



КАУЛИМОВИРУСЫ И ИХ ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ПРОМОТОРЫ

Кулуев Б.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук,
г. Уфа. Kuluev@bk.ru

Резюме

Рассмотрены классификация, распространение, строение и воспроизведение генома, а также способы распространения каулимовирусов. Данная группа растительных ДНК-содержащих вирусов представляет большой интерес, благодаря наличию в их геноме сильного конститутивного промотора, который находит широкое применение в растительной биотехнологии для повышения уровня экспрессии целевых генов. Поэтому большое внимание уделено описанию полногеномных и субгеномных промоторов каулимовирусов. Наибольшую известность получил 35S промотор вируса мозаики цветной капусты. Активно ведутся исследования промоторов и других каулимовирусов. В рамках наших исследований были выделены и исследованы промоторы вируса мозаики георгина и вируса кольцевой гравировки гвоздики, а также созданы их гибридные формы.

Ключевые слова: параретровирусы, каулимовирусы, вирус мозаики цветной капусты, вирус мозаики георгина, 35S промотор.

Классификация растительных параретровирусов

Каулимовирусы – это растительные вирусы, инфицирующие высшие растения и относящиеся к группе растительных параретровирусов, родственные ретровирусам. К супергруппе параретровирусов относят две большие группы вирусов, одни поражают представителей высших растений и относятся к семейству *Caulimoviridae*, другие поражают представителей позвоночных и относятся к семейству *Hepadnaviridae* (Haas et al., 2002).

Параретровирусы в отличие от ретровирусов в качестве генома содержат ДНК, а не РНК, к тому же ДНК ретровирусов часто интегрирована с ДНК хозяина, а ДНК параретровирусов чаще всего ведет себя как свободная хромосома. Объединяет их то, что геном и тех и других проходит через стадию обратной транскрипции. Но у параретровирусов из прегеномной РНК образуется геномная ДНК, а у ретровирусов при этом из геномной РНК образуется прегеномная ДНК, которая интегрируется с геномом хозяина. Но все же ряд функциональных и структурных особенностей показывает, что параретровирусы и ретровирусы филогенетически связаны (Hull, 1992). Все известные ныне растительные параретровирусы относятся к семейству *Caulimoviridae*. Семейство *Caulimoviridae* делят на две большие группы - каулимовирусы и

баднавирусы, которые возводят в ранг родов *Caulimovirus* и *Badnavirus* (de Kochko et al., 1998; Lochart, 1990).

Наиболее типичным и изученным представителем каулимовирусов является вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК) (Odell et al., 1985; de Kochko et al., 1998), давший название всему роду. Все каулимовирусы, описанные к настоящему времени, инфицируют только двудольные растения, передаются различными видами тлей, имеют изометричное строение вириона, размером приблизительно 50 нм, с константами седиментации около 200S, содержат кольцевые молекулы ДНК с размерами от 7700 до 8300 пар нуклеотидов (Hohn et al., 1985; de Kochko et al., 1998; Haas et al., 2002).

Кроме вируса мозаики цветной капусты, к каулимовирусам относят вирус кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ) (Hauber, 2001); Hull et al., 1986; Mahmoudpour, 2003), вирус мозаики норичника (ВМН) (Maiti et al., 1997; Richins et al., 1987; Sanger et al., 1990), вирус мозаики ночной красавицы (ВМНК) (Dey, Maiti, 1999), вирус, окаймляющий жилки земляники (ВОЖЗ) (Franova-Honetslegrova et al., 1999; Mraz et al., 1996; Mraz et al., 1997; Petrzik et al., 1998a; Petrzik et al., 1998b; Thompson et al., 2003), вирус мозаики георгина (ВМГ) (Богунов, 2006; Черкасский, 1965; Nicolaisen, 2003), вирус бледной

пятнистости сои (Hasegawa et al., 1989), вирус бледной полосатости арахиса (Reddy et al., 1993), вирус мозаики маниока (de Kochko et al., 1998; Verdaguer et al., 1996), вирус желтых листовых завивок цеструма (Stavolone et al., 2003), вирус красных кольцевых пятен черешни (Glasheen et al., 2002), скрытый вирус хрена (Richins, Shepherd, 1986), вирус пятнистости бодяка (Donson, Hull, 1983) и другие.

Представители рода *Badnavirus* могут инфицировать как однодольные, так и двудольные растения, их частицы имеют палочковидную форму, они могут передаваться различными видами насекомых (Hull et al., 1996). К баднавирусам относятся палочковидный вирус риса (Hay et al., 1991; Kano et al., 1992; Qu et al., 1991), палочковидный вирус сахарного тростника (Bouhida et al., 1993), вирус, увеличивающий почки какао (Hagen et al., 1993), вирус желтой пятнистости коммелины (Medberry et al., 1990; de Kochko et al., 1998) и некоторые другие.

Также описаны растительные параретровирусы, принадлежность которых к тому или иному роду не определена. Это, например, вирус, обесцвечивающий жилки петунии (Richert-Poggeler et al., 2003), вирус мозаики водосбора (Fauquet, Mayo, 1999), вирус подорожника 4 (Chiang et al., 2003, Hitchborn et al., 1966), вирус пятнистости осота (Fauquet, Mayo, 1999), вирус, обесцвечивающий жилки табака (Lockhart et al., 2000) и другие.

Вирус мозаики маниока также трудно классифицировать, хотя он по многим фенотипическим признакам близок к роду *Caulimovirus*, но по строению генома и расположению открытых рамок считывания он занимает промежуточное положение между каулимовирусами и баднавирусами (de Kochko et al., 1998).

Растения-хозяева, симптоматика вирусных заболеваний, распространение каулимовирусов

Вирус мозаики цветной капусты (рис. 1а) поражает растения семейства *Brassicaceae* (крестоцветные), рода *Brassicae* (капуста) и *Arabidopsis thaliana* (резуховидка Таля) (Haas et al., 2002). Некоторые штаммы ВМЦК, такие как D4 и W266 способны также инфицировать растения семейства *Solanaceae*, родов *Datura* (дурман) и *Nicotiana* (табак) (Haas et al., 2002). Вирион ВМЦК, как и других каулимовирусов имеет икосаэдрическую симметрию (рис. 1г). Разные изоляты ВМЦК вызывают различные симптомы, такие как хлороз (некроз фотосинтетической ткани), мозаичные просветления листьев и жилок, остановку роста. Симптомы заболевания растений могут отличаться в

зависимости от штамма вируса, экотипа растения-хозяина и от состояния окружающей среды (Chenault, Melcher, 1993). ВМЦК распространен по всему миру, где выращивается цветная капуста (Haas et al., 2002).

Вирус кольцевой гравировки гвоздики (рис. 1б) также вероятно распространен по всему миру. Этот вирус вызывает заболевание, характеризующееся некротическими пятнами на листьях гвоздики *Dianthus caryophyllus* (Hegedus et al., 2001). Чаще всего данное заболевание проявляется хлорозом листьев, некротическими крапинками и кольцами, полосками и пятнами на стеблях. Развитие симптомов зависит от температуры среды, например при +21°C наблюдаются четко выраженные симптомы, но при +26°C инфекция становится менее заметной. Симптомы наиболее заметны на *Dianthus caryophyllus* в марте – июне на ранних стадиях роста в теплицах. Кроме гвоздики этот вирус может инфицировать и других представителей этого же семейства *Caryophyllaceae*, например *Silene armeria* (смолевка армериевидная) и *Saponaria vaccaria* (мыльнянка) (Hegedus et al., 2001; Hull et al., 1986; Mahmoudpour, 2003; Raikhy, 2003).

Вирус мозаики норичника пока идентифицирован только в США, где обнаружено два штамма этого вируса: M3 и DxS, которые инфицируют растение *Scrophularia californica* (норичник калифорнийский), вызывая некротические пятна на листьях в виде мозаики (Maiti et al., 1997; Richins et al., 1987; Sanger et al., 1990).

Вирус мозаики ночной красавицы также описан только в США и способен инфицировать растения семейства *Nyctaginaceae*: *Mirabilis nyctaginea* и *Mirabilis jalapa*, вызывая просветления, идущие по жилкам на верхних листьях, и хлороз между жилками у старых листьев (Deu, Maiti, 1999).

Вирус, окаймляющий жилки земляники инфицирует только представителей рода *Fragaria*, в основном дикие виды: *F. chiloensis*, *F. vesca*, *F. virginiana* и культивируемый вид *F. x ananassa*. Он в комплексе с другими вирусами вызывает образование складок, пожелтения, завивание листьев и другие симптомы. Этот вирус также был впервые обнаружен в США, но потом было показано его распространение в Японии, Австралии, а также в Европе (Franova-Honetslegrova et al., 1999; Mraz et al., 1996; Mraz et al., 1997; Petrzik et al., 1998a; Petrzik et al., 1998b; Thompson et al., 2003).

Вирус мозаики георгина (ВМГ) вызывает образование просветлений (рис. 1в), идущих по жилкам, в природе инфицирует только представителей рода *Dahlia* (георгин) семейства сложноцветные (*Compositae*), но этим вирусом можно искусственно инфицировать представителей других родов этого же семейства, например, циннию (*Zinnia*)

(Черкасский, 1965). Данный вирус, видимо, распространен по всему миру, где выращивают георгины. На территории России ВМГ выявлен в 80-х гг. XX в. в коллекции георгинов Главного ботанического сада РАН при исследовании ультраструктуры листьев растений (Богунов, 2006). В 90-х годах XX в. этот вирус обнаружен на юге Дальнего Востока (Богунов, 2006). Встречается

данный вирус и на европейской части России (Кулуев и др., 2007).

Вирус мозаики маниока был впервые обнаружен в Бразилии, поражает растения рода *Manihot* семейства молочайные (*Euphorbiaceae*), симптомы вирусного заболевания слабо выражены, другие виды растений не инфицируются этим вирусом (de Kochko et al., 1998).

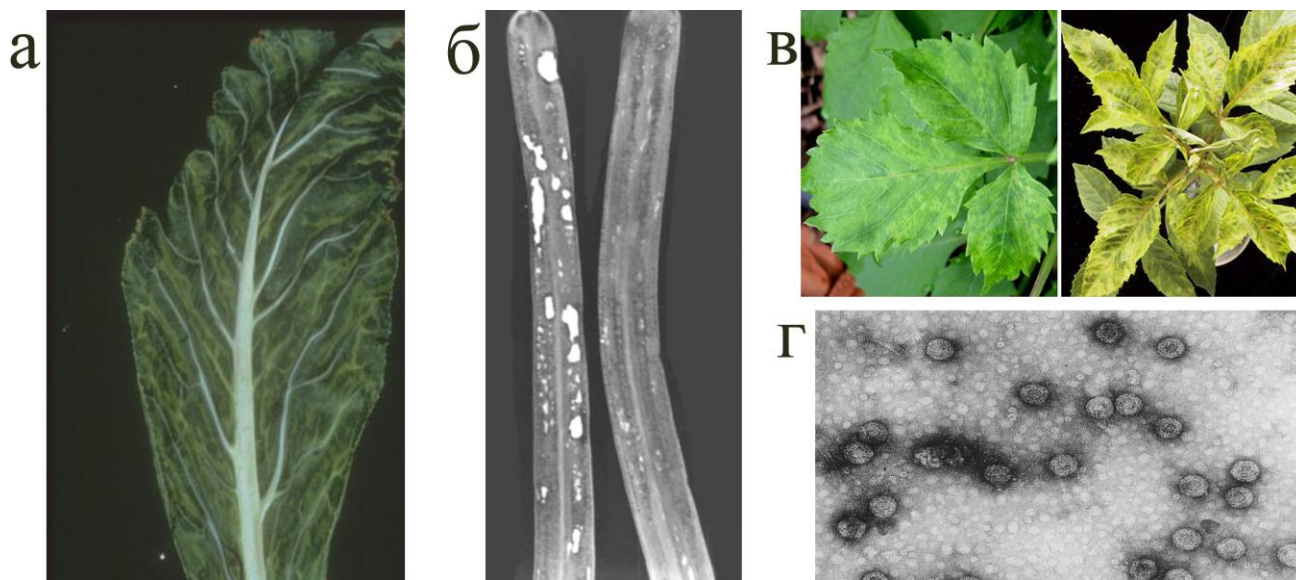


Рис. 1. Проявления заболеваний, вызываемых каулимовирусами. а – листья цветной капусты, зараженной ВМЦК; б – листья гвоздики, зараженной ВКГГ (<http://www.dpvweb.net>); в – листья георгина, зараженного ВМГ (Pappu, Wyatt 2003) г – вирионы ВМЦК (увеличение x300 000; <http://www.rothamsted.ac.uk>).

Вирус бледной пятнистости сои обнаружен в Японии и поражает только сою (*Glycine max*). Симптомы также выражены не сильно и сходны с другими каулимовирусами (Hasegawa et al., 1989; Takemoto, Hibi, 2001). Вирус бледной полосатости арахиса был описан в Индии, инфицирует арахис (*Arachis hypogaea*) (Reddy et al., 1993). Вирус красных кольцевых пятен черешни распространен в США и инфицирует растение *Vaccinium corymbosum* (черешня щитковая) (Glasheen et al., 2002), скрытый вирус хрена обнаружен в Дании и инфицирует растение *Armoracia rusticana* (хрен обыкновенный) и *Brassica campestris* (капуста полевая) (Richins, Shepherd, 1986). Вирус пятнистости бодяка обнаружен в Великобритании и инфицирует растение *Cirsium arvense* (бодяк полевой) (Donson, Hull, 1983). Вирус желтых листовых завивок цеструма распространен в Южной Италии, где произрастают растения рода *Cestrum* (сем. пасленовые) (Stavolone et al., 2003).

Механизм передачи вирусной инфекции

В природе ВМЦК передается преимущественно тлями рода *Myzus*, его передача другими способами не наблюдалось, и нет сообщений о передаче вируса при контакте растений, хотя ВМЦК можно легко инокулировать механическим воздействием на хозяйское растение, при этом удается заразить и некоторые близкородственные виды (Naas et al., 2002). Для передачи вирусных частиц необходим Р2 белок, который также называют фактором передачи тлями. Но очищенные вирионы после добавления только Р2 белка не могли инфицировать хозяйское растение. А вот те же вирионы, обработанные Р2 и Р3 белками, оказывались способными к инфекции (Leh et al., 1999). Следовательно, ВМЦК для трансмиссии тлями нуждается в двух факторах вирусного происхождения Р2 и Р3, оба из которых найдены в электрон-светлых вироплазмах. Существование второго трансмиссионного фактора (фактор передачи тлями), показало, что опосредованная тлями передача ВМЦК подразумевает образование моста, состоящего

из двух компонентов (P2 и P3) для связывания вирионов с кутикулярной поверхностью тлей (Schmidt et al., 1994) Оказывается, большой С-терминальный домен P3 ответственен за взаимодействие с вирионом, тогда как α -спиральная структура N-конца соединяется с $\alpha 1$ -спиралью С-конца P2 (рис. 2). Комплекс P2-P3-вирион видимо формируется уже в тлях, ведь такие комплексы в инфицированных клетках не обнаруживаются (Schmidt et al., 1994). Согласно выдвинутой гипотезе вначале P2 связывается с кутикулой стилета тлей, который находится в электрон-светлых вироплазмах, в дальнейшем к P2 присоединяется P3-вирион комплекс, который формируется в электрон-плотных

вироплазмах (Haas et al., 2002). Таким образом, формируется вирусный трансмиссивный инфекционный комплекс (рис. 2). Для вируса мозаики цветной капусты было выяснено, что он распространяется по флоеме, передается 27 видами тлей, но в основном *Brevicoryne brassicae* и *Myzus persicae* (Palacios et al., 2002). Все каулимовирусы способны передаваться по этому механизму разными видами тлей. Баднавирусы также способны передаваться по такому же механизму, но в отличие от каулимовирусов, переносчиками могут быть не только тли, но и другие насекомые (de Kochko et al., 1998).

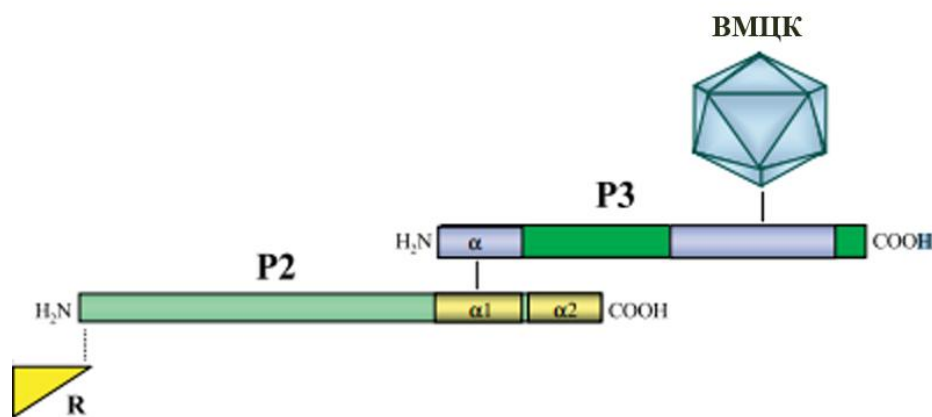


Рис. 2. Вирусный трансмиссивный инфекционный комплекс, состоящий из белков P2 и P3 (по Haas et al., 2002).

Вирус кольцевой гравировки гвоздики также передается *Myzus persicae* и механической инокуляцией растительного сока (Raikhy et al., 2006). Вирус окаймляющий жилки земляники также переносится несколькими видами тлей, повиликой, и при прививке (Mahmoudpour, 2003). Вирус мозаики георгина переносится инокуляцией сока и 13 видами тлей (Parpu et al., 2005). Вирус мозаики ночной красавицы передается также *Myzus persicae*, механической инокуляцией, но не переносится контактом между растениями, через семена и пыльцу (Dey, Maiti, 1999). Вирус красных кольцевых пятен черешни передается механической инокуляцией и при прививании (Glasheen et al., 2002). Скрытый вирус хрена передается *Myzus persicae* и механической инокуляцией (Richins, Shepherd, 1986). Вирус, обесцвечивающий жилки табака и вирус бледной полосатости арахиса хорошо переносятся семенами и в отличие от всех других каулимовирусов не передаются механической инокуляцией или тлями (Lockhart et al., 2000).

Структура и воспроизведение генома, белковые продукты каулимовирусов

Геном каулимовирусов содержит двуцепочечную кольцевую молекулу ДНК размером около 8000 пар нуклеотидов. В растительной клетке каулимовирусная ДНК принимает суперскрученную форму, ассоциируется с гистонами и формирует минихромосому, состоящую из 42 нуклеосом (Haas et al., 2002; Menissier et al., 1983). ДНК каулимовирусов также может подвергаться рекомбинации, что чаще происходит в процессе обратной транскрипции прегеномной РНК, и гораздо реже на уровне ДНК (Haas et al., 2002). Геном всех каулимовирусов содержит 7 открытых рамок считывания (ORF1 - ORFVII), которые кодируют 6 белков с известными функциями (P1-P6), продукт 7-й открытой рамки считывания пока не обнаружен. В геноме каулимовирусов содержатся также два межгенных спейсера – большой и малый, размерами около 1500 и 700 пар нуклеотидов соответственно. Большой межгенный спейсер содержит промотор полноразмерного транскрипта или полногеномный

промотор, который регулирует транскрипцию всего генома и обеспечивает образование мРНК, которая у вируса мозаики цветной капусты имеет константу седиментации 35S и потому носит название 35S РНК. В связи с этим полногеномный промотор ВМЦК получил название 35S промотора. Малый межгенный спейсер содержит промотор субгеномного транскрипта или субгеномный промотор, который у ВМЦК носит название 19S промотора. Этот промотор регулирует экспрессию шестого гена, при транскрипции которого образуется 19S РНК (Haas et al., 2002).

Итак, минихромосома ВМЦК под контролем 35S и 19S промоторов транскрибируется однонаправлено клеточной РНК-полимеразой II в два больших экпированных и полиаденилированных транскрипта, - 35S и 19S РНК. 35S РНК включает весь геном и дополнительно еще около 180 п.н., этот излишек появляется из-за того, что РНК-полимераза II игнорирует в первом проходе сигнал полиаденилирования, который расположен на 180 п.н. ниже сайта инициации транскрипции, и терминация происходит, когда РНК-полимераза второй раз подходит к сайту полиаденилирования (Haas et al., 2002). Полицистронная 35S РНК служит матрицей для синтеза белков от P1 до P5 и как матрица в обратной транскрипции (прегеномная РНК→геномная ДНК). В клетке обнаруживают несколько сплайсированных версий 35S РНК. Анализ процессов сплайсинга показал наличие донорного сайта сплайсинга в лидерной области 35S РНК и 3-х добавочных сайтов в пределах 3' терминальной части ORF1 (Kiss-Laszlo et al., 1995). Все 4 донора используют единственный акцепторный сайт, который расположен в пределах ORFII. 35S РНК может содержать цис-активные последовательности, которые регулируют сплайсинг, что обеспечивает поддержание пула полноразмерных РНК, необходимых для обратной транскрипции (Jurin, Chua, 1996; Lam et al., 1994). Также известны вирус-специфичные факторы Rev и Rex, которые могут регулировать сплайсинг 35S РНК и служить посредником в экспорте в цитоплазму (Hauber, 2001).

Кроме 35S и 19S РНК были описаны и другие вирусные РНК, например, 22S субгеномная РНК, экспрессия кодирующего участка которой находится под контролем предполагаемого собственного промотора, расположенного в ORFV, который возможно запускает экспрессию P5 (Plant et al., 1985), но наличие и функциональность данного промотора не доказаны.

Синтез генных продуктов каулимовирусов вероятно происходит на поверхности цитоплазматических включений - электрон-плотных вироплазм, состоящих из вирусного белка P6. И

действительно, при исследовании вироплазм обнаруживается наличие на их поверхности полисом и белков (Drucker et al., 2002; Givord et al., 1984; Martinez-Izquierdo et al., 1987). Как указывалось выше, все белки каулимовирусов транскрибируются благодаря подвергшейся процессингу 35S РНК. 35S РНК имеет необычное строение и свойства, она экпирована и полиаденилирована подобно эукариотической мРНК, но полицистронна в отличие от нее, в связи с чем каулимовирусы развили специфические стратегии для обмана канонической эукариотической регуляции трансляции. Именно поэтому 35S РНК имеет нетипичную лидерную последовательность длиной около 600 п.н. и содержит до 9 маленьких рамок считывания (sORFs) в зависимости от штамма и вида вируса. Все эти маленькие рамки считывания (sORFs) простираются до лидерного конца цепи и формируют стабильную шпильку. В формировании шпильки не участвует только первая рамка sORFA, располагающаяся до шпильки (Pooggin et al., 1999). Эта лидерная последовательность 35S РНК оказывает сильное влияние на уровень трансляции расположенных за ним ассоциированных рамок считывания в протопластах растения-хозяина и почти полностью ингибируется в протопластах других, неродственных растений (Futterer et al., 1989). Исследование этих процессов ингибирования трансляции и полицистронный характер мРНК каулимовирусов позволяет сделать заключение, что в трансляцию вовлечены 2 процесса, а именно рибосомное шунтирование и терминация-реинициация и в обоих случаях необходим белок P6 (Boneville et al., 1989; Futterer et al., 1993; Pooggin et al., 2000). Рибосомное шунтирование - это механизм перехода, который позволяет рибосомам переключаться после трансляции sORFA на сайт инициации возле 3'-конца шпильки. Это шунтирование происходит эффективно только после трансляции sORFA с последующим высвобождением соответствующего пептида (Hemmings-Mieszczak et al., 1998). Этот механизм шунта, который описан для ВМЦК, характерен для инициации трансляции прегеномных РНК всех каулимовирусов. Исследования позволили обнаружить три клеточных белка, которые специфично связываются с лидерной областью 35S РНК (Dominiques et al., 1998; Hemmings-Mieszczak et al., 2000; Pooggin et al., 2000). Было также показано, что эти белки могут включаться в механизм шунтирования и трансляцию 35S РНК в целом. После шунтирования, рибосомы продолжают считывание и достигают первой большой открытой рамки считывания, где уже стартует механизм терминации-реинициации, который позволяет экспрессироваться всем большим открытым рамкам, исключая ORFVI.

Белок Р6, также называемый трансактиватором трансляции, абсолютно необходим для процессов терминации-реинициации (Boneville et al., 1989). Недавно было показано, что функционирование Р6 зависит от ассоциации его с полисомами и фактором инициации трансляции эукариот eIF3 (Park et al., 2001). Р6 взаимодействует с g-субъединицей eIF3 и тремя белками 60S субъединицы рибосом, а именно с L18 (Leh et al., 1999), L24, L13 (Park et al., 2001). L18 и L13 взаимодействуют с Р6 miniTAV доменом, который соответствует минимальной последовательности, необходимой для трансляционной трансактивации, тогда как L24 и g-субъединица eIF3 взаимодействуют с областью, расположенной непосредственно ниже от miniTAV. Таким образом Р6 обеспечивает эффективное прикрепление eIF3 к полисомам, обеспечивая тем самым трансляцию полицистронной мРНК и вызывая репликационный процесс после окончания считывания каждой рамки.

Р1 (40кДа) – это белок, который формирует трубки в плазмодесмах, что позволяет частицам вируса двигаться из одной клетки в другую (Perbal et al., 1993). Центральный домен Р1 необходим для продвижения самого белка в клеточную периферию после этапа его биосинтеза на рибосомах. Большая же часть белка Р1, исключая С-терминальную область, необходима для формирования трубочек. N- и С-концы этого белка выходят за внешнюю и внутреннюю стороны трубки, соответственно Р6 также содержит и РНК-связывающий домен (Citovsky et al., 1991), поэтому возможно Р1 опосредует транспорт между клетками не только сформированных вирусных частиц, но и транспорт 35S РНК (Haas et al., 2002).

Р2 (18кДа) – необходим для передачи вирусных частиц тлями и не выполняет никаких функций в процессе репликации вирусного генома (Armour et al., 1983). Р2 – основной составляющий компонент электрон-светлых вироплазм (Espinosa et al., 1991), которые также содержат белок Р3 и некоторое количество вирионов (Drucker et al., 2002). Этот белок еще называют фактором трансмиссии насекомыми. Этот белок не обнаруживают, в содержащих белки Р6 электрон-плотных вироплазмах, где и происходит обратная транскрипция и морфогенез зрелых вирусных частиц.

Р3 (15кДа) – этот белок также совершенно необходим для инфицирования растений, так как его делеция из генома вируса ведет к прекращению инфекционности (Leclerc et al., 1998). С-конец данного белка содержит пролин-богатую последовательность, которая способна связываться с нуклеиновой кислотой неспецифически (Mougeot et al., 1993), поэтому его еще называют ДНК-

связывающим белком. Считается, что он может быть включен в вирион и выполняет там функции связывания ДНК с белковым капсидом. Также известно, что Р3 играет важную роль в формировании комплекса Р2-Р3-вирион, который переносится тлями (Leclerc et al., 1998).

Р4 (56кДа) – предшественник белков оболочки и соответствует gag-белку ретровирусов. Кислые N- и С-терминальные концы Р4 модифицируются посттрансляционно вирусной протеиназой, кодируемой ORFV и вероятно клеточными протеазами, продуцирующими полипептиды с различными молекулярными массами (Haas et al., 2002). На N-конце капсидные белки обладают сигналом ядерной локализации, которые выставлены на поверхности зрелых вирионов. Оказалось, что для сигнала ядерной локализации мишенью являются ядра и она позволяет зрелым вирусным частицам прикрепляться к ядерным оболочкам и проникать в ядра через ядерные поры (Leclerc et al., 1998).

Р5 (78кДа) является полипротеином, гомологичным продукту гена *pol* ретровирусов. Он необходим для репликации вирусного генома, является предшественником протеиназы, обратной транскриптазы и РНКазы Н. Протеиназа (18кДа) освобождается от Р5 «саморасплавлением», но неизвестно, разделяются ли обратная транскриптаза и РНКазы Н. Обратная транскриптаза использует цитоплазматическую тРНК^{мет} как затравку для синтеза цепи ДНК по матрице прегеномной 35S РНК. Далее в процесс включается РНКазы Н, которая расщепляет РНК в нескольких богатых пурином участках и на цепи ДНК остаются олигорибонуклеотиды, залипшие по этим сайтам, которые служат праймерами для обратной транскрипции комплементарной цепи ДНК.

Р6 (62кДа) – мультифункциональный белок, который имеет большое значение в течение жизненного цикла вируса. Р6 основной компонент аморфных, не заключенных в мембраны цитоплазматических включений. Эти электрон-плотные структуры, называемые вироплазмами, содержат новые сформированные вирусные частицы. Эти вироплазмы сформированы на специфических взаимодействиях между молекулами Р6. Вироплазмы – это вирусные фабрики, где происходит синтез ДНК и белков, морфогенез и хранение вирусных частиц. Среди всех функций Р6 наиболее известна его способность трансактивировать трансляцию от ORF1 до ORFV и тем самым активирова синтез вирусных белков (Futterer, Hohn, 1991; Scholthof et al., 1992; Gowda et al., 1989).

Размер генома вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) варьирует в зависимости от

штамма. Были секвенированы последовательности геномов по крайней мере 4-х штаммов данного вируса. Впервые геном этого вируса был секвенирован еще в 1980 году (Franck et al., 1980) (V00141), размер генома составил 8024 п.н. Размеры геномов других штаммов, секвенированных позже, составляют 8031 п.н. (Gardner et al., 1981), (V00140); 8016 п.н. (Balazs et al., 1982), (M10376), 8060 п.н. (Fang et al., 1985), (AF140604). ГЦ состав различных штаммов ВМЦК меняется от 39,97 до 40,19%. С помощью компьютерного анализа были исследованы семь открытых рамок считывания и два межгенных спейсера. Позже было выяснено, что данная структура генома и организация рамок считывания характерна для большинства каулимовирусов. Все штаммы ВМЦК показали высокую гомологию нуклеотидной последовательности во всех рамках считывания и в промоторных последовательностях (Franck et al., 1980, Odell et al., 1985, de Kochko et al., 1998). Лишь Бари-изолят показал различие в последовательности нуклеотидов до 10% с другими штаммами (de Kochko et al., 1998). Было выяснено, что оридгин репликации у ВМЦК находится между большим межгенным спейсером и седьмой рамкой считывания (de Kochko et al., 1998). Геном вируса кольцевой гравировки гвоздики (Нидерланды) был клонирован и описан в 1986 году (Hull et al., 1986), (X04658; NC_003498). Содержание ГЦ-пар составляет 36,39%, размер генома - 7932 п.н. Также был секвенирован геном индийского изолята ВКГГ (Raikhy et al., 2006) (AJ853858). Размер генома составил 7924 п.н. ГЦ состав оказался меньше, чем у ВМЦК, но чуть больше, чем у европейского изолята - 37%. Уровень гомологии между геномами этих изолятов составил приблизительно 96-99%, в зависимости от гена. Гомология геномов ВКГГ и ВМЦК в кодирующих областях составляет 53%, в то время как в межгенных спейсерах она уменьшается до 37% (Raikhy et al., 2006). Что касается вируса мозаики норичника, было исследовано два штамма, причем геном штамма DхS, размером 7743 п.н. был секвенирован и депонирован в GenBank (X06166) (Richins et al., 1987).

Геном вируса мозаики ночной красавицы (ВМНК) был выделен и исследован в 1983 году (Donson, Hull 1983; Richins, Shepherd, 1983). Размер генома ВМНК составил 7857 п.н. (Deu, Maiti, 1999), (NC_004036). Вирус, окаймляющий жилки земляники (ВОЖЗ) имеет геном размером в 7876 п.н. (Petrzik et al., 1998a) (X97304), ГЦ состав равен 39,08%. Трудности идентификации данного вируса заключаются в сложности его очищения и механического инфицирования земляники, к тому же и другие вирусы земляники могут вызывать

сходные симптомы (Thompson et al., 2002). К тому же очищенные частицы вируса не вызывают инфекцию, что создает еще большие трудности. Геном ВОЖЗ был клонирован в 1988 году, однако полученная генно-инженерная конструкция рSVBV-E не обладала инфекционной активностью (Stenger et al., 1988). Лишь при использовании технологии бомбардировки золотыми частицами для инфицирования земляники вирусом, удалось инфицировать здоровые растения клонированным геномом ВОЖЗ (Mahmoudpour, 2003). Были инфицированы листья земляники диким вирусом, очищенными вирусами и клоном рSVBV-V3 и во всех случаях удалось получить положительные результаты и симптомы инфекции были сходны с симптомами природной инфекции. Анализ генома ВОЖЗ показал высокую гомологию с ВМЦК, у ВОЖЗ также семь открытых рамок считывания, которые кодируют гомологичные белки весом: 37,8, 18,1, 16,6, 81,1, 59,0, 12,6 кДа соответственно, оридгин репликации находится на конце седьмой рамки (Petrzik et al., 1998a; Petrzik et al., 1998b; Thompson et al., 2003).

Геном вируса георгина секвенирован частично, в GenBank представлены, в основном, последовательности отдельных генов. Например, размер предполагаемых рамок считывания ORFI составляет 966 п.н. (AY291585), ORFII – 504 п.н. (AY291586), ORFIII – 363 п.н. (AY291587), ORFIV – 1476 п.н. (AY291588), ORFV – 1830 п.н. (AY309479), ORFVI – 1515 п.н. (AY309480). Для сравнения, например, размеры рамок считывания у ВМН таковы: 971, 484, 347, 1469, 2000, 1538 п.н. (Richins et al., 1987). Из этих данных можно сделать вывод о гомологичности рамок считывания ВМН и ВМГ. В более ранних работах также было осуществлено рестрикционное картирование генома ВМГ (Richins et al., 1983). Были секвенированы и исследованы ORFV (Nicolaisen, 2003), ORF IV (Богунов, 2006), промотор (Кулуев и др., 2007).

Геном вируса бледной пятнистости сои также секвенирован и составляет 8178 п.н. (Hasegava et al., 1989), (X15828). По ГЦ составу вирус сои близок к вирусу бледной полосатости арахиса и составляет приблизительно 34%. Геном вируса арахиса также секвенирован и по числу нуклеотидов мало отличается от генома вируса сои. Размер генома вируса арахиса составил 8174 п.н. и депонирован в GenBank (U13988). У вирусов сои и арахиса 1-я рамка считывания делится на 2 части: ORFIa и ORFIb, причем было выяснено, что продукт гена ORFIb не является существенным для развития вирусной инфекции (Takemoto et al., 2001), видимо из-за того, что у этих каулимовирусов на ORFIb находится оридгин репликации, который не

кодирует важных белковых продуктов для развития вируса (de Kochko et al., 1998).

Размер генома вируса мозаики маниока составляет 8159 п.н., по ГЦ составу геном данного вируса довольно сильно отличается от вируса сои и арахиса (de Kochko et al., 1998). Строение генома у вируса мозаики маниока несколько отличается от других каулимовирусов. Например, ориджин репликации находится в начале ORFI, после ORFI идет ORFIV. Есть много и других различий, которые подробно рассматриваются в цитируемом источнике (de Kochko et al., 1998). Наиболее близким к вирусу мозаики маниока оказался вирус, обесцвечивающий жилки табака, геном которого также секвенирован (Lockhart et al., 2000) и депонирован в GenBank (AF190123). Размер генома составляет 7767 п.н. В геноме этого вируса было обнаружено и исследовано 4 открытые рамки считывания, гомологичные рамкам считывания других каулимовирусов. В геноме инфицированного табака были обнаружены высокогомологичные вирусной участки ДНК (Lockhart et al., 2000). Такие же данные были отмечены и для вируса арахиса. Было доказано, что геном данных вирусов может интегрироваться в геном растения-хозяина, такие данные для других каулимовирусов пока не подтвердились (Lockhart et al., 2000). Видимо этим

объясняется то, что эти два вируса переносятся семенами, но не передаются другими способами.

Размер генома вируса желтых листовых завивок цеструма немного превышает размер генома других каулимовирусов и составляет 8252 п.н., ГЦ состав - 37% (Stavolone et al., 2003). Последовательность генома этого вируса доступна в GenBank (AF36175). В клетках цеструма были обнаружены ДНК вируса в кольцевой и линейной формах, которые при определенном способе выделения разделялись и были видны при проведении агарозного гель-электрофореза. Геном вируса цеструма оказался ближе к вирусам сои и арахиса, несмотря на то, что цеструм относится к семейству пасленовые (Stavolone et al., 2003).

На основе выравнивания нуклеотидных последовательностей геномов каулимовирусов было показано, что наиболее близкими к ВМЦК являются скрытый вирус хрена и ВКГГ (рис. 3). Следующую близкую группу составляют ВМГ, ВМНК и ВМН. К этим каулимовирусам близок также и вирус, окаймляющий жилки земляники. К более отдаленной группе относятся вирус красных кольцевых пятен черешни, вирус бледной пятнистости сои, вирус бледной полосатости арахиса и вирус мозаики маниока (рис. 3).

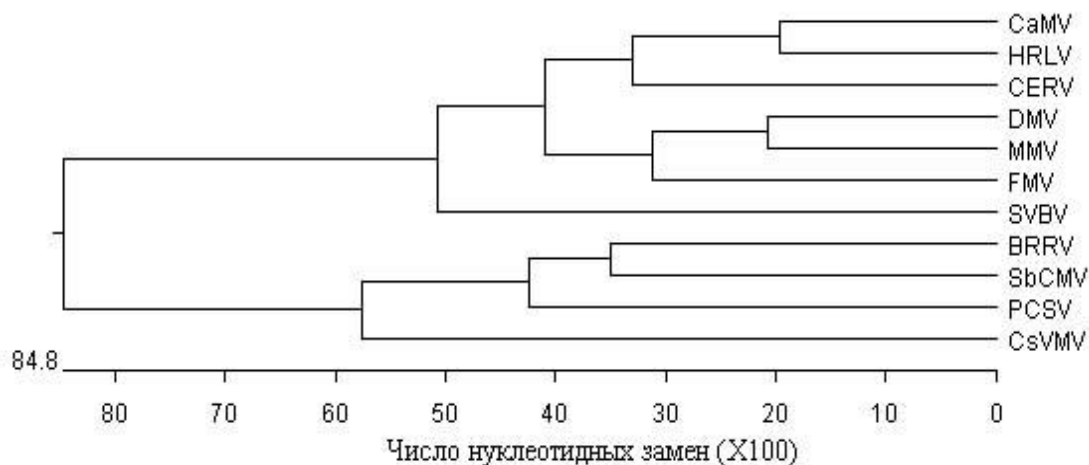


Рис. 3. Филогенетическое древо сходства некоторых представителей каулимовирусов, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей геномов. CaMV – ВМЦК; HRLV – скрытый вирус хрена; CERV – вирус кольцевой гравировки гвоздики; DMV – вирус мозаики георгина; FMV – вирус мозаики норичника; MMV – вирус мозаики ночной красавицы; SVBV – вирус, окаймляющий жилки земляники; SbCMV – вирус бледной пятнистости сои; CsVMV – вирус желтых листовых завивок цеструма; PCSV – вирус бледной полосатости арахиса; BRRV – вирус красных кольцевых пятен черешни; CsVMV – вирус мозаики маниока.

Полногеномные промоторы каулимовирусов

Как уже отмечалось выше, каулимовирусы в составе своего генома имеют два типа промоторов. Один промотор регулирует экспрессию всего генома вируса и называется промотором полноразмерного транскрипта или просто полногеномным, размер которого у разных каулимовирусов составляет примерно 500 - 600 п.н. (Dey, Maiti, 1999; Maiti et al., 1997; Pattanaik et al., 2004). Но эти последовательности включают обычно и околопромоторную область, не являющуюся необходимым элементом промотора. Показано, что для выражения наибольшей активности промотора достаточно 300 - 400 п.н. в зависимости от вида вируса (Sanger et al., 1990; Verdaguer et al., 1996; Maiti et al., 1997; Dey, Maiti, 1999; Pattanaik et al., 2004). Промотор полноразмерного транскрипта в геноме вируса располагается на конце кодирующей области гена 6 белка, и частично занимает большой межгенный спейсер, находящийся между шестой и седьмой открытыми рамками считывания (Noad et al., 1997). Среди каулимовирусов этот промотор был впервые описан и изучен у ВМЦК в 1985 году (Odell et al., 1985). Он был назван 35S промотором. Данный промотор оказался очень сильным и конститутивным и нашел широкое применение в генной инженерии растений. 35S промотор помещен в различные векторные системы и используется для регулирования экспрессии чужеродных генов в трансгенных растениях. 35S промотор применяют при получении трансгенных растений, где он управляет экспрессией тех или иных генных продуктов, и благодаря своей конститутивности может работать при различных физиологических состояниях растения и, главное, в большинстве двудольных растений, практически с одинаковой силой. 35S промотор проявляет свою активность также в клетках бактерий *E. coli* и дрожжей *Saccharomyces pombe* (Lam, 1994). Одним из объяснений этой активности является наличие гомологии -315 последовательности 35S промотора с -10/-35 элементом прокариотического промотора.

Вторым промотором каулимовирусов является 19S промотор, который регулирует экспрессию шестого гена. В результате транскрипции шестого гена образуется отдельный, субгеномный транскрипт, константа седиментации которого составляет 19S. Этот промотор у всех каулимовирусов обычно носит название промотора субгеномного транскрипта (Bhattacharyya et al., 2002). Этот промотор располагается в малом межгенном спейсере, находящимся между пятым и шестым генами. Для проявления наибольшей промоторной активности 19S промотора достаточно 300 п.н. (Bhattacharyya et al., 2002). 19S промотор ВМЦК

оказался намного слабее 35S промотора и не получил такого же широкого применения в генной инженерии растений, хотя в некоторых работах все же использовался (Sanders et al 1987; Sanger et al., 1990; van der Fits et al., 1997).

Первый промотор-делеционный анализ 35S промотора был проведен в 1985 году (Odell et al., 1985). Было выяснено, что для проявления наибольшей активности 35S промотора достаточно 343 п.н. Делеция до -105 нуклеотида приводила к уменьшению активности в 3 раза, а до -46 – приводила к 20-ти кратному уменьшению активности. Было показано, что делеция до -168 нуклеотида не приводила к потере активности промотора (Odell et al., 1985). Дальнейшие исследования показали, что 5'-граница промотора лежит между -148 и -134 нуклеотидами (Lam, 1994). Делеции до -108 или -104 нуклеотида приводили к 5-ти кратному уменьшению активности. Делеция участка от -89 до -73 вызывала 20-ти кратное падение активности. Показано, что область между -89 и -73 нуклеотидами абсолютно необходима для способности последовательности -148/-89 активировать транскрипцию (Lam, 1994). Более детальный делеционный анализ 35S промотора (Fang, 1989) показал следующие результаты: область от -343 до -46 содержит, по меньшей мере, три домена, важных для экспрессии в листьях. Домен -343/-208 обеспечивает 50%-ную промоторную активность. В свою очередь делеция последовательности -208/-90 также приводит к уменьшению активности в два раза. Третий домен -90/-46 нуждается в активации двумя первыми доменами. В итоге стало известно, что для максимального уровня экспрессии необходима и достаточна последовательность -343/-46 (Fang, 1989).

Полноразмерные промоторы всех каулимовирусов включают три функционально важные области. Это во-первых два мотива области инициации транскрипции РНК-полимеразой II: ТАТА и ССАСТ боксы и энхансерная область, сильно влияющая на ССАСТ бокс (Bhullar et al., 2003; Lam, 1994). Выделяют также -18 +1 домен, с которого происходит непосредственная инициация транскрипции. Транскрипционная активность полногеномных промоторов каулимовирусов есть результат синергизма и комбинированного эффекта энхансерных элементов, расположенных в области от -350 до -50 выше ТАТА-боксов (Noad et al., 1997). Последовательности, лежащие за сайтом инициации транскрипции и включающие около 60 п.н. транскрибируемой области, также показали энхансерную активность (Futterer et al., 1990). Этот участок получил название стимулирующей области I (S1) (Pauli et al., 2004). Энхансерная область делится на два домена: А домен (от -50 до -90) и В домен (от -

90 до -350) (Fang et al., 1989). Все цис-регуляторные элементы имеют большое значение для развития вирусной инфекции. Удаление TATA, CCAAT-боксов, энхансерной области приводило к потере инфекционности, в то время как удаление А-домена или В-домена по отдельности, не приводило к значительным нарушениям развития инфекции (Turner et al., 1996).

Активность промотора также зависит от различных тканеспецифических элементов или так называемых транс-регуляторных ядерных факторов. Первый обнаруженный ядерный фактор, способный связываться с 35S промотором, был назван активирующим фактором 1 (Lam et al., 1989). Активирующий фактор 1 связывается с так называемой активируемой последовательностью 1 (сайт as-1), расположенной от -82 до -62 нуклеотида 35S промотора, что приблизительно совпадает с А-доменом энхансерной области (Lam, 1994). Весьма важным для ДНК-белковых взаимодействий являются два TGACG консервативных мотива, расположенных на сайте связывания активирующего фактора 1 (Lam et al., 1989). Было выяснено, что активирующий фактор 1 ответственен за корнеспецифическую экспрессию, поэтому его сайт связывания можно назвать корнеспецифическим цис-элементом. Важное значение этот фактор имеет и для экспрессии в стеблях (Lam et al., 1989). Дальнейшие исследования в этой области привели к открытию еще нескольких ядерных белковых факторов, способных связываться с 35S промотором, приводя к повышению экспрессии (Benfey et al., 1990; Lam et al., 1989, Lam, 1994). Наиболее изученный фактор был назван активирующим фактором 2 (Lam et al., 1989). Активирующий фактор 2 связывается с листоспецифическим цис-элементом, расположенным в конце В-домена от -110 до -85 (Haas et al., 2002), по другим данным с последовательностью от -105 до -85 (Lam, 1994) и этот участок получил название активируемой последовательности 2 (сайт as-2). Активирующий фактор 2 взаимодействует с последовательностью GAT(A/G) в пределах активируемой последовательности 2. GAT(A/G) повтор был также найден в сходных позициях промоторов 12 различных генов хлорофилл-связанных белков многих видов растений (Lam et al., 1989). Мутации в пределах GAT(A/G) повторов активируемой последовательности 2 приводит к прекращению взаимодействия с активирующим фактором 2 и к прекращению экспрессии в листьях (Lam, 1994). Эти результаты совпадают с данными о том, что внутренняя делеция области -105/-90 приводила к потере экспрессии в листьях (Fang et al., 1989). В дальнейшем был обнаружен еще один белковый

фактор, который получил название GT1 фактор (Lam et al., 1989). Предполагается, что этот фактор вступает во взаимодействие с активирующим фактором 2 и этот комплекс также способен взаимодействовать с 35S промотором, регулируя уровень транскрипции (Lam, 1994). Было выяснено, что GT1 фактор стимулирует листоспецифическую транскрипционную активность. Расщепление по сайту рестрикции *Hinf* I приводило к прекращению взаимодействия GT1 фактора с 35S промотором и к редукции экспрессии в листьях (Lam, 1994). Благодаря этим данным стало известно, что данный белковый фактор взаимодействует с последовательностью GGTAA, расположенной в области -302/-299 (Lam, 1994). Были обнаружены еще два белковых фактора, способных связываться с 35S промотором, это фактор CAF, повышающий уровень экспрессии в листьях табака и MNF1 - листоспецифический фактор кукурузы. Фактор CAF взаимодействует с областью -208/-155, а фактор MNF1 взаимодействует с областью -281/-235 35S промотора (Lam, 1994).

Исследования активности 35S промотора в различных тканях выявили весьма незначительный уровень экспрессии на самых ранних стадиях развития. Экспрессия увеличивалась с переходом на более поздние стадии развития (Sunilkumar et al., 2002). Бенфи с сотр. исследовали домены 35S промотора и выделили пять важных регуляторных областей или так называемых субдоменов и выяснили, что на ранних стадиях развития растений лишь три из них активны и инициируют транскрипцию (Benfey et al., 1990). Эти субдомены занимают следующие положения: B1 (от -105 до -90); B2 (от -155 до -106); B3 (от -208 до -156); B4 (от -301 до -209); B5 (от -343 до -302).

B2 и B4 субдомены не показали экспрессию на ранних стадиях развития растений ни в листьях, ни в стебле, ни в корнях. В зрелом состоянии эти субдомены показали очень незначительный уровень экспрессии в стеблях и листьях, а в корнях показали нормальный уровень. В стеблях наибольшая экспрессия была обнаружена в апикальной меристеме. Самыми важными для экспрессии в стеблях оказались субдомены B1 и B3. Было определено, что для корней такими являются субдомены B2 и B3 (Benfey et al., 1990).

В зрелом состоянии во всех тканях наблюдается довольно высокий уровень экспрессии, обусловленной 35S промотором. Самый низкий уровень экспрессии был обнаружен в пыльниках (de Mesa et al., 2004; Sunilkumar et al 2002).

Активность 35S промотора подвержена также сезонным изменениям. Например, при исследовании экспрессионной активности 35S

промотора в клетках сосны обыкновенной, она оказалась наиболее высокой в марте. Также было выяснено, что наиболее минимальный уровень экспрессии наблюдался в начале и в конце вегетационного периода (Aronen et al., 1995).

Итак, работа полногеномного промотора зависит от влияния различных физиологических факторов растения на энхансерную область. В разных тканях растений на промотор влияют различные факторы, но все они распознаются сайтами связывания энхансерной области и в итоге тканеспецифичность промотора не проявляется. Полногеномный промотор каулимовирусов может работать и без влияния каких-либо активирующих факторов растения, хотя его “сила” будет несколько ниже.

Полногеномные промоторы других каулимовирусов интенсивно исследуются и некоторые уже находят применение в генной инженерии растений, причем многие из них оказались более сильными, чем 35S промотор.

Полногеномный промотор вируса мозаики норичника был впервые охарактеризован в 1990 г. (Sanger et al., 1990). Из-за того, что размер генома ВМН слегка меньше генома ВМЦК, он получил название 34S промотор, по аналогии с 35S промотором. 34S и 35S промоторы показывают примерно 63% нуклеотидную гомологию в ТАТА, ССАТ и -18 +1 доменах, но в других местах гомология уменьшается до 50% и ниже (Sanger et al., 1990). 34S промотор оказался сравнимым по силе (Maiti et al., 1997) и даже превосходящим силу 35S промотора (van der Fits et al., 1997) и в 20 раз более активным, чем в одно время широко используемый в генной инженерии, промотор маннопинсинтазы из Т-ДНК агробактерий (Sanger et al., 1990). Было изучено два штамма ВМН: М3 и DхS. Эти штаммы по последовательности нуклеотидов промоторных областей характеризовались 26%-м различием, в отличие от консервативных 35S промоторов различных штаммов ВМЦК.

Был проведен промотор-делеционный анализ 34S промотора, с использованием маркерных генов *GUS* и *CAT* в трансгенных растениях (Maiti et al., 1997). Этот анализ проводился для выяснения месторасположения основных доменов и важности того или иного домена для активности промотора. Был изучен 34S промотор в координатах генома ВМН от 6481 до 7680 п.н. Было выяснено, что для максимальной экспрессии маркерного гена достаточен участок с 5'-концом в положении -249 относительно сайта инициации, а на 3'-конце в положении +64. Таким образом, размер самого 34S промотора составил 314 п.н. (Maiti et al., 1997).

Для получения этих данных было сконструировано множество делеционных структур, с условными обозначениями рFMV, например, рFMV CAT20 (от-248 до +64), которые были введены в протопласты табака методом электропорации для проверки транзientной экспрессии. Выяснив, что конструкция рFMV19 (от-249 до+64) проявляет наибольшую активность (100%), были проведены делеции вначале на 3'-конце, а потом и на 5'-конце, а также проверены активности всех полученных конструкций. Конструкции рFMV CAT (от-249 до +377), рFMV CAT19 (от -249 до +287) и рFMV CAT32 (от -249 до +736) показали лишь 5%-ную активность, по сравнению с рFMV CAT20. А вот уже конструкции рFMV CAT15 (от-249 до+167) и рFMV CAT4 (от-249 до +204) показали 25-30% активности. Эти результаты показывают, что лидерная последовательность от +167 до +736 имеет значительный ингибиторный эффект на промоторную активность, вероятно через влияние на трансляцию транскрипта. К стати такой же ингибиторный эффект лидерной последовательности был обнаружен до этого и для ВМЦК. 3'-делеция до +10 нуклеотида в рFMV CAT6 (от -249 до +10) показывает около 75% активности, по сравнению с рFMVCAT20. Это показывает, что для лучшей экспрессии необходима более длинная 3'-лидерная последовательность. А вот 3' делеция до -47 п.н. в конструкции рFMV CAT5 (от -249 до -47) вызывала падение промоторной активности почти до 0%, так как в эту делецию попадал ТАТА-бокс.

Далее был проделан 5'-делеционный анализ, где +64 нуклеотид был зафиксирован как 3'-конечная точка. Конструкция рFMV CAT7 (от -198 до+64) показывает лишь 10% активность, что означает важность элементов, расположенных между -198 до -249. рFMV CAT17 (от -238 до +64) показывает уже 50% активность по сравнению с рFMV CAT20. А вот конструкция рFMV CAT16 (от-284 до+64) показывает 12% активность, но для рFMV CAT (от -456 до +64) характерна 30% активность. Это означает, что последовательность между -249 и -284 имеет негативный, ингибиторный эффект. Этот промотор был клонирован в растительные экспрессионные векторы рKLF и рKLF2. На основе этих векторов были получены трансгенные растения. В общем, были получены такие конструкции как рKLF-Flt_{пром}-GUS, рKLF-Flt_{пром}-CAT и другие. Анализ полученных трансгенных растений показал конститутивность и отсутствие тканеспецифичности. После выяснения месторасположения энхансерного домена 34S промотора, было проведено сравнение силы

промотора с одним энхансерным доменом и с двумя энхансерными доменами. Последние показали в четыре раза большую активность, чем 34S промотор с одним энхансерным доменом (Maiti et al., 1997).

Геном ВМН секвенирован и составляет 7743 п.н., в котором нумерация нуклеотидов идет с точки начала репликации вирусного генома, находящейся у

каулимовирусов непосредственно между большим межгенным спейсером и седьмой рамкой считывания. В результате проведенного промотор-делеционного анализа стало известно расположение основных регуляторных областей 34S промотора (Maiti et al., 1997; Sanger et al., 1990), представленных в таблице.

Таблица.

Основные регуляторные области 34S промотора

34S промотор и его основные регуляторные области	Расположение 34S промотора и регуляторных областей в геноме
Полноразмерный 34S промотор	6677-7003
Энхансерная область	6677-6885
ССАСТ-бокс	6843-6847
ТАТА-бокс	6896-6902
TGACG-бокс	6860-6864
-18+1 домен	6910-6930
Сайт инициации транскрипции	6900

При исследовании полногеномного промотора вируса мозаики ночной красавицы было выяснено, что для проявления наибольшей его активности достаточно 360 п.н. (от -297 до +63). Была доказана необходимость для экспрессии последовательности, расположенной за сайтом инициации транскрипции (от +33 до +63). При сравнительном анализе промотор ВМНК оказался сильнее, чем 35S промотор (Deu, Maiti, 1999).

Был также выделен и исследован промотор вируса, окаймляющего жилки земляники (Pattanaik et al., 2004). Существенным для проявления активности данного промотора оказался фрагмент размером 371 п.н. (от -352 до +19) (Pattanaik et al., 2004), хотя по данным других исследователей для проявления максимальной активности было достаточно даже 328 п.н. (Wang et al., 2000). Этот промотор показал 60%-ную гомологию с 35S промотором в ССАСТ и ТАТА-боксах (Wang et al., 2000).

Промотор вируса мозаики маниока показал высокий уровень экспрессии в вакуолях, листьях, корнях как двудольных, так и однодольных растений (Verdaguer et al., 1996). Этот промотор также оказался более сильным, чем 35S промотор (Samac et al., 2004). Для максимальной генной экспрессии необходима область от -443 до +72. Было показано, что нуклеотиды от -222 до -173 содержат цис-элементы, контролирующие экспрессию в зеленых тканях и в корнях. Результаты этих исследований показывают важность as-1 элемента и GATA мотива для экспрессии. Работа промотора в сосудистых элементах управляется областью, охватывающей нуклеотиды от -178 до -63. Элементы,

расположенные между нуклеотидами -149 и -63 активируют работу промотора в зеленых тканях.

Промотор вируса кольцевой гравировки гвоздики упоминается в трех работах английских исследователей (Holmberg et al., 2002; Jobling et al., 2002; Holmberg et al., 2003). Этими исследователями был клонирован промоторный участок ВКГГ размером 380 п.н. (6737-7118). Этот промотор был использован для проверки экспрессии гена стерол С-24 метилтрансферазы типа 1 в семенах табака. Был сконструирован вектор с промотором ВКГГ, геном и терминатором гена нопалинсинтазы. Использование этой конструкции позволило зафиксировать увеличение количества стеролов на 44% (Holmberg et al., 2002). Далее этот промотор был использован при исследовании иммуномодуляции ферментативной активности в растениях моноклональными антителами (Jobling et al., 2002). В третьей работе при помощи промотора ВКГГ было выяснено, что ферменты 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА редуктаза и С24-стеролметилтрансфераза типа 1 играют ключевую роль в обмене углерода через регуляцию биосинтеза стерола (Holmberg et al., 2003). Но в упомянутых работах исследователи не занимались изучением силы промотора, не проводили промотор-делеционный анализ, и использовали его лишь как инструмент для обеспечения высокого уровня экспрессии целевых генов.

Из упомянутых выше каулимовирусов полногеномный промотор исследован еще у вируса бледной пятнистости сои (Hasegawa et al., 1989). Размер данного промотора составляет 378 п.н.

Промотор вируса сои также показал отсутствие тканеспецифичности, конститутивность и силу сравнимую с 35S промотором.

Активно ведутся исследования и субгеномных промоторов каулимовирусов. Например, был проведен промотор-делеционный анализ субгеномного промотора ВМН (Bhattacharyya et al., 2002). Он показал в два раза большую силу, чем 35S промотор. При этом в двудольных растениях он оказался приблизительно в 25 раз сильнее, чем в однодольных растениях (Bhattacharyya et al., 2002).

Ввиду того, что “сила” 35S промотора иногда бывает недостаточной, кроме поисков новых промоторов, ведутся работы по созданию промоторов с двумя или более энхансерными доменами. Увеличение повторов энхансерного домена приводит к возрастанию силы промотора в несколько раз. Также создаются гибридные формы промоторов. Например, были получены гибриды 35S промотора и промотора маннопинсинтазы. Этот гибридный промотор показал уровень экспрессии в 3-5 раз больший в листьях и в 10-15 раз больший в корнях, чем 35S промотор с двумя энхансерными доменами (Comai et al., 1990).

В одной работе говорится о создании химерного промотора содержащего промоторный участок пшеничного гена альфа-амилазы и два энхансерных домена 35S промотора. Этот промотор показал высокую активность в протопластах и трансгенных растениях риса (Omirulleh et al., 1993).

Сконструированы также и промоторные каскады для высокоуровневой экспрессии генов (Mitsuhara et al., 1996). Для этих целей были применены 3 фрагмента 35S промотора:

1. Последовательность от -419 до -90 нуклеотида
2. Последовательность от -390 до -90 нуклеотида
3. Последовательность от -290 до -90 нуклеотида.

При конструировании химерных промоторов также были применены первый интрон гена запасного белка фасоли *Phaseolus vulgaris*, 5'-нетранслируемая область генома вируса табачной мозаики, терминатор 35S транскрипта и терминатор гена нопаинсинтазы. Эффективность этих химерных промоторов была проверена на протопластах двудольных (табак) и однодольных (рис) растений, где маркером служил ген глюкоуридазы (GUS). В протопластах табака показали активность только 1-й и 2-й фрагменты 35S

промотора, а в протопластах риса эту активность показали все 3 фрагмента. Также было показано, что терминатор 35S транскрипта более эффективен, чем терминатор нопаинсинтазы. В итоге оказалось, что самой эффективной для протопластов табака является конструкция, содержащая все элементы 35S промотора, 5'-нетранслируемую область генома вируса табачной мозаики и терминатор 35S транскрипта. А для протопластов риса было важно также добавление интрона гена фасоли. Но в любом случае, в протопластах табака уровень экспрессии был в несколько раз выше, чем в протопластах риса (Mitsuhara et al., 1996).

Получение сильных конститутивных промоторов является очень важным для генной инженерии растений. Несмотря на то, что промоторы многих каулимовирусов выделены и некоторые из них оказались сильнее 35S промотора, их “сила” оказалась недостаточной для некоторых целей (Mitsuhara et al., 1996). Использование одних и тех же промоторов может приводить к так называемому “молчанию” трансгена. Поэтому, наряду с поиском новых промоторов каулимовирусов, представляет интерес попытка искусственной молекулярной эволюции этих промоторов. Положительный эффект может иметь и создание химерных промоторов каулимовирусов. Эксперименты в этом направлении уже проводятся и привели к положительным результатам (Comai et al., 1990; Mitsuhara et al., 1996).

Нами были выделены и исследованы промоторы вируса мозаики георгина (ВМГ) и вируса кольцевой гравировки гвоздики (ВКГГ) (Кулуев и др., 2008). Методами ДНК-шаффлинга, ПЦР и рестрикции-лигирования получены гибридные формы промоторов вируса мозаики цветной капусты, вируса мозаики георгина и вируса кольцевой гравировки гвоздики в различных комбинациях. 12 гибридных промоторов были клонированы в бинарных векторах pCambia с репортерным геном *GUS* и флюориметрическим методом была определена их активность в трансгенных растениях табака. В качестве контроля были использованы 35S промотор, промотор ВМГ размером 442 п.н. и промоторы ВКГГ размером 371 и 501 п.н. 7 из анализируемых промоторов показали большую, а 7 меньшую, чем 35S промотор силу в трансгенных растениях табака. Наибольшую активность показал природный промотор ВМГ, а наименьшую природный промотор ВКГГ размером 501 п.н. (рис. 4).

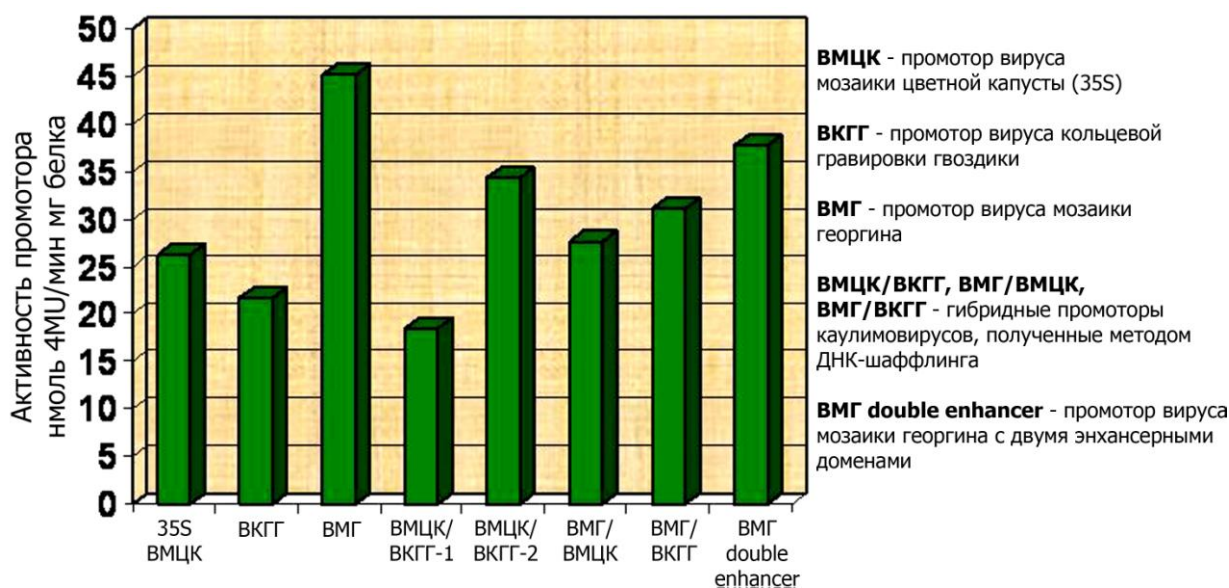


Рис. 4. Активность природных и гибридных форм промоторов каулимовирусов (Кулуев и др., 2010).

Активность промотора ВКГГ размером 371 п.н. оказалась примерно равной силе 35S промотора (Кулуев и др., 2010). Промотор вируса мозаики георгина был использован для получения трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *ARGOS Arabidopsis thaliana* (Кулуев и др., 2011). На данный момент промотор ВМГ клонирован в бинарные векторы pCambia 2301 и 1301. Ведутся работы по созданию различных трансгенных растений, в которых целевой ген находится под контролем промотора ВМГ. Особый интерес представляет получение трансгенных растений, экспрессирующих гены-регуляторы роста и развития растений под контролем различных промоторов каулимовирусов (Кулуев, 2011). Предполагается, что при этом могут быть получены трансгенные растения с увеличенными размерами органов.

Список литературы

1. Богунов Ю.В. Идентификация вируса мозаики георгина молекулярно-биологическими методами // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 184-185.
2. Черкасский Е.С. Адаптация вируса мозаики георгина к циннии и получение антисывороток для серологической диагностики // Доклады Академии наук СССР. 1965. Т. 165. № 3. С. 696 - 698.
3. Кулуев Б.Р., Чемерис А.В., Князев А.В. Активность промоторов вируса мозаики георгина и вируса кольцевой гравировки гвоздики в протопластах и трансгенных растениях табака // Физиология растений. 2008. Т.55. №5. С. 763-770.
4. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов и анализ их активности в трансгенных растениях // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 623-632.
5. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011. Т. 58. №3. С. 443-452.
6. Armour S.L., Melcher U., Pirone T.P., Lyttle D.J., Essenberg R.C. Helper component for aphid transmission by region II of CaMV DNA // Virology. 1983. V. 129. P. 25-30.
7. Aronen T., Hontola A., Laukkanen H., Haggman H. Seasonal changes in the transient expression of a 35S CaMV-GUS gene construct introduced into Scots pine buds // Tree Physiology. 1995. V. 15. P. 65-70.
8. Balazs E., Guilley H., Jonard G., Richards K. Nucleotide sequence of DNA from an altered-virulence isolate D/H of the cauliflower mosaic virus // Gene. 1982. V. 19. P. 239-249.
9. Benfey P.N., Ren L., Chua N.H. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains // EMBO. 1990. V. 9. P. 1685-1696.
10. Bhattacharyya S., Dey N., Maiti I.B. Analysis of cis-sequence of subgenomic transcript promoter from the Figwort mosaic virus and comparison of promoter activity with the cauliflower mosaic virus

- promoters in monocot and dicot cells // *Virus Research*. 2002. V. 90. P. 47-62.
11. Bhullar S., Chakravarthy S., Advani S., Datta S., Pental D., Burma P.K. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping // *Plant Physiology*. 2003. V. 132. P. 988-998.
 12. Boneville J.M., Sanfacon H., Futterer J., Hohn T. Post-transcriptional *trans*-activation in Cauliflower mosaic virus // *Cell*. 1989. V. 59. P. 1135-1153.
 13. Bouhida M., Lochart B., Olszewski N.E. An analysis of the complete sequence of a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice // *J. Gen. Virol.* 1993. V. 74. P. 15-22.
 14. Chang C., Chen T. Evolution of cytokine using DNA shuffling // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 793-797.
 15. Chenault K.D., Melcher U. Cauliflower mosaic virus isolate CMV-1 // *Plant Physiol.* - 1993. V. 101. P. 1395-1396.
 16. Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Lin C.C. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica* // *Am J Chin Med.* - 2003. V. 31, N 2. P. 225-234.
 17. Citovsky V., Knorr D., Zambryski P. Gene I, a potential cell-to-cell movement locus of CaMV, encodes an RNA-binding protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 2476-2480.
 18. Comai L., Moran P., Maslyar D. Novel and useful properties of chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements // *Plant Mol Biol.* 1990. V. 15. P. 373-381.
 19. De Mesa M.C., Santiago-Domenech N., Pliego-Alfago F., Quesada M.A., Mercado J.A. The CaMV 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 23. P. 32.
 20. De Kochko A., Verdaguer B., Taylor N., Carcamo R., Beachy R.N., Fauquet C. Cassava vein mosaic virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses // *Arch. Virol.* 1998. V. 143. P. 945-962.
 21. Dey N., Maiti I.B. Structure Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants // *Plant Mol. Biol.* 1999. V. 40. P. 771-782.
 22. Donson J., Hull R., Physical mapping and molecular cloning of caulimovirus DNA // *J. Gen. Virol.* 1983. V.64. P. 2281-2288.
 23. Drucker M., Froissart R., Hebrard E., Uzest M., Ravallec M., Esperandieu P., Mani J.-L., Pugniere M., Roquet F., Fereres A., Blanc S. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of CaMV acquisition by its aphid vector // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 2422-2427.
 24. Fang R., Wu X., Bu M., Tian Y., Cai F., Mang K. Complete nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus (Xinjiang isolate) genomic DNA // *Bing Du Xue Bao*. 1985. V. 1. P. 247-256.
 25. Fang R.X., Nagy F., Sivasubramaniam S., Chua N.H. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the CaMV 35S promoter in transgenic plants // *Plant Cell*. 1989. V. 1. P. 141-150.
 26. Fauquet M.C., Mayo M. A. Abbreviations for plant virus names // *Archives. Virology*. 1999. V. 144. P. 1249-1273.
 27. Franck A., Guilley H., Jonard G., Richards K., Hirth L. Nucleotide sequence of CaMV DNA // *Cell*. 1980. V. 21. P. 285-294.
 28. Franova-Honetslegrova J., Mraz I., Nebesárova J., Sip M. Preferential banding of secondary veins in strawberry is caused by mixed virus infection // *Acta Virol.* 1999. V. 43. P. 349-355.
 29. Futterer J., Gordon K., Pfeiffer P., Sanfacon H., Pisan B., Bonneville J.-M., Hohn T. Differential inhibition of downstream gene expression by the CaMV 35S RNA leader // *Virus Genes*. 1989. V. 3. P. 45-55.
 30. Futterer J., Gordon K., Sanfacon H., Bonneville J.-M., Hohn T. Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 1697-1707.
 31. Futterer J., Hohn T. Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the CaMV transactivator protein // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 3887-3896.
 32. Futterer J., Kiss-Laszlo Z., Hohn T. Nonlinear ribosome migration on CaMV 35S RNA // *Cell*. 1993. V. 73. P. 789-802.
 33. Gardner R. C., Howarth A. J., Hahn P., Brown-Luedi M., Shepherd R.J., Messing J. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing // *Nucl. Acids Res.* 1981. V 9. P. 2871-2888.
 34. Givord L., Xiong C., Giband M., Koenig I., Hohn T., Lebeurier G., Hirth L. A second CaMV gene product influences the structure of the viral inclusion body // *EMBO J.* 1984. V. 3. P. 1423-1427.
 35. Glasheen B.M., Polashock J.J., Lawrence D.M. et al. Cloning, sequencing, and promoter identification of Blueberry red ringspot virus, a member of the family Caulimoviridae with similarities to the "Soybean chlorotic mottle-like"

- genus // *Archives Virology*. 2002. V. 147. P. 2169-2186.
36. Gowda S., Wu F.C., Scholthof H.B., Shepherd R.J. Gene VI of figwort mosaic virus (caulimovirus group) functions in posttranscriptional expression of genes on the full-length RNA transcript // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 9203-9207.
 37. Haas M., Bureau M., Geldreich A., Yot P., Keller M. Cauliflower mosaic virus: still in the news // *Molecular Plant Pathology*. 2002. V. 3. P. 419-429.
 38. Hagen L.S., Jacquemond M., Lepingle A., Lot H., Tepfer M. Nucleotide sequence and genomic organization of cacao swollen shoot virus // *Virology*. 1993. V. 196. P. 619-628.
 39. Hasegawa A., Verver J., Shimada A., Saito M., Goldbach R., Van Kammen A., Miki K., Kameya-Iwaki M., Hibi T. The complete sequence of soybean chlorotic mottle virus DNA and the identification of a novel promoter // *Nucl. Acids Res*. 1989. V. 17. P. 9993-10013.
 40. Hauber L. Nuclear export mediated by the Rev/Rex class of retroviral trans-activator proteins // *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2001. V. 259. P. 55-76.
 41. Hay J.M., Lones M.C., Blakebrough M.L., Dasgupta I., Davies J.W., Hull R. An analysis of the sequence of an infectious clone of rice tungro bacilliform virus, a plant pararetrovirus // *Nucl. Acids Res*. 1991. V. 19. P. 2615-2621.
 42. Hegedus K., Palcovics L., Toth E.K., Dallmann G., Balazs E. The DNA form of a retroviroid-like element characterized in cultivated carnation species // *J. Gen. Virol*. 2001. V. 82. P. 687-691.
 43. Hemmings-Mieszszak M., Steger G., Hohn T. Regulation of CaMV 35S RNA translation is mediated by a stable hairpin in the leader // *RNA*. 1998. V. 4. P. 101-111.
 44. Hemmings-Mieszszak M., Hohn T., Preiss T. Termination and peptide release at the upstream open reading frame are required for downstream translation on synthetic shunt-competent mRNA leaders // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 6212-6223.
 45. Hitchborn J.H., Hills G.J., Hull R. Electron microscopy of viruslike particles found in diseased *Plantago lanceolata* in Britain // *Virology*. 1966. V. 28. P. 768-772.
 46. Hohn T., Hohn B., Pfeiffer P. Reverse transcription in CaMV // *Trends Biol. Sci*. 1985. V. 8. P. 205-209.
 47. Holmberg N., Harker M., Gibbard C.L., Wallace A.D., Clayton J.C., Rawlins S., Hellyer A., Safford R. Sterol C-24 Methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed // *Plant Physiol*. 2002. V. 130. P. 303-311.
 48. Holmberg N., Harker M., Wallace A.D., Clayton J.C., Gibbard C.L., Safford R. Co-expression of N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and C24-sterol methyltransferase type 1 in transgenic tobacco enhances carbon flux towards end-product sterols // *Plant J*. 2003. V. 36. P. 12-20.
 49. Hull R., Sadler J., Longstaff M. The sequence of carnation etched ring virus DNA comparison with CaMV and retroviruses // *EMBO J*. 1986. V. 5. P. 3083-3090.
 50. Hull R. Genome organization of retroviruses and retroelements: evolutionary considerations and implications // *Semin Virol*. 1992. V. 3. P. 372-382.
 51. Hull R. Molecular biology of rice tungro viruses // *Annu. Rev. Phytopatol*. 1996. V. 34. P. 275-297.
 52. Hwang D. S., Yoo H.J., Jun J.H., Moon W.K., Cha H.J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein mgfp-5 in *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol*. 2004. V. 70. P. 3352-3359.
 53. Jobling S.A., Jarman C., Teh M.M., Holmberg N., Blake C., Verhoeven M.E. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments // *Nature Biotech*. 2002. V. 21. P. 77-80.
 54. Jupin I., Chua N.H. Activation of the CaMV as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a // *EMBO J*. 1996. V. 15. P. 5679-5689.
 55. Kano H., Koizumi M., Noda H., Hibino H., Ishikawa K., Omura T., Cabautan P.Q., Koganazawa H. Nucleotide sequence of capsid protein of rice tungro bacilliform virus // *Arch. Virol*. 1992. V. 124. P. 157-163.
 56. Kiss-Laszlo., Blanc S., Hohn T. Splicing of cauliflower mosaic virus 35S RNA is essential for viral infectivity // *EMBO J*. 1995. V. 14. P. 3552-3562.
 57. Lam E., Benfey P.N., Gilmartin P.M., Fang R.-X., Chua N.-H. Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 7890-7894.
 58. Lam E. Analysis of tissue-specific elements in the CaMV 35S promoter // *Results Problems Cell Differentiation*. 1994. V. 20. P. 181-196.
 59. Leclerc D., Burri L., Kajava A.V. Mougeot J.-L., Hess D., Lustig A., Kleemann G., Hohn T. The open reading frame III product of cauliflower mosaic virus forms a tetramer through a N—

- terminal coiled-coil // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 29015-29021.
60. Leh V., Jacquot E., Geldreich A., Hermann A., Leclerc D., Cerutti M., Yot P., Keller M., Blanc S. Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 7077-7085.
 61. Lochart B.E. Evidence for a double-stranded circular genome in a second group of plant viruses // *Phytopathology.* 1990. V. 80. P. 127-131.
 62. Lockhart B.E., Menke J., Dahai G., Olszewski N.E. Characterization and genomic analysis of tobacco vein clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome // *Journal of General Virology.* 2000. V. 81. P. 1579-1585.
 63. Mahmoudpour A. Infectivity of recombinant strawberry vein banding virus DNA // *J. Gen. Virol.* 2003. V. 84. P. 1377-1381.
 64. Maiti I.B., Gowda S., Kiernan J., Ghosh S.K. Shepherd R.J. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (Flt) promoter containing single or double enhancer domains // *Transg. Research.* 1997. V. 6. P. 143-156.
 65. Martinez-Izquierdo J., Futterer J., Hohn T. Protein encoded by ORF I of cauliflower mosaic virus is part of the viral inclusion body // *Virology.* 1987. V. 160. P. 527-530.
 66. Medberry S.L., Lochart B.E., Olszewski N.O. Properties of Commelina yellow mottle virus's complete DNA sequence, genome discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5505-5513.
 67. Menissier J., de Murcia G., Lebeurier G., Hirth L. Electron microscopic studies of the different topological forms of the cauliflower mosaic virus DNA: knotted encapsidated DNA and nuclear minichromosome // *EMBO J.* 1983. V. 2. P. 1067-1071.
 68. Mitsuhashi I., Ugaki M., Hirochika H. Efficient promoter cassettes for enhancer expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants // *Plant Cell Physiol.* 1996. V. 37. P. 49-59.
 69. Mougéot J.L., Guidasci T., Wurch T., Lebeurier G., Menard J.M. Identification of C-terminal amino acid residues of cauliflower mosaic virus open reading frame III protein responsible for its DNA binding activity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 1470-1473.
 70. Mraz I., Franova-Honetslegrova J., Sip M. Diagnosis of strawberry vein banding virus by a non-radioactive probe // *Acta Virol.* 1996. V. 40. P. 139-141.
 71. Mraz I., Petrzik K., Franova-Honetslegrova J., Sip M. Detection of strawberry vein banding virus by polymerase chain reaction and dot blot hybridization // *Acta Virol.* 1997. V. 41. P. 241-242.
 72. Nicolaisen M. Partial molecular characterization of dahlia mosaic virus and its detection by PCR // *Plant Disease.* 2003. V. 87. P. 945-948.
 73. Noad R.J., Turner D.S., Covey S.N. Expression of functional elements inserted into the 35S promoter region of infectious cauliflower mosaic virus replicons // *Nucl. Acids Res.* - 1997. V. 25. P. 1123-1129.
 74. Odell J.T., Nagy F., Chua N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Nature.* 1985. V. 313. P. 810-812.
 75. Omirulleh S., Abraham M., Golovkin M., Stefanov I., Karabaev M.K., Mustardy L., Morocz S., Dubits D. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. P. 415-428.
 76. Palacios I., Drucker M., Blanc S., Leite S., Moreno A., Fereres A. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 3163-3171.
 77. Pappu H.R., Wyatt S.D., Druffel K.L. Dahlia mosaic virus: molecular detection and distribution in Dahlia in the United States // *HortScience.* 2005. V. 40. P. 697-699.
 78. Pattanaik S., Dey N., Bhattacharyya S., Maiti I. Isolation of full-length transcript promoter from the strawberry vein banding virus (SVBV) and expression analysis by protoplasts transient assays and in transgenic plants // *Plant Science.* 2004. V. 167. P. 427-438.
 79. Pauli S., Rothnie H.M., Chen G., He X., Hohn T. The cauliflower mosaic virus extends into the transcribed region // *Virology.* 2004. V. 78. P. 12120-12128.
 80. Perbal M.-C., Thomas C.L., Maule A.J. Cauliflower mosaic virus gene I product (PI) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts // *Virology.* 1993. V. 195. P. 281-285.
 81. Petrzik K., Benes V., Mraz I., Honetslegrova-Franova J., Ansoorge W., Spak J. Strawberry vein banding virus – definitive member of the genus caulimovirus // *Virus Genes.* 1998a. V. 16. P. 303-305.

82. Petrzik K., Mraz I., Dulic-Marcovic I. Quarantine strawberry vein banding virus firstly detected in Slovakia and Serbia // *Acta Virol.* 1998b. V. 42. P. 87-89.
83. Plant A.L., Covey S.N., Grierson D. Detection of a subgenomic mRNA for gene V, the putative reverse transcriptase gene of cauliflower mosaic virus // *Nucleic Acids Research.* 1985. V. 13. P. 8305-8321.
84. Pooggin M.M., Futterer J., Skryabin G., Hohn T. A short open reading terminating in front of a stable hairpin is the feature in pregenomic RNA leaders of plants pararetroviruses // *J. Gen. Virol.* 1999. V. 80. P. 2217-2228.
85. Pooggin M., Hohn T., Futterer J. Role of a short open reading frame in ribosome shunt on the cauliflower mosaic virus RNA leader // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 17288-17296.
86. Powell S.K., Kallos M.A., Pinkstaff A. Breeding of retroviruses for improved stability and processing yields // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. P. 1279-1282.
87. Qu R., Bhattacharyya M., Laco G., de Kochko A., Subba Rao B.L., Kaniewska M., Elmer J.S., Rochester D.E., Smith C.E., Beachy R.N. Characterization of the genome of rice tungro bacilliform virus: comparison with commelina yellow mottle virus and caulimoviruses // *Virology.* 1991. V. 185. P. 354-364.
88. Raikhy G., Hallan V., Kulshrestha S., Lal Sharma M., Ram R., Zaidi A.A. Molecular characterization of carnation etched ring virus isolate from India // *Acta Virol.* 2003. V. 47. P. 105-111.
89. Raikhy G., Hallan V., Kulshrestha S., Ram R., Zaidi A.A. Complete nucleotide sequence of an Indian isolate of carnation etched ring virus and its homology with other caulimoviruses // *Current Science.* 2006. V. 90. P. 176-186.
90. Reddy D.V.R., Richins R.D., Rajeshwari R., Lizuka N., Manohar S.K., Shepherd R.J. Peanut chlorotic streak virus, a new caulimovirus infecting peanuts (*Arachis hypogaea*) in India // *Phytopathology.* 1993. V. 83. P. 129-133.
91. Richert-Poggeler K.R., Noreen F., Schwarzacher T., et al. Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia // *EMBO J.* - 2003. V. 22. P. 4836-4845.
92. Richins R.D., Shepherd R.J. Physical maps of the genomes of Dahlia mosaic virus and Mirabilis mosaic virus – two members of the caulimovirus group // *Virology.* 1983. V. 124. P. 208-214.
93. Richins R D, Shepherd R.J. Horseradish latent virus, a new member of the caulimovirus group // *Phytopathology.* 1986. V. 76. P. 749-754.
94. Richins R.D., Scholthof H.B., Shepherd R.J. Sequence of figwort mosaic dirus DNA (caulimovirus group) // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. P. 8451-8465.
95. Samac D.A., Tesfaye M., Dornbusch M., Saruul P., Temple S.J. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*) // *Transgenic Research.* 2004. V. 13. P. 349-361.
96. Sanders P.R., Winter J.A., Barnason A.R. Rogers S.G., Fraley R.T. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants // *Nucleic Acids Research.* 1987. V. 14. P. 1543-1558.
97. Sanger M., Daubert S., Goodman R.M. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and regulated mannopine synthase promoter // *Plant Molecular Biology.* 1990. V. 14. P. 433-443.
98. Schmidt I., Blanc S., Esperandieu P., Kuhl G., Devauchelle G., Louis C., Cerutti M. Interaction between the aphid transmission factor and virus particles is a part of the molecular mechanism of cauliflower mosaic virus aphid transmission // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 8885-8889.
99. Scholthof H.B., Gowda S., Wu F.C., Shepherd R.J. The full-length transcript of a caulimovirus is a polycistronic mRNA whose genes are trans activated by the product of gene VI // *J. Virol.* 1992. V. 66. P. 3131-3139.
100. Stavalone L., Ragozzino A., Hohn T. Characterization of Cestrum yellow leaf curling virus: a new member of the family Caulimoviridae // *J. Gen. Virol.* 2003. V. 84. P. 3459 - 3464.
101. Sunilkumar G., Mohr L., Lopata-Finch E., Emami C., Rathore K.S. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP // *Plant Mol Biol.* 2002. V. 50. P. 463-474.
102. Takemoto Y., Hibi T. Genes Ia, II, III, IV and V of Soybean Chlorotic mottle virus are essential but the gene Ib product is non-essential for systemic infection // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 1481-1489.
103. Thompson J.R., Leone G., Lindner L.J., Jelkman W., Schoen C.D. Characterization and complete nucleotide sequence of strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 229-239.
104. Thompson J.R., Wetzel S., Klerks M.M., Vaskova D., Schoen C.D., Jelkmann W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in

- Fragaria spp.* In combination with a plant mRNA specific internal control // J. Virol. Methods. - 2003. - V. 111, N 2. - P. 85-93.
105. Turner D.S., McCallum D.G., Covey S.N. Roles of the promoter and multiple overlapping domains in the pathogenicity of the pararetrovirus cauliflower mosaic virus // J. Virol. 1996. V. 70. P. 4514-4521.
106. Van der Fits L., Memelink J. Comparison of the activities of CaMV 35S and FMV 34S promoter derivatives in *Catharantus roseus* cells transiently and stably transformed by particle bombardment // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 943-946.
107. Verdaguer B., de Kochko A., Beachy R.N., Fauquet C. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. P. 1129-1139.
108. Wang Y., Gaba V., Wolf D., Xia X.D., Zelcer A., Gal-On A. Identification of a novel plant promoter using a potyvirus infectious clone // Virus Genes. 2000. V. 20. P. 11-17.

CAULIMOVIRUSES AND THEIR PROMOTERS

Kuluev B.R.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of the Russian Academy of Sciences,
Russia, Republic of Bashkortostan, Ufa, kuluev@bk.ru

The classification, distribution, structure and reproduction of the genome, as well as ways to spread caulimoviruses. This group of plant DNA viruses is of great interest due to the presence of the genome of a strong constitutive promoter, which is widely used in plant biotechnology to improve the expression level of target genes. So much attention being paid to the full-length transcript and subgenomic transcript promoters of caulimoviruses. The most famous was the 35S promoter of cauliflower mosaic virus. Promoters are active in research and other caulimoviruses. As part of our research have been identified and investigated promoters of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus and also created their hybrid forms.

Keywords: pararetroviruses, caulimoviruses, cauliflower mosaic virus, dahlia mosaic virus, 35S promoter.