты в отсутствие ауксина аккумулировали более высокие уровни транскриптов IAA1 и IAA12 генов по сравнению с диким типом, а уровни транскриптов IAA4 гена являлись аналогичными таковым диких типов. Установлено, что у *age1* и *age2*

мутантов гиперэкспрессия двух ранних ауксин-индуцируемых генов вызывает дефектную морфологию: оба вида являются короткими и кустистыми, однако *age1* растения имеют также нарушенную морфологию корней и листьев и изменение сроков цветения [154—156].

К классу первично регулируемых ауксином генов относится также многочисленное семейство SAUR генов, первоначально изолированных из элонгирующих клеток гипокотилей сои. В последующие годы SAUR гены идентифицированы у многих других растений: у вики, редьки, гороха, арабидопсиса, табака, яблони и недавно — у кукурузы [139, 142, 158].

В соответствии с анализом генома у *Arabidopsis* выявлено свыше 70 гомологов SAUR генов, однако, как установлено в настоящее время, лишь 11 из них кодируют белки — сигнальные компоненты ауксина (выяснено, что экспрессия 10 генов SAUR индуцируется и одного (SAUR6) — репрессируется ауксином) [139]. Доказательством индуцирующего влияния ауксина на экспрессию SAUR генов служат результаты экспериментов, свидетельствующие о том, что в *shy2* мутантных проростках *Arabidopsis* (гиперэкспрессирующих SHY2/IAA3 белки — репрессоры ауксин-стимулируемых генов) индуцирующее влияние ауксина на экспрессию SAUR1, SAUR10, SAUR13, SAUR15, SAUR16, SAUR25 генов полностью устраняется (по сравнению с дикими типами растений), в то время как его репрессирующее действие на экспрессию SAUR6 гена и отсутствие при этом каких-либо изменений в экспрессии SAUR9, SAUR12, SAUR32, SAUR36 генов (не являющихся регулируемыми ауксином генами) являются подобными таковым у диких типов растений [142, 143].

Аналогичные результаты получены при трансформации *shy2* мутантов генетической конструкцией SAUR-AC1::GUS (содержащей репортерный GUS ген под ауксин-регулируемым промотором SAUR15 гена, имеющего первоначальное название SAUR-AC1). Показано, что экспрессия SAUR-AC1::GUS наблюдается в элонгирующих зонах гипокотилей растущих в темноте растений и в гипокотылях, семядолях, первичных листьях и умеренно — в корнях растущих при освещении диких типов растений, в то же время у *shy2* мутантов как в условиях темноты, так и на свету уровень экспрессии SAUR-AC1::GUS намного ниже по сравнению с таковым у диких типов растений и еще более

низкий — в семядолях и меристемах побегов в сравнении с гипокотиллями. Полученные данные подтверждают тот факт, что ауксин тканеспецифически регулирует экспрессию *SAUR* генов у диких типов растений, и показывают, что у *shy2* мутантов проведение его сигналов нарушается белками-репрессорами *SHY2/IAA3*.

Существуют и другие сведения, подтверждающие стимулирующее влияние ауксина на экспрессию *SAUR* генов. Например, выявлено, что в обработанных ауксином горизонтально растущих проростках сои экспрессия *SAUR* генов становится асимметричной, вследствие чего уровень мРНК *SAUR* на нижней стороне гипокотыла возрастает по сравнению с таковым на противоположной верхней стороне [16]. Результаты этих исследований доказывают, что асимметричная экспрессия *SAUR* генов является следствием латерального распределения ауксина в гравитропически стимулированных стеблях (в соответствии с постулатами гипотезы Холодного-Вента). Показано также, что ауксин индуцирует появление *SAUR* мРНК в течение 2—5 мин, оказывая регулирующее действие на уровне транскрипции; обработка *CHX* не изменяет индуцируемой ауксином транскрипционной активности *SAUR* генов, т. е. уровень возрастания *SAUR* мРНК транскриптов под влиянием ауксина соответствует таковому у необработанных *CHX* растений [139, 159]. Секвенирование трех *SAUR* кДНК сои показало, что они лишены интронов и содержат ORF, кодирующие белки с м. м. 9—10 кДа, содержащие С-терминальные аминокислотные последовательности с высокой степенью гомологии [160]. Экспрессия *SAUR* генов является тканеспецифической — она преобладает в элонгирующих клетках гипокотилей и более умеренна в эпидермальных и кортикальных клетках; ауксин стимулирует экспрессию генов *SAUR* во всех этих тканях растений сои [139].

Подробно изучены функциональные свойства *SAUR* генов и у *Arabidopsis* [142]. Установлено, что все *SAUR* гены этого растения (кроме *AtSAUR11*) лишены интронов; кодируемые этими генами мРНК являются нестабильными с быстрыми биосинтезом и распадом, предположительно регулируемые на уровне консервативного *DST* (downstream) элемента 3'-нетранслируемой области мРНК, а также с помощью элементов внутри ORF-кодирующих областей мРНК [160—163].

Установлено, что экспрессия *SAUR* генов регу-

лируется не только на транскрипционном, но и на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях [138]. В отличие от сои, *CHX* индуцирует регулируемый ауксином синтез *SAUR* мРНК у *Arabidopsis* (в частности, транскрипцию *SAUR-AC1*).

Гомолог генов *SAUR* идентифицирован при изучении регулируемых фитогормонами физиологических реакций в колеоптилях кукурузы — органах, используемых в качестве модельной системы для изучения роста клеток растяжением и тропизмов. При скрининге кДНК библиотеки генов из обработанных ауксином элонгирующих колеоптилей кукурузы изолирован и охарактеризован клон кДНК, обозначенный как *ZmSAUR2* в соответствии со своей гомологией к *SAUR* генам [142]. Обнаружено, что ген *ZmSAUR2* обладает типичными характеристиками первично регулируемых ауксином генов. В частности, показано, что ИУК и ее синтетические аналоги α -НУК, 2,4-Д, а также ингибитор биосинтеза белков *CHX* индуцируют экспрессию этого гена в течение нескольких минут (предполагается, что стимулирующее действие *CHX* на экспрессию гена *ZmSAUR2* вызвано либо тем, что в регуляции его транскрипции участвует эндогенный пул репрессоров, либо лабильностью нуклеазы, ответственной за деградацию РНК) [136, 142].

С помощью секвенирования выявлены присутствующие у всех членов семейства *SAUR* генов растений последовательности NLS (nuclear localization signal) и *DST* (которые, как известно, обеспечивают быструю деградацию *SAUR* транскриптов) [139, 160—163]. Эксперименты по трансформации эпидермальных клеток лука генетической конструкцией, содержащей репортерный *GUS* ген, встроенный в 3'-конец кодирующей области *ZmSAUR2* гена под контролем сильного конститутивного *CaMV* (*Cauliflower mosaic virus*) 35S промотора, и последующий гистохимический анализ белка, кодируемого химерным *ZmSAUR2::GUS* геном, свидетельствуют об исключительно ядерной локализации этого белка [142].

Для определения времени полужизни белков *ZmSAUR2* в бесклеточной системе из проростков пшеницы *in vitro* в присутствии [³⁵S]-метионина/цистеина синтезировали эти белки на матрице поли(А)⁺ мРНК (выделенной из колеоптилей). Параллельно в колеоптилях *in vivo* в присутствии ауксина проводили импульсное мечение [³⁵S]-метионином/цистеином белков *ZmSAUR2* с последу-

ющей заменой в среде радиоактивных аминокислот на нерадиоактивные; через короткие интервалы времени ZmSAUR2 белки выделяли из колеоптилей и очищали. Белки, синтезированные *in vitro* (контроль) и *in vivo* (опыт) иммунопреципитировали с антителами (полученными иммунизацией кролей рекомбинантным антигеном (мальтозо-связующий белок::ZmSAUR2), экспрессированным в клетках *E. coli*), которые затем очищали методом аффинной хроматографии. С помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле и последующей радиоавтографии определяли уровень радиоактивности пятен ZmSAUR2 из преципитатов. В результате показано, что ZmSAUR2 являются короткоживущими белками с периодом полураспада ~7 мин [142].

Получены данные, свидетельствующие о том, что белок кальмодулин (CaM) специфически связывается *in vitro* с белком ZmSAUR1, экспрессирующимся в гетерологической системе *E. coli*, или с синтетическими пептидами, содержащими аминокислотные последовательности, присутствующие в белках, кодируемых ZmSAUR-10A5 геном кукурузы, AtSAUR-AC1 геном *Arabidopsis* и GmSAUR-10A5 геном сои, на основании чего сделано предположение, что ZmSAUR2 является кальмодулин-связывающим белком (CaM-binding protein) и, возможно, участвует в передаче сигналов ауксина через Ca²⁺/CaM систему вторичных мессенджеров [142, 158].

Последующие эксперименты подтвердили эту гипотезу. Анализ вторичной структуры белков ZmSAUR2 показал наличие α -спиралевидных участков в N-терминальных последовательностях этих белков, аналогичных амфифильным α -спиралевидным доменам, обнаруженным у растительных Ca²⁺/CaM-зависимых протеинкиназ (CCaMK), у связывающихся с ДНК транскрипционных факторов, взаимодействующих с CaM, а также у SAUR белков. Получены также данные о формировании стабильного комплекса [³⁵S]-меченных ZmSAUR2 белков с CaM бычьими белками в присутствии ионов Ca²⁺ *in vitro* [139, 142, 158, 164].

К числу ранних генов, экспрессия которых регулируется ауксином, относится также семейство генов GH3, обнаруженных у дву- и однодольных растений, синезеленых водорослей, а также у дрожжей и дрозофилы [139]. Например, показано, что в проростках сои в отсутствие экзогенного ауксина уровень GH3 мРНК довольно низок и

ассоциируется в основном с сосудистой системой; экзогенная обработка ауксином индуцирует экспрессию GH3 во многих тканях и органах растения. В противоположность регулируемым ауксином Aux/IAA и SAUR мРНК, уровень накопления GH3 мРНК не изменяется при воздействии ингибитора биосинтеза белков CHX [139]. В настоящее время идентифицирован белок с м. м. 70 кДа, имеющий цитоплазматическую локализацию и являющийся членом мультигенного семейства GH3 белков сои, однако выполняемые им функции еще не установлены [165].

У *Arabidopsis* идентифицированы 19 членов семейства GH3 генов, наиболее охарактеризованными из которых являются GH3-1—GH3-3, GH3-5, GH3-6, GH3-11, GH3-14 и GH3-17; клонированы ORF этих генов для выяснения, индуцируется ли их экспрессия ауксином [139]. Как свидетельствуют проведенные исследования, синтетический ауксин НУК стимулирует экспрессию всех вышеуказанных генов (за исключением GH3-17) при обработке растений в течение 1,5 ч.

Эксперименты по изучению ингибирующего влияния семидоминантных *shy2* мутаций на экспрессию некоторых из семейства генов GH3 (GH3-1—GH3-3, GH3-5) показали, что индукция ауксином экспрессии GH3-3 и GH3-5 генов снижается на 20—50 %, а экспрессии гена GH3-1 уменьшается незначительно по сравнению с дикими типами растений; в то же время уровень экспрессии GH3-2 гена является практически нормальным, подобным таковому у диких типов растений [143]. Эти данные указывают на то, что к регулируемым ауксином относятся GH3-1, GH3-3 и GH3-5 гены; их экспрессия индуцируется ауксином у диких типов растений и репрессирована SHY2/IAA3 белками у мутантов *shy2*.

Существуют также данные, подтверждающие значительную роль в фотоморфогенезе GH3 генов, являющихся связующим звеном между сигналами фитохромов и физиологическими ауксин-регулируемыми реакциями растений [139, 146, 165, 166].

Кроме многочисленных семейств Aux/IAA, SAUR и GH3 генов растений, к классу первично регулируемых ауксином генов принадлежит также небольшое семейство генов ACS [139]. Определено, что экспрессия трех из них (ACS4, ACS6, ACS8) не индуцируется ауксином у *shy2* мутантных растений *Arabidopsis*, тогда как противоположная картина наблюдается у диких типов растений, на основании

чего был сделан вывод о принадлежности этих генов к классу ранних ауксин-индуцируемых генов [143].

В настоящее время у разных видов растений идентифицировано также большое количество генов, относящихся к числу вторичных и более поздних индуцируемых или репрессируемых ауксином генов.

Подробный перечень их представлен в обзоре [143]. В частности, к ауксин-стимулируемым генам относятся: ген мембранного белка AUX1 пермеазы, участвующей в переносе ИУК через мембрану и в стимуляции специфических регулируемых ауксином физиологических внутриклеточных реакций; гены ферментов и белков клеточной стенки, регулирующих ее биогенез в период растяжения (например, белки экспансины, ферменты гликозилтрансферазы, XTR4 белок, подобный ксиланоглюкан-эндотрансгликозилазе, а также кодируемая *HLS1* (*HOOKLESS1*) геном ацетилтрансфераза, дифференцированно регулирующая рост клеток в период формирования апикального крючка гипокотыля) [9]; гены метаболических ферментов (в частности, белки из семейства цитохромов P450, подобная митохондриальным белкам АТРаза, ИУК- β -гликозилтрансфераза, контролирующая ауксин-регулируемые реакции посредством коъюгации ИУК); гены белков — транскрипционных трансфакторов (auxin-response factor — ARF) и белка, подобного трансляционному фактору EF-1 α ; гены *LEA* (late embryogenesis abundant) белков дегидринов (защищающих клеточные мембраны и другие клеточные белки от высоких потерь воды) и многие другие гены, индуцируемые ауксином.

К репрессируемым ауксином генам относятся [143]: гены ряда транскрипционных факторов (например, Zinc finger белок, RING-H2 finger белок RHA4a, R2R3-MYB трансфактор, WRKY ДНК-связывающий белок); гены рецепторных белков (среди них подобные гистидинкиназе и протеинкиназе белки); гены транспортных белков (в частности, подобный нодулину-26 белок); гены метаболических ферментов (например, пероксидазы, эндохитиназы, пектинэстеразы, белки семейства цитохромов P450); ген белка, взаимодействующего с РНК (RNA-binding protein); ген *NPH-3* (nonphototropic hypocotyl-3), участвующий в регуляции фототропизма, и другие гены.

Все вышеизложенное, несомненно, является строгим доказательством того, что ауксин регули-

рует экспрессию целой сети генов и, следовательно, контролирует кругооборот белков.

Молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов ауксинами. В настоящее время выявлено, что ключевую роль в опосредовании сигналов ауксина выполняют регуляторные белки Aux/IAA, SAUR и GH3, а также белки ауксин-регулируемых трансфакторов (ARF) [136—139, 167—172].

Показано, что семейство ауксин-регулируемых *Aux/IAA* генов *Arabidopsis* (насчитывающее 29 членов) кодирует белки с м. м. 25—35 кДа, имеющие общие консервативные I—IV домены и два консервативных сигнала ядерной локализации (NLS): N-терминальный и C-терминальный, что указывает на их ядерную локализацию [139, 170—172]. Установлено, что период полураспада многих ядерных Aux/IAA белков составляет от 5 до 10 мин (например, период полураспада ядерных PS-IAA4 и PS-IAA6 белков гороха подобен таковому ZmSAUR2 белков и составляет 6—8 мин) [70, 138, 142]. Важную роль в дестабилизации Aux/IAA белков играет II домен (содержащий последовательность из 13 аминокислотных остатков, называемую дедроном), являющийся мишенью для убиквитирования белков и последующей их деградации в протеасоме [22, 173, 174]. Например, иммунологическим методом с применением [³⁵S]-меченных белков определено, что у растений, мутантных по II домену IAA17/AXR3 белков, возрастает уровень белков Aux/IAA и увеличивается продолжительность их жизни по сравнению с дикими типами растений [171, 175]. В настоящее время также четко установлена функциональная роль III домена Aux/IAA белков, являющегося частью амфипатической *βαα*-складчатой последовательности, подобной β -лентовидным мультимеризационным и ДНК-связывающим доменам (DNA-binding domain — DBD) Arg и MetJ репрессорных белков прокариотов [148, 176].

Как предполагается, данная *βαα*-последовательность участвует в димеризации/мультимеризации Aux/IAA белков и в гетеродимеризации белков Aux/IAA с белками ARF [171, 175, 177]. Изучена также функция I домена, необходимого для поддержания стабильности Aux/IAA белков, их гомодимеризации и для проявления ими репрессорных функций; в то же время роль IV домена остается до конца не выясненной (однако не исключается его участие в гетеродимеризации белков Aux/IAA с ARF) [139, 171, 175]. Многочисленные исследова-

ния свидетельствуют о том, что мутации в I, II и III доменах *Aux/IAA* генов (в частности, *IAA3*, *IAA7*, *IAA17*, *IAA28* генов *Arabidopsis*) приводят к исчезновению ответной реакции на воздействие ауксина и к появлению аномальной морфологии как у проростков, так и у взрослых растений [138—146, 157, 171].

Тот факт, что белки *Aux/IAA* имеют ядерную локализацию и подобны *Arg* и *MetJ* белкам-репрессорам, связывающимся с ДНК, приводит к выводу о том, что *Aux/IAA* белки являются транскрипционными факторами [176], проявляющими, как предполагается, свою регулируемую активность не за счет прямого взаимодействия с ДНК, а через образование гетеродимерных комплексов с ARF белками (посредством общих С-терминальных III и IV доменов), которые затем связываются через N-терминальные DBD домены ARF трансфакторов с чувствительными к ауксину элементами — *Aux/RE* промоторов ранних ауксин-регулируемых генов [171, 178, 179]. К настоящему времени ARF обнаружены у многих классов растений: двудольных, однодольных, голосеменных и папоротников [139].

Первый трансфактор ARF1 выявлен в моногибридной системе дрожжей с использованием синтетических *AuxRE* P3 (4X) (содержащих P3 (4X)-палиндромные повторы протяженностью 3 п. н. и являющихся в 5—10 раз чувствительнее к ауксину, чем натуральные *AuxRE*) в качестве «приманок» для селекции N-терминальных DBD, кодируемых кДНК библиотекой *Arabidopsis* [139, 179]. В настоящее время у *Arabidopsis* с помощью дигибридной системы дрожжей (используя в качестве «приманки» кДНК, кодирующую С-терминальные III и IV домены (аминокислотные остатки 533—655) ARF1 фактора, идентифицированы 23 гена подобных ARF1 трансфакторов (гибридирующихся с ARF1 через общие III и IV домены), один из которых — ARF23, — как предполагается, кодируется псевдогеном (вследствие отсутствия у него характерных для других ARF С-терминальных последовательностей и наличия стоп-кодона в его DBD [139, 178, 179]). Анализ экспрессии *ARF1—ARF10* генов показал, что высокие уровни мРНК транскриптов этих генов присутствуют во всех мажорных тканях и органах *Arabidopsis*, а также в суспензионной культуре клеток этого растения [180].

Кодируемые ARF генами белки с м. м. 70—130 кДа содержат NLS-сигнальные N-терминальный

DBD и (за исключением ARF3 и ARF17) общие с *Aux/IAA* белками III и IV С-терминальные домены, способствующие гомо- и гетеродимеризации ARF как между собой, так и с *Aux/IAA* белками [137, 181]. Универсальные для всех растений N-терминальные DBD домены ARF (содержащие около 100 аминокислотных остатков) подобны В3 DBD доменам транскрипционных факторов, обнаруженных, например, у кукурузы (VP1 фактор) и *Arabidopsis* (ABI3, FUSCA3, RAV1 и RAV2 факторы) и участвующих в специфическом присоединении ARF к TGTCTC последовательностям *AuxRE* [139, 182, 183].

Различные ARF могут подавлять или активировать *AuxRE* промоторов регулируемых ауксином генов в зависимости от доменов, расположенных между DBD и основными последовательностями димеризации у ARF [138, 139, 171, 178—181]. Детальное исследование палиндромных последовательностей ARF выявило присутствие в них средних доменов (расположенных между N-терминальным DBD и III и IV С-терминальными доменами), функционирующих как активаторные или репрессорные домены. Например, выяснено, что синтезируемые в трансформированных ARF генами протопластах растений белки ARF1 и ARF2, содержащие обогащенные пролином или серином средние домены, проявляют свойства репрессоров транскрипции, в то время как ARF5—ARF8 и ARF19 белки, имеющие обогащенные глутамином домены, являются активаторами транскрипции [178].

Проведенные генетические и физиологические исследования мутантных по трем генам (*ARF3*, *ARF5* и *ARF7*) растений *Arabidopsis* позволили установить роль этих генов в регулируемом ауксином росте. Показано, что при (*mp*)/*arf5* (monopierous) мутациях наблюдается прекращение формирования эмбриональной оси и развития сосудисто-проводящей системы [184], тогда как *nph4/arf7* мутации приводят к нарушению различных стадий морфогенеза [185]. Раскрыта также важная функциональная роль ETTIN/ARF3 транскрипционного фактора, участвующего в опосредовании регуляции ауксином инициации закладки и роста флоральных органов у *Arabidopsis* [186, 187]. Обнаружено, что мутации *ett* (*ettin*) вызывают плейотропный эффект на развитие цветков, включая увеличение количества околоцветников и нарушение дифференциации репродуктивных органов. Некоторые фенотипические черты *ett* мутантов (например,

сокращение размера завязи) подобны таковым у *pid* (pinoid) и *tr* мутантов, у которых нарушен полярный транспорт ауксина [184, 188, 189]. На основании проведенной аналогии сделан вывод о том, что вследствие *ett* мутаций нарушается передача сигналов ауксина.

Более того, показано, что фенотип диких растений, обработанных ингибитором полярного транспорта ауксина NPA, проявляющийся в сокращении расстояния между флоральными органами — от центральной завязи до апекса (рыльца) пестика с одной стороны и до базального междоузлия с другой стороны, сходен с фенотипами *pid*, *ett* и дефектных по транспорту ауксина *pin1* (*pin-formed1*) мутантов [186—189]. Полученные данные позволили предположить, что ген *ETT* контролирует развитие завязи внутри гинецея и его функциональная активность зависит от градиента концентрации ауксина [190].

Анализ аминокислотных последовательностей белка *ETT* показал, что этот белок принадлежит к многочисленному семейству ARF белков, однако, в отличие от других его членов, имеющих III и IV C-терминальные домены, обеспечивающие их гетеродимеризацию с семейством репрессорных белков Aux/IAA, *ETT* белок (названный ARF3 транскрипционным фактором) имеет один уникальный обогащенный серином C-терминальный домен, вследствие чего возможность его гетеродимеризации с Aux/IAA белками исключается [139, 187, 191].

Дальнейшие поиски модификаторов *ett* мутантного фенотипа позволили идентифицировать *SEU* (*SEUSS*) ген, регулирующий экспрессию флорального гомеотического гена *AG* (*AGAMOUS*), кодирующего MADS-box белок — транскрипционный фактор, контролирующий гомеотическую трансформацию лепестков в тычинки, чашелистики или мозаичные плодолистики [192].

Выяснено, что *seu-3* мутации приводят к редуцированию классических ответных реакций растений на действие экзогенного ауксина (таких как апикальное доминирование, инициация образования латеральных корней, а также нарушение формирования мутовок листьев и цветков). При двойных *ett-7 seu-3* и *pid-1 seu-3* мутациях наблюдается синергическое усиление морфологических дефектов, характерных для *ett* и *pid* мутантов и проявляющихся в полной остановке развития цветков [187]. На основании полученных данных сделан вывод о том, что *SEU* и *ETT* гены отвечают за

развитие флоральных органов, совместно контролируя транскрипцию регулируемых ауксином генов. Предполагается, что *SEU* белки выполняют связующую роль между *ETT* белками и другими регуляторными молекулами, такими как ARF и (или) Aux/IAA белки, хотя, с другой стороны, результаты исследований в дигибридной системе дрожжей свидетельствуют о взаимодействии гомологов флоральных *SEU* лишь с одним трансфактором — *ETT/ARF3* и неспособности *SEU* связываться, в частности, с ARF1. Тем не менее, поскольку экспрессия *SEU* и *ETT/ARF3* генов не является тканеспецифической, т. е. наблюдается не только в цветках, но также во многих других тканях и органах растения, возможность проявления регуляторного действия *SEU* и *ETT/ARF3* комплексов на экспрессию Aux/IAA генов при непосредственном участии других трансфакторов все же не исключается [179, 186, 187].

В настоящее время не существует строгих доказательств того, что репрессивный эффект белков Aux/IAA возникает в результате их непрямого связывания с AuxRE промоторов ауксин-регулируемых генов только при участии DBD доменов ARF. Напротив, известно, что Aux/IAA белки способны сами действовать как репрессоры [171, 172, 180]. В частности, белки, кодируемые плазмидными генами Aux/IAA (например, *Aux22* и *GH1* генами сои и *PS-IAA4/5* и *PS-IAA6* генами гороха) под контролем сильного конститутивного *CaMV 35S* промотора, могут самостоятельно функционировать как транскрипционные репрессоры, подавляя транскрипцию ауксин-регулируемых репортерных генов в трансформированных протопластах моркови [180].

При использовании различных генетических методов (делеционного анализа, линкер-сканирующего сайт-направленного мутагенеза, эпистатического анализа) определены последовательности внутри AuxRE промоторов многих регулируемых ауксином генов. Например, выяснено, что (GT)G-TCCCAT последовательность присутствует внутри AuxRE промоторов *PS-IAA/5* генов гороха, TGT-CTC последовательность обнаружена в AuxRE промоторов *GH3* генов сои, а оба типа этих палиндромных повторов локализуются в AuxRE промотора *SAUR15A* гена сои [170, 171, 180, 193]. Выяснена функциональная роль AuxRE последовательностей: при низком уровне ауксина они репрессируют транскрипционную активность близле-

жащих или удаленных конститутивных элементов ДНК и, наоборот, повышение уровня ауксина вызывает дерепрессию конститутивных элементов ДНК и их активацию.

Другими хорошо изученными AuxRE промоторов индуцируемых ауксином генов являются *osc/as-1* элементы, впервые обнаруженные в *CaMV 35S* промоторе. Как показано, элементы *as-1*, состоящие из двух неполных TGACGTCA палиндромов, опосредуют индуцируемую салициловой кислотой и ауксином активацию транскрипции [194—197]. Элементы *as-1* идентифицированы в промоторах генов различных растений, включая ауксин-индуцируемые *TGA* и *Par* гены табака [194—198]. С помощью метода смещения электрофоретической подвижности (electrophoretic mobility shift assay) установлено, что палиндром TGACGTCA связывается с ядерным белковым ASF-1 комплексом [195].

Получены также данные о том, что в регуляции экспрессии генов, промоторы которых содержат AuxRE типа *as-1*, участвуют *транс*-активирующие факторы, являющиеся членами семейства TGA белков, имеющих bZIP (basic leucine zipper) DBD домен лейциновой «застежки-молнии», называемых G-box объединяющими факторами (GBFs) [196, 198, 199]. Например, показано, что в трансгенных растениях, имеющих гены, содержащие AuxRE *as-1* типа, *цис*-элементы и их *транс*-активирующие факторы проявляют тканеспецифическую активность в связывании с промоторами генов *GTS* (кодирующих глутатионтрансферазу) [200]. Обнаружено, что *транс*-активирующий фактор, кодируемый *TGA1a* геном табака, влияет на транскрипцию регуляторных генов, содержащих AuxRE типа *as-1*, в ответ на ксенобиотические стресс-факторы: повышение уровня экспрессии *TGA* гена наблюдается в корнях и побегах, коррелируя с *as-1*-регулируемым базальным уровнем экспрессии *GUS* трансгена и двумя *GTS* генами.

Методом гибридизации *in situ* у интактных проростков обнаружено, что *TGA1a* и *GTS* гены в основном экспрессируются в верхушечных меристемах корней. Похожие данные получены при генетическом анализе *PG13*, гомолога *транс*-активирующего фактора *TGA1a*, и подтверждено предположение о том, что оба фактора присутствуют в первичных корнях и их меристемах и могут влиять на экспрессию изоферментов. Выяснено, что экспрессия генов растений, регулируемая *транс*-активирующим фактором *TGA1a* или его гомологами,

ингибируется генами *GTS* (*GNT1* и *GNT35*), активность которых потенцируется ауксинами через *as-1*. Количество *TGA1a* и *PG13* транскриптов коррелирует с относительной базальной активностью *as-1*-регулируемых генов, обработка ауксином увеличивает эту активность больше в побегах, чем в корнях.

К идентифицированным в последние годы генам, экспрессия которых потенциально активируется ауксином благодаря присутствию у них AuxRE (*osc/as-1* типа), относятся также *ZMK1* ген кукурузы (кодирующий белки калиевых каналов), *NAC1* ген *Arabidopsis* и гены митоген-активируемых протеинкиназ (*MAPK*) разных растений [139, 201—203].

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что ауксин в зависимости от его внутриклеточной концентрации влияет на продолжительность существования Aux/IAA белков и их способность подавлять транскрипцию ранних ауксин-регулируемых генов. Например, показано, что в трансформированных химерным *IAA::LUC* геном клетках растений при возрастании концентрации ауксина белки Aux/IAA становятся менее стабильными (короткоживущими) в результате присоединения к N-концу этих белков с участием фермента убиквитинпротеинлигазы метки — цепочки из четырех молекул белка убиквитина, включающего 76 аминокислотных остатков (зависимость скорости деградации белков от природы N-концевых аминокислот (правило N-конца) и понятие «короткоживущие белки» впервые сформулированы и предложены проф. А. Варшавским). Впоследствии такие убиквитинированные белки подвергаются деградации в протеасоме (состоящей из двух субчастиц — протеолитического ядра с м. м. около 700 кДа и коэффициентом седиментации 20S, входящего в состав еще более сложной частицы, имеющей коэффициент седиментации 26S), вследствие чего снижается их репрессорный эффект по отношению к другим ауксин-регулируемым генам [171, 204, 205].

Как установлено, в процессе транспортировки белков-репрессоров Aux/IAA к центру их деградации — протеасоме — участвуют активные белки-ферменты: E1, активирующий молекулу убиквитина и передающий ее конъюгирующему ферменту E2, который, в свою очередь, переносит активированную молекулу убиквитина к представителю семейства сшивающих ферментов — убиквитин-

протеинлигазе E3, ковалентно пришивающей к белку-субстрату цепочку убиквитина [89, 206].

Представителями E3 лигазы у растений являются SCF комплексы (контролирующие развитие флоральных органов, активность физиологических часов, ответные реакции клетки на воздействие ауксина и жасмоновой кислоты), состоящие из четырех субъединиц: Cdc53 белков куллина, белков, кодируемых *SKP1* и *RBX1* генами, а также большого семейства F-box белков [207]. Функцией последних является взаимодействие с белками-мишенями с последующей их деградацией в 26S протеасоме. Активность F-box белков регулируется SCF комплексом таким образом, что вначале один из компонентов такого комплекса (белок куллин) взаимодействует с белком RBX1, затем образовавшийся димерный комплекс присоединяется к C-терминальному домену F-box белков, причем связующим звеном являются белки SKP1 (взаимодействующие с N-терминальным доменом F-box белков).

У *Arabidopsis* идентифицирован и наиболее охарактеризован E3 лигазный SCF комплекс (называемый SCF^{TIR1}), выполняющий ведущую роль в регуляции деградации Aux/IAA белков. Мутации в генах, кодирующих компоненты SCF^{TIR1} лигазы, ослабляют ответную на ауксин реакцию растений [172, 208—210]. В состав SCF^{TIR1} комплекса входят белки, кодируемые *AtCUL1*, *ASK1* или *ASK2* и *RBX1* генами, и F-box белок, кодируемый *TIR1* (transport inhibitor response1) геном. Мутации в *ASK1* или *TIR1* генах проявляются в снижении ответной реакции на ауксин и, наоборот, при гиперэкспрессии гена *TIR1* усиливается экспрессия ауксин-регулируемых генов [208]. Активирование TIR1 F-box белка (ответственного за деградацию в протеасоме белков Aux/IAA) осуществляется посредством присоединения компонентов SCF^{TIR1} комплекса к лейцин-обогащенным последовательностям TIR1 F-box белка [172].

Как указывалось выше, сайтом дестабилизации белков Aux/IAA является II домен, содержащий последовательность из 13 аминокислотных остатков (QVVGWPPVRSYRK) — дегрон, центральный участок которого (GWPPV) необходим для взаимодействия этих белков с TIR1 F-box белком. Показано, что мутации во II домене, играющем центральную роль для белков Aux/IAA, снижают способность их взаимодействия с SCF^{TIR1} комплексом и усиливают стабильность и функциональную активность этих

белков, репрессирующих проведение сигналов ауксина.

Установлено, что активность SCF^{TIR1} (E3-лигазного комплекса) может регулироваться посредством посттрансляционных модификаций AtCUL1 белков куллинов с участием подобного убиквитину белка-фермента RUB1; мутации генов, кодирующих AtCUL1 белки, проявляются в дефектной реакции растений на ауксин.

В настоящее время установлено что *AXR1* ген кодирует одну субъединицу (N-терминальные последовательности) фермента E1 лигазы (активирующей убиквитин-подобный RUB1 белок), аналогичной ENR2p белку дрожжей, являющемуся компонентом сигнального пути, в котором активно участвуют также циклин-зависимый ингибитор киназы Sic1p и *TIR1* ген, кодирующий F-box белки, взаимодействующие с Sic1p [168]. Другая субъединица (C-терминальные последовательности) фермента E1 лигазы кодируется геном *ECR1* (E1 C-terminal related). Предполагается, что *AXR1* и *TIR1* гены регулируют метаболизм различных ауксин-зависимых белков, в том числе белков, участвующих в клеточном цикле.

Выяснено, что за формирование конъюгатов белков RUB1 и куллинов ответствен фермент E2 лигаза, кодируемая *RCE1* геном. Результаты исследований у дрожжей показали, что компоненты белково-лигазных комплексов E1, E2 и E3 могут подвергаться модификациям при ковалентном присоединении RUB1 белка [89, 211]. Например, обнаружено, что белки RUB1 взаимодействуют с Uba3p белком (содержащим аминокислотные последовательности, идентичные таковым C-терминальной последовательности E1 активирующего фермента) [212]; Uba3p формирует комплекс с Enr2p белком, аналогичным по аминокислотному составу E2 ферменту и присутствующим у всех экспрессирующих *AXR1* ген дрожжей [204]; образование конъюгатов белков RUB1 опосредуется Uba12p — одним из 12 E2-подобных ферментов, обнаруженных также у дрожжей [212]; модификация Cdc53p белков куллинов (компонентов белково-лигазного комплекса E3, кодируемых *AtCUL1* геном) конъюгатами RUB1 белков контролируются геном *AXR1* (кодирующим фермент E1 лигазу). Показано также, что мутации в генах, кодирующих компоненты E3 (SCF^{Cdc4}) комплекса, затрагивают *ENR2p*, *Cdc4p*, *Cdc53p* и *Scp1p* гены [204]. Все вышеперечисленные данные, несомненно, сви-

детельствуют о значительной роли подобного убиквитину фермента RUB1 в протеасомо-опосредованном разрушении белков у дрожжей.

Аналогичные пути передачи сигналов ауксина, контролируемые *AXR1* геном, существуют и у растений. В частности, генетический анализ мутантных по компонентам убиквитин-лигазного комплекса фенотипов *Arabidopsis* подтвердил, что существует сигнальное взаимодействие по вышеуказанному пути между ENR2p-подобным белком (кодируемым *AXR1* геном) и Cdc4p-подобным белком (F-бокс белком, кодируемым *TIR1* геном) [89, 207]; мутантные *axr1* и *tir1* растения являются устойчивыми к ингибиторам полярного транспорта ауксина и дефицитными по ауксин-опосредованным процессам. Данные о синергическом взаимодействии *axr1* и *tir1* аллелей указывают на тот факт, что они являются компонентами упомянутого выше пути и согласуются с наблюдениями о нарушении нормальных фенотипов у двойных *axr1 tir1* мутантов растений (подобных *enr2 cdc4* мутантам дрожжей). Следовательно, очевидно, что *AXR1* и *TIR1* гены опосредуют сигналы ауксина, участвуя в деградации репрессорных Aux/IAA белков в протеасоме с последующей активацией семейства ранних ауксин-регулируемых генов [89, 170, 171, 207].

Недавно идентифицирован еще один компонент сложного убиквитин/протеасомного пути расщепления белков — ключевой репрессор фотоморфогенеза COP9 сигналосома, представляющая собой мультисубъединичный регуляторный комплекс (кодируемый семейством *CSN* генов), выявленный у разнообразных организмов: дрозофилы, нематод, дрожжей, растений и человека [213—219].

У растений COP9 сигналосома открыта при генетическом анализе светорегулируемых проростков *Arabidopsis*, развивающихся по двум противоположным путям, таким как фотоморфогенез на свету и скотоморфогенез (или этиоляция) в темноте [213, 217]. В ходе этих исследований идентифицированы 11 локусов, названных плейотропными *COP/DET/FUS* (constitutive/photomorphogenic/detiolated/fusca) генами, ответственными за скотоморфогенез [213, 220—222]. Рецессивная природа *cop/det/fus* мутаций свидетельствует о том, что гены *COP/DET/FUS* кодируют белки — негативные регуляторы фотоморфогенеза. Установлено, что у *cop/det/fus* растений из всех 11 изолированных аллелей восемь локусов (*CSN1—CSN8*) конт-

ролируют биогенез COP9 сигналосома (мутации в этих локусах фенотипически проявляются в замедлении роста проростков на ранних стадиях развития и в летальности — на более поздних стадиях) [223].

С помощью молекулярно-генетических исследований выяснено, что субъединицы сигналосома *CSN8*, *CSN7*, *CSN4*, *CSN1* и *CSN3* (кодируемые генами *COP9*, *FUS5*, *COP8/FUS4*, *COP11* и *FUS11* соответственно) существуют исключительно в виде комплекса сигналосома COP9, в то же время *CSN5A/CSN5B*, *CSN6A/CSN6B* и *CSN7* компоненты могут присутствовать в виде как комплексных, так и мономерных форм [213, 224, 225].

Ключевую роль в расщеплении меченных убиквитином белков в протеасоме играют *CSN5* и *CSN6* гены, кодирующие семейство Mov34 белков, являющихся компонентами COP9 сигналосома, eIF3 комплекса (содержащего eIF3-p47 и eIF3-p40 — факторы инициации трансляции) и 26S субчастицы протеасомы у *Arabidopsis* [213, 223]. В соответствии с анализом аминокислотных последовательностей, Mov34 белки делят на два класса. К первому принадлежат белки *CSN5* и *Rpn11* (субъединица 26S протеасомного комплекса), ко второму — белки *CSN6*, *Rpn8* (субъединица 26S протеасомного комплекса), а также eIF3-p47 и eIF3-p40 белки (субъединицы eIF3 комплекса). Эти результаты свидетельствуют о том, что субъединицы 26S протеасомы и COP9 сигналосома являются компонентами общего белкового комплекса, образованного двумя классами семейства Mov34 белков.

С использованием генетических и биохимических методов выяснена функциональная роль COP9 сигналосома в регуляции роста и развития растений. Как установлено, COP9 сигналосома участвует в протеасомо-опосредованной деградации ключевых регуляторных белков фотоморфогенеза (кодируемых *PHYA* и *HY5* генами) [213, 226], а также в деградации Aux/IAA белков — репрессоров ауксин-регулируемых генов (посредством их взаимодействия с SCF^{TIR1}-убиквитинлигазным E3 комплексом и последующей деконъюгации убиквитин-подобного белка RUB1 и белка куллина 1 — ключевой субъединицы SCF^{TIR1}-убиквитинлигазного комплекса E3) [227, 228].

Показано, что частичное снижение функциональной активности COP9 сигналосома вследствие антисмысловой косупрессии *CSN5* и *CSN6A* генов проявляется в разнообразных дефектах в развитии

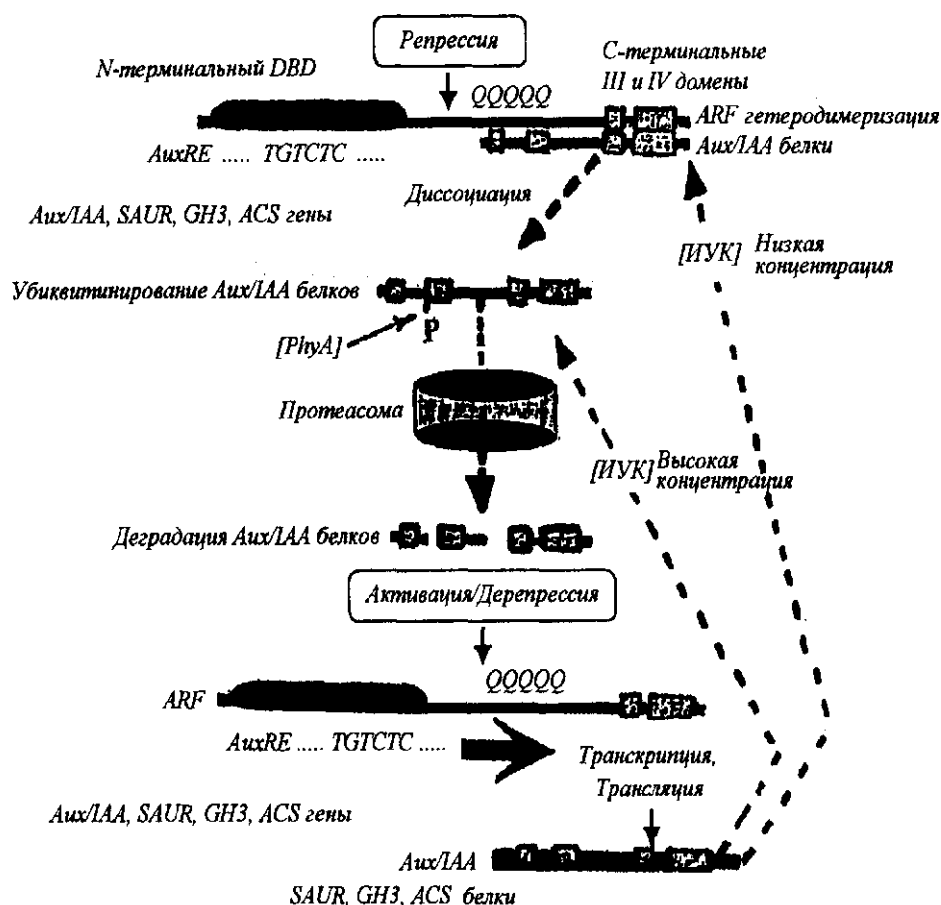


Рис. 4. Схема регуляции белками ARF и Aux/IAA экспрессии ранних первично регулируемых ауксином генов ([139, 171] с нашими дополнениями, подробности см. в тексте)

растения, фенотипически проявляющихся в симметричной форме (в результате гомеотической трансформации) многих органов, включая корни, стебель, семядоли, розеточные и стеблевые листья, органы цветков — тычинки и пестики (это доказывает, что COP9 сигналосома экспрессируется во всех вышеуказанных органах) [217, 219]. Эти трансгенные растения фенотипически подобны растениям, мутантным по разным компонентам сигнального пути ауксина (в частности, по компонентам убиквитин/протеасомного пути расщепления белков Aux/IAA), таким как, например, *ifo* мутанты (поскольку UFO является F-бок белком и компонентом SCF^{UFO}-специфического E3 лигазного комплекса, регулирующего развитие цветков) [229, 230], *pin1* и *pinoid* мутанты (имеющие тройные или единичные семядоли), у которых нарушен полярный транспорт ауксина [188, 231], *tir1-1* мутанты с редуцированным ростом латеральных корней [168], а также *axr11* и *axr1-12* мутанты растения со сниженным апикальным доминированием, карликовостью и выраженным фотоморфогенетическим развитием в темноте [211].

Как свидетельствуют результаты блот-анализа мРНК с кДНК *Aux/IAA*, во всех этих мутантных растениях аккумулируются значительные количества убиквитинированных белков Aux/IAA (вследствие нарушения их последующего расщепления протеасомой), что, несомненно, демонстрирует ключевую роль COP9 сигналосомы в регуляции протеасомо-опосредованной деградации Aux/IAA-белков в ответ на воздействие ауксина [213].

Учитывая все вышеизложенное, предложена гипотетическая схема регуляции ауксином экспрессии генов (рис. 4), суть которой состоит в следующем [139, 171]: при низких концентрациях ИУК в тканях и клетках растений ранние регулируемые ауксином гены (*Aux/IAA*, *GH3*, *SAUR* и *ACS*) активно репрессируются белками Aux/IAA (более стабильными при невысоких концентрациях ауксина). Репрессия генов, первично регулируемых ауксином, по-видимому, возникает в результате гетеродимеризации Aux/IAA репрессорных белков с активаторами транскрипции — белками ARF, подобными ARF5—ARF8, через общие C-терминальные III и IV домены и последующего взаимодей-

вия образовавшегося комплекса через глутамин-обогащенные N-терминальные DBD (обозначенные на схеме буквой Q) ARF факторов с сайтами-мишенями (TGTCTC последовательностями) AuxRE промоторов ранних ауксин-регулируемых генов. Высокая репрессорная активность Aux/IAA белков подавляет стимулирующее влияние ARF трансфакторов на экспрессию ранних генов, регулируемых ауксином.

Увеличение концентрации ИУК вызывает быструю (в течение 2—5 мин) дерепрессию/активацию транскрипции ранних ауксин-регулируемых генов (в том числе и Aux/IAA генов) вследствие диссоциации комплекса белков Aux/IAA и ARF, деградации Aux/IAA белков-репрессоров путем убиквитинирования (возможно, и фосфорилирования фитохромами [173], условно обозначенными на схеме, как *PhyA*) и расщепления в протеасоме, а затем присоединения освободившихся ARF (посредством глутамин-обогащенных N-терминальных DBD) к TGTCTC последовательностям AuxRE промоторов первично регулируемых ауксином генов с последующей их активацией, которая может потенцироваться присоединением дополнительных транскрипционных активаторов (посредством димеризации/мультимеризации через III и IV домены) к ARF.

Установлено, что экспрессия генов Aux/IAA, многие из которых содержат TGTCTC последовательности AuxRE, также возрастает при повышении концентрации ИУК. Однако, несмотря на тот факт, что мРНК Aux/IAA белков продолжают активно транслироваться, белки Aux/IAA становятся нестабильными и подвергаются быстрой деградации убиквитин/протеасомным путем (в случае, если концентрации ауксина остаются высокими). При снижении уровня содержания ИУК аккумуляция Aux/IAA белков возрастает (вследствие продолжения трансляции их мРНК) и по достижении их концентрации существенных значений репрессорные белки Aux/IAA подавляют свою собственную экспрессию, а также экспрессию других ранних ауксин-регулируемых генов, содержащих TGTCTC AuxRE.

Выводы. Необходимо отметить, что представленная гипотетическая схема регуляции ауксином экспрессии генов является несколько упрощенной, так как в ней не охарактеризовано участие некоторых молекулярных компонентов сигнальных путей ауксина (вследствие того, что они идентифициро-

ваны совсем недавно и выполняемые ими функции окончательно не установлены). Например, остается до конца не выясненным вопрос, каким образом транскрипционные репрессоры ARF (подобные ARF1 и ARF2) опосредуют регуляцию ауксином экспрессии генов (эксперименты в дигибридной системе дрожжей показали, что ARF1 связывается исключительно с Aux/IAA белками через общие III и IV консервативные C-терминальные домены и в то же время не взаимодействуют с белками SAUR и GH3, имеющими аналогичные III и IV домены) [179]. Один из предполагаемых механизмов заключается в том, что репрессоры ARF могут ингибировать транскрипцию генов подобно белкам Aux/IAA (т. е. посредством присоединения к ARF транскрипционным активаторам и подавления их активаторных функций). Данная схема не объясняет механизма совместного регулирующего экспрессию генов действия транскрипционных факторов: ETT/ARF3 (не проявляющего способности к гетеродимеризации с Aux/IAA белками) и SEU (регулирующего экспрессию флорального гомеостического MADS-Box транскрипционного фактора) [187] ввиду того, что не идентифицированы все промежуточные компоненты, участвующие в этом процессе. До сих пор не существует также достоверной информации относительно вопроса, регулирует ли ауксин экспрессию генов только посредством димерных ARF-Aux/IAA комплексов (в соответствии с данной моделью), поэтому не исключается возможность того, что в этот ауксин-регулируемый процесс вовлечены мультимерные ARF-Aux/IAA комплексы более высокого порядка. Последующие детальные исследования всех вышеперечисленных вопросов, несомненно, дополнят и расширят перечень идентифицированных в настоящее время молекулярных компонентов, участвующих в передаче сигналов ауксина.

V. A. Tsygankova, L. A. Galkina, L. I. Musatenko, K. M. Sytnik

Genetic and epigenetic control of plant growth and development. Molecular-genetic control of transmission and realization of auxin signals

Summary

In the review the data on regulator components of the indole-3-acetic acid (IAA) signal pathway in plant cells are presented: the membrane proteins-receptors perceiving the exogenous signals of IAA, the system of second messengers (cAMP, cGMP, inositoltriphosphat and diacylglycerol, cytoplasmic calcium, the «sensory» protein of the Ca²⁺ signals — kalmodulin), which mediate transmission of the IAA signals from receptors to effectors (en-

zymes), catalyzing processes of intracellular metabolism. The list of recently identified genes, which determine the synthesis of proteins participating in transmission of the IAA signals at *Arabidopsis*, is given: the gene *ABP1*, encoding membrane protein — the IAA receptor; the *AtCPI* and *AtCBL1* genes, encoding «sensory» proteins of Ca^{2+} ; numerous families of the *MDR* genes of membrane proteins participating in the active-dependent transport of the proton form IAA through the cell membranes, the *PIN* genes of proteins, controlling passive polar intra- and intercellular transport of anionic form of the IAA, *ARG1* and *RCN* genes of proteins responsible for the transmission of gravitropic signals and regulating the polar transport of the anionic form IAA through the membranes of the specialized gravity-perceiving cells — statocytes, the *VTI* genes of the *SNAREs* proteins participating in the vesicular intracellular transport IAA, and the *AtMRP5* gene of protein — transporter of the conjugated forms of IAA; the *ARF* genes of auxin-activated transactors, controlling expression of early auxin-regulated *Aux/IAA*, *SAUR*, *CH3* genes, and also the numerous families of the *SKP1*, *RBX1*, *ATCUL1*, *ASK1*, *ASK2*, *AXR1*, *ECR1*, *RCE1*, *ENR2p*, *Cdc4p*, *Cdc53p*, *Scp1p*, *TIR1* genes of proteins (members of ubiquitin-protein ligases complex) and *CSN* genes of proteins (members of multisubunit protein regulator complex of *COP9* signalosome) — components of ubiquitin/proteasome-mediated degradation of *Aux/IAA* proteins repressing transmission of auxin signals. The hypothetical model of regulation of genes expression by the IAA is considered.

Key words: the indole-3-acetic acid (IAA) receptors, second messengers of IAA, proteins-transporters of IAA, auxin-regulated genes, ubiquitin-proteasome's way degradation of proteins-repressors of IAA.

В. А. Цыганкова, Л. А. Галкина, Л. И. Мусатенко, К. М. Ситник

Генетичний і епігенетичний контроль росту і розвитку рослин. Молекулярно-генетичний контроль проведення і реалізації сигналів ауксинів

Резюме

Представлено дані щодо регуляторних компонентів сигнального шляху індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) у клітинах рослин: мембранні білки-рецептори, які сприймають екзогенні сигнали ІОК, систему вторинних месенджерів (сАМР, сGMP, інозитолтрифосфат і діацилгліцерол, цитоплазматичний кальцій, «сенсорний» білок Ca^{2+} сигналів — кальмодулін), що опосередковують передачу сигналів ІОК з рецепторів на ефектори (ферменти), які каталізують процеси внутрішньоклітинного метаболізму. Подано перелік ідентифікованих в останні роки генів, які детермінують синтез білків, що беруть участь у проведенні сигналів ІОК у *Arabidopsis*: ген *ABP1*, який кодує мембранний білок — рецептор ІОК; *AtCPI* і *AtCBL1* гени, що кодують «сенсорні» білки Ca^{2+} ; численні родини *MDR* генів мембранних білків, які беруть участь в активному АТР-залежному транспорті протонної форми ІОК через мембрани клітин, *PIN* генів білків, що контролюють пасивний полярний внутрішньо- і міжклітинний транспорт аніонної форми ІОК, *ARG1* і *RCN1* генів білків, які відповідальні за передавання гравітропічних сигналів і регулюють полярний транспорт аніонної форми ІОК через мембрани спеціалізованих гравічутливих клітин — статоцитів, *VTI* генів *SNARE* білків, що беруть участь у везикулярному внутрішньоклітинному транспорті ІОК, і *AtMRP5* гена білка — транспортера кон'югованих форм ІОК; *ARF* генів трансфакторів, що активуються ауксином і контролюють експресію ранніх ауксин-регульованих *Aux/IAA*, *SAUR*, *GH3* і *ACS* генів, а також численні родини *SKP1*, *RBX1*, *ATCUL1*, *ASK1*, *ASK2*,

AXR1, *ECR1*, *RCE1*, *ENR2p*, *Cdc4p*, *Cdc53p*, *Scp1p*, *TIR1* генів білків (членів убіквітин-протеїлігазного комплексу) і *CSN* генів білків (членів мультисубодичного білкового регуляторного комплексу *COP9* сигналоми) — компонентів убіквітин/протеасомо-опосередкованого шляху деградації *Aux/IAA* білків, що пригнічують проведення сигналів ауксину. Розглянуто гіпотетичну модель регуляції ІОК експресії генів.

Ключові слова: рецептори індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), вторинні месенджери ІОК, білки — транспортери ІОК, ауксин-регульовані гени, убіквітин-протеасомний шлях деградації білків — репресорів ІОК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Vivanco J. M., Flores H. E. Control of root formation by plant growth regulation // The plant growth regulators in agriculture and horticulture. Role and commercial uses / Ed. A. S. Basra.—New York: Haworth press, 2000.—P. 1—25.
2. Arteca R. Plant growth substances: principles and applications.—New York: Chapman and Hall, 1996.—255 p.
3. Arteca R. Hormonal stimulation of ethylene biosynthesis // Polyamines and ethylene: biochemistry, physiology, and interactions / Eds H. E. Flores, R. N. Arteca, J. C. Shanon.—Rockville: Amer. Soc. Plant Physiol., 1990.—P. 216—223.
4. Vogel J. P., Woeste K. E., Theologis A., Kieber J. J. Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95.—P. 4766—4771.
5. Dehio C., Grossman K., Schell J., Schmulling T. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rol* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA // Plant Mol. Biol.—1993.—23.—P. 1199—1210.
6. Leopold A. C. Contemplations of hormones as biological regulators // Hormone action in plant development — a critical appraisal / Eds G. V. Hoard, J. R. Lenton.—London: Butterworth and Co Publ. LTD, 1987.—P. 3—15.
7. Stoddart J. L. Biochemical considerations in developmental studies // Hormone action in plant development — a critical appraisal / Eds G. V. Hoard, J. R. Lenton.—London: Butterworth and Co Publ. LTD, 1987.—P. 275—286.
8. Gruenbaum Y., Naveh-Manly T., Cedar H., Razin A. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA // Nature.—1981.—292.—P. 860—862.
9. Цыганкова В. А., Галкина Л. А., Мусатенко Л. И., Ситник К. М. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Гены биосинтеза ауксинов и ауксин-регулируемые гены, контролирующие деление и растяжение клеток растений // Биополимеры и клетка.—2005.—21, № 2.—С. 107—133.
10. Venis M. A. Hormone-binding sites in plants.—Harlow: Longman, 1985.—390 p.
11. Venis M. A. Hormone receptor sites and the study of plant development // Hormone action in plant development — a critical appraisal / Eds G. V. Hoard, J. R. Lenton.—London: Butterworth and Co Publ. LTD, 1987.—P. 53—61.
12. Macdonald H. Auxin perception and signal transduction // Plant Physiol.—1997.—100.—P. 423—430.
13. Bauky J. M., Sealy J. M., Macdonald H., Brearley J., Droge S., Hillmer S., Robinson D. G., Venis M. A., Blatt M. R., Lazarus C. M., Napier R. M. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin // Plant Physiol.—2000.—124.—P. 1229—1238.
14. Vreugdenhil D., Burgers A., Harkers P. A. A., Libbenga K. R.

- Modulation of the number of membrane-bound auxin-binding sites during the growth of batch-cultured tobacco cells // *Planta*.—1981.—152.—P. 415—419.
15. Hertel R., Thomson K. S., Russo V. E. A. *In vitro* auxin-binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles // *Planta*.—1972.—107.—P. 325—340.
 16. Kende H., Zeevaert J. A. D. The five «classical» plant hormones // *The Plant Cell*.—1997.—9.—P. 1197—1210.
 17. Jones A. M. Auxin-binding proteins // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1994.—45.—P. 393—420.
 18. Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G., Klambt D., Ghislain M., Guern J. Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86.—P. 891—895.
 19. Leblanc N., Perrot-Rechenmann C., Barbier-Brygoo H. The auxin-binding protein Ni-Erabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway // *FEBS Lett.*—1999.—449.—P. 57—60.
 20. Jones A. M., Im K. H., Savka M. A., Wu M. J., DeWitt G., Shillito R., Binns A. N. Auxin-dependent cell expansion mediated by over-expressed auxin-binding protein 1 // *Science*.—1998.—282.—P. 1114—1117.
 21. Gehring C. A., McConchie R. M., Venis M. A., Parish R. W. Auxin-binding protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH // *Planta*.—1998.—205.—P. 581—586.
 22. Кулаева О. Н., Прокопцева О. С. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов // *Биохимия*.—2004.—69, № 3.—С. 293—310.
 23. Lobler M., Klambt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn. I. Purification by immunological methods // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 9848—9853.
 24. Lobler M., Klambt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn. II. Localisation of a putative auxin receptor // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 9854—9859.
 25. Lobler M., Klambt D., Simon K. Auxin-binding in target tissue // *J. Cell. Biochem.*—1986.—10 B.—P. 11—19.
 26. Kearns A. W. The search for the auxin receptor.—New York: D. Phyl. Thes. Univ. publ., 1982.—228 p.
 27. Oostrom H., Kulescha Z., Van Vliet T. B., Libenga K. R. Characterization of a cytoplasmic auxin receptor from tobacco pith callus // *Planta*.—1980.—149.—P. 44—47.
 28. Maan A. C., Van der Linde P. C. G., Harces P. A. A., Libenga K. R. Correlation between the presence of membrane-bound auxin-binding and root regeneration in cultured tobacco cells // *Planta*.—1985.—164.—P. 376—378.
 29. Zudi J. Increases in the capacity of pea tissue to form acyl-aspartic acids specifically induced by auxins // *New Phytologist*.—1966.—65.—P. 9—21.
 30. Zurfluh L. L., Guilfoyle T. J. Auxin- and ethylene-induced changes in the population of translatable messenger RNA in basal sections and intact soybean hypocotyl // *Plant Physiol.*—1982.—69.—P. 338—340.
 31. Бабаков А. В. Функции фузикоцин-связывающих белков в высших растениях // Тез. докл. IV Междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений».—М.: Изд-во Мос. гос. аграр. ун-та, 1997.—С. 10.
 32. Venis M. A., Watson P. J. Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: identification as benzoxazinones // *Planta*.—1978.—142.—P. 103—107.
 33. Aducci P., Federico R., Ballio A. Fusicocin receptors. Evidence for an endogenous ligand // *Planta*.—1980.—148.—P. 208—210.
 34. Bhattacharya K., Biswas B. B. Induction of a high affinity binding site for auxin in *Avena* root membrane // *Phytochemistry*.—1982.—21.—P. 325—340.
 35. Trewavas A. An auxin induces the appearance of auxin-binding activity in artichoke tubers // *Phytochemistry*.—1980.—19.—P. 1303—1308.
 36. Nishikura Y. Studies and perspectives of protein kinase C // *Science*.—1986.—233.—P. 305—312.
 37. Takahashi S., Katagiri T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca²⁺-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration // *Plant and Cell Physiol.*—2000.—41.—P. 898—903.
 38. Sanders D., Brownlee C., Harper J. F. Communicating with calcium // *Plant Cell*.—1999.—11.—P. 691—706.
 39. Cheung W. Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation // *Science*.—1980.—207.—P. 19—27.
 40. Roux S. J., Slocum R. D. Role of calcium in mediating functions important for growth and development in plants // *Calcium and cell function*.—New York: Acad. press, 1982.—Vol. 3.—P. 409—453.
 41. Poovaiah B. W., Leopold A. C. Effects of inorganic solutes on the binding of auxin // *Plant Physiol.*—1976.—58.—P. 783—785.
 42. Hasenstein K. H., Evans M. L. Calcium dependence of rapid auxin action in maize roots // *Plant Physiol.*—1986.—81.—P. 439—443.
 43. Knight H., Brandt S., Knight M. R. A history of stress alters drought calcium signaling pathways in *Arabidopsis* // *Plant J.*—1998.—16.—P. 681—687.
 44. Zhang M., Tanaka T., Ikura M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin // *Nat. Struct. Biol.*—1995.—2.—P. 758—767.
 45. Zielinski R. E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1998.—49.—P. 697—725.
 46. Jang H. J., Pih K. T., Kang S. G., Lim J. H., Jin J. B., Piao H. L., Hwang I. Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress // *Plant Mol. Biol.*—1998.—37.—P. 839—847.
 47. Guerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1997.—37.—P. 839—847.
 48. Shi J., Kim K. N., Ritz O., Albrecht V., Gupta R., Harter K., Luan S., Kudla J. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis* // *Plant Cell*.—1999.—11.—P. 2393—2406.
 49. Liu J., Zhu J. K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance // *Science*.—1998.—280.—P. 1943—1945.
 50. Elliott D. C., Batchelor S. M., Cassar R. A., Marinos N. G. Calmodulin-binding drugs affect responses to cytokinin, auxin and gibberellic acid // *Plant Physiol.*—1983.—72.—P. 219—224.
 51. Kelly G. J. Calcium, calmodulin and the action of plant hormones // *Trends Biochem. Sci.*—1984.—9.—P. 4—5.
 52. Tanaka T., Ames J. B., Harvey T. S., Stryer L., Ikura M. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state // *Nature*.—1995.—376.—P. 444—447.
 53. Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins // *Trends Biochem. Sci.*—1996.—21.—P. 14—17.
 54. Sze H., Liang F., Hwang I., Curran A. C., Harper J. F. Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from

- expression in yeast // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—2000.—51.—P. 433—462.
55. Батов А. Ю., Маркова И. В., Машков А. В., Калинина А. Ю., Катриченко М. И., Медведев С. С. ИУК-чувствительные кальциевые каналы плазмалеммы клеток coleoptилей кукурузы // Тез. докл. IV Междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений».—М.: Изд-во Моск. гос. аграр. ун-та, 1997.—С. 74.
 56. Борисова Т. А. Особенности роста проростков кукурузы при ингибировании кальциевого обмена // Тез. докл. IV Междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений».—М.: Изд-во Моск. гос. аграр. ун-та, 1997.—С. 76.
 57. Noh B., Murphy A., Spalding E. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 2441—2454.
 58. Sanchez-Fernandez R., Davies T. G. E., Coleman J. O. D., Rea P. A. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory // *J. Biol. Chem.*—2001.—276.—P. 30231—30244.
 59. Davies T. G. E., Coleman J. O. D. The *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette proteins: an emerging superfamily // *Plant Cell Environ.*—2000.—23.—P. 431—433.
 60. Decottignies A., Grant A. M., Nichols J. W., de Wet H., McIntosh D. B., Goffeau A. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 12612—12622.
 61. Ambudkar S. V., Dey S., Hrycyna C. A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M. M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*—1999.—39.—P. 361—398.
 62. Higgins C. F. The ABC of channel regulation // *Cell.*—1995.—82.—P. 693—696.
 63. Ferte J., Kuhnel J. M., Chapius G., Rolland Y., Lewin G., Schwaller M. A. Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships // *J. Med. Chem.*—1999.—42.—P. 478—489.
 64. Johnstone R. W., Ruefli A. A., Smyth M. J. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein // *Trends Biochem. Sci.*—2000.—25.—P. 1—6.
 65. Theodoulou F. L. Plant ABC transporters // *Biochim. et Biophys. Acta.*—2000.—1465.—P. 79—103.
 66. Roepe P. D. What is the precise role of human MDR1 protein in chemotherapeutic drug resistance? // *Curr. Pharm. Design.*—2000.—6.—P. 241—260.
 67. Dudier R., Hertig C. Structure of an MDR-like gene from *Arabidopsis thaliana*: evolutionary implications // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 5882—5888.
 68. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein // *Eur. J. Biochem.*—1998.—251.—P. 252—261.
 69. Sidler M., Hassa P., Hasan S., Ringli C., Dudler R. Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 1623—1636.
 70. Wong L. M., Abel S., Shen N., de la Foata M., Mall Y., Theologis A. Differential activation of the primary auxin response genes, *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6*, during early development // *Plant J.*—1996.—9.—P. 587—599.
 71. Gil P., Green P. J. Regulatory activity exerted by the *SAUR-AC1* promoter region in transgenic plants // *Plant Mol. Biol.*—1997.—34.—P. 803—808.
 72. Zhao Y., Christensen S. K., Cohen J. D., Weigel D., Chory J. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis // *Science.*—2001.—291.—P. 306—309.
 73. Boerjan W., Cervera M. T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M., Inze D. *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction // *Plant Cell.*—1995.—7.—P. 1405—1419.
 74. Fei H., Sawhney V. K. Role of plant growth substances in MS33-controlled stamen filament growth in *Arabidopsis* // *Physiol. Plant.*—1999.—105.—P. 165—170.
 75. Lobello G., Fambrini R., Baraldi R., Lercari B., Pugliesi C. Hormonal influence on photocontrol of the protandry in the genus *Helianthus* // *J. Exp. Bot.*—2000.—51.—P. 1403—1412.
 76. Lincoln C., Britton J. H., Estelle M. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—1990.—2.—P. 1071—1080.
 77. Murphy A., Peer W. A., Tatz L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids // *Planta.*—2000.—211.—P. 315—324.
 78. Murphy A., Hoogner K., Peer W. A., Taiz L. Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—2001.—127.—P. 835—849.
 79. Faulkner I. J., Rubery P. H. Flavonoids and flavonoid sulfates as probes of auxin-transport regulation in *Cucurbita pepo* hypocotyl segments and vesicles // *Planta.*—1992.—186.—P. 618—625.
 80. Brown D. E., Rashotte A. M., Murphy A. S., Tague B. W., Peer W. A., Taiz L., Muday G. K. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.*—2001.—126.—P. 524—535.
 81. Peer W. A., Brown D., Taiz L., Muday G. K., Murphy A. S. Flavonoid accumulation patterns of *transparent testa* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.*—2001.—126.—P. 536—548.
 82. Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Gaspar T., Masson P. H. The *Arabidopsis thaliana* *AGRAVITROPIC 1* gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95.—P. 15112—15117.
 83. Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. Regulation of polar auxin transport by *ATPIN* in *Arabidopsis* vascular tissue // *Science.*—1998.—282.—P. 2226—2230.
 84. Muller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K. *ATPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 6903—6911.
 85. Lusching C., Gaxiola R. A., Grisafi P., Fink G. R. EIR1, a root specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana* // *Genes and Develop.*—1998.—12.—P. 2175—2187.
 86. Estelle M. Polar auxin transport: new support an old model // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 1775—1778.
 87. Roman C., Lubarsky G. B., Kieber J. J., Rothenberg M., Ecker J. R. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress-response pathway // *Genetics.*—1995.—139.—P. 1393—1409.
 88. Kiss J. Z., Wright J. B., Casper T. Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis* // *Physiol. Plant.*—1996.—97.—P. 237—244.

89. Dolan L. Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity // *Genes and Develop.*—1998.—12.—P. 2091—2095.
90. Lehman A., Black R., Ecker J. R. *HOOKLESS1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyls // *Cell.*—1996.—85.—P. 183—194.
91. Fujita H., Syono K. Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.*—1996.—37.—P. 1094—1101.
92. Celenza J. L., Grisafi P. L., Fink G. R. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana* // *Genes and Develop.*—1995.—9.—P. 2131—2142.
93. Boonsirichai K., Sedbrook J., Chen R., Gilroy S., Masson P. H. Altered response to gravity is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes // *Plant Cell.*—2003.—15.—P. 2612—2625.
94. Swarup R., Friml J., Marchant A., Liung K., Sandberg G., Palme K., Bennet M. Localization of the auxin permease *AUX1* suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex // *Genes and Develop.*—2001.—15.—P. 2648—2653.
95. Friml J., Wisniewska J., Benkova E., Mendgen K., Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator *PIN3* mediates tropism in *Arabidopsis* // *Nature.*—2002.—415.—P. 806—809.
96. Friml J., Palme K. Polar auxin transport: old questions and new concepts? // *Plant Mol. Biol.*—2002.—49.—P. 273—284.
97. Blancaflor E., Fasano J., Gilroy S. Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity // *Plant Physiol.*—1998.—116.—P. 213—222.
98. Masson P. H., Tasaka M., Morita M. T., Guan C., Chen R., Boonsirichai K. *Arabidopsis thaliana*: a model for the study of root and shoot gravitropism // *Arabidopsis book* / Eds E. M. Meyerowitz, C. R. Somerville, M. D. Rockville.—New York: Amer. Soc. Plant Biologist, 2002.—P. 199.
99. Yoder T. L., Zheng H., Todd P., Staehelin L. A. Amyloplast sedimentation dynamics in maize columella cells support a new model for the gravity-signal apparatus of roots // *Plant Physiol.*—2001.—125.—P. 1045—1060.
100. Sievers A., Busch M. B. An inhibitor of the Ca^{2+} -ATPases in the sarcoplasmic and endoplasmic reticula inhibits transduction of the gravity stimulus in cress roots // *Planta.*—1992.—188.—P. 619—622.
101. Sedbrook J. C., Chen R., Masson P. H. *ARG1* (Altered Response to Gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with cytoskeleton // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96.—P. 1140—1145.
102. Fasano J. M., Swanson S. J., Blancaflor E. B., Dowd P. E., Kao T., Gilroy S. Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 907—921.
103. Pieth C., Trewavas A. J. Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients // *Plant Physiol.*—2002.—129.—P. 786—796.
104. Zuber U., Buchberger A., Laufen T., Bukau B. DnaJ proteins. // *Molecular chaperones in the life cycle of proteins: structure, function and mode of action* / Eds A. L. Fink, Y. Goto.—New York: Marcel Dekker, 1998.—P. 241—273.
105. Artigues A., Iriarte A., Martinez-Carrion M. Binding to chaperones allows import of purified mitochondrial precursor into mitochondria // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 25047—25055.
106. Lemmon S. K. Clathrin uncoating: auxilin comes to life // *Curr. Biol.*—2001.—11.—P. R49—R52.
107. Tsai M. Y., Morfini G., Szebenyi G., Brady S. T. Release of kinesin from vesicles by hsc70 and regulation of fast axonal transport // *Mol. Biol. Cell.*—2000.—11.—P. 2161—2173.
108. Guan C., Rosen E. S., Boonsirichai K., Poff K. L., Masson P. H. The *ARG1-LIKE2* gene of *Arabidopsis* functions in a gravity signal transduction pathway that is genetically distinct from the PGM pathway // *Plant Physiol.*—2003.—133.—P. 100—112.
109. Baluska F., Hlavacka A., Samaj J., Palme K., Robertson G. D., Matoh T., McCurdy D. W., Menzel D., Volkman D. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells: insights from brefeldin A-induced compartments // *Plant Physiol.*—2002.—130.—P. 422—431.
110. Geldner N., Friml J., Stierhof Y. D., Jurgens G., Palme K. Auxin transport inhibitors block *PIN1* cycling and vesicle trafficking // *Nature.*—2001.—413.—P. 425—428.
111. Ottenschlager I., Wolff P., Wolverson C., Bhalerao R. P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M., Palme K. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2003.—100.—P. 2987—2991.
112. Garbers C., De Long A., Deruere J., Bernassoni P., Soll D. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affect auxin transport in *Arabidopsis* // *The EMBO J.*—1996.—15.—P. 2115—2124.
113. Zhou H. W., Cindy N., Chao Y., DeLong A. Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in *Arabidopsis* protein phosphatase 2A // *Plant Cell.*—2004.—16.—P. 709—722.
114. Deruere J., Jackson K., Garbers C., Soll D., DeLong A. The *RCN1*-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity *in vivo* // *Plant J.*—1999.—20.—P. 389—399.
115. Camilleri C., Azimzadeh J., Pastuglia M., Bellini C., Grandjean O., Bouchez D. The *Arabidopsis* *TONNEAU2* gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton // *Plant Cell.*—2002.—14.—P. 833—845.
116. Kwak J. M., Moon J. H., Murata Y., Kuchitsu K., Leonhardt N., DeLong A., Schroeder J. I. Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, *RCN1*, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2002.—14.—P. 2849—2861.
117. Larsen P. B., Cancel J. D. Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis* *eir1* mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A regulatory subunit, *RCN1* // *Plant J.*—2003.—34.—P. 709—718.
118. Surpin M., Zheng H., Morita M., Saito C., Avila E., Blakeslee J., Bandyopadhyay A., Kovaleva V., Carter D., Murphy A., Tasaka M., Raikhel N. The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways // *Plant Cell.*—2003.—15.—P. 2885—2899.
119. Von Mollard F., Stevens T. H. The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to vacuole // *Mol. Biol. Cell.*—1999.—10.—P. 1719—1732.
120. Abeliovich H., Darsow T., Emr S. D. Cytoplasm to vacuole trafficking of aminopeptidase I requires a t-SNARE-*Sec1p* complex composed of *Tlg2p* and *Vps45p* // *EMBO J.*—1999.—18.—P. 6005—6016.
121. Sanderfoot A. A., Assad F. F., Raikhel N. V. The *Arabidopsis*

- genome: an abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors // *Plant Physiol.*—2000.—124.—P. 1558—1569.
122. Sanderfoot A. A., Pilgrim M., Adam L., Raikhel N. V. Disruption of individual members of *Arabidopsis* syntaxin gene families indicates each has essential functions // *Plant Cell.*—2001.—12.—P. 659—666.
 123. Sanderfoot A. A., Kovaleva V., Bassham D. C., Raikhel N. V. Interaction between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the *Arabidopsis* cell // *Mol. Biol. Cell.*—2001.—12.—P. 3733—3743.
 124. Zheng H., Fischer von Mollard G., Kovaleva V., Stevens T. H., Raikhel N. V. The plant vesicle-associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment // *Mol. Biol. Cell.*—1999.—10.—P. 2251—2264.
 125. Bassham D. C., Sanderfoot A. A., Kovaleva V., Zheng H., Raikhel N. V. AtVPS45 complex formation at the trans-Golgi network // *Mol. Biol. Cell.*—2000.—11.—P. 2251—2265.
 126. Ahmed S. U., Rojo E., Kovaleva V., Venkataraman S., Dombrowski J. E., Matsuoka K., Raikhel N. V. The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana* // *J. Cell. Biol.*—2000.—149.—P. 1335—1344.
 127. Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene // *Plant Physiol.*—2002.—129.—P. 1181—1193.
 128. Morita M. T., Kato T., Nagafusa K., Saito C., Ueda T., Nakano A., Tasaka M. Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2002.—14.—P. 47—56.
 129. Kato T., Morita M. T., Fukaki H., Yoshiro Y., Uehara M., Nihama M., Tasaka M. SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2002.—14.—P. 33—46.
 130. Rojo E., Gillmor C. S., Kovaleva V., Somerville C. R., Raikhel N. V. YACUOLESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis* // *Develop. Cell.*—2001.—1.—P. 1—20.
 131. Sato T. K., Rehling P., Peterson M. R., Emr S. D. Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion // *Mol. Cell.*—2000.—6.—P. 661—671.
 132. Rojo E., Zouhar J., Kovaleva V., Hong S., Raikhel N. V. The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in *Arabidopsis* // *Mol. Biol. Cell.*—2003.—14.—P. 361—369.
 133. Gaedeke N., Klein M., Kolukisaoglu U., Foresteir C., Muller A., Anson M., Becker D., Mamnun Y., Kuchler K., Schulz B., Mueller-Roerber B., Martinoia E. The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement // *EMBO J.*—2001.—20.—P. 1875—1887.
 134. Davies R. T., Goetz D. H., Lasswell J., Anderson M. N., Bartel B. IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—1999.—11.—P. 365—376.
 135. Lasswell J., Rogg L. E., Nelson D. C., Rongey C., Bartel B. Cloning and characterization of IAR1, a gene required for auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2000.—12.—P. 2395—2408.
 136. Abel S., Theologis A. Early genes and auxin action // *Plant Physiol.*—1996.—111.—P. 9—17.
 137. Fujii N., Kamada M., Tamasaki S., Takahashi H. Differential accumulation of Aux/IAA mRNA during seedling development and response in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Plant Mol. Biol.*—2000.—42.—P. 731—740.
 138. Nagpal P., Walker L. M., Young J. C., Sonawala A., Timpte C., Estelle M., Reed J. W. AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family // *Plant Physiol.*—2000.—123.—P. 563—573.
 139. Hagen G., Guilfoyle T. J. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters, and regulatory factors // *Plant Mol. Biol.*—2002.—49.—P. 373—385.
 140. Dargeviciute A., Roux C., Decreux A., Sitbon F., Perrot-Rechenmann C. Molecular cloning and expression of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in *Nicotiana tabacum* // *Plant Cell Physiol.*—1998.—39.—P. 993—1002.
 141. Nebenfuhr A., White T. J., Lomax T. L. The diageotropica mutation alters auxin induction of a subset of the Aux/IAA gene family in tomato // *Plant Mol. Biol.*—2000.—44.—P. 73—84.
 142. Knauss S., Rohrmeier T., Lehke L. The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 23936—23943.
 143. Tian Q., Uhlir N. J., Reed J. W. *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression // *Plant Cell.*—2002.—14.—P. 301—319.
 144. Abel S., Nguyen M. D., Chow W., Theologis A. ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.*—1995.—270.—P. 19093—19099.
 145. Rouse D., Mackay P., Stirnberg P., Estelle M., Leyser O. Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene // *Science.*—1998.—279.—P. 1371—1373.
 146. Tian Q., Reed J. W. Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene // *Development.*—1999.—126.—P. 711—721.
 147. Timpte C., Wilson A., Estelle M. The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response // *Genetics.*—1994.—138.—P. 1239—1249.
 148. Leyser H. M. O., Pickett F. B., Dharmasiri S., Estelle M. Mutations in the AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter // *Plant J.*—1996.—10.—P. 403—413.
 149. Kim B. C., Soh M. S., Kang B. J., Furuya M., Nam H. G. Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2* // *Plant J.*—1996.—9.—P. 441—456.
 150. Reed J. W., Elumalai R. P., Chory J. Suppressors of an *Arabidopsis thaliana* *phyB* mutation identify genes that control light signalling and hypocotyl elongation // *Genetics.*—1998.—148.—P. 1295—1310.
 151. Bak S., Tax F. E., Feldmann K. A., Galbraith D. A., Feyereisen R. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branchpoint in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 101—111.
 152. Hull A. K., Vij R., Celenza J. L. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 2379—2384.
 153. Kotake T., Nakagawa N., Takeda K., Sakurai N. Auxin-in-

- duced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo- and endo- β -glucanases in Barley coleoptiles // *Plant and Cell Physiol.*—2000.—41.—P. 1272—1278.
154. Hooley R. Auxin signaling: homing in the targeted genetics // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 1581—1584.
155. Oono Y., Chen Q. G., Overvoorde P. J., Kouler C., Theologis H. age mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 1649—1662.
156. Ballas N., Wong L. M., Ke M., Theologis A. Two auxin-responsive domains interact positively to induce expression of the early indole-acetic acid-inducible gene *PS-IAA4/5* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 3483—3487.
157. Rogg L. E., Lasswell J., Bartel B. A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 465—480.
158. Poovaiah B. W., Wang W., Yang T. Novel calcium/calmodulin-modulated proteins. Chimeric protein kinase and small auxin up-regulated RNA // *Signal transduction in plant: current advances* / Ed. S. K. Sopory.—New York: Kluwer Acad. Plenum Publ., 2000.—P. 167—176.
159. McClure B. A., Guilfoyle T. J. Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs // *Plant Mol. Biol.*—1987.—9.—P. 611—623.
160. McClure B. A., Hagen G., Brown C. S., Gee M. A., Guilfoyle T. J. Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean // *Plant Cell.*—1989.—1.—P. 229—239.
161. McClure B. A., Guilfoyle T. J. Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism // *Science.*—1989.—243.—P. 91—93.
162. Li Y., Strabala T. J., Hagen G., Guilfoyle T. J. The *SAUR* open reading frame contains a *cis*-element responsible for cycloheximide-mediated mRNA accumulation // *Plant Mol. Biol.*—1994.—24.—P. 715—723.
163. Newman T. C., Ohme-Takagi M., Taylor C. B., Green P. J. DST sequences, highly conserved among plant *SAUR* genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco // *Plant Cell.*—1993.—5.—P. 701—714.
164. Yang T., Poovaiah B. W. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 3137—3143.
165. Hagen G., Martin G., Li Y., Guilfoyle T. J. Auxin-induced expression of the soybean *GH3* promoter in transgenic tobacco plants // *Plant Mol. Biol.*—1991.—17.—P. 567—579.
166. Цыганкова В. А., Галкина Л. А., Мусатенко Л. И., Сытник К. М. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Гены фотоморфогенеза и регуляция их экспрессии светом // *Биополимеры и клетка.*—2004.—20, № 6.—С. 451—471.
167. Hobbie L. J. Auxin: Molecular genetic approaches in *Arabidopsis* // *Plant Physiol. Biochem.*—1998.—36.—P. 91—102.
168. Ruegger M., Dewey E., Gray W. M., Hobbie L., Turner J., Estelle M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p // *Genes and Develop.*—1998.—12.—P. 198—207.
169. Lazarus C. M. Hormonal regulation of plant gene expression // *Developmental regulation of plant gene expression. Plant biotechnology series.*—New York: D. Grierson-Chapman and Hall, Inc., 1991.—Vol. 2.—P. 42—68.
170. Guilfoyle T., Hagen G., Ulmasov T., Murfett J. How does auxin turn on genes? // *Plant Physiol.*—1998.—118.—P. 341—347.
171. Tiwari S. B., Wang X., Hagen G., Guilfoyle T. J. AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 2809—2822.
172. Kepinski S., Leyser O. Auxin-induced SCF^{TIR1}-AUX/IAA interaction involves stable modification of the SCF^{TIR1} complex // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2004.—101.—P. 12381—12386.
173. Colon-Carmona A., Chen D. L., Yeh K. C., Abel S. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro* // *Plant Physiol.*—2000.—124.—P. 1728—1738.
174. Worley C. K., Zenser N., Ramos J., Rouse D., Leyser O., Theologis A., Callis J. Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling // *Plant J.*—2000.—21.—P. 553—562.
175. Ouellet F., Overvoorde P. J., Theologis A. *IAA17/AXR3*: biochemical insight into an auxin mutant phenotype // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 829—842.
176. Abel S., Oeller P. W., Theologis A. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 326—330.
177. Morgan K. E., Zarembinski T. I., Theologis A., Abel S. Biochemical characterization of recombinant polypeptides corresponding to the predicted beta alpha fold in Aux/IAA proteins // *FEBS Lett.*—1999.—454.—P. 283—287.
178. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. G. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements // *Science.*—1997.—276.—P. 1865—1868.
179. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. G. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // *Plant Cell.*—1997.—9.—P. 1963—1971.
180. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. J. Dimerization and DNA binding of auxin response factors // *Plant J.*—1999.—19.—P. 309—319.
181. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. G. Activation and repression of transcription by auxin response factors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96.—P. 5844—5849.
182. Luerksen H., Kirik V., Herrmann P., Misera S. *FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.*—1998.—15.—P. 755—764.
183. Kagaya Y., Ohmiya K., Hattori T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in plants // *Nucl. Acids Res.*—1999.—27.—P. 470—478.
184. Hardtke C. S., Berleth T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROUS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 1405—1411.
185. Harper R. M., Stowe-Evans E. L., Luesse D. R., Muto H., Tatamatsu K., Watahiki M. K., Yamamoto K., Liscum E. The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue // *Plant Cell.*—2000.—12.—P. 757—770.
186. Sessions A., Nemhauser J. L., McColl A., Roe J. L., Feldman K. A., Zambryski P. C. *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs // *Development.*—1997.—124.—P. 4481—4491.
187. Pfluger J., Zambryski P. The role of *SEUSS* in auxin response and floral organ patterning // *Development.*—2004.—131.—P. 4697—4707.
188. Bennett S. R. M., Alvarez J., Bossinger G., Smyth D. R.

- Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.*—1995.—8.—P. 505—520.
189. *Benjamins R., Quint A., Weijers D., Hooykaas P., Offringa R.* The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport // *Development.*—2001.—128.—P. 4057—4067.
190. *Nemhauser J. L., Feldman L. J., Zambryski P. C.* Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis gynoecium* morphogenesis // *Development.*—2000.—127.—P. 3877—3888.
191. *Dharmasiri S., Estelle M.* The role of regulated protein degradation in auxin response // *Plant Mol. Biol.*—2002.—49.—P. 401—409.
192. *Franks R. G., Wang C., Levin J. Z., Liu Z.* SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG // *Development.*—2002.—129.—P. 253—263.
193. *Ulmasov T., Liu Z. B., Hagen G., Guilfoyle T.* Composite structure of auxin response elements // *Plant Cell.*—1995.—7.—P. 1611—1623.
194. *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.
195. *Lam E., Benfey P. N., Gilman P. M., Rang 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.
196. *Krawczyk S., Thurow C., Niggeweg R., Galtz 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.
197. *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.
198. *Sassone-Corsi P., Borrelli E.* Transcriptional regulation by trans-acting factors // *Trends Genet.*—1986.—2.—P. 215—219.
199. *Fukazawa J., Sakai T., Ishida S., Yamaguchi K., Kamiya Y.* Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins // *Plant Cell.*—2000.—12.—P. 901—915.
200. *Klinedinst S., Pascurri P., Redman J., Desai M., Arias J.* A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems // *Plant Mol. Biol.*—2000.—42.—P. 679—688.
201. *Philippar K., Fuchs I., Luthen H., Hoth S., Bauer C. S., Haga K., Thiel G., Ljung K., Sandberg G., Bottger M., Becker D., Hedrich R.* Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96.—P. 12186—12191.
202. *Xie Q., Frugis G., Colgan D., Chua N. H.* *Arabidopsis NAC1* transduces auxin signal downstream of *TIR1* to promote lateral root development // *Genes and Develop.*—2000.—14.—P. 3024—3036.
203. *Mockaitis K., Howell S. H.* Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings // *Plant J.*—2000.—24.—P. 785—796.
204. *Lammer D., Mathias N., Laplaza J. M., Jiang W., Lui Y., Callis J., Goebel M., Estelle M.* Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein RUB1p affects function of the SCF^{Cd4} complex // *Genes and Develop.*—1998.—12.—P. 914—926.
205. *Абрамова Е. Б., Карнов В. Л.* Протеасома: разрушение во имя созидания // *Природа.*—2003.—7.—С. 1—15.
206. *Hochstresser M.* There's the Rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation // *Genes and Develop.*—1998.—12.—P. 901—907.
207. *Del Pozo J. C., Estelle M.* F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation // *Plant Mol. Biol.*—2000.—44.—P. 123—128.
208. *Gray W. M., del Pozo J. C., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W. L., Yang M., Ma H., Estelle M.* Identification of a SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana* // *Genes and Develop.*—1999.—13.—P. 1678—1691.
209. *Gray W. M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M.* Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of Aux/IAA proteins // *Nature.*—2001.—414.—P. 271—276.
210. *Zenser N., Ellsmore A., Leasure C., Callis J.* Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—20.—P. 11795—11800.
211. *Gray W. M., Estelle M.* Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response // *Trends Biochem. Sci.*—2000.—25.—P. 133—138.
212. *Liakopoulos D. G., Donenges K., Matuschewski K., Jentsch S.* A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 2208—2214.
213. *Peng Z., Serino G., Deng X. W.* Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2001.—13.—P. 2393—2407.
214. *Freilich S., Oron E., Kapp Y., Nevo-Caspi Y., Orgad S., Segal D., Chamovitz D. A.* The COP9 signalosome is essential regulator for development of *Drosophila melanogaster* // *Curr. Biol.*—1999.—9.—P. 1187—1190.
215. *Mundt K. E., Porte J., Murray J. H., Brikos C., Chistensen P. U., Caspari T., Haagan I. M., Millar J. B. A., Simanis V., Hofmann K., Carr A. M.* The COP9 signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase // *Curr. Biol.*—1999.—9.—P. 1427—1430.
216. *Seeger M., Kraft R., Ferrell K., Bech-Otschir D., Dumdey R., Schade R.* A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits // *FASEB J.*—1998.—12.—P. 469—478.
217. *Chamovitz D. A., Wei N., Osterlund M. T., von Arnim A. G., Staub J. M., Matsui M., Deng X. W.* The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch // *Cell.*—1996.—86.—P. 115—121.
218. *Mahalingam S. A. V., Patel M., Kieber-Emmons T., Koo G. D., Muschel R. J., Weiner D. B.* HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa Mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95.—P. 3419—3424.
219. *Wei N., Deng X. W.* Making sense of the COP9 signalosome, a conserved regulatory protein complex from *Arabidopsis* to human // *Trends Genet.*—1999.—15.—P. 98—103.
220. *Wei N., Deng X. W.* The role of pleiotropic *COP/DET/FUS* genes in light control of *Arabidopsis* seedling development // *Plant Physiol.*—1996.—112.—P. 871—878.
221. *Chory J.* Light modulation of vegetative development // *Plant Cell.*—1997.—9.—P. 1225—1234.
222. *Kwok S. F., Piekos B., Misera S., Deng X. W.* A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis COP/DET/FUS* genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness // *Plant Physiol.*—1996.—110.—P. 732—742.

223. Kwok S. F., Solano R., Tsuge T., Chamovitz D. A., Matsui M., Ecker J. R., Deng X. W. *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex and their abundance is differentially affected by the pleiotropic *cop/det/fus* mutations // *Plant Cell*.—1998.—10.—P. 1779—1790.
224. Karniol B., Malec P., Chamovitz D. A. *Arabidopsis FUSCA5* encodes a novel phosphoprotein that is a component of COP9 complex // *Plant Cell*.—1999.—11.—P. 839—848.
225. Serino G., Tsuge T., Kwok S. F., Matsui M., Wei W., Deng X. W. *Arabidopsis cop8* and *fus4* mutations define the same locus that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome // *Plant Cell*.—1999.—11.—P. 1967—1980.
226. Osterlund M. T., Hardike C. H., Deng X. W. Targeted destabilization of *HY5* during light-regulated *Arabidopsis* development // *Nature*.—2000.—405.—P. 462—466.
227. Schwechheimer C., Serino G., Callis J., Crosby W., Lyapina S., Deshaies R. J., Gray W. M., Estelle M., Deng X. W. Interaction of the COP9 signalosome with E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin-response // *Science*.—2001.—292.—P. 1379—1382.
228. Lyapina S., Cope G., Shevchenko A., Serino G., Tsuge T., Zhou C., Wolf D. A., Wei N., Deshaies R. J. Promotion of NEDD8-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome // *Science*.—2001.—292.—P. 1382—1385.
229. Samach A., Klenz J. E., Kohalmi S. E., Risseuw G. W. H., Grosby W. L. The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem // *Plant J*.—1999.—20.—P. 433—445.
230. Levin J. Z., Meyerowitz E. M. *UFO*: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development // *Plant Cell*.—1995.—7.—P. 529—548.
231. Goto N., Starke M., Kranz A. R. Effect of gibberellins on flower development of the *pin*-formed mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Arabidopsis Inf. Serv.*—1987.—23.—P. 66—71.

УДК 631.811.98

Надійшла до редакції 03.02.04