



УДК 577.21

Н. Н. Доманский, А. П. Галкин

## CIS-ЭЛЕМЕНТЫ И TRANS-ФАКТОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ У РАСТЕНИЙ

*Обзор современных литературных данных о механизмах регуляции транскрипции генов в растениях. Рассматривается структура наиболее исследованных промоторов, функционирующих в растениях: 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, промотора малой субъединицы рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы / оксигеназы, промоторов генов патапина. Обсуждаются новые сведения о структуре регуляторных белковых факторов и возможные механизмы их взаимодействий с промоторными регуляторными последовательностями.*

Современные исследования механизмов органоспецифической и регулируемой в процессе развития экспрессии генов в растительных клетках свидетельствуют о том, что регуляция на уровне транскрипции является важнейшим этапом в осуществлении контроля генной экспрессии. Во многих случаях этот этап является первым, а то и единственным, обуславливающим эффективность экспрессии определенного гена в данный период развития организма [1, 2].

Известно, что способность РНК-полимеразы инициировать транскрипцию зависит главным образом от свойств промотора и прилегающих к нему регуляторных последовательностей [3].

Функциональный анализ промоторов проводят, исследуя эффективность экспрессии химерных маркерных генов, активность которых в эукариотических клетках легко тестировать (обычно это бактериальные гены хлорамфениколацетилтрансферазы, неомицинфосфотрансферазы и др.), и сравнивая ее с транскрипционной активностью различных делеционных вариантов изучаемого промотора. Используя этот подход, удалось установить, что в большинстве случаев тканеспецифическая экспрессия генов в растениях контролируется отдельными участками последовательности ДНК, называемыми *cis*-действующими или *cis*-активными элементами. Это означает, что данные участки ДНК оказывают влияние только на последовательности, расположенные на той же молекуле ДНК, на которой находятся они сами, и не могут влиять на гомологичные последовательности, расположенные в других местах.

Информация, необходимая для функционирования промотора и *cis*-действующих элементов, заложена в последовательности ДНК и служит сигналом для инициации транскрипции или связывания различных белковых факторов. Эти белковые факторы узнают и связываются с последовательностями ДНК, расположенными рядом с промотором или перекрывающимися с ним и, таким образом, влияют на эффективность инициации транскрипции с данного промотора. А так как транскрипционные белковые факторы оказывают влияние на гены независимо от того, на какой молекуле ДНК они расположены, их называют *trans*-действующими или *trans*-активными факторами.

Промоторы структурных генов содержат практически все регуляторные элементы, необходимые и достаточные для осуществления правильной специфической экспрессии, причем каждый из них имеет уникальную структуру этих элементов. Установлено, что *cis*-действующие

элементы могут быть организованы в виде отдельных либо перекрывающихся модулей или блоков, ответственных за количественную и качественную (т. е. органоспецифическую или регулируемую в развитии) экспрессию гена [4, 5].

Организация промоторов в виде отдельных регуляторных модулей предполагает, что существует определенная комбинация взаимодействий *trans*-действующих белковых факторов и *cis*-действующих регуляторных элементов, которая и определяет уровень экспрессии данного гена на той или иной стадии развития растительной клетки или ткани [6]. При этом вопрос о том, каким образом клетка преобразует информацию, состоящую из линейно взаимодействующих с ДНК транскрипционных факторов, остается пока невыясненным.

Практически все изложенные данные об организации и механизмах регуляции транскрипции в эукариотических организмах были получены в экспериментах с клетками животных, а затем подтверждены и на растительных клетках. Однако после того, как в качестве маркера для определения эффективности функционирования промоторов в растительных клетках было предложено использовать бактериальный ген  $\beta$ -глюкуронидазы (ГУЗ), появилась возможность при помощи метода гистохимической локализации активности ГУЗ [7] анализировать экспрессию не только в различных растительных тканях, но и в отдельных клетках этих тканей, что в экспериментах с животными клетками пока невозможно. Естественно, что столь высокочувствительный метод определения эффективности функционирования промоторов был немедленно использован для исследования структуры и организации целого ряда регуляторных последовательностей растительных генов.

В настоящем обзоре рассматриваются данные о структуре и механизмах регуляции транскрипции некоторых наиболее изученных растительных генов, полученных, главным образом, с использованием метода гистохимической локализации активности ГУЗ.

**Организация *cis*-действующих элементов в 35S-промоторе вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК).** 35S-промотор ВМЦК является одним из наиболее изученных промоторов, контролирующих экспрессию в растительных клетках. Установлено, что он функционирует как сильный конститутивный промотор в большинстве органов трансгенных растений, причем направляемая им экспрессия не зависит от вирусных *trans*-действующих факторов [8, 9]. Последнее обстоятельство часто используется в биотехнологии растений при конструировании экспрессирующихся химерных генов.

С помощью метода делеционного анализа было выявлено, что в последовательности 35S-промотора существует несколько блоков или модулей, участвующих в регуляции эффективности экспрессии с данного промотора и, по-видимому, взаимодействующих с регуляторными белками.

В частности, в каллусных клетках табака и листовой ткани делеция промоторного участка ДНК от —943 до —343 п. о. не приводила к уменьшению экспрессии. (Положения оснований в промоторах нумеруются в обоих направлениях от точки инициации транскрипции, обозначаемой как +1. Позиции оснований, расположенных против хода транскрипции, обозначаются со знаком минус.) Однако делеция последовательности до —105 п. о. снижала транскрипционную активность до 1/3 контрольного уровня, а делеция ДНК до —46 п. о. уменьшала ее до 1/2 по сравнению с контролем [7]. Эти результаты свидетельствуют о том, что в 35S-промоторе между —343 и —105, а также между —105 и —46 п. о. располагаются блоки последовательностей (или модули), присутствие которых необходимо для активации транскрипции.

Для того чтобы выяснить более точные границы *cis*-действующих последовательностей в промоторе ВМЦК, были проведены эксперименты, в которых последовательность промотора делетировали с 3'- и 5'-концов, постепенно увеличивая размеры делеций. Было показано, что в случае удаления последовательности промотора от —208 до —46 п. о.

эффективность транскрипции падала до 1/2 от контрольного уровня. Однако при встраивании удаленной последовательности эффективность транскрипции снова восстанавливалась, причем независимо от ориентации вставки. Таким образом, установлено, что функционирование регуляторного участка ДНК в 35S-промоторе ВМЦК, расположенного в пределах от —46 до —343 п. о., не зависит от его ориентации и расстояния по отношению к точке инициации транскрипции, т. е. этот фрагмент ДНК имеет свойства энхансера [10—12].

Кроме того, было выявлено, что комбинация из нескольких *cis*-действующих элементов 35S-промотора способна вызывать экспрессию в тканях, в которых отдельные *cis*-действующие элементы из этой комбинации транскрипции не иницируют. Так, участок 35S-промотора от —90 до +8 п. о. не способен иницировать транскрипцию в листовой ткани. Аналогичная картина наблюдается и при встраивании фрагмента, содержащего последовательность от —343 до —208 п. о., перед минимальным 35S-промотором (от —46 до +8 п. о.). Однако, когда фрагмент от —343 до —208 п. о. встраивают перед последовательностью от —90 до +8 п. о., экспрессия в листовой ткани восстанавливается [12].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в активации транскрипции с 35S-промотора задействовано несколько *cis*-действующих элементов. Так, когда участок от —90 до +8 п. о. встраивают перед структурным геном хлорамфениколацетилтрансферазы (ХАТ), активность фермента обнаруживается только в клетках корня, но не в листовой ткани. Из этого следует, что отдельные участки 35S-промотора могут направлять экспрессию в строго определенных тканях.

Для выявления специфичности экспрессии промоторов в клетках различных растительных тканей в качестве маркерного гена удобно использовать бактериальный ген ГУЗ, что позволяет определить экспрессию различных генноинженерных конструкций с этим геном при помощи метода гистохимической локализации активности этого фермента [7].

Встраивая различные фрагменты 35S-промотора перед геном ГУЗ, удалось установить, что вирусный энхансер 35S-промотора в свою очередь состоит из двух доменов, обозначенных А (от —90 до +8) и В (от —343 до —90), каждый из которых способен направлять тканеспецифическую и регулируемую в развитии транскрипцию в трансгенных растениях. Домен А, в состав которого входит ТАТА-блок, может направлять транскрипцию главным образом в клетках корня и эмбриональных тканях, из которых образуются корни [13]. Наиболее сильная экспрессия в корне наблюдается в меристематической ткани. Однако небольшая активность фермента обнаруживается также в меристеме стебля (особенно в проростках) и в васкулярных тканях стебля и листьев. Тканеспецифичность транскрипции обеспечивается *cis*-действующим элементом, расположенным на участке от —63 до —83 п. о. Этот элемент, названный «activation sequence of the cauliflower mosaic virus 35S enhancer» или «*as-1*» (последовательность, активирующая 35S-энхансер вируса мозаики цветной капусты), содержит в своем составе тандемно расположенную повторяющуюся последовательность TGACG и связывается с ядерным белком, получившим название *ASF-1* (от «activation sequence factor» — фактор, активирующий последовательность). Мутации в тандемном повторе интактного промотора приводят к снижению экспрессии в корнях. В то же время встраивание *as-1* в последовательность промотора, обычно функционирующего только в фотосинтезирующих тканях, вызывает сильную экспрессию в корнях и усиление транскрипции в листовой ткани [14].

Регуляторный белок *ASF-1* способен также связываться с *cis*-действующими регуляторными элементами других промоторов, таких как *hex-1*, в промоторе гена гистона НЗ пшеницы [15], *nos-1*, в промоторе гена нопалинсинтазы *Ti*-плазмиды [16] и *osc* палиндромной последовательностью в промоторе гена октопинсинтазы *Ti*-плазмиды [17, 18].

Интересно, что уровень синтеза РНК, гибридизующейся с кДНК, кодирующей обладающий способностью связываться с теми же последовательностями, что и *ASF-1*, белок, в клетках корней в 5—10 раз выше, чем в листовой ткани. Таким образом, преимущественная экспрессия в корнях, контролируемая доменом А, очевидно, определяется более высокой концентрацией в корнях регуляторного фактора, взаимодействующего с *as-1* [15].

Следует также отметить, что домен А участвует в регуляции экспрессии и в других тканях, а ядерный фактор *ASF-1* обнаруживается не только в корнях.

Вторая регуляторная последовательность 35S-промотора, обозначенная как домен В, расположена на расстоянии от —90 до —343 п. о. от точки инициации транскрипции. В отличие от домена А, эта регуляторная последовательность направляет экспрессию главным образом в надземных частях растений. Особенно сильная экспрессия наблюдается в клетках васкулярной, эмбриональной и мезофильной тканей эмбриональных листьев и семядолей, а также в васкулярной ткани стебля. В корне экспрессия с домена В обнаруживается в основном в васкулярной ткани и в корневом чехлике [19].

В случае комбинации из двух доменов А и В экспрессия выявляется во всех тканях и на всех стадиях развития растения, что свидетельствует о комбинаторном взаимодействии доменов.

Так как домен В способен направлять транскрипцию в клетках многих растительных тканей, можно предположить, что его нуклеотидная последовательность содержит несколько *cis*-действующих элементов, т. е. состоит из отдельных модулей. Для выяснения структуры этих модулей домен В был разделен на пять субдоменов, обозначенных от В1 до В5.

Оказалось, что каждый из этих субдоменов по-разному направляет экспрессию в растительных клетках, причем четыре из пяти субдоменов при встраивании перед минимальным промотором способны направлять экспрессию по крайней мере в одном из типов растительных клеток.

В частности, было показано, что домен В2 направляет экспрессию только в одном типе клеток в составе флоэмных элементов стебля и листьев, а также в корневом чехлике и корневых волосках.

Субдомен В3 обнаружил различные свойства в разных независимых трансгенных растениях. В одних трансгенных растениях этот субдомен обеспечивал сильную экспрессию в ткани эндосперма у корневого полюса семян, слабую экспрессию в основании семядолей и в примордиях листьев, образующихся из меристемы. В других — экспрессия наблюдалась в семядолях эмбрионов и проростков, а также в корневом кортексе и в большинстве клеток взрослого стебля.

Субдомен В4 направлял экспрессию в клетках васкулярной паренхимы листьев и стебля, а субдомен В5 обеспечивал слабую экспрессию только в участках ниже стеблевого апекса и листовых почках, образующихся из стебля.

Что касается субдомена В1, то он не обнаружил способности направлять экспрессию при встраивании перед минимальным промотором ни в одном из типов растительных клеток [20].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в состав домена В входят по крайней мере четыре *cis*-действующих элемента или модуля. Однако, если суммировать характеристики экспрессии всех четырех индивидуальных модулей, то оказывается, что в сумме они не соответствуют экспрессии интактного домена В.

Существуют два возможных объяснения наблюдаемому несоответствию. Первое — при разделении последовательности домена В на отдельные модули происходит разрыв каких-то неидентифицированных пока *cis*-регуляторных последовательностей, необходимых для обеспечения специфических характеристик экспрессии; второе — специфичность экспрессии обеспечивается синергическим взаимодействием от-

дельных регуляторных модулей. Так как количество и структура *cis*-регуляторных последовательностей в 35S-промоторе полностью пока не выяснены, предположение о разрыве регуляторных последовательностей исключить нельзя. Однако анализ экспрессии, направляемой комбинацией из нескольких индивидуальных субдоменов В, встроенных перед доменом А, во многих случаях подтверждает синергическое взаимодействие отдельных регуляторных доменов, так как по крайней мере некоторые недостающие характеристики экспрессии могут быть при этом восстановлены.

Комбинаторные свойства субдоменов 35S-промотора ВМЦК. Данные, свидетельствующие в пользу комбинаторного и синергического взаимодействия субдоменов В, получены в экспериментах, в которых каждый из пяти субдоменов В по очереди, а также их комбинации встраивали перед химерным геном, содержащим домен А и ген ГУЗ. При этом наблюдаемая в каждом случае экспрессия отличалась по своей специфичности и эффективности от таковой, направляемой только доменом А или индивидуальными субдоменами В. В частности, ни один из субдоменов не мог направлять экспрессию гена ГУЗ в мезофильных клетках взрослых листьев, как это делает интактный домен В. Кроме того, генетическая конструкция, содержащая комбинацию из двух субдоменов В4 и В5, встроенных перед доменом А, направляла экспрессию химерного гена ГУЗ в семенах и проростках, тогда как ни один из этих субдоменов по отдельности не обеспечивал экспрессию в этих органах [20, 21].

Синергический эффект различных комбинаций субдоменов проявлялся только на определенных стадиях развития растения. Как уже отмечалось выше, субдомен В1 при встраивании перед минимальным промотором не способен направлять экспрессию в каких-либо тканях, однако при встраивании его перед доменом А направляемая этой комбинацией экспрессия гена ГУЗ обнаруживалась в семядолях семян и проростков табака. Комбинация субдомена В2 и домена А, не изменяя экспрессии в семенах и проростках (по сравнению с одним доменом А), обеспечивала значительное ее усиление во флоэмных элементах листьев, стеблей и корней взрослых растений.

Еще более сложная зависимость экспрессии от комбинации *cis*-регуляторных последовательностей обнаружена в клетках цветков табака. В этих клетках 35S-промотор не очень активен и направляет экспрессию главным образом в васкулярных тканях и трихомах лепестков, а также в клетках эпидермиса.

Для выяснения того, какие субдомены или их комбинации обеспечивают специфичность экспрессии 35S-промотора в исследуемых тканях, авторы анализировали экспрессию гена ГУЗ, направляемую различными комбинациями индивидуальных субдоменов В с минимальным промотором или с доменом А.

Оказалось, что во взрослых лепестках цветков табака специфичность экспрессии 35S-промотора обеспечивается аддитивным взаимодействием отдельных регуляторных модулей, тогда как в развивающихся бутонах при их взаимодействии наблюдается синергический эффект [21].

В то же время во взрослых лепестках цветков петунии, где 35S-промотор функционирует значительно эффективнее, чем в аналогичных клетках табака, наблюдается синергическое взаимодействие *cis*-регуляторных последовательностей 35S-промотора [13].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в зависимости от вида растения, стадии развития и типа ткани механизм воздействия *cis*-регуляторных последовательностей ДНК на эффективность экспрессии 35S-промотора может быть различным. А так как последовательность ДНК 35S-промотора во всех случаях была одинаковой, то подобные различия, по-видимому, связаны с тем, что в каждом случае в растительных клетках существует набор специфических *trans*-действующих белковых факторов, которые при взаимодейст-

вии с *cis*-действующими последовательностями и обеспечивают специфичность экспрессии в данной ткани.

**Комбинаторные свойства промоторов растений.** Большинство исследованных промоторов растений содержит в своем составе сразу несколько *cis*-регуляторных последовательностей, обуславливающих специфичность транскрипции, инициируемую данным промотором. Индивидуальные модули обеспечивают количественные или тканеспецифические характеристики экспрессии и необходимы для нормального функционирования промотора [3, 22].

В настоящее время достаточно подробно изучена структура регуляторных последовательностей всего нескольких растительных промоторов, среди которых промоторы генов белков, регулируемых светом, а также промоторы генов пататина.

Структура и регуляция промоторов генов *rbcS*. Свет играет важную роль в регуляции роста растений и их развитии, оказывая влияние на уровень экспрессии генов, регулируемых светом. Воспринятый фоторецептором сигнал передается по неидентифицированной пока цепочке и посредством специфических *trans*-действующих факторов воздействует на экспрессию соответствующих «светочувствительных» генов [23—25].

Среди генов белков, регулируемых светом, особенно интенсивно исследовались промоторы семейства генов малой субъединицы рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы (*rbcS*). Гены этого семейства активно экспрессируются в клетках листьев, причем мРНК гена *rbcS-3A* составляет около 40 % от суммарной мРНК генов *rbcS* [26].

Чувствительность транскрипции гена *rbcS-3A* к свету определяется наличием в составе промотора этого гена нескольких *cis*-регуляторных последовательностей, называемых светочувствительными элементами (*light-responsive elements, LRE*). Идентифицировано несколько *trans*-регуляторных белковых факторов, связывающихся с *LRE* [27]. При этом один из таких факторов, названный *GT-1*, связывался в промоторе гена *rbcS-3A* в шести местах [29, 30]. Подобные последовательности обнаружены и в промоторах других генов, регулируемых светом [31—33].

Анализируя экспрессии делеционных вариантов промотора гена *rbcS-3A*, удалось установить, что светочувствительные элементы находятся на расстоянии от —55 до —166 п. о. от точки начала транскрипции [34]. В этой последовательности обнаружены два регуляторных модуля, обозначенных как блок II (5'-GTGTGGTTAATATG-3') и блок III (5'-ATCATTTTCACT-3'). Блок II расположен на расстоянии от —152 до —138 п. о., а блок III — от —125 до —114 п. о. Делеция любого из них резко снижала эффективность транскрипции [34]. Однако, когда в делетированном до —166 п. о. промоторе *rbcS-3A* вместо одного из блоков встраивали две копии другого, уровень экспрессии был таким же, как и в исходном промоторе, причем в обоих случаях чувствительность к регуляции экспрессии светом сохранялась. Интересно, что уровень транскрипции при встраивании двух копий блока II был таким же, как в исходном промоторе, а при встраивании двух копий блока III — приблизительно в 20 раз меньше. 20-кратное различие наблюдалось и в экспериментах по конкурентному связыванию фрагментов ДНК, содержащих две копии блока II или блока III, с регуляторным белком *GT-1* в присутствии фрагмента исходного промотора [28]. Таким образом, блок III и *GT-1*, скорее всего, слабо влияют на уровень экспрессии, определяемой светочувствительными элементами.

Решающая роль блока II в регуляции экспрессии светом продемонстрирована в экспериментах, в которых его синтетический тетрамер встраивали перед доменом А 35S-промотора ВМЦК. В этом случае тетрамер блока II вызывал у гетерологичного 35S-промотора чувствительность к регуляции светом [35]. Однако, если тот же тетрамер встраивали перед минимальным 35S-промотором ВМЦК, то экспрессия не наруживалась.

В минимальном 35S-промоторе ВМЦК по сравнению с доменом А того же промотора отсутствует фрагмент от —46 до —90 п. о., который, как уже упоминалось выше, содержит *cis*-действующую регуляторную последовательность *as-1* и тандемный повтор, связывающийся с *trans*-действующим белковым фактором *ASF-1*. Исходя из этого логично предположить, что чувствительность к регуляции светом обусловливается взаимодействием *trans*-действующих факторов *GT-1* и *ASF-1* [36].

Эти исследования показывают, что связывание *GT-1* является необходимым, но недостаточным условием для определения чувствительности транскрипции к свету. Кроме того, они однозначно указывают на регуляторную роль участка блока II, связывающего фактор *GT-1*, в транскрипции, регулируемой светом.

Если фактор *GT-1* способен взаимодействовать с регуляторными *trans*-действующими факторами в химерных промоторах, то вполне вероятно, что он взаимодействует и с регуляторными факторами, взаимодействующими с промотором гена *rbcS-3A*. Эксперименты, проведенные с делеционными вариантами промотора *rbcS-3A*, у которых удалены фрагменты до —50 и до —135 п. о., подтверждают такую возможность. В частности, тетрамер блока II, встроенный перед обоими вариантами этого промотора, ни в том, ни в другом случае не направлял экспрессии соответствующего гена [36].

Отсутствие экспрессии в случае с промотором *rbcS-3A*, делетированным до —135 п. о., можно объяснить тем, что отрезок от тетрамера блока II до регуляторных элементов блока III превышает то максимальное расстояние, при котором еще возможна экспрессия [28]. Однако отсутствие экспрессии при встраивании тетрамера блока II перед промотором, делетированным до —50 п. о., позволяет предположить, что фактор *GT-1* действует совместно с другими белковыми факторами, участки связывания которых делетированы, так как находятся в пределах от —50 до —135 п. о. Как уже упоминалось, взаимодействие *GT-1* с блоком III, расположенным в пределах от —114 до —125 п. о., не является обязательным для регулируемой светом экспрессии с промотора *rbcS-3A*. Это обстоятельство дало авторам основание для предположения о том, что гипотетические белковые факторы взаимодействуют с *cis*-регуляторными последовательностями, перекрывающимися или фланкирующими блок III.

Для локализации таких регуляторных последовательностей в промоторе *rbcS-3A*, делетированный до —166 п. о., были внесены дополнительные сканирующие делеции, затрагивающие блок III и фланкирующие его области, и проанализирована экспрессия, направляемая этими делеционными вариантами. Кроме того, методом электрофореза анализировали подвижность фрагментов ДНК, содержащих эти последовательности и обработанных экстрактами из листьев растений.

В результате оказалось, что области, фланкирующие блок III, действительно необходимы для экспрессии, так как являются участками связывания ранее неизвестных *trans*-действующих белковых факторов. Белок, связывающийся с 5'-концом последовательности ДНК блока III, был обозначен, как *ZAF5*, а с 3'-концом — *ZAF3*. При этом подвижность при электрофорезе комплексов фрагментов ДНК с белками *ZAF5* и *ZAF3* из экстрактов листьев растений, выросших на свету, была ниже, чем в случае экстрактов растений, выросших в темноте.

Удалось также установить, что обнаруженный эффект связан с различной степенью фосфорилирования белковых факторов *ZAF5* и *ZAF3* в разных экстрактах. Причем предварительная обработка фосфатазой экстрактов листьев, выросших на свету, приводила к увеличению подвижности комплексов.

Фосфатазная обработка по-разному влияла на способность белковых факторов связываться с соответствующей регуляторной последовательностью. В случае фактора *ZAF5* подобная обработка не снижала его способности связываться с регуляторным фрагментом ДНК. В то же время по мере удаления фосфатных остатков белка *ZAF3* увеличи-

валась не только подвижность комплекса, но и уменьшалась возможность связывания *ZAF3* с соответствующим фрагментом ДНК [37].

Приведенные результаты свидетельствуют о необходимости фосфорилированных форм *ZAF5* и *ZAF3* для светорегулируемой экспрессии гена *rbсS-3A*. При этом механизмы их активации в ответ на воздействие света, по-видимому, различны.

Структура и регуляция промоторов генов пататина. Пататин — основной запасный белок клубней картофеля, обладающий высокими питательными свойствами, которые определяются его аминокислотным индексом, в большинстве случаев равняющимся 100 %. Пататин представляет собой семейство гликопротеинов, состоящих из приблизительно 40 % растворимого белка в клубнях картофеля. Молекулярная масса белков этого семейства, очищенных до гомогенности, находится в пределах 40 000. В обычных условиях пататин обнаруживается во всех культивируемых сортах картофеля только в клубнях и в небольших количествах — в корнях, однако его синтез можно индуцировать и в изолированных листьях или участках стебля картофеля, если их культивировать *in vitro* на среде с высокой концентрацией сахарозы [38, 39].

мРНК пататина в клубнях и в корнях приблизительно одинаковы по размеру и имеют высокую гомологию. Основное отличие между ними состоит в том, что мРНК пататина в клубнях (как и соответствующие гены) не имеет в 5'-нетранслируемой области вставки длиной 22 п. о. В связи с этим все гены и мРНК пататина такого типа относят к классу I, а все гены и мРНК пататина с подобной вставкой — к классу II [40].

В настоящее время из 20—40 генов, составляющих геном, описаны и секвенированы лишь 5—6, а подробно изучена регуляция только двух генов класса I. Один из них, обозначенный В33, активно экспрессируется в клубнях. Кроме того, его экспрессию можно индуцировать в листьях, увеличив концентрацию сахарозы в культивируемой среде до 7 % [38]. При исследовании этого гена было установлено, что клубнеспецифичность и индуцируемость экспрессии сахарозой определяются *cis*-регуляторными элементами промотора, расположенными в пределах фрагмента длиной около 1500 п. о. Анализ последовательности этого фрагмента выявил две структуры, которые могут быть вовлечены в регуляцию транскрипции изучаемого гена, — прямой повтор длиной 208 п. о. и АТ-богатую последовательность длиной 37 п. о., повторяющуюся 3 раза [38].

Учитывая расположение прямого повтора, 1500-парный фрагмент промотора В33 был разделен на четыре модуля, расположенных в пределах от —1512 до —951 п. о. (№ 4), от —930 до —736 п. о. (№ 3), от —736 до —339 п. о. (№ 2) и от —339 до +18 (№ 1). Модуль № 2 был в свою очередь разделен на участки от —736 до —509 п. о. и от —509 до —339 п. о. Для анализа модуля № 1 использовали метод ступенчатых делеций с 5'-конца этого фрагмента.

Модули №№ 2—4 встраивали в различных комбинациях перед модулем № 1 и исследовали их роль в определении тканеспецифичности, индуцибельности и эффективности экспрессии гена ГУЗ, направляемой промотором В33.

Оказалось, что модуль № 1 может направлять клубнеспецифическую экспрессию, хотя уровень ее был в 20 раз ниже, чем у исходного промотора. Делеции с 5'-конца этого модуля до —228 и до —195 п. о. также направляли клубнеспецифическую экспрессию, тогда как делеция до —103 п. о. вызывала прекращение экспрессии. Из этого следует, что регуляторные элементы, обеспечивающие клубнеспецифическую экспрессию промотора В33, расположены в пределах от —195 до —103 п. о. [41].

В состав этого участка входит одна из трех копий высококонсервативных повторяющихся 37-парных АТ-богатых последовательностей. Причем анализ рестрикционного фрагмента от —249 до —105 п. о. при

помощи метода замедления подвижности фрагмента в геле показал, что с ним связывается ядерный белковый фактор, присутствующий как в листовых, так и в клубневых экстрактах. Интересно, что анализируемые нуклеопротеидные комплексы в зависимости от экстракта имели несколько различную подвижность, что может служить аргументом в пользу предположения о том, что в листьях и в клубнях присутствуют различные белковые факторы.

Аналогичные белковые комплексы образовывались и с другими фрагментами, содержащими АТ-богатый повтор. При этом ни последовательность плазмиды *pUC18*, ни фрагмент 35S-промотора от +8 до -90 п. о. с этими факторами не связывались, из чего можно сделать вывод о том, что участком связывания белкового фактора или факторов является АТ-богатая консервативная последовательность в промоторе пататина [41].

Анализируя экспрессию различных делеционных вариантов промотора пататина, авторы обнаружили в его составе три различных позитивно действующих регуляторных элемента — *A*, *B* и *C*. Элемент *A* располагается в модуле № 1 на расстоянии от -228 до -195 п. о. Дупликация фрагмента ДНК, содержавшего этот элемент, приводила к 4—5-кратному увеличению экспрессии.

Элемент *B* входит в состав модуля № 2, так как при делеции последовательности этого модуля от -736 до -509 п. о. экспрессия падает до уровня, который обеспечивает элемент *A*. В то же время делеция всего домена № 2 из интактного промотора не приводила к изменению его экспрессии. Однако образовавшуюся конструкцию можно рассматривать и как встраивание модуля № 4 перед модулями №№ 1 и 3. В этом случае уровень направляемой ею экспрессии превышает таковой, который обеспечивают модули №№ 1 и 3, в 4 раза. Из этого следует, что модуль № 4 должен содержать третий позитивно действующий регуляторный элемент — *C*. Тем не менее, встраивание ни одного из этих элементов перед делетированным до -90 п. о. 35S-промотором ВМЦК не оказывало никакого влияния на его экспрессию [41].

В данной серии экспериментов авторы не смогли разделить действие клубнеспецифических и индуцируемых сахарозой регуляторных элементов, хотя ими установлено, что элементы, обеспечивающие индукцию сахарозой, располагаются в промоторе гена *V33* в области от -228 до -1 п. о.

Регуляторные элементы, обеспечивающие промотору пататина индуцируемость сахарозой, удалось локализовать в промоторе другого гена пататина — *PAT21* [41]. Промотор гена *PAT21* был клонирован как *HindIII-DraI*-фрагмент длиной около 3500 п. о. (от -3500 до +24), который затем укорачивали, используя участки узнавания различных рестриктаз и экзонуклеазу *ExoIII*.

Экспрессию гена *ГУЗ*, направляемую различными делеционными вариантами этого промотора, анализировали как в клетках трансгенных растений, так и в срезах их междоузлий, содержавших пазушные почки, которые культивировали *in vitro* на среде с концентрацией сахарозы 2 и 10 %.

Авторы установили, что промотор гена *PAT21*, делетированный до -119 п. о., не способен направлять экспрессию в срезах независимо от концентрации сахарозы в среде. Делеционный вариант до -369 п. о. при низкой концентрации сахара также обеспечивает только очень слабую экспрессию *ГУЗ*, но при ее увеличении эффективность экспрессии возрастала в 4 раза.

Промоторный фрагмент с делецией до -957 п. о. при низкой концентрации сахарозы обеспечивал уровень экспрессии приблизительно в два раза ниже, чем делеционный вариант до -674 п. о., однако при увеличении сахарозы в среде уровень направляемой им экспрессии был только немного ниже, чем у последнего.

Интересно, что при низком содержании сахара уровень экспрессии варианта с делецией до -2164 был даже ниже, чем в случае делеции

до —674 п. о., а уровень экспрессии исходного промотора ниже, чем в вариантах с делециями до —2164, —957 и —674 п. о. Аналогичная картина наблюдалась и на среде с увеличенным содержанием сахара.

Таким образом, оказалось, что *in vitro* минимально необходимый фрагмент промотора *PAT21*, который еще обеспечивает индуцируемость экспрессии сахарозой, должен содержать не менее 369 п. о., а более длинный фрагмент до —674, по-видимому, включает регуляторный элемент, стимулирующий экспрессию при любой концентрации сахарозы [43].

Похожая картина наблюдалась и при анализе экспрессии тех же вариантов промотора в различных тканях трансгенных растений. Делеционный вариант до —119 п. о. был практически так же неактивен, как и в экспериментах *in vitro*. Вариант с делецией до —369 п. о. обеспечивал относительно высокий уровень экспрессии *ГУЗ* в стебле и корнях, но в целом уровень направляемой им экспрессии в клубнях был значительно ниже, чем у более длинных вариантов промотора. Промотор с делецией до —2164 и исходный фрагмент обеспечивали очень высокий уровень экспрессии главным образом в клубнях, однако уровень направляемой ими экспрессии в стебле и листьях был ниже, чем в случае варианта с делецией до —367 п. о.

Для выяснения того, какие же фрагменты промотора *PAT21* содержат регуляторные элементы, обеспечивающие индукцию сахарозой и клубнеспецифичность, различные фрагменты пататинового промотора встраивали перед 35S-промотором ВМЦК, укороченным до —90 п. о.

При встраивании фрагмента от —40 до —409 п. о. экспрессия гена *ГУЗ* в клубнях увеличивалась в 80 раз по сравнению с экспрессией в листьях независимо от ориентации встроеного фрагмента. При этом абсолютный уровень экспрессии был выше в случае прямой ориентации, а таковой в клубнях был намного выше, чем экспрессия укороченного 35S-промотора.

Встраивание более длинного фрагмента (от —40 до 957 п. о.) приводило к 100-кратному увеличению активности *ГУЗ* в клубнях по сравнению с активностью в клетках листьев, однако в обратной ориентации фрагмента этот эффект был менее выражен. При встраивании более дальних фрагментов промотора пататина (от —270 до —957 и от —409 до —957 п. о.) перед укороченным 35S-промотором также наблюдалось увеличение активности *ГУЗ* в клубнях, но в этом случае разница по сравнению с активностью *ГУЗ* в листьях была значительно меньше [43].

Суммируя изложенное, можно предположить, что регуляторные последовательности, определяющие клубнеспецифичность экспрессии промотора гена пататина, локализованы в пределах от —40 до —369 п. о., что, в принципе, согласуется с результатами предыдущей работы. Эти элементы, похоже, обладают свойствами энхансеров, так как функционируют независимо от ориентации по отношению к кодирующему участку гена. Кроме того, судя по тому, что фрагмент от —270 до —957 п. о. также способен обеспечивать определенную специфичность экспрессии, регуляторные элементы, определяющие индуцируемость сахарозой, должны находиться и в этом фрагменте.

Всем этим требованиям удовлетворяют прямые повторы, обнаруженные в промоторах всех генов пататина класса 1 и располагающиеся в области от —154 до —224 и от —471 до —579 п. о. в промоторе *PAT21*. Вероятно, что в ближайшее время могут появиться и непосредственные доказательства в пользу этого предположения.

**Структура *trans*-действующих белковых факторов.** Современные представления о структуре *trans*-действующих регуляторных факторов в основном основаны на исследованиях, выполненных на клетках животных, амфибий, а также дрожжей, поскольку о структуре регуляторных факторов растений известно пока немного. Тем не менее полученные данные позволяют предположить, что в основе ДНК-белковых взаимодействий у растений лежат те же механизмы, которые обнаружены в клетках животных.

Согласно модели, предложенной Лэндшульцем и соавт. для регуляторного белка клеток печени крысы С/ЕВР, связывающегося в виде димера как с энхансерами, так и с ССААТ-блоками промоторов многих генов, участок взаимодействия между двумя мономерами содержит последовательность аминокислотных остатков, в которой через регулярные промежутки располагаются остатки лейцина, так называемая «лейциновая застежка-молния» (leucine zipper). Рядом с этим участком находятся кластеры основных аминокислот, обеспечивающие связывание с регуляторным фрагментом ДНК [43].

Обнаруженная структура («лейциновая застежка»+домен из основных аминокислот), обеспечивающая димеризацию регуляторного фактора и связывание с ДНК, оказалась очень консервативной и в настоящее время выявлена не только в составе многих транскрипционных факторов класса В-ZIP (basic-zipper, т. е. основной домен-«застежка»), но и в неядерных белках [44].

Исследования, осуществленные на делеционных вариантах белков и на синтетических пептидах, не только подтвердили предложенную модель, но и позволили создать модель узнавания белками класса В-ZIP регуляторных последовательностей ДНК, названную «сжатием ножницами» (scissors-grip) [45].

*Trans*-действующие факторы растений также интенсивно изучаются в последнее время. Эти факторы локализуются главным образом в ядре, где взаимодействуют с соответствующими *cis*-регуляторными последовательностями генов. Для характеристики специфичности взаимодействия регуляторных факторов обычно используют методы замедления подвижности фрагмента ДНК в геле и ДНКазных отпечатков с применением клеточных либо ядерных экстрактов.

На основании результатов таких экспериментов *in vitro* сделан вывод о том, что 5'-регуляторные последовательности растительных генов содержат участки связывания сразу для нескольких ядерных регуляторных факторов [27, 28, 46]. Более того, в некоторых случаях один и тот же регуляторный фактор может взаимодействовать с регуляторными последовательностями в нескольких промоторах.

Примером подобного регуляторного фактора может быть ядерный белок *ASF-1* [14], взаимодействующий с *as-1*-последовательностью 35S-промотора ВМЦК и с *cis*-регуляторными последовательностями *hex-1* в промоторе гена гистона H3 пшеницы [15], *nos-1* в промоторе нопа-линсинтазы [16] и *osc* в промоторе октопинсинтазы [17].

Этот регуляторный фактор был исследован очень подробно после того, как с помощью последовательности *hex-1* в качестве зонда удалось идентифицировать клон кДНК табака, кодирующий белок класса В-ZIP, названный *TGA1a* [15]. Специфичность связывания этого белка была такой же, как и у фактора *ASF-1*, что предполагает идентичность этих белков. В то же время оказалось, что в геноме присутствуют по крайней мере четыре гена семейства *TGA1a*. Один из них, обозначенный как *G13*, был выделен и детально проанализирован [47].

Показано, что белок, кодируемый геном *G13*, высокогомологичен по аминокислотной последовательности с *TGA1a*, причем степень гомологии особенно высока в области В-ZIP. Основной домен белка гена *G13* оказался идентичным таковому в *TGA1a*, что подтверждает данные о связывании этих белков *in vitro* с одинаковыми последовательностями ДНК. Участок «лейциновой застежки» также обнаружил высокую консервативность, в связи с чем можно предположить возможность образования гетеродимера этих белков *in vivo*. Интересно, что «лейциновая застежка» и основной домен кодируются в гене *G13* отдельными небольшими экзонами. Это согласуется с гипотезой Гилберта о том, что экзоны кодируют отдельные домены белков [48].

В промоторе гена *G13* был также обнаружен участок последовательности ДНК, связывающийся с факторами *TGA1a*, белком собственно гена *G13*, а также с *ASF-1*, из чего следует, что, возможно, как и в случае регуляторных факторов из других организмов [49], экспрессия

гена *G13* регулируется (по крайней мере частично) по типу авторегуляции [47].

Основной домен белков типа *TGA1a*, по-видимому, участвует не только в узнавании специфической последовательности ДНК. Есть также основания полагать, что этот домен содержит в своем составе пептид, определяющий транспорт факторов, родственных *TGA1a*, в ядро, так как при встраивании фрагмента ДНК, кодирующего основной домен *TGA1a*, перед геном ГУЗ активность фермента обнаруживалась главным образом в ядре [50].

В настоящее время в клетках растений обнаружено уже несколько белковых факторов класса В-ZIP, которые связываются с промоторными последовательностями растительных генов [15, 51—56]. Роль не-

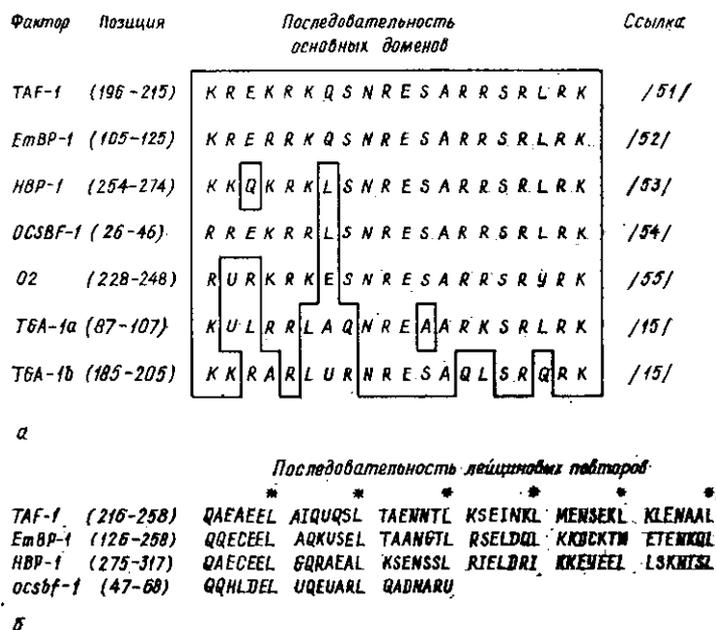


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей основных доменов (а) и лейциновых повторов (б) растительных белков класса bZip [51]. Консервативные аминокислоты взяты в рамку. Лейциновые остатки повторов отмечены звездочкой

которых из них в регуляции транскрипции пока еще не установлена, однако сравнение их аминокислотных последовательностей подтверждает высокую степень гомологии их основных доменов и «лейциновых застеек» (рис. 1).

**Модель комбинаторного взаимодействия *cis*-регуляторных элементов в промоторах генов растений.** Приведенные данные о механизмах регуляции транскрипции некоторых растительных генов, а также результаты исследований механизмов регуляции транскрипции других эукариотических генов свидетельствуют о том, что комбинация из нескольких *cis*-регуляторных элементов способна направлять экспрессию в клетках тех тканей, в которых индивидуальные элементы этой комбинации экспрессии не направляют.

Для объяснения этого факта исследователи из Рокфеллеровского университета Нью-Йорка Бенфи и Чуа предложили две модели возможного механизма регуляции транскрипции [22]. Эти модели в виде схемы представлены на рис. 2.

Первая из них (а) предполагает кооперативное взаимодействие между гетерологичными *trans*-действующими регуляторными факторами. Происходит это следующим образом. В том случае, когда концентрация одного из регуляторных факторов достаточно высока (I и II), он связывается с регуляторным участком ДНК и таким образом ак-

тивирует транскрипцию. Когда же концентрации обоих факторов слишком низки для активации транскрипции, происходит их взаимодействие между собой, в результате чего активируется транскрипция только тех генов, которые содержат в промоторах участки узнавания для обоих факторов (III).

Вторая модель (б) основывается на наличии в клетке еще одного белкового фактора-мишени, взаимодействующего более чем с одним регуляторным фактором. При этом с фактором-мишенью должно быть связано несколько регуляторных факторов, образующих комплекс, обеспечивающий взаимодействие с соответствующими *cis*-регуляторными последовательностями ДНК. В том случае, когда концентрация активного фактора достаточно высока, происходит активация транскрипции

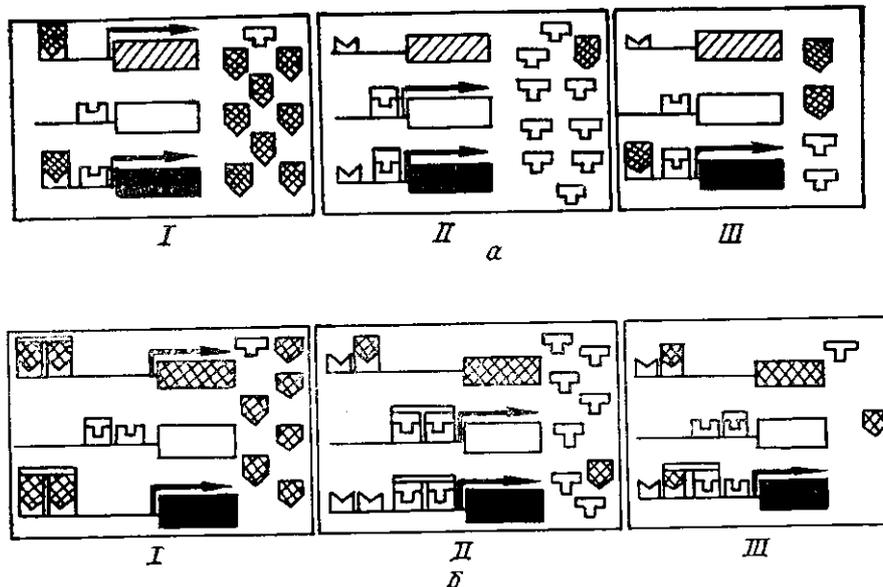


Рис. 2. Модели взаимодействий между *cis*-регуляторными элементами [22]: а — кооперативное взаимодействие между гетерологичными *trans*-действующими факторами; б — синергизм, опосредованный кооперативным взаимодействием с фактором-мишенью

(I и II). Однако, если концентрации активных факторов недостаточно высоки для заполнения всех мест связывания фактора-мишени, экспрессии тех генов, промоторы которых содержат *cis*-регуляторные элементы только одного типа, не происходит (III, два верхних промотора). Все же те промоторы, которые содержат комбинацию различных *cis*-регуляторных элементов, способны в этих условиях направлять транскрипцию, поскольку с фактором-мишенью взаимодействуют оба регуляторных фактора (III, нижний промотор).

Конечно, ни одна из моделей не может объяснить всего многообразия механизмов регуляции транскрипции эукариотических генов. Тем не менее эти модели удовлетворительно поясняют экспрессию многих уже известных промоторных последовательностей, поддаются экспериментальной проверке и дают возможность вносить те или иные коррективы.

**Заключение.** Исследование регуляторных механизмов, контролирующих транскрипцию растительных генов, исключительно важно не только для понимания процессов, происходящих в растениях, но и для биотехнологических целей, особенно в тех случаях, когда необходимо экспрессировать какой-либо ген в строго определенном типе клеток и на определенной стадии развития. К сожалению, пока неизвестно, можно ли предсказать экспрессию гена на основании знания нуклеотидной последовательности его промотора. Тем не менее некоторые необходимые параметры, обуславливающие эффективность и специфичность

транскрипции с данного промотора, уже определены: это а) количество и вид *cis*-регуляторных последовательностей; б) их сродство к *trans*-действующим факторам и в) концентрация регуляторных факторов в клетке. Для понимания того, как клетка использует информацию, содержащуюся в нуклеиново-белковом взаимодействии, для регуляции экспрессии генов необходимы дальнейшие исследования структуры и экспрессии промоторов, содержащих различные комбинации *cis*-регуляторных элементов, как природных, так и сконструированных.

Однако, несмотря на информативность такого метода на данном этапе исследований, в дальнейшем искусственное разделение промоторных последовательностей на изолированные фрагменты и анализ эффективности их функционирования, скорее всего, отойдут на второй план, поскольку с помощью такого подхода невозможно выяснить роль отдельных нуклеотидных остатков в белково-нуклеиновых взаимодействиях. Следующим этапом исследования промоторных последовательностей, по-видимому, будет внесение точечных мутаций в структуру промотора методом сайт-направленного мутагенеза, что позволит перейти к установлению точного соответствия между отдельным нуклеотидным остатком и его значением в регуляции активности гена.

Вполне вероятно, что для изучения механизмов регуляции транскрипции можно будет использовать и обратный подход — внесение точечных мутаций в ген регуляторного белка с последующим исследованием взаимодействия мутантного регуляторного фактора с интактным или же мутантным промотором. Такой способ мог бы выявить роль отдельных аминокислотных остатков в пространственной организации *trans*-факторов и их функциональном поведении. Кроме того, он открывает путь для биомемитической технологии, которая занимается конструированием белков, предназначенных для выполнения определенных функций. Это значит, что в будущем будет возможно направленно конструировать *trans*-факторы, обеспечивающие определенную специфичность регуляции транскрипции генов.

Резюме. Огляд сучасних літературних даних про механізми регуляції транскрипції в рослинах. Аналізується структура найбільш вивчених промоторів, що функціонують у рослинах: 35S-промотора вірусу мозаїки цвітної капусти, промотора малої субодиниці рибулозо-1,5-діфосфаткарбоксилази/оксигенази, промоторів генів лататину. Обговорюються нові відомості про структуру регуляторних білкових факторів та можливі механізми їх взаємодії з промоторними послідовностями.

Summary. This review describes some of the recent progress in the understanding of transcriptional regulatory mechanisms in plants. The structure of best studied promoters directing transcription in plants such as 35S-promoter of cauliflower mosaic virus, promoter of the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene and patatin promoters is considered. The modern data about the structure of regulatory protein factors and possible mechanisms of their interaction with promoter sequences are discussed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhlmeier C., Green P., Chun N.-H. Regulation of gene expression in higher plants // Ann. Rev. Plant Physiol.— 1987.— 38.— P. 221—257.
2. Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W. et al. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus* // Science.— 1990.— 250, N 4983 — P. 931—936.
3. Walden R., Schell J. Techniques in plant molecular biology—progress and problems // Eur. J. Biochem.— 1990.— 192, N 2.— P. 563—576.
4. Dynan W. S. Modularity in promoters and enhancers // Cell.— 1989.— 58, N 1.— P. 1—4.
5. Mitchell P. J., Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific binding proteins // Science.— 1989.— 245, N 4917.— P. 371—378.

6. Yamamoto K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks // *Ann. Rev. Genet.*—1985.—19.—P. 209—252.
7. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bavan M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO J.*—1987.—6, N 13.—P. 3991—3907.
8. Odell J. T., Nagy F., Chua N.-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Nature.*—1985.—313, N 6005.—P. 810—812.
9. Jensen J. S., Marcker K. A., Otten L., Schell J. Nodule-specific expression of a chimeric soybean // *Ibid.*—1986.—321, N 6071.—P. 669—674.
10. Kay R., Chan A., Daly M., MacPherson J. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes // *Science.*—1987.—236, N 4806.—P. 1299—1302.
11. Nagy F., Boutry M., Hsu M.-Y. et al. The 5'-proximal region of the wheat Cab-1 gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response // *EMBO J.*—1987.—6, N 9.—P. 2537—2542.
12. Fang R.-X., Nagy F., Sivasubramaniam S., Chua N.-H. Multiple *cis* regulatory elements for maximal expression of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants // *Plant Cell.*—1989.—1, N 1.—P. 141—150.
13. Benfey P. N., Chua N.-H. Regulated genes in transgenic plants // *Science.*—1989.—244, N 4901.—P. 174—181.
14. Lam E., Benfey P. N., Gilmartin P. M. et al. Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plant // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 20.—P. 7890—7894.
15. Katagiri F., Lam E., Chua N.-H. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB // *Nature.*—1989.—340, N 6236.—P. 727—730.
16. Lam E., Katagiri F., Chua N.-H. Plant nuclear factor ASF-1 binds to an essential region of the nopaline synthase promoter // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—N 17.—P. 9909—9913.
17. Fromm H., Katagiri F., Chua N.-H. An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts // *Plant Cell.*—1989.—1, N 8.—P. 977—984.
18. Bouchez D., Tokushiba J. G., Llewellyn D. J. et al. The *osc*-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes // *EMBO J.*—1989.—8, N 13.—P. 4197—4204.
19. Benfey P. N., Ren L., Chua N.-H. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns // *Ibid.*—N 8.—P. 2195—2202.
20. Benfey P. N., Ren L., Chua N.-H. Tissue-specific expression from CaMV enhancer subdomains in early stages of plant development // *Ibid.*—1990.—9, N 6.—P. 1677—1684.
21. Benfey P. N., Ren L., Chua N.-H. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains // *Ibid.*—P. 1685—1696.
22. Benfey P. N., Chua N.-H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants // *Science.*—1990.—250, N 4983.—P. 959—966.
23. Kuhlmeier C., Strittmatter G., Ward K., Chua N.-H. The pea *rbcS-3A* promoter mediates light responsiveness but not organ specificity // *Plant Cell.*—1989.—1, N 4.—P. 471—478.
24. Jenkins G. Photoregulation of gene expression in plants // *Photochem. and Photobiol.*—1988.—48, N 8.—P. 821—832.
25. Nagy F., Kay S. A., Chua N.-H. Gene regulation by phytochrome // *Trends Genet.*—1988.—4, N 1.—P. 37—42.
26. Flur R., Moses P., Morelli G. et al. Expression dynamics of the *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts // *EMBO J.*—1986.—5, N 9.—P. 2063—2071.
27. Gilmartin P. M., Chua N.-H. Localization of phytochrome responsive element within the upstream region of pea *rbcS-3A* // *Mol. and Cell. Biol.*—1990.—10, N 11.—P. 5565—5568.
28. Gilmartin P. M., Chua N.-H. Spacing between *GT-1* binding sites within a light-responsive element is critical for transcriptional activity // *Plant Cell.*—1990.—2, N 5.—P. 447—455.
29. Green P. J., Kay S. A., Chua N.-H. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS3-3A* gene // *EMBO J.*—1987.—6, N 9.—P. 2543—2549.
30. Green P. J., Yong M.-H., Cuozzo M. et al. Binding site requirements for pea nuclear protein factor *GT-1* correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS3-3A* gene // *Ibid.*—1988.—7, N 13.—P. 4035—4044.
31. Stockhaus J., Eckes P., Rocha-Sosa M. et al. Analysis of *cis*-acting sequences involved in the leaf-specific expression of a potato gene in transgenic plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 22.—P. 7943—7947.
32. Dean C., Pichersky E., Dunsmuir P. Structure, evolution and regulation of *rbcS* genes in higher plants // *Ann. Rev. Plant Physiol.*—1989.—40.—P. 415—439.
33. Lawton M. A., Dean S. M., Dron M. et al. Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to *GT-1* // *Plant and Mol. Biol.*—1991.—16, N 2.—P. 235—249.
34. Kuhlmeier C., Cuozzo M., Green P. et al. Localization and conditional redundancy of regulatory elements in *rbcS3-3A*, a pea gene encoding the small subunit of ribu-

- lose-biphosphate carboxylase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 13.— P. 4662—4666.
35. Davis M. C., Yong M.-H., Gilmartin P. M. et al. Minimal sequence requirements for the regulated expression of *rbcS3-3A* from *Pisum sativum* in transgenic tobacco plants // Photochem. and Photobiol.—1990.—52, N 1.— P. 43—50.
  36. Sarokin L. P., Chua N.-H. Binding sites for two novel phosphoproteins, *3AF5* and *3AF3*, are required for *rbcS3-3A* expression // Ibid.—1992.—4, N 4.— P. 473—483.
  37. Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer W. et al. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene // EMBO J.—1989.—8, N 1.— P. 23—29.
  38. Wenzler H. C., Mignery G. A., Fisher L. M., Park W. D. Analysis of a chimeric class-I patatin-GUS gene in transgenic potato plants: High-level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stem explants // Plant and Mol. Biol.—1989.—12, N 1.— P. 41—50.
  39. Mignery C. A., Pikaard C. S., Park W. D. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato // Gene.—1988.—62, N 1.— P. 27—44.
  40. Liu X. J., Prat S., Willmitzer L., Frommer W. B. Cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expression of a chimeric class I patatin promoter / GUS-gene fusion // Mol. and Gen. Genet.—1990.—223, N 3.— P. 401—406.
  41. Bevan M. W., Barker R., Goldsbrough A. et al. The structure and transcription start site of a major potato tuber protein gene // Nucl. Acids Res.—1986.—14, N 11.— P. 4625—4638.
  42. Jefferson R., Goldsbrough A., Bevan M. Transcriptional regulation of a patatin-I gene in potato // Plant and Mol. Biol.—1990.—14, N 6.— P. 995—1006.
  43. Landschutz W. H., Johnson P. F., McKnight S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins // Science.—1988.—240, N 4860.— P. 1759—1764.
  44. Busch S. J., Sasone-Corsi P. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains // Trends Genet.—1990.—6, N 2.— P. 36—40.
  45. Vinson C. R., Sigler P. B., McKnight S. L. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins // Science.—1989.—246, N 4932.— P. 911—916.
  46. Schnindler U., Cashmore A. R. Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins // EMBO J.—1990.—9, N 11.— P. 3415—3427.
  47. Fromm H., Katagiri F., Chua N.-H. The tobacco transcription activator *TGA1a* binds to a sequence in the 5'upstream region of a gene encoding a *TGA1a*-related protein // Mol. and Gen. Genet.—1991.—229, N 1.— P. 181—188.
  48. Gilbert W. Why genes in pieces? // Nature.—1978.—271.— P. 501—503.
  49. Serfling E. Autoregulation — a common property of eukaryotic transcription factors? // Trends Genet.—1989.—5, N 2.— P. 131—133.
  50. Van der Krol A. R., Chua N.-H. The basic domain of plant B-ZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei // Plant Cell.—1991.—3, N 7.— P. 667—675.
  51. Oeda K., Salinas J., Chua N. H. A tobacco bZip transcription activator (*TAF-1*) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes // EMBO J.—1991.—10, N 7.— P. 1793—1802.
  52. Guiltinan M. J., Marcotte W. R., Jr, Quatrano R. S. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element // Science.—1990.—250, N 4978.— P. 267—271.
  53. Tabata T., Takase H., Takayama S. et al. A protein that binds to cis-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif // Ibid.—1989.—245, N 4921.— P. 965—967.
  54. Singh K., Dennis E. S., Ellis J. G. et al. OCSBF-1, a maize Ocs enhancer binding factor: isolation and expression during development // Plant Cell.—1990.—2, N 9.— P. 891—903.
  55. Hastings H., Maddaloni M., Lazzaroni N. et al. The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators // EMBO J.—1989.—8, N 10.— P. 2795—2801.
  56. Schmidt R. J., Burr F. A., Aukerman M. J., Burr B. Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a «leucine-zipper» motif that binds to zein DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87, N 1.— P. 46—50.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии  
АН Украины, Киев

Получено 27.01.93