

# **Lucerna hiszton H3 gén szabályozó régióinak vizsgálata transzgénikus növényekben**

**Készítette: Kelemen Zsolt**

**Témavezetők:  
Dr. Györgyey János  
Professzor Dr. Dudits Dénes**

**Növénybiológiai Intézet  
MTA Szegedi Biológiai Központ**

**2002**

# Tartalomjegyzék

<b>Tartalomjegyzék</b>	<b>2</b>
<b>Gyakrabban előforduló rövidítések</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés</b>	<b>5</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	<b>7</b>
<b>A hiszton gének kifejeződése állati sejtekben</b>	<b>7</b>
<b>A növényi hiszton gének kifejeződése</b>	<b>8</b>
Sejtosztódáshoz kapcsolt hiszton gén kifejeződés növényekben	8
A sejtciklus S-fázisához kapcsolódó hiszton gén kifejeződés	9
Replikációtól független hiszton gén kifejeződés	10
<b>A hiszton gének kifejeződésének szabályozása a transzkripció szintjén</b>	<b>11</b>
Promóter aktivitás merisztémában és S-fázisban	11
A növényi hiszton gének expressziójában szerepet játszó <i>cisz</i> -elemek	12
A különböző <i>cisz</i> elemek együttműködése	15
Az I-es típusú elemek	15
II-es típusú elemek	16
III-as típusú elemek	17
Nona, CCGTC és szóló-Oct; modulátor elemek	18
<b>Poszttranszkripcionális szintű szabályozás</b>	<b>18</b>
<b>A növényi hiszton gének transzkripcionális regulációjának modellje</b>	<b>19</b>
<b>3. Előzmények és célkitűzés</b>	<b>21</b>
<b>4. Anyagok és módszerek</b>	<b>24</b>
<b>Molekuláris biológiai és biokémiai technológiák</b>	<b>24</b>
Baktériumos tápoldatok, törzsek és vektorok	24
Plazmid konstrukciók készítése	24
Plazmid DNS izolálás	26
Emésztés restrikciós enzimekkel	26
A nukleinsavak elektroforézise	26
PCR amplifikáció	26
Össz-RNS analízis	27
Fluorimetrikus GUS aktivitás mérés	27
Hisztokémiai GUS festés	28
<b>Szövettenyésztés</b>	<b>28</b>
<b>5. Eredmények</b>	<b>30</b>
<b>Az izolált lucerna hiszton H3.2 promóter erős, konstitutív kifejeződést biztosít a riporter génnek</b>	<b>30</b>
<b>A lucerna H3.2 gén első, CT-gazdag intronjának hatása a riporter gén működésére lucerna A2-es protoplasztokban</b>	<b>33</b>
<b>A lucerna H3.2 gén első, CT-gazdag intronjával kiegészített H3.2 promóter és a virális CaMV 35S promóter működésének összehasonlítása transzgenikus dohány növényekben</b>	<b>34</b>

<b>CT-gazdag szekvencia elemek hatása az merisztéma-specifikus kifejeződésű lucerna hiszton H3.1 promóter működésére</b>	<b>38</b>
<b>6. <i>Eredmények megvitatása</i></b>	<b>42</b>
<b>7. <i>Eredmények összefoglalása</i></b>	<b>51</b>
<b><i>Köszönetnyilvánítás</i></b>	<b>52</b>
<b><i>Summary</i></b>	<b>53</b>
<b><i>Referenciák</i></b>	<b>58</b>

## Gyakrabban előforduló rövidítések

GUS	$\beta$ -glükuronidáz riporter gén
PPY/PPU	polipirimidin/polipurin
rHIS gén	kicserélődési (replacement) hiszton gén
DNS	dezoxiribonukleinsav
RNS	ribonukleinsav
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
S-fázis	a DNS szintézis fázisa a sejtciklusban
HEX-N::GUS, HEXd::GUS, HEX110::GUS, HEX111::GUS, 2CT::GUS, 4CT::GUS, 6CT::GUS, H3.1::GUS	a kísérletekben felhasznált expressziós kazetták elnevezései
pHEX-N::GUS, pHEXd::GUS, pHEX110::GUS, pHEX111::GUS, p2CT::GUS, p4CT::GUS, p6CT::GUS, pH3.1::GUS	általános klónozó vektorban (pUC19, Biolabs) elhelyezkedő expressziós kazetták
pBHEX-N::GUS, pBHEXd::GUS, pBHEX110::GUS, pBHEX111::GUS, pB2CT::GUS, pB4CT::GUS, pB6CT::GUS, pBH3.1::GUS	un. bináris vektorban (pBIN19, Bevan, 1984) elhelyezkedő expressziós kazetták

## 1. Bevezetés

Az eukarióta sejt genomja a membránnal határolt sejtmagban helyezkedik el. A genomalkotó DNS kromoszómális méretű lineáris kettőshélix, és ún. nukleoszómaképző fehérjékkel, a hisztonokkal specifikus dezoxiribonukleoprotein (DNP) komplexet alkot. A hisztonok kis molekulatömegű, 100-200 aminosavból felépülő, erősen bázikus fehérjék. Meglehetősen konzervatív szekvenciák, ami azt jelenti, hogy aminosav-sorrendjük az evolúcióban alig változik. A DNP ötféle hisztonból épül fel: H1, H2A, H2B, H3 és H4.

Állati sejtekben a hiszton fehérjék szintézise számos szinten, komplex mechanizmusok útján szabályozott. A tipikus, replikációtól függő kifejeződést mutató hiszton gének kivételesnek számítanak abban a tekintetben, hogy nem tartalmaznak intront, és nem poliadenilált mRNS-sé íródnak át (Chaubet és Gigot, 1998). A megfelelő hiszton fehérjemennyiség több szinten szabályozott: a transzkripció elindítása, a pre-mRNS érése, és az érett mRNS lebomlása szintjén. A transzkripcionális szabályozásban részt vevő pozitív és negatív elemeket számos emberi és a két élesztő (H2A és H2B) hiszton génben kimutatták (Osley, 1991). Ezek az elemek önmagukban elégségesek a sejtciklusspecifikus kifejeződés biztosításához, de az alapállapothoz képest csak körülbelül ötszörös erősödést biztosítanak az S-fázis során. Az mRNS 3' nemkódoló régiójában található jellemző hajtű-szerű struktúra az RNS érésének és féléletidejének befolyásolásával a hiszton fehérje mennyiségnek további 5-10 szerez növekedését biztosítja az S fázisban (Birnstiel és mtsai, 1985).

A növények esetében a merisztéma-specifikus hiszton gének poliadenilált mRNS-sé íródnak át, hosszú 3' nemkódoló régióval, melyben nem található meg az állati hiszton génekre jellemző hajtű szerkezet. Ez arra utal, hogy a növényi hiszton gének kifejeződésének szabályozása alapvetően transzkripciós szinten történhet (Chaboute és mtsai, 1986; Wu és mtsai, 1989).

A sejtciklus függő variánsok kivül a hiszton géneknek állatokban és növényekben egyaránt létezik egy másik csoportja, melyek konstitutívan fejeződnek ki, poliadenilált mRNS-sé íródnak át, intronokat tartalmaznak (Kapros és mtsai, 1992; Robertson és mtsai, 1996). Transzkripció alkalmával az átíródott szekvenciák elveszítik nukleoszómaikat, újraszerveződésükben a konstitutív hiszton gének

fehérje termékei vesznek részt. Mivel erre a hiszton variánsra cserélődik ki az S-fázis specifikus géntermék, az azt kódoló géneket összefoglaló néven kicserélődési (replacement, rHis) hiszton géneknek nevezzük.

A lucerna haploid genom három kicserélődési hiszton H3 gént tartalmaz (Robertson és mtsai, 1996). Ez a három gén a logaritmusos növekedés fázisában levő lucerna sejtszuszpenzióban kétszer annyi hiszton fehérjét termel, mint a több, mint ötven sejtciklus-függő kifejeződésű hiszton H3 gén összesen (Waterborg, 1993; Wu és mtsai, 1989).

Valamennyi ismert növényi hiszton gén promóterében, függetlenül azok kifejeződési mintázatától, hasonló elemek találhatóak (Chaubet és mtsai, 1992; Robertson és mtsai, 1997), de egyik sem tűnik felelősnek az rHis gének konstitutív kifejeződéséért. Felmerül tehát a kérdés, hogy melyek azok a további szabályozó elemek, amelyek ezt a magas szintű, sejtosztódási állapottól független kifejeződést biztosítják. A lucerna hiszton H3.2 gének 5' nem transzlálódó régiójában és intronjaiban nagy mennyiségben fordulnak elő polipirimidin/polipurin-gazdag szekvenciák (PPY/PPU), melyek nem gyakoriak a sejtciklus-függő hiszton H3 génekben (Robertson és mtsai, 1996). Feltételezhető, hogy ezek azok az elemek, amelyek, ha nem is kizárólagosan, de szükségesek a magas szintű, konstitutív kifejeződés biztosításához.

Ennek az érdekes és fontos szabályozással összefüggő kérdésnek a tanulmányozásához laboratóriumunkban megvannak a feltételei, amelyeket jól kiegészít eredményes együttműködésünk Jakob H. Waterborg és Kapros Tamás munkacsoportjával (University of Missouri-Kansas City, Kansas City, USA).

A rekombináns DNS módszerek és a hatékony transzformáció különösen kedvező lehetőséget kínál e biológiai probléma tanulmányozásához.

A génkifejeződés szabályozásában fellelhető törvényszerűségek megismerésén túl az előállított vektorkonstrukciók széleskörűen felhasználhatók idegen gének magas szintű kifejeztetésére transzgenikus növényekben. Ez külön jelentőséggel bír, ha el kívánjuk kerülni a virális DNS-ek használatát a géntechnológiával történő növénynevelés során.

## 2. Irodalmi áttekintés

A sejtciklus szabályozásának alapmechanizmusai az eukarióta rendszerekben nagyfokú konzerváltságot mutatnak. Az utóbbi időben jelentős erőfeszítések történtek a sejtosztódási folyamatok megértésére. A sejtciklus egyik ellenőrző pontja a G1/S fázis határán van, ez az átmeneti pont nagyon fontos a sejtciklus szabályos működése szempontjából. Itt fehérjék nagy tömegére van szükség a tökéletes működéshez (Doonan és mtsai, 1997; Dudits és mtsai, 1998). Ezen fehérjék legnagyobb tömegét a hiszton fehérjék adják, melyeknek intenzív szintézise szükséges a sejtciklus S-fázisában, és amelyek a megfelelő kromatinszerkezet létrehozásában játszanak szerepet. Ezeket a fehérjéket öt alcsaládba soroljuk: a négy „core” hiszton H2A, H2B, H3 és H4, amelyek a kromoszómális DNS-sel a nukleoszómat hozzák létre és az úgynevezett „linker” hiszton H1 fehérje, amely a nukleoszóman kívül kapcsolódik a DNS-hez, és a nukleoszóma magasabb szintű bepakolódásáért felelős (Wolffe, 1995; Crane-Robinson, 1997).

### ***A hiszton gének kifejeződése állati sejtekben***

Állati sejtekben a hiszton fehérjék bioszintézise különböző szinteken szabályozott. A replikáció-függő hiszton gének a II családba tartoznak, intront nem tartalmaznak, a transzkripció útján képződött mRNS-ük nem poliadenált. A fehérje termelődése három különböző módon szabályozott: a transzkripció megindítása, a pre-mRNS módosítása és az érett mRNS lebomlása szintjén (Chaubet és Gigot, 1998). Állati hiszton gének promóter régióiban kimutattak olyan pozitív elemeket, amelyek a transzkripció szabályozásban vesznek részt (Heintz, 1991; Osley, 1991), ezenkívül pozitív és negatív elemek találhatóak az élesztő hiszton H2A és H2B gének promóter régióiban (Osley, 1991). A *cis*-elemek jelenléte általában elég ahhoz, hogy a gének sejtciklus függő expresszióját biztosítsa, bár az S-fázisban az expresszió növekedése csak körülbelül 5-szörös mint az alapállapotban. Az mRNS szint növekedéshez ezenkívül még hozzájárul az mRNS módosítása és az mRNS féléletidejének növekedése. Az mRNS 3' nemátíródo végén jellegzetes hajtúhurok

szerkezet alakul ki. Ezek a tényezők még további 5-10-szeres növekedést jelentenek az S-fázisban a hiszton mRNS-ek akkumulációját tekintve (Birnstiel és mtsai, 1985).

Ismert, hogy a replikáció-függő hiszton gének mellett létezik a hiszton gének egy kisebb családja is, amelyek konstitutív módon és alacsony szinten íródnak át. Ők az úgynevezett kicserélődési (replacement) hiszton fehérjéket kódolják melyek a nem osztódó szövetekben halmozódnak fel. Ezek a gének felépítésükben hasonlítanak az eukarióta gének alaptípusához, általában a gén intront tartalmaz és a génről keletkezett mRNS poliadenált. Ezenkívül megkülönböztetnek még fejlődés- illetve szövetspecifikus kifejeződésű hiszton géneket (Meshi és mtsai, 2000).

### ***A növényi hiszton gének kifejeződése***

A növényi hiszton gének többszörösen különböznek az állati hiszton génektől. Míg az állati hiszton gének általában egy bizonyos kromoszóma területen csoportosulnak, addig a növényi hiszton gének a kromoszómán különböző helyeken szétszóródva egy-egy multigén család tagjaiként helyezkednek el. A második jelentős különbség az, hogy az állati, replikációtól-független hiszton génekhez hasonlóan, a transzkripció során hosszú 3' nem transzlálódó régiót tartalmazó, poliadeniált mRNS-ek képződnek (Chaboute és mtsai, 1986; Wu és mtsai, 1989). A mRNS-ben nem található meg az állati replikáció-függő hiszton génekre jellemző palindromikus szerkezet. A növényi hiszton fehérjék mennyisége az állatiaktól eltérően, alapvetően transzkripcionális szinten szabályozott. Ezért a funkcionális vizsgálatok elsősorban promóter analízisen alapulhattak.

### **Sejtosztódáshoz kapcsolt hiszton gén kifejeződés növényekben**

A *northern* hibridizációs kísérletek (Minami és mtsai, 1993; Sundás és mtsai, 1993; Brandstadter és mtsai, 1994; Jayawardene és Riggs, 1994; Huh és mtsai, 1995; Szekeres és mtsai, 1995; Woo és mtsai 1995 és Kanazin és mtsai, 1996) és az *in situ* hibridizációs eredmények (Köhler és mtsai, 1992; Fleming és mtsai, 1993; Sundás és mtsai, 1993; Tanimoto és mtsai, 1993; Brandstadter és mtsai, 1994 és Sundás és Engström, 1995) azt mutatják, hogy a hiszton gének főleg a



merisztémákban és a osztódó sejtekben gazdag szövetekben működnek, mint például a gyökér-, és hajtáscsúcsban, a fiatal levelekben, a sziklevéiben, a szállítószövetekben, a bimbóban, az embrióban és a kallusz sejtekben. A hiszton gének expressziós mintázata több kísérletben jelentős mértékű egybeesést mutatott a DNS szintézis mintázatával. A kukorica embrió DNS szintézise és a hiszton mRNS akkumulációja a fejlődés korai szakaszában (csírázás után 5 napig) erőteljes időbeni egybeesést mutatott (Brignon és Chaubet, 1993). A búza embrió analízise alapján a csírázás után 1,5 nappal a hiszton mRNS-ek szintjének változása egybeesett a DNS szintézis változásával, a hiszton H1 mRNS kivételével, amelynek a felhalmozódása a csírázás kezdete után pár órával csökkent (Minami és mtsai, 1993). Hasonló csökkenés tapasztalható a búza egyes hiszton H2A mRNS-einek szintjében (Huh és mtsai, 1995).

A szuszpenziós kultúrákban a hiszton mRNS-ek magas transzkripciós szintje tapasztalható az intenzív növekedés szakaszában és alacsony szint a stacionális fázisban (Callard és Mazzolini, 1997). Amikor szuszpenziós kultúrát hidroxipreúrával (HU) kezelték, amely a ribonukleotid reduktáz inhibitora, a hiszton mRNS szint a háttér értékére csökkent, miközben a növekedés késlekedése is tapasztalható volt (Atanassova és mtsai, 1998). Mezofill protoplasztok megfelelő, auxinnal és citokininnel kiegészített tápoldatban való tenyésztésének vizsgálata hasonló módon alátámasztotta, hogy kapcsolat létezik a hiszton mRNS-ek felhalmozódása és a DNS szintézis között (Kaprocs és mtsai, 1992, 1993; Atanassova és mtsai, 1998).

## **A sejtciklus S-fázisához kapcsolódó hiszton gén kifejeződés**

Az *in situ* hibridizációs analízisek azt mutatják, hogy a hiszton mRNS-ek a merisztémákban foltos mintázatot adnak, ami arra utal, hogy ezek az RNS-ek korlátozott ideig vannak jelen a sejtciklus során (Fleming és mtsai, 1993; Tanimoto és mtsai, 1993; Fobert és mtsai, 1994; Kouchi és mtsai, 1995 és Sundás és Engström, 1995). A részletesebb analízis érdekében olyan homogén sejt kultúrát kell létrehozni, ami legalább részlegesen szinkronizálható. Dohányból (Taoka és mtsai, 1999), rizsből (Taoka és mtsai, 1998), lucernából (Kaprocs és mtsai, 1992, 1993, 1995) és *Arabidopsis*-ből (Callard és Mazzolini, 1997) készült szuszpenziós kultúra ilyen céllal. A dohány BY2 sejt szuszpenzióval kapott szinkronizálási eredmények

kiemelkedően hatékonyak bizonyultak. Aphidicolint használva, amely a DNS-polimeráz inhibitora és a sejteket a G1/S fázis határán gátolja, az tapasztalható, hogy a drog eltávolítása után a hiszton mRNS szintje a DNS szintézissel öszhangban változik és a génexpresszió magas szintje tapasztalható a sejtciklus S-fázisában, azonban más fázisokban, főleg a G2/M fázis határán az expressziós szint nagy mértékben lecsökken (Mikami és Iwabuchi, 1993 és Reichheld és mtsai, 1995, 1998).

### **Replikációtól független hiszton gén kifejeződés**

Hiszton mRNS-ek felhalmozódása olyan szövetekben is megfigyelhető amelyek proliferatív aktivitása alacsony esetleg azokban a sejtekben is, amelyek nem osztódnak (Raghaven, 1989; Raghaven és Olmedilla, 1989; Chaubet és mtsai, 1991, 1992; Koning és mtsai, 1991; Razafimahatratra és mtsai, 1991; Joanin és mtsai, 1992; Kapros és mtsai, 1992; Huh és mtsai, 1995; Kanazin és mtsai, 1996 és van den Heuvel és mtsai, 1999). Az ilyen típusú hiszton gének külön családot alkotnak expressziójukról elmondhatjuk, hogy a fejlődés szabályozása alatt állnak és főként a reproduktív szervekben működnek.

A nukleoszóma felépülése során először a H3 és a H4 hisztonok között alakul ki kapcsolat (Wolffe, 1995). A növényekben az összes hiszton H4 fehérje aminosav szekvenciája megegyezik, míg a hiszton H3 fehérjének két-három variánsa is ismert (Waterborg, 1991, 1992), amelyek közül az egyiket kódoló gén expressziója a replikációtól független és szekvenciáját tekintve az állati rendszerekből ismert replacement (rHis) és fejlődés specifikus hiszton variánsokhoz mutat hasonlóságot (Kapros és mtsai, 1992; Robertson és mtsai, 1996). A lucerna rHis hiszton H3.2 variáns mRNS-e a sejtciklus során magas szinten, mindvégig jelen van, és kimutatható olyan szövetekben, amelyekben alacsony az osztódás mértéke (kifejlett levél). A H3 variánsok ezen típusai intront tartalmazó lucerna gének által kódoltak (Robertson és mtsai, 1996). Más növényből származó, intront tartalmazó hiszton H3 gének hasonló módon replikációtól független expressziót mutatnak (Kanazin és mtsai, 1996). Ugyanakkor ez a kifejeződési mintázat nem tapasztalható a hiszton H1 és H2A esetében, ugyanis az intron jelenléte nem jelentett replikációtól

független génexpressziót (Jayawardene és Riggs, 1994; Huh és mtsai, 1997 és Taoka és mtsai, 1998).

A génspecifikus próbával végzett *northern* hibridizációs kísérletek azt mutatják, hogy a merisztémában aktív hiszton variánsok mRNS-ei gyakran kimutathatók alacsony proliferatív aktivitással jellemezhető szövetekben is (Chaubet és mtsai, 1991; Joanin és mtsai, 1992). A transzgénikus növények vizsgálata arra utal, hogy a búza H3 (Terada és mtsai, 1993) és *Arabidopsis* H4 gének (Atanassova és mtsai, 1992; Lepetit és mtsai, 1992) tudnak proliferációtól-függő és –független expressziót is biztosítani.

### ***A hiszton gének kifejeződésének szabályozása a transzkripció szintjén***

#### **Promóter aktivitás merisztémában és S-fázisban**

Nakamaya és munkatársai (1989) kimutatták, hogy a búza hiszton H3 gén (*TH012*) transzkripciója során tökéletes iniciáció és a 3' vég megfelelő módosítása figyelhető meg napraforgó sejtszuszpenzióban. A 3' nemtranszlálódó vég mutációja nem befolyásolta a transzkripció megindítását. A továbbiakban a hiszton gének aktivitását promóter/GUS ( $\beta$ -glükuronidáz) kiméra génekkel analizálták. A transzgénikus növények hisztokémiai festődése azt mutatta, hogy azokban a növényekben, amelyek a teljes hosszúságú (0.7-1.7 kb) promóteret tartalmazták az osztódó sejtekben gazdag régiókban figyelhettek meg aktivitást (Medford és mtsai, 1991; Atanassova és mtsai, 1992, 1998; Lepetit és mtsai, 1992; Brignon és mtsai, 1993; Terada és mtsai, 1993; Omirulleh és mtsai, 1994; Yang és mtsai, 1995; Huh és mtsai, 1997). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a merisztéma-specifikus hiszton promóterekben található *cis*-elemek és szabályozó faktorok konzerváltak a növények széles táborában, beleértve az egy- és kétszikű növényeket egyaránt. Ugyanakkor néhány különbség tapasztalható.

A deléciós analízisek azt mutatják, hogy a TATA-boxhoz közeli régiók (-185 és -219 közötti szekvenciák) felelősek a búza H3 (*TH012*) és az *Arabidopsis* *H4A748* promóterében a merisztéma-specifikus kifejeződésért rizs (Terada és mtsai, 1993) és *Arabidopsis* (Atanassova és mtsai, 1992) szövetekben. A lucerna *ALH3-1.1* gén 284 bp-os promótere szintén merisztéma-specifikus expressziót biztosított transzgénikus

dohány szövetekben (Kapros és mtsai, 1993). Ezeket az eredményeket kiegészíti, hogy a kukorica *H3C4* gén TATA-boxhoz közeli promóterrégiója erős érzékenységet mutatott a nukleázokkal szemben transzgénikus dohányban (Brignon és mtsai, 1993).

Lucerna sejtszuspenzióban az *ALH3-1.1/GUS* transzgén kifejeződése a DNS szintézissel egyidőben zajlott, úgy mint az endogén H3 géné (Kapros és mtsai, 1993). Ohtsubo és munkatársa (1993) létrehozta egy rizs sejt vonalat, amely tartalmazza a búza H3 promóter/GUS kiméra gént. Ezen a sejt vonalon S1 nukleáz vizsgálattal analizálták a GUS mRNS-szint változását. Az eredmények azt mutatják, hogy a megemelkedett GUS mRNS-szint a DNS szintézissel egyidőben fordul elő, azaz a H3 promóter S-fázis specifikus expressziót biztosít. A promóter egy rövidített változata, ami csak a -185 bp-tól kezdődő szakaszt tartalmazza, hasonló kifejeződési mintázatot biztosított (Ohtsubo és mtsai, 1993). A búza H1 (Taoka és mtsai, 1998) és a H2A (Huh és mtsai, 1997) gének, TATA-boxhoz közeli régiói a transzkripció iniciációs helytől számított -128 bp-tól (TH315) ill. -120 bp-tól (TH254) elégségesek voltak az S-fázishoz kapcsolni a gének aktivitását.

Mindezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy a növényi hiszton gének promóterében a TATA-box-hoz közeli régiókban vannak olyan *cis* elemek, amelyek ezeknek a géneknek merisztéma és S-fázis specifikus expressziót biztosítanak és azt is megállapíthatjuk, hogy a 3' nemkódoló régió nem befolyásolja ezt a gének kifejeződési mintázatot. Ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a promóterek távolabbi szakaszaiban található olyan elemek, amelyek erősíthetik, vagy gyengíthetik a promóter aktivitását (Atanassova és mtsai, 1992; Ohtsubo és mtsai, 1993; Terada és mtsai, 1993; Ito és mtsai, 1995; Huh és mtsai, 1997). A kukorica *H3C4* promóterében elhelyezkedő közeli és távoli *cis* elemek egyaránt hozzájárulnak a gén végső kifejeződési mintázatához *Arabidopsis* szövetekben (Atanassova és mtsai, 1998).

## **A növényi hiszton gének expressziójában szerepet játszó *cis*-elemek**

Tranziens expressziós kísérletek segítségével sok pozitív és negatív hatású *cis* elemet határoztak meg a növényi hiszton gének promóterében (Nakayama és mtsai, 1992; Lepetit és mtsai, 1993; Ito és mtsai, 1995; Yang és mtsai, 1995;

Sakamoto és mtsai, 1996; Huh és mtsai, 1997; Taoka és mtsai, 1998). Ezek közül több motívum erős konzerváltságot mutat és az *in vivo* footprinting kísérletek eredményei megerősítik, hogy a hiszton gének szabályozásában szerepet játszanak (Brignon és Chaubet, 1993; Chaubet és mtsai, 1996; Reichheld és mtsai, 1998).

Több mint 10 évvel ezelőtt először az úgynevezett oktamer (Oct) motívumot - szekvenciája: CGCGGATC - azonosították több hiszton gén promóterében (Chaubet és mtsai, 1986). Azóta szinte valamennyi hiszton gén promóterében (> 40 gén) kimutattak legalább egy Oct motívumot (Meshi és mtsai, 1998), sőt a lucerna H3.1 gén promóterében is, amelyben azonban nem a tipikus felépítést mutatja (Robertson és mtsai, 1997). A mutációs analízisek azt igazolták, hogy az Oct motívum fontos szerepet játszik az osztódás-specifikus és az S-fázis specifikus expresszióban (Nakayama és mtsai, 1992; Terda és mtsai, 1995; Chaubet és mtsai, 1996; Ohtsubo és mtsai, 1997; Taoka és mtsai, 1999). Az Oct motívum határoló szekvenciái is erőteljes konzerváltságot mutatnak és ennek alapján három alcsoportba sorolhatóak, az I-, II-, III-elem (Mikami és Iwabuchi, 1993; Yang és mtsai, 1995; Taoka és mtsai, 1998). Mindhárom fajta Oct képes S-fázis specifikus expressziót biztosítani a promóter mögött elhelyezkedő gén számára (Taoka és mtsai, 1999).

A hat bp-t tartalmazó hexamer (Hex) szekvencia elem (ACGTCA), amelyet először a búza H3 és H4 gének promóterrégióiban azonosítottak, búzasejt nukleális kivonatából származó fehérjékhez kötődött (Mikami és mtsai, 1987). Későbbi eredmények szerint a motívum 5' határoló szekvenciáinak két citozinja fontos szerepet játszik a feltételezhetően DNS-kötő fehérjékhez való kapcsolódásban, ezért a hosszabb, 8 bp-os szekvencia, a CCACGTCA (bővített hexamer) tűnik inkább jellemző motívumnak az eredeti Hex motívummal szemben (Brignon és Chaubet, 1993; Reichheld és mtsai, 1998). A búza H3 promóter Hex motívumának mutációja vagy deléciója a promóter szövetspecifikus vagy sejtciklus függő expresszióját megváltoztatta (Nakayama és mtsai, 1989, 1992; Terda és mtsai, 1995; Taoka és mtsai, 1999). Azt is fontos megjegyeznünk, hogy a hiszton promóterekben a Hex motívum általában a fordított Oct elemmel együtt helyezkedik el és ez a motívum együttes alkotja I típusú elemet, ezért a Hex motívum funkcióját ilyen komplex formában is fontos vizsgálni (Meshi és mtsai, 2000).

Az eredetileg 9 taguként leírt nonamer szekvencia CATCCAACG (Nona), vagy ennek közeli változata a hiszton gének promótereinek felében található meg (Meshi és mtsai, 1998). Az első Nona motívum felismerése a búzasejtek sejtmagi

extraktumában található DNS-kötő fehérjéknek vizsgálata során történt (Kawata és mtsai, 1988), majd mutációs analizisek támasztották alá ennek a motívumnak a fontosságát búza H3 és kukorica H4 gének promóterében (Nakayama és mtsai, 1992; Lepetit és mtsai, 1993). A Nona motívum konzerváltsági foka elég alacsony (Brignon és Chaubet, 1993; Chaubet és Gigot, 1998): CCATC(-/N)CAACG vagy CCATC(-/N)CAACGGCR az egyszikű növények, és CAATC(-/N)CAACGRYY a kétszikű növények esetében, ahol az (-/N) bázis hiányt vagy bármilyen más bázis jelenlétét jelzi (Brignon és Chaubet, 1993). A Nona motívum és az ahhoz hasonló szekvenciák megtalálhatók a nukleális faktor kötő helyeken. A dohány génekben található úgynevezett NON motívumok CAATCG(G/C)CCACG, különböznek a Nona szekvenciáktól (Reichheld és mtsai, 1998). A *H4A748* promóterben mutatták ki először a NON motívumot (AGATCGACG) és *in vivo* footprinting kísérlettel igazolták, hogy ennek a szekvenciának szerepe van a gén merisztéma-specifikus expressziójában (Chaubet és mtsai, 1996). Meg kell jegyeznünk, hogy a NON motívum egyaránt hasonlít az Oct és a Nona szekvenciákhoz.

A CCGTC vagy CCGTC(C/T) motívumok szintén kimutathatók különböző promóterekben. Először nukleális faktor kötő helyként írták le a kukorica H3 és H4 gének (Brignon és Chaubet, 1993), majd *Arabidopsis* H4 gén promóterében (Chaubet és mtsai, 1996). Meglepő módon a CCGTC és a Nona motívum egyes gének promóterében együtt helyezkednek el, mégpedig úgy, hogy a két motívumot 10 bp választja el egymástól, feltételezhetően a két *cisz* elem egymást segítve biztosítja a szabályozott működést (Brignon és Chaubet, 1993; Chaubet és Gigot, 1998).

A CCAAT motívum szintén egy jól ismert szekvencia-elem. Állati sejtek vizsgálata szerint ehhez a szekvenciához DNS-kötő fehérjék kapcsolódnak (Maity és de Crombrughe, 1998; Mantovani, 1998). Növényi hiszton gének promóterében egy ehhez hasonló 8 bp-os szekvencia ACCAATCA mutatható ki (Yang és mtsai, 1995; Taoka és mtsai, 1998), ez a III-as típusú elem alkotórésze, ahol az Oct motívum fordított orientációjú szekvenciájával található együtt. Ezekben az elemekben 8 bp választja el a két motívumot. A búza H1 gén promóterében található CCAAT boxról Taoka és munkatársai (1998) kimutatták, hogy *cisz* aktiváló elem.

Az eredeti CCAAT-box-tól különböző, de CCAAT tartalmú szekvencia található (CAT) a kukorica *H3C4* promóterében is, amelyről *in vivo* footprinting kísérlet segítségével kimutatták, hogy ehhez az elemhez nukleális faktorok

kapcsolódnak (Brignon és Chaubet, 1993). A kukorica *H4C7* gén promóterében szintén megtalálható ez a szekvencia (Brignon és Chaubet, 1993).

Több más típusú *cisz*-aktiváló elem is ismert a növényi hiszton gének promóter régióiban, bár ezek konzerváltsága kisebb mértékű. Ilyen például a búza hiszton gén promóterében kimutatható AT-gazdag szekvencia és direkt ismétlődésű szekvenciák (Huh és mtsai, 1997) vagy az ACT-box, amelyhez a WZF1 cink-finger fehérje kapcsolódik (Sakamoto és mtsai, 1993, 1996). Az *Arabidopsis H4A748* gén promóterében a II-es típusú elemtől 3' irányban található a CarG (CTAATATG) szekvencia, aminek feltételezhető szerepe a vaszkuláris szövetspecifikus expresszióban nyilvánul meg (Shen és Gigot, 1997; Taoka és mtsai, 1999).

## **A különböző *cisz* elemek együttműködése**

Már korábban emítettük, hogy a különböző *cisz*-elemek között együttműködés tapasztalható. Az Oct gyakran más motívumokkal együtt van jelen és így hozzák létre a különböző típusú (I, II, III) elemeket. Ezeket a motívumokat Oct-tartalmú elemeknek nevezzük (OCE). Az I-es típusú elem (CCACGTCANCGATCCGCG) egy Hex és egy fordított orientációjú Oct motívumot tartalmaz, méghozzá úgy, hogy a két konzervált változat között 2 bp szünet található (Mikami és Iwabuchi, 1993). A II-es típusú elem (TCACGCGGATC), egy 11 bp-os elem, amely 3 bp túlnyúló részt tartalmaz a konzervatív régió kívül (Mikami és Iwabuchi, 1993). A III-as típusú elem (GATCCGCG-N<sub>14</sub>-ACCAATCA) pedig egy fordított orientációjú Oct motívumot és egy CCAAT-boxot tartalmaz 14 bp szünettel szétválasztva (Yang és mtsai, 1995; Taoka és mtsai, 1998). Meglepő módon mindegyik eddig vizsgált hiszton gén tartalmaz legalább egyet a három különböző OCE-ből (Meshi és mtsai, 1998), ennek megfelelően mindegyik hiszton gén besorolható valamelyik típusba (I, II vagy III), attól függően, hogy a promóterében melyik OCE-t található (Taoka és mtsai, 1998).

## **Az I-es típusú elemek**

A két I típusú búza és lucerna H3 gén promóteréről ismert, hogy S-fázis és merisztéma-specifikus expressziót biztosít a promóter mögött elhelyezkedő génnek (Kaprocs és mtsai, 1993; Ohtsubo és mtsai, 1993; Terada és mtsai, 1993). A búza H3

promóterének pontmutációja, amely a Hex vagy az Oct motívumot érintette, transzgenikus rizs növények merisztéma-specifikus expresszióját (Terada és mtsai, 1995) és transzgenikus rizs szuszpenzióban a sejtciklus függő kifejeződést (Ohtsubo és mtsai, 1997) megszüntette, ugyanakkor ezek a mutációk nem befolyásolták a sejtosztódástól független expressziót (Terada és mtsai, 1995).

Taoka és munkatársai (1999) az I-es típusú elemek és az S-fázisos génextpresszió közötti kapcsolatot vizsgálták. Az I-es típusú elem három-négy kópiáját építették be a 35S promóter és a GUS riporter gén közé. Dohány BY2 sejteket transzformáltak ezzel a kiméra génnel, és afidikolinnal szinkronizálták a sejtuszuszpenziót. A transzgenről származó GUS mRNS szint változását követték nyomon a sejtciklus során RT-PCR segítségével. Az eredmények azt mutatják, hogy az I-es típusú elemek S-fázis specifikus expressziót biztosítanak a heterológ promóter számára. Transzgenikus dohány növényekben GUS aktivitás a merisztématikus szövetekben: a gyökércsúcsban, levél és oldalgyökér kezdeményekben és fiatal szikleveleiben volt tapasztalható (Kaprok és mtsai, 1993; Ohtsubo és mtsai, 1993; Terada és mtsai, 1993; Taoka és mtsai, 1999). Az S-fázis specifikus expresszióhoz az Oct és a Hex motívumra egyaránt szükség van, ez is az I-es típusú elem összetett funkciójára utal.

## **II-es típusú elemek**

A II-es típusú elemek direkt és fordított orientációban is elhelyezkedhetnek (Mikami és Iwabuchi, 1993; Meshi és mtsai, 1998). Az *Arabidopsis H4A748* gén TATA boxhoz közeli régiójának expresszióra gyakorolt hatását különböző merisztématikus szövetekben vizsgálták. Az aktivitás a két Oct tartalmú motívum (II-es típusú elem és a II-es típus-szerű egyedülálló Oct motívum (aCACaCGGATC)) mutációja során elveszett (Chaubet és mtsai, 1996). Egy másik II-es típusú elem promóter aktiválását (búza H2A gén *TH254* promótere) transzgenikus dohány növényben vizsgálták, ahol a promóter S-fázis specifikus expresszióját tapasztalták (Huh és mtsai, 1997). A kukorica *H3C4* promótere szintén II-es típusú elemet tartalmaz, amely merisztéma-specifikus expressziót biztosít *Arabidopsis* növényekben (Atanassova és mtsai, 1998).



A mutációs kísérletek azt mutatják, hogy a II-es típusú elem szintén egy összetett elem és S-fázis specifikus expressziót képes kialakítani (Taoka és mtsai, 1999), ugyanakkor sejtszinkronizációs kísérletekben az afidikolin eltávolítása után az aktivitás a második S-fázisban viszonylag alacsony. A transzgenikus dohány növények hisztokémiai festődése a fiatal szikleveleiben és a fejlődő segítősejtekben volt magas, ugyanakkor más merisztématikus sejtek nem mutatták a transzgen működését (Taoka és mtsai, 1999). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a II-es típusú elem működése eléggé korlátozott és feltételezhetően más *cisz*-elemek is felelősek a kifejeződésért.

### **III-as típusú elemek**

Az összes vizsgált hiszton gén tartalmaz valamilyen III-as típusú elemet direkt vagy fordított orientációban (Meshi és mtsai, 1998). Vannak olyan hiszton génvariánsok, amelyek napi ritmus által szabályozott vagy szárazságindukált H1 gént tartalmaznak (Wei és O'Connel, 1996; Ascenzi és Gantt, 1997) és bennük olyan változatai találhatóak meg a III-as típusú elemnek, amelynél a két motívum közötti távolság eltér az eredeti motívum esetében megfigyelttől (Taoka és mtsai, 1998). Olyan hiszton gének expresszióját vizsgálták transzgenikus dohány növényekben, amelyek III-as típusú elemet tartalmaztak, mint a búza H2B gén *TH123*, és *TH153* promótere (Yang és mtsai, 1995) és a búza H2A gén *TH274* promótere (Huh és mtsai, 1997). Ezek a promóterek merisztématikus régiókban mutattak aktivitást. A *TH153* és a *TH274* promóter a III mellett I és II típusú elemet is tartalmazott.

A mutációs eredmények azt mutatják, hogy a III-as típusú elem egyedül képes osztódó sejt és S-fázis specifikus expressziót biztosítani, noha a benne előforduló CCAAT box egyedül nem képes kimutatható aktivitást indukálni (Taoka és mtsai, 1999). Az általános expressziós mintázat azokéra a növényekére hasonlított, amelyek I-es típusú elemet tartalmaznak. Ugyanakkor a III-as típus működéséről elmondhatjuk, hogy ennek a promóternek az expressziója szinkronizált sejt kultúrában az afidikolin eltávolítása előtt kezdődik, ami arra utal, hogy a III-as elem képes aktiválni az expressziót a replikáció kezdete előtt, és magas szintet tud biztosítani végig a DNS szintézis során (Taoka és mtsai, 1999).

## **Nona, CCGTC és szóló-Oct; modulátor elemek**

A Nona és a CCGTC motívum sejtosztódás-specifikus szabályozó szerepére utalnak a nyugalmi állapotban lévő, és az osztódó kukorica sejtek H3 és H4 génjeinek promóterein végzett *in vivo* footprint kísérletek (Brignon és Chaubet, 1993). Az *Arabidopsis H4A748* gén analízise azt mutatja, hogy a Nona szerű szekvenciáknak és a CCGTC motívumnak merisztéma-specifikus működést elősegítő szerepük van (Chaubet és mtsai, 1996). Azonban ha az I-es típusú elemet eltávolították a búza H3 gén promóteréből a Nona és CCGTC elemek jelenlétének ellenére nem volt megfigyelhető az S-fázis specifikus expresszió (Ohtsubo és mtsai, 1997), ami arra utal, hogy ezek az elemek modulátor szerepet tölthetnek be, erősítve az OCE elemek hatását.

## **Poszttranszkripcionális szintű szabályozás**

A hiszton transzkriptumok S-fázis specifikus felhalmozódásához szükséges a hiszton mRNS-ek lebomlása az S/G2 határ környékén. Állati, merisztéma-specifikus expressziót mutató hiszton gének esetében az mRNS 3' vége nem poliadenilált, hanem egy hajtúszerű struktúra figyelhető meg ezen a szakaszon. Ez a speciális struktúra és az ehhez szorosan kapcsolódó szekvenciák szükségesek az mRNS megfelelő éréséhez és a sejtmagi transzporthoz (Marzluff és Pandey, 1998; Heintz, 1991; Osley, 1991), és ez a hajtú felelős az mRNS megfelelő lebomlásáért (Osley, 1991). Ezzel ellentétben a növényi hiszton gének poliadeniláltak (Chaboute és mtsai, 1988; Chaubet és mtsai, 1988; Wu és mtsai, 1989; Mikami és Iwabuchi, 1993), ezért a növények esetében az állatitól eltérő mechanizmus kell, hogy biztosítsa az mRNS destabilizációját a megfelelő időpontban.

Részletesen vizsgálták a lucerna H3 mRNS stabilitását (Kapros és mtsai, 1995), és az S-fázison kívüli alacsonyabb hiszton H3.1 mRNS szint valószínűsítette egy H3.1-specifikus degradációs mechanizmus meglétét (Kapros és mtsai, 1992, 1995). A specifikus destabilizációban szerepet játszhatnak a kódoló és/vagy a 3' nemkódoló régiók, mivel az ALH3-1.1/GUS gén transzkript szintje transzgénikus lucerna sejtekben az S-fázison túllépve sokkal stabilabbnak bizonyult, mint az endogén H3.1 mRNS (Kapros és mtsai, 1993). Jelenleg a 3' régió szerepe nem

tisztázott. Búza esetében az mRNS éréséhez szükséges a poliadenilációs helytől felfelé és lefelé elhelyezkedő konzervált ATG(-/G)AAATG és valószínűleg a T<sub>3</sub>(N)<sub>13-16</sub>GATT motívum (Nakayama és mtsai, 1989; Ohtsubo és Iwabuchi, 1994). Robertson és munkatársai (1997) írtak le egy olyan mRNS-t, mely annak ellenére S-fázis specifikus felhalmozódást mutatott, hogy génje promóterében nem tartalmazta a tipikus Oct motívumot. Ennek a szekvenciának az összehasonlítása további H3 mRNS-ekkel arra a feltételezésre vezetett, hogy valószínűleg a 3' nemkódoló régióban található TTAATNA szekvencia lehet az a szabályozó elem, mely a sejtciklus-specifikus expressziót biztosítja.

### ***A növényi hiszton gének transzkripcionális regulációjának modellje***

Habár a hiszton gének transzkripciós szabályozását vizsgáló kutatások még folyamatban vannak, a meglévő ismeretek alapján felállítható egy modell a hiszton gének transzkripciós szabályozásáról. Valamennyi ismertett *cis* elem a hozzájuk kapcsolódó protein komplexszel együtt, összehangoltan, mint pozitív faktor vesz részt a végső expressziós szint kialakításában, és néhányuk befolyással bírhat az kifejeződési mintázat kialakulására is. A jellemző expressziós kép kialakításáért elsősorban az OCE és a modulátor elemek felelősek, melyek valószínűleg együttesen alakítják ki a sejtosztódáshoz kapcsolt, S-fázis specifikus mintázatot. Mindhárom OCE elem képes S-fázis specifikus kifejeződést elősegíteni, azonban mindegyikük különböző aktivitást eredményez (Taoka és mtsai, 1999). Az I-es és III-as típusú elemekkel összehasonlítva a II-es típusú önmagában gyenge kifejeződést okoz, mely más elemek által könnyen módosítható. Egyedül a III-as típusú elem képes a replikáció előtti transzkripció aktiválásra, azonban az ekkor képződött mRNS-ek mennyisége még mindig alatta marad az összes endogén hiszton mRNS mennyiségének.

Valószínűleg a feltételezett OCE komplexek érzékelik a jelet a sejtciklus, vagy az osztódás állapotáról, és az alap transzkripciós komplexszel kommunikálva hozhatja létre az ennek megfelelő transzkripciót. Ezzel összefüggésben meg kell említeni, hogy a HiNF-D komplex, mely kötődik az emberi H4 gén S-fázis specifikus eleméhez pRB rokon fehérjét, Cdc2-t és ciklin A-t tartalmaz (Stein és mtsai, 1996). Az OCE által elősegített expressziót módosíthatják a Nona, CCGTC és szülő Oct

motívumok, és a velük való kapcsolódásra képes faktorok, melyek egyéb szignálokat közvetíthetnek az OCE komplexeknek (mint például az osztódási aktivitás).

Habár még nem vizsgálták meg teljes mértékben a lehetőséget, de a TATA boxot tartalmazó alap promóter is részt vehet a specifikus expresszió kialakításában, ugyanis magas, funkcionálisan különböző aktivitás volt megfigyelhető, amikor a búza H2A és H3 gének ezen régióit összehasonlították a 35S alap promóterével (Nakayama és mtsai, 1995; Huh és mtsai, 1997). Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a növényi hiszton gének végső expressziós mintázatát a transzkripcionális és a poszttranszkripcionális szabályozás összessége adja, az utóbbi magában foglalja az S-fázisbeli visszacsatolásos szabályozást és a hiszton mRNS érésének valamint stabilitásának kontrollját (Ohtsubo és Iwabuchi, 1994; Kapros és mtsai, 1995; Reichheld és mtsai, 1998).

Meg kell azonban jegyezni, hogy az OCE elemek megtalálhatók a replikációtól független kifejeződésű hiszton génekben is (Chaubet és mtsai, 1992; Robertson és mtsai, 1996), ami arra utal, hogy ezeknek a géneknek a szabályozását a *cis* elemek, beleértve az OCE-eket, módosító elemek, valamint eddig még nem azonosított faktorok kombinációja biztosítja.

### 3. Előzmények és célkitűzés

A Sejtosztódási és Differenciálódási Csoportban a 80-as évek közepétől kezdve vizsgálják a hiszton géneket, elsősorban lucernára alapozott kísérleti rendszerekben. 1989-ben jelent meg a közlemény, amely igazolta a H3 hiszton génvariánsok meglétét lucernában (Wu és mtsai). Ezt követően a cDNS klónok birtokában ki lehetett mutatni egy sejtciklus függő (H3.1) és egy konstitutív (H3.2) gén működését. A H3.1 genomikus klónját korábban szintén csoportunkban izolálták (Wu és mtsai, 1988), és később igazolták az osztódási állapottól függő promóterműködést (Kaproos és mtsai, 1992). A konstitutív cDNS variáns genomikus megfelelőjét izolálva vált lehetővé e gén működését befolyásoló elemek jellemzése és felhasználása (Robertson és mtsai, 1996).

A szekvencia adatok alapján elkülöníthető az 5' végi promóter régió (a transzkripció kezdőpontjához viszonyítva –482 és –1 bázispárok között), három intron (555 és 668; 746 és 962; 1053 és 1174 bázispárok között), valamint a 3' nemtranszlálódó régió (1346 és 1676 bázispárok között).

Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján bebizonyosodott, hogy a sejtciklus-függő hiszton gének S-fázisos és merisztéma-specifikus kifejeződése meghatározott szekvencia elemeknek köszönhető, melyek a promóteren a transzkripció startponttól számított 300 bázispáron belül, 5' irányban helyezkednek el (Brignon és Chaubet, 1993; Chaubet és mtsai, 1996; Kapros és mtsai, 1993; Ohtsubo és mtsai, 1997; Shen és Gigot, 1997). Meglepő módon ezen motívumok többsége szintén megtalálható a konstitutívan működő lucerna hiszton H3.2 génben (msH3g1 genomi klón, 1. ábra) (Robertson és mtsai, 1996). Ezek közé tartozik az úgynevezett nonamer motívum (CCATCN<sub>0-2</sub>CANC), egy szabályozó elem, melyről kimutatták, hogy kapcsolódik egy, az S-fázis indukálta génexpresszióhoz elengedhetetlenül szükséges fehérjéhez (Brignon és Chaubet, 1993; Ohtsubo és mtsai, 1997). Annak ellenére, hogy a H3.2 gének tartalmaznak a replikáció-függő variánsokra jellemző promóter elemeket, *northern* analízis világosan mutatta ezen gének konstitutív kifejeződését, egy, a sejtciklus-függő H3.1 génekét messze meghaladó egyensúlyi mRNS szinttel (Kaproos és mtsai, 1992, 1995; Robertson és mtsai, 1996).

1 ACTTNACTAA CGGAGTCTGC ATTTAGGTAC TAAAATGACT AATATAGTCT  
51 ACATTCAGGG ACTATTTTGC AATTTACCTG CATTTCAGGGA CTAAAGTGAC

**CAAT**

101 GACTTCTTTC CTATTCAGAG ACTAAAGTGA **CCAAT**CTCTC AAAATGAAGA  
151 TATTTTGT TGT TTTGGCG AGATAAGTTG CACACGATTT ACACTCACAA

**CAAT**

**nonamer motívum**

201 AAGAAACACA AATTGTCCAC GCTGG**CAATC** **CGCAAC**TTTA CAAACCAACC

... **oktamer motívum**

251 **AATCAGAAAC** AAACAC**CACGG** **ATCGCACTTA** ATATTTTCAC TTAAAAA**ACT**  
301 CATCATTACC GTTGAAGCAT TCAAAGTCCA CGATCTCTCT ACTCTAATTA

**TATA szignál**

351 ACCTTCCTTA ATCATCATT ACCCTTGCAT **ATATAA**ACAC ACTTCTCTTC

**CAP**

401 AACAA**CCCTC** ATTACACATT TCTTCTCTTT CGCTAAATCT **AATCAATCTT**

451 TCCCTCTCTT CGAGCTTTCT CTCTCCGATT CCATGGCTCG TACCAAGCAA  
501 ACCGCTCGCA AATCCACTGG TGGTAAGGCT CCAAGGAAGC AGCTCGCCAC  
551 CAAGGTAACC ACCGTTCACC GCCGTAACGG TTTTTTCTTC TTTCTGTTTT  
601 CTTGATCTTA GGGTTTCGTT TTCTTCAATT CGAATTTTTT GATTGATTTT  
651 ATCGATTTTT TGGTTCAGGC TGCTAGGAAA TCTGCTCCTA CTACTGGAGG  
701 AGTCAAGAAA CCTCACCGAT ACCGCCCTGG AACTGTCGCT CTTCGGTAA**T**  
751 TTCCTTTTCC CCAATTTT GGTTTTCGGA GTTTTGCAGT TTCTATTATT  
801 AATTTTTTTT AGGTTTTCGT TGTGTTTTGA ATATTCTATT GAATTTTATG  
851 TTNNGAATTT GAATTTTGGA TTCATAATTT TTAGGAATTT GGAGTTTTGT  
901 ATTCTCGGTT TATGATTTTT AGGTTTTCGT AGTTGTTAAT TTTCAATTGT  
951 TGTGATTTAC AGTGAGATCC GTAAGTACCA GAAGAGTACC GAGCTTTTGA  
1001 TCCGCAAGCT TCCATTT**CAG** CGTCTTG**TCC** GTGAAAT**TGC** TCAAGAT**TTC**  
1051 AAGGTAATA TTGTTACTTA GTTTCATAAT TGATTTTGTG TGAAATCTTG  
1101 TTCTCTTTG GTTTATTAA TTTGTAATTG TTGTTTTTGA TATTTTCTG  
1151 ATTAATTTGC TGTGTTGTT ATAGACGGAT CTGAGAT**TCC** AGAGCCAT**GC**  
1201 AGTTC**TTGCA** C**TT**CAGGAAG CAGCTGAGGC TTACCTGG**TT** GGAT**TGTTG**  
1251 AGGAC**CCAA** TCTGTGT**GCA** ATTCATG**GTA** AGAGGGT**GAC** AATTATG**CC**T  
1301 AAGGAC**ATTC** AGCTTGCT**CG** TCGCATT**CGC** GGTGAAC**GTG** CTTAGGGT**G**  
1351 TGAAGGCGCT TTTAGCG**TTA** TGGTGGAT**TA** GTATTTT**GGA** AGGATTT**AGG**  
1401 GTTTTAT**GAA** TTGAATTT**C** TTTTATG**CGT** TGTATAG**TTC** TGAAC**TATA**  
1451 ATGTTCA**ATC** TTTAACA**ACA** GACATAT**TTT** GGATTAT**GAT** TAGT**TTTTTG**  
1501 CGGACAA**ATT** TGTGAT**GTA** TTGGTCA**ATT** ACAATTGAAG TCTCTG**CAAC**  
1551 TATTTT**ACTT** ATATCT**CCAT** TGCTT**CCTGA** TTT**CGTTATG** CGCTTTT**TGAT**  
1601 GATGCG**ACTG** TGGTTT**CTAG** CTCTGA**ATTC** AATTT**TGTGAT** GCGTTT**TCTCT**  
1651 CTATGGT**AGT** TTGTCT**ATCG** CTG**ACA**

**1. ábra** A lucerna H3.2 gén nukleotidsorrendje. A fontosabb promóterelemeket az ábrán megjelöltük. A CT gazdag 5' nemkódoló régiót aláhúzás, az intronokat szaggatott vonalas aláhúzás jelzi. A poliadenilációs jeleket kétszeres aláhúzás mutatja.

Az irodalomban számos közlemény foglalkozik a hiszton gének expressziójával, annak szabályozásával, a szabályozásban részt vevő *cis*z és transz faktorok azonosításával, jellemzésével (lásd az "Irodalmi áttekintés" fejezetet). Ezek a kísérletek azonban elsősorban az S-fázis specifikus, sejtciklus függő kifejeződésű hiszton gének vizsgálatára korlátozódtak. Nem vizsgálják azt a kérdést, hogy annak ellenére, hogy az rHis gének (a mi esetünkben a lucerna H3.2) promóterében megtalálhatók azok a *cis*z szabályozó elemek, melyek bizonyítottan az S-fázis specifikus kifejeződésért felelősek, ezek a gének mégis konstitutívan, magas szinten fejeződnek ki.

A virális promóterek használata transzgénikus növények előállítására számos problémát jelenthet. Ezek közé tartozik például a megemelkedett rekombinációs gyakoriság (Kohli és mtsai, 1999), fontos transzgének elhallgatása (silencing; Al-Kaff és mtsai, 2000), és a vírus eredetű szekvenciákkal szemben megfigyelhető ellenérzés. A hiszton gének több kópiában fordulnak elő a genomban, az evolúció során nem váltak gén inaktiváció tárgyává. A replacement H3 gének valamennyi növényfajban megtalálhatók, és magas szinten, konstitutívan fejeződnek ki. A gén promóterében és intronjaiban olyan szekvenciák találhatóak, melyek feltételezhetően megakadályozzák az olyan kromatinszerkezet kialakulását, amely a génműködés gátlásáért felelős (Robertson és mtsai, 1996; Waterborg és Robertson, 1996).

Az elmondottak alapján munkánk kezdetén kitűzött céljaink két fő pont köré csoportosíthatók:

1. Megválaszolandó kérdésként merült fel, hogy az izolált lucerna H3.2 promóter is képes-e a konstitutív, magas szintű kifejeződést biztosítani a hozzá kapcsolt riporter génnek? A gén intronja, 3' nemkódoló régiója képes-e befolyásolni, megváltoztatni az expressziót? A CT gazdag szekvenciák, melyek a gén 5' nemkódoló régiójában és intronjaiban találhatóak hatással vannak-e a merisztéma-specifikus lucerna H3.1 promóter működésére?

2. Tanulmányoztuk továbbá, hogy az említett szabályozó régiók egyenként és kombinációkban alkalmasak-e új vektormolekulák kifejlesztésére, amelyek lehetővé tehetik idegen gének működtetését a növényi sejtekben, szövetekben, valamint a saját gének expressziós mértékének, vagy térbeli, időbeli mintázatának megváltoztatását. Ezért célul tűztük ki, hogy az izolált MsH3g1 génvariáns szabályozó régióinak felhasználásával széles gazdaspecificitású, konstitutív expressziót biztosító növényi expressziós vektort állítsunk elő.

## 4. Anyagok és módszerek

### *Molekuláris biológiai és biokémiai technológiák*

#### **Baktériumos tápoldatok, törzsek és vektorok**

A baktériumok számára az antibiotikus tápoldatot Sambrook és munkatársai (1989) által leírt módon készítettük el. Baktérium törzsek közül a *Escherichia coli-t* (DH5 $\alpha$ ) használtuk. A kémiai kompetens sejteket, amire a plazmid DNS felszaporítása érdekében volt szükségünk, Inoue és munkatársai (1990) módszerével készítettük el.

#### **Plazmid konstrukciók készítése**

##### *pHEX-N::GUS*

A pBI122.3 (Clonotech) plazmid HindIII/SacI GUS fragmentjét kicseréltük a pLP100 (Kapros és mtsai, 1993) azonos fragmentjével (pBImod). A lucerna H3.2 promóter (MsH3g1 genomi klón, Robertson és mtsai, 1996) mint Accl/NcoI fragmentet építettük be a pBImod plazmid NcoI és feltöltött BamHI vágóhelyeire (pHEX-N::GUS).

##### *pHEX-d::GUS*

A lucerna H3.2 promóter 193 bázispár hosszúságú SspI/NcoI fragmentjét építettük be a pBImod plazmid NcoI és feltöltött BamHI vágóhelyeire (pHEX-d::GUS).

##### *pHEX-110::GUS*

Az MsH3g1 genomikus klón első intronját polimeráz lánreakció (PCR) segítségével izoláltuk. A felhasznált primerek a következők voltak:

5'-CATAGGTAACCAACCGTTCACCGCCG-3' és

5'-GCCTGAACCAAAAAATCGATGAAA-3'.

A PCR terméket NcoI hasítás után a pHEX-N::GUS konstrukció azonos helyére építettük be (pHEX-110::GUS).



### *pHEX-111::GUS*

A pHEX110 konstrukció SacI/EcoRI nopalín szintáz (NOS) terminátorát PCR reakció segítségével kicseréltük az Msh3g1 genomi klón 3' nemátíródó régiójára (pHEX111::GUS). A felhasznált primerek a következők voltak:

5' – GAG CTC TAG GTA GGT AGC ATT CGC GGT GAA CGT GCT - 3'

5' – GCG GCC GCT GTC ACC GAT AGA CAA ACT ACC - 3'

### *pH3.1::GUS*

A Kapros és munkatársai (1993) által leírt konstrukcióból, mely a H3.1 promóter – GUS – NOS expressziós kazettát tartalmazza a pLP100 promóter tesztelő vektorban, a HindIII/SacI promóter-riporter gén fragmentet a pBI122.3 vektorba építettük. Az így létrehozott plazmid SacI/EcoRI szakaszát (NOS terminátor) kicseréltük az ALH3-1.1 klón (lucerna hiszton H3.1 cDNS; Wu és mtsai, 1989) HinfI/HindIII fragmentjével (3' nemátíródó régió) a megfelelő linkerek felhasználásával (pH3.1::GUS).

### *p2CT::GUS, p4CT::GUS, p6CT::GUS*

A CTCTCGGCTCTC (p2CT::GUS), CTCTCGGCTCTC CTCTCGGCTCTC (p4CT::GUS) valamint a CTCTCGGCTCTC CTCTCGGCTCTC CTCTCGGCTCTC (p6CT::GUS) oligonukleotidok mindkét szálát megszintetizáltattuk oly módon, hogy a két szál kapcsolódásakor mindkét oldalon GTAC szekvenciájú túlnyúló vég képződjön. Az oligonukleotidokat KpnI restrikciós enzimmel hasított pH3.1::GUS plazmidba építettük be.

### *Expressziós kazetták bináris vektorba építése*

Stabil transzformáns dohány növények előállítására az expressziós kazettákat mint EcoRI/HindIII fragmentet a pBIN19 (Bevan és mtsai, 1984) bináris vektor azonos vágóhelyeire klónoztuk. Az így kialakított konstrukciók T-DNS-eiken belül tartalmazzák a hiszton promótereken alapuló expressziós kazettákat, az *Agrobacterium* közvetítette növénytranszformációhoz szükséges határoló szekvenciákat, valamint egy növényi kanamicin rezisztenciát biztosító gént (pBHEX-N::GUS, pBHEX-d::GUS, pBHEX-110::GUS, pBHEX-111::GUS, pH3.1::GUS, pB2CT::GUS, pB4CT::GUS, valamint pB6CT::GUS)

## **Plazmid DNS izolálás**

A plazmid DNS izolálás, attól függően, hogy mennyi DNS-re volt szükség (mini és maxi preparálás) alkalikus lízis módszerével, Sambrook és munkatársai (1989) leírása alapján készültek.

## **Emésztés restrikciós enzimekkel**

Az enzimatikus reakciókat a gyártó cég (New England Biolabs, Boehringer, Fermentas) javaslatai alapján a megfelelő pufferekben végeztük el. Az emésztett DNS-t fenol/kloroformmal tisztítottuk, majd kicsaptuk. Lecentrifugáltuk és kis mennyiségű vízben oldottuk fel.

## **A nukleinsavak elektroforézise**

A nukleinsavak frakcionálását Sambrook és munkatársai (1989) javaslatai alapján hajtottuk végre. A frakcionálást az elválasztás céljától függően különböző koncentrációjú agaróz gélben és a megfelelő pufferben végeztük el. A restrikciós fragmenteket 1%-os TBE-agaróz gélben választottuk el egymástól és UV fény segítségével tettük láthatóvá olyan gélekben, amelyek 0,5 µg/ml EtBr-ot tartalmaztak.

## **PCR amplifikáció**

A DNS amplifikációt az alap protokollban szereplő módon végeztük el. A PCR primerek automata oligó szintetizátorral készültek. A PCR reakciót 0,2 mM dNTP, 0,1 µM primer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2U Taq DNS polimeráz, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl és 1-10 ng templát DNS jelenlétében végeztük 50 µl végtérfogatban. Az alkalmazott program a következő volt: 1 x 5 perc 95 °C; 25 x 30 másodperc 95 °C, 30 másodperc 55 °C és 1 perc 72 °C; 1 x 5 perc 72 °C. A PCR fragmenteket agaróz gélben választottuk el, ahonnan üveggyöngy (Amersham) segítségével izoláltuk.

## Össz-RNS analízis

Az össz-RNS izolálásra Chomzynski és Sacchi (1987) módszerét alkalmaztuk. A mintákat folyékony nitrogén jelenlétében tártuk fel, majd hozzá megfelelő puffert adtunk (4M guanídium tiocianát; 25mM nátrium citrát, pH 7.; 0,5 % szarkozil, 0,1 M 2-merkaptoetanol). 0,1 térfogat nátrium acetát, 1 térfogat vízzel telített fenol és 0,2 térfogat kloroform hozzáadása után a mintákat lecentrifugáltuk, és a felülúszóból izopropanol segítségével csaptuk ki az RNS. Az izolált RNS-t fenol/kloroformmal tisztítottuk tovább, majd etanollal kicsaptuk. Lecentrifugáltuk és kis mennyiségű vízben oldottuk fel. Az össz-RNS-t denaturáló formaldehid tartalmú gélben frakcionáltuk és Hybond N+ (Amersham) membránhoz rögzítettük. Az RNS-t UV fény segítségével keresztkötöttük a membránhoz és a filtereket a felhasználás idejéig – 20 °C-on tároltuk. Próbaként a pHEX110::GUS konstrukció NcoI / Sac I fragmentjét (GUS) használtuk. A hibridizáláshoz felhasznált próbákat random primerek segítségével <sup>32</sup>P jelenlétében hoztuk létre. A hibridizálást 65 °C-on végeztük 0.25 M NaHPO<sub>4</sub> (pH 7.2), 1 mM EDTA, 20% SDS és 0.5% blokkoló reagens (Boehringer) tartalmú oldatban. A filter mosása 20 mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 7.2), 1 mM EDTA és 1% SDS jelenlétében történt 65 °C-on, háromszor 20 percig.

## Fluorimetrikus GUS aktivitás mérés

GUS aktivitás kvantitatív kimutatására Jefferson és munkatársai (1987) módszerét alkalmaztuk. A mintákat GUS extrakciós pufferben (50 mM NaHPO<sub>4</sub> /pH 7/, 10 mM β-merkaptoetanol, 10 mM EDTA, 0,1% nátrium lauril szarkozin és 0.1% Triton X-100). 20 μg fehérje kivonatot adtunk 200 μl GUS reakciópufferhez (4-metilumbelliferil-β-D-glükoronid az extrakciós pufferben). A sejtextaktumok fehérje koncentrációját Bradford reagenssel (BioRad) mértük. 0 perc és 1-3 óra °C-os inkubálás után a reakciót 0,8 ml 0,2 M-os Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldat hozzáadásával állítottuk le. A képződött fluoreszcens 4-metilumbelliferon mennyiségét Hoefer TKO 100 fluoriméterrel mértük (365nm gerjesztés / 465 nm emisszió). A mért értékeket a 0 időponthoz viszonyítottuk.

## **Hisztokémiai GUS festés**

A transzgénikus dohány csíranövényeket és azok gyökereit Beeckman és munkatársai (1994) által kidolgozott módszerrel analizáltuk. A friss növényi anyagot az X-Gluc (5-bromo-4kloro-3-indolil- $\beta$ -glükuronid) tartalmú festékben (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:7,0) 1 mg/ml X-Gluc, 10 mM 2-merkaptoetanol) 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Utána a szövetet, 95 % etanollal tisztítottuk meg, egy napon keresztül 4 °C-on. A festett növényi anyag hosszútávú tárolása 95 % etanol oldatban történt.

## **Szövettenyésztés**

### **Protoplaszt izolálás és fenntartás**

Kísérleteink során *Medicago varia* cv. Rambler A2 sejtszuszpenziót használtunk. A kultúrát MS tápoldaton 1 mg/l 2,4-D és 0.2 mg/l kinetin jelenlétében, hetenkénti passzállással tartottuk fenn. A protoplaszt izolálás és protoplaszt fenntartás Bögre és mtsai (1988) valamint Deák és mtsai (1988) által leírtak szerint történt. A lucerna sejtszuszpenziót három nappal az átpasszálás után sejtfalemésző oldattal (2% Celluláz RS és 0,2% pektoláz Y23 MaCa oldatban (3,64% mannitól, 1,17% CaCl<sub>2</sub> és 0,2% MES)) kezeltük egy éjszakán át. Következő lépésként a protoplasztokat leszűrtük (100-50 $\mu$ m), majd 0,6 M-os szacharóz gradiensen centrifugáltuk őket, hogy az életképes protoplasztokat elkülöníthessük a sejttörmeléktől. Az izolált protoplasztokat MaCa oldattal való mosás után K75 (Kao és mtsai, 1974) tápoldatban tenyésztettük tovább 2x10<sup>5</sup> protoplaszt/ml sűrűségben.

### **Protoplaszt transzformálás**

A protoplasztok DNS felvételét polietilén-glikollal (PEG) indukáltuk (Negrutiu és mtsai, 1987). 2x10<sup>6</sup> protoplasztot 20  $\mu$ g plazmid DNS-sel transzformáltunk.

### **Növénytranszformálás**

A bináris vektor konstrukciókat kompetens *Agrobacterium tumefaciens* (GV 2260 törzs; Deblaere, 1985) sejtekbe transzformáltuk. A kompetens sejtek készítését és azok transzformálását Holsters és mtsai (1978) módszerével végeztük.

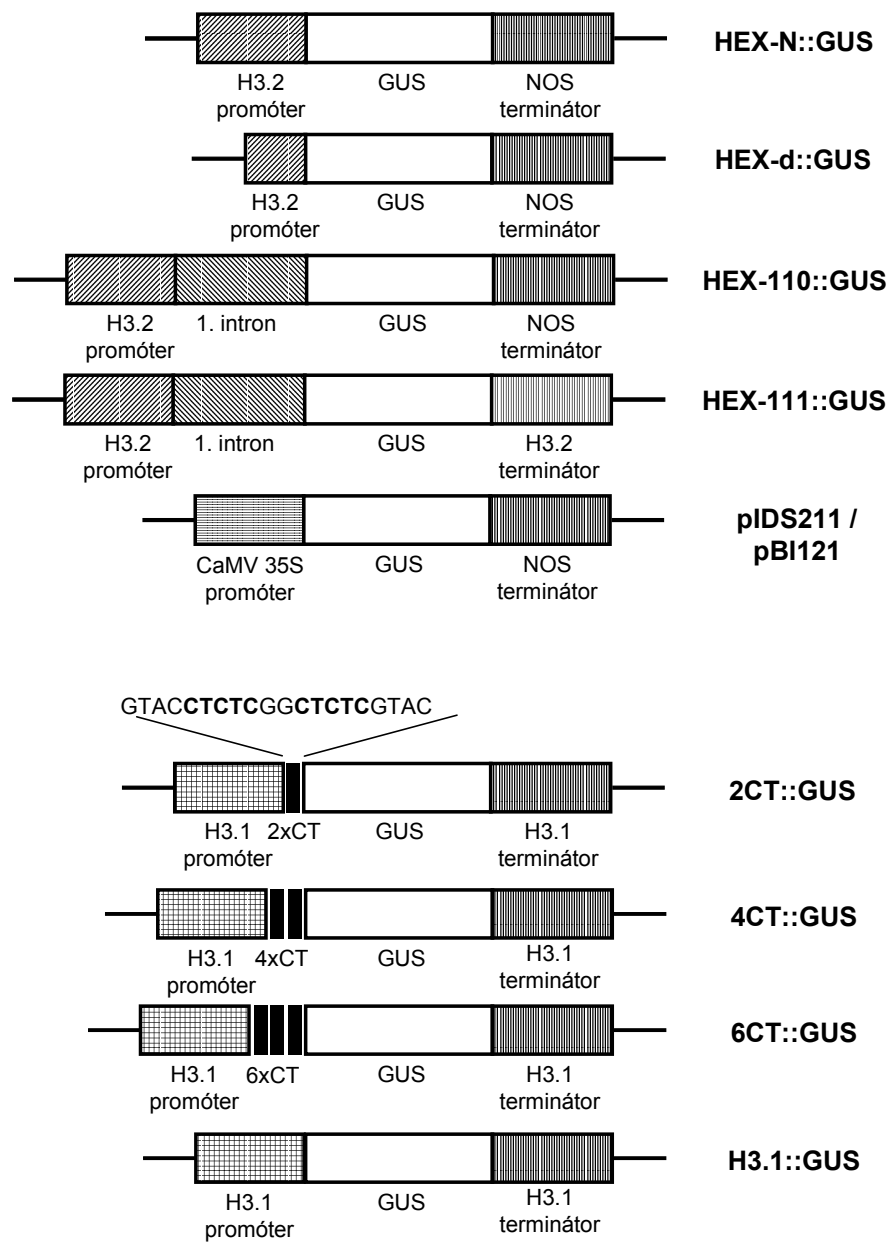
A dohány növények (*Nicotiana tabacum* cv SR1) transzformálását Fisher és Guiltinan (1995) módszerével végeztük. A dohány növények levéldarabkáit a megfelelő plazmidot hordozó *Agrobacterium* törzssel inkubáltuk együtt regeneráló táptalajon (MS táptalaj 1 mg/l 6-benzilaminopurinnal /6-BAP/ kiegészítve, antibiotikum nélkül) 2 napig. A baktérium eltávolítása után (a levelek steril vízzel való mosása) a levéldarabokat 1 mg/l 6-BAP, 100 mg/l kanamicin és 500 mg/l augmentin tartalmú MS táptalajon regeneráltattuk. A regenerált hajtásokat hormonmentes MS táptalajon gyökerezettük 100 mg/l kanamicin és 500 mg/l augmentin jelenlétében.

## 5. Eredmények

### ***Az izolált lucerna hiszton H3.2 promóter erős, konstitutív kifejeződést biztosít a riporter génnek***

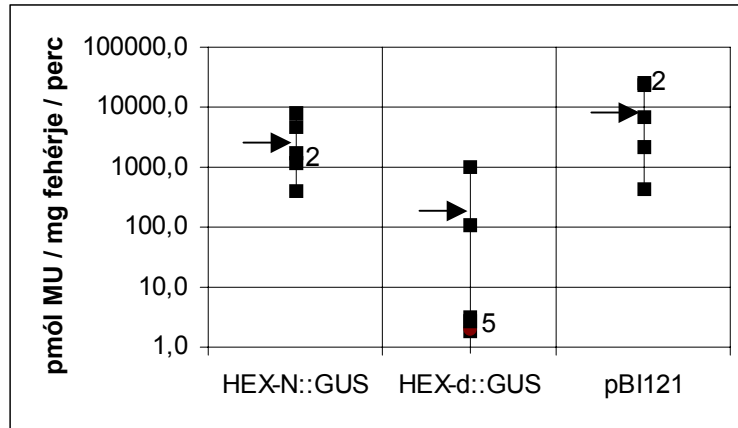
Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy az izolált, riporter génhez kapcsolt H3.2 promóter is mutatja-e a sejtciklustól független, magas szintű kifejeződést. A H3.2 gén 424 bázispárnyi promóter szakaszát az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon a GUS riporter génhez fúzionáltattuk. Transzkripció terminációs és poliadenilációs jelként a nopalin szintáz gén (NOS) terminátorát alkalmaztuk. A HEX-N::GUS elnevezésű expressziós kazettát (2. ábra) a pBIN19 bináris vektorba építettük be (pBHEX-N::GUS). Kontrollként a pBI121 (Clonetech) vektort használtuk, mely a GUS riporter gént tartalmazza a CaMV 35S promóter irányítása alatt (2. ábra). Negatív kontrollként egy olyan konstrukciót készítettünk, mely a H3.2 promóter egy rövid, 193 bázispárnyi szakaszát hordozza (pHEX-d::GUS, 2. ábra, illetve pBHEX-d::GUS). Ez a promóter szakasz egy minimális promótert jelent, melyben csak a TATA box található meg, róla transzkripció egyéb *cis* szabályozó elemek hiányában nem indulhat el. Mindhárom konstrukcióval *Agrobacterium tumefaciens* segítségével dohány növényeket transzformáltunk. A pBHEX-N::GUS és a pBI121 konstrukciók esetében 5, a pBHEX-d::GUS esetében pedig 7 független elsődleges transzformáns vonalat regeneráltattunk. A teljes hosszúságú génkazetta jelenlétét és a beépülések számát Southern hibridizációs analízissel vizsgáltuk (az adatokat nem mutatjuk), ami azt mutatta, hogy a transzgenikus növényekben az expressziós kazetta 1-4 példányban fordul elő.

A második generációs növények 5 centiméternél hosszabb leveléből GUS aktivitásokat mértünk. Ezek a levelek kevés aktívan osztódó sejtet tartalmaznak, amire a sejtciklus függő hiszton H3.1 génvariáns alacsony aktivitása is utal (Kapos és mtsai, 1993). A fluorometriás GUS aktivitás mérés eredménye a 3. ábrán látható. A pBHEX-N::GUS konstrukció magas szintű aktivitást mutatott meghatározott variációkkal az egyes független vonalak esetében. A mért aktivitások átlaga alatta maradt a CaMV 35S promóter (pBI121) esetében megfigyeltnek, de az egyes vonalakat vizsgálva sok esetben elérte azt. A hét, rövid promóter szakaszt hordozó vonalból (pBHEX-d::GUS) csak kettő mutatott jól mérhető aktivitást, ami valószínűleg



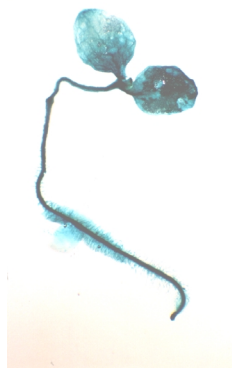
**2. ábra** A transzformálásra felhasznált növényi vektorok expressziós kazettáinak vázlatos képe. A konstrukciók elkészítésének, illetve az expressziós kazetták növény transzformálására alkalmas, úgynevezett bináris vektorba építésének menetét az “Anyagok és módszerek” fejezet tartalmazza.

a beépülés helyének köszönhető. Öt további vonal ugyanis a megfelelő méretű transzgen jelenlétének ellenére, a várakozásainknak megfelelően nem mutatott mérhető, a transzformálatlan háttérnél magasabb aktivitást.



**3. ábra** GUS aktivitások transzgenikus dohány növényekben. A négyzetek a független vonalak levelében mért értékeket mutatják. Azokban az esetekben, ahol a független vonalak aktivitási értékei az ábrán nem különíthetők el egyértelműen az azonos értékhez tartozó független vonalak számát is feltüntettük. Az egyes konstrukciók esetében az átlagos aktivitást nyíllal jelöltük.

Az izolált hiszton H3.2 promóter szövetspecifitásának vizsgálatára transzgenikus dohány csíranövényeken hisztokémiai GUS festést végeztünk. Valamennyi független vonal hasonló festődést mutatott, ezek egyike látható a 4. ábrán. Erős GUS festődés volt megfigyelhető a csíranövény valamennyi szövetében, ami világosan utal arra, hogy az izolált H3.2 promóter azokban a szövetekben is aktív, melyek csak kevés osztódó sejtet tartalmaznak.



**4. ábra** A HEX-N::GUS expressziós kazettát hordozó dohány csíranövény hisztokémiai GUS festésének eredménye.

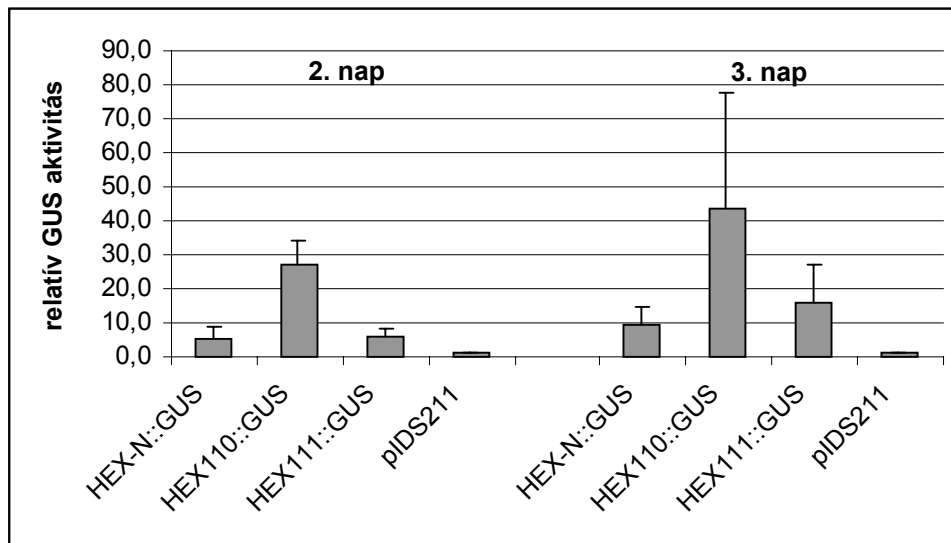


## ***A lucerna H3.2 gén első, CT-gazdag intronjának hatása a riporter gén működésére lucerna A2-es protoplasztokban***

Következő megválaszolandó kérdésként arra kerestük a választ, hogy mely további elemek képesek a hiszton H3.2 promóter erősségét befolyásolni. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy az msH3g1 genomi klón első, CT gazdag intronja képes-e erősíteni az izolált promóter működését. A kérdés vizsgálatára további GUS expressziós kazettákat készítettünk az msH3g1 genomi klón különböző szekvencia részleteinek felhasználásával. Ezen expressziós kazetták, konstrukciók felépítése az 2. ábrán látható. A pHEX110::GUS konstrukció a pHEX-N::GUS-hoz hasonlóan tartalmazza a GUS riporter gént a lucerna hiszton H3.2 gén 424 bázispárnyi promóteréhez fúzionáltatva, a NOS terminációs szignált, valamint a transzkripcionális és a translációs kezdő pont között a hiszton gén első, CT-gazdag intronját. A harmadik vizsgálandó konstrukció megegyezett a pHEX110::GUS összeállítással, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a NOS terminátort a hiszton gén saját terminátorára cseréltük (pHEX111::GUS). Pozitív kontrollként a pIDS211 elnevezésű plazmidot használtuk, amely a GUS riporter gént tartalmazza transzkripcionálisan fúzionáltatva a széleskörűen alkalmazott CaMV 35S promóterhez. Transzkripció terminációs szignálként ebben az esetben a bakteriális NOS terminátor szolgált. A pIDS211 és pBI121 plazmidok ugyanazt az expressziós kazettát tartalmazták (Stefanov és mtsai, 1991).

A konstrukciók működését tranziens expressziós kísérletekben vizsgáltuk. Lucerna A2-es sejtszuszpenzióból származó protoplasztokat transzformáltunk az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon. Transzformálás után 2 és 3 nappal mintát vettünk, és a mintákból GUS aktivitásokat mértünk. A 5. ábra három független kísérlet eredményét mutatja. Minden esetben a három független kísérlet átlagát ábrázoltuk a pozitív kontroll CaMV 35S promóter által mutatott aktivitáshoz viszonyítva. A transzformálatlan protoplasztokban, valamint a pHEX-d::GUS konstrukció esetében mért GUS aktivitás mértéke minden esetben alacsonyabb volt, mint 1 pmól MU miligramm fehérje<sup>-1</sup> perc<sup>-1</sup>. Az ábrán látható, hogy mindhárom, hiszton promóteren alapuló konstrukció magasabb GUS aktivitásokat mutatott, mint a virális promóter. A legmagasabb aktivitás a pHEX-110::GUS konstrukció esetében volt mérhető, ami arra utal, hogy a polipirimidin-gazdag intron szekvencia felerősítette a promóter működését. Ezzel szemben NOS terminátornak az msH3g1

genomi klón 3' nemtranszlálódó régiójára cserélése a GUS aktivitás csökkenését okozta.



**5. ábra** Tranziens GUS aktivitások lucerna A2-es protoplasztokban. A protoplasztokat az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon transzformáltuk a jelölt konstrukciókkal. Transzformálás után 2 és 3 nappal mintát vettünk, és belőle GUS aktivitást mértünk. Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát mutatja, a szórás feltüntetésével. A mért aktivitás értékeket minden esetben a CaMV 35S promóter (pIDS211) által mutathoz viszonyítottuk.

### ***A lucerna H3.2 gén első, CT-gazdag intronjával kiegészített H3.2 promóter és a virális CaMV 35S promóter működésének összehasonlítása transzgenikus dohány növényekben***

Tranziens expressziós kísérletekben a legmagasabb szintű kifejeződést a pHEX110::GUS konstrukció mutatta. A következőkben megvizsgáltuk, hogy ez a magas szintű kifejeződés kimutatható-e heterológ rendszerben, transzgenikus dohány növényekben. Az "Anyagok és módszerek" részben leírt módon az expressziós kazettát a pBIN19 bináris vektorba klónoztuk (pBHEX110::GUS). Kontrollként ebben az esetben is a pBI121 (Clontech) vektort használtuk. Mindkét konstrukcióval *Agrobacterium tumefaciens* segítségével dohány növényeket transzformáltunk. A pBHEX110::GUS konstrukció esetében 15, a pBI121 esetében

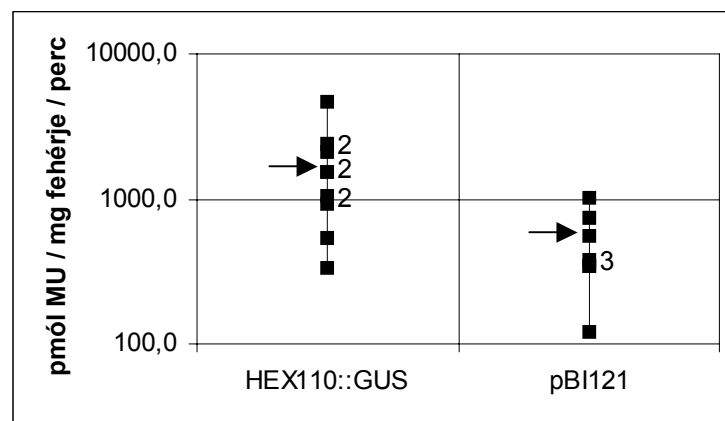
HEX110::GUS	
#1	++
#2	++
#3	++
#4	-
#5	++
#6	++
#7	++
#8	++
#9	++
#10	++
#11	+
#12	++
#13	++
#14	+
#15	-

pBI121	
#1	-
#2	+
#3	+
#4	+
#5	+
#6	-
#7	++
#8	++
#9	++
#10	++
#11	-
#12	-
#13	++
#14	++

**1. táblázat** Az első generációs transzgénikus dohány növények hisztokémiai GUS festésének eredménye. Jelölések: ++ : erős festődés; + : gyenge festődés; - : nincs festődés. A növények levélnyelét X-Gluc tartalmú puffer oldatban inkubáltuk az “Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint.

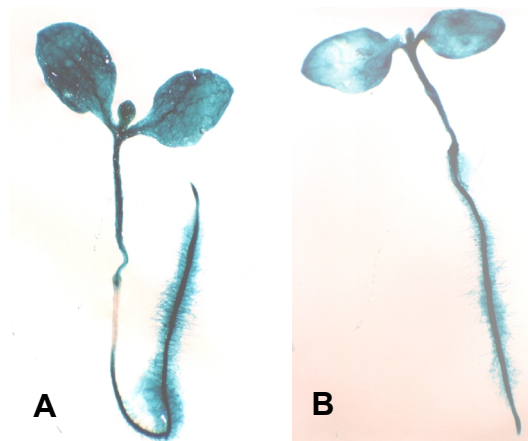
pedig 16 független elsődleges transzformáns vonalat regeneráltattunk. A teljes hosszúságú génkazetta jelenlétét és a beépülések számát Southern hibridizációs analízissel vizsgáltuk (az adatokat nem mutatjuk), ami alapján elmondható, hogy a transzgénikus növényekben az expressziós kazetta 1-4 példányban fordul elő. A funkcióképes transzgén jelenlétének igazolására az elsődleges transzformánsok levelén hisztokémiai GUS festést végeztünk, melynek eredményét a 1. táblázat mutatja.

A hiszton promóter esetében kilenc, a CaMV 35S esetében hét független vonalat vizsgáltunk tovább. A növényeket üvegházban földbe helyeztük. Fejlődésük során nem mutattak morfológiai abnormalitást, az önbeporzás minden esetben magot eredményezett. A magokat kanamicin jelenlétében csíráztattuk ki. Az előző transzformáláshoz hasonlóan a második generációs növények idős, 5 centiméternél hosszabb leveléből GUS aktivitást mértünk. A fluorometriás GUS aktivitás mérés magas szintű promóterműködést mutatott a H3.2 konstrukció esetében, meghatározott variációkkal az egyes vonalakat tekintve (6. ábra). A pBI121 konstrukció esetében az átlagos GUS aktivitás a hiszton promóter által biztosított harmada volt.



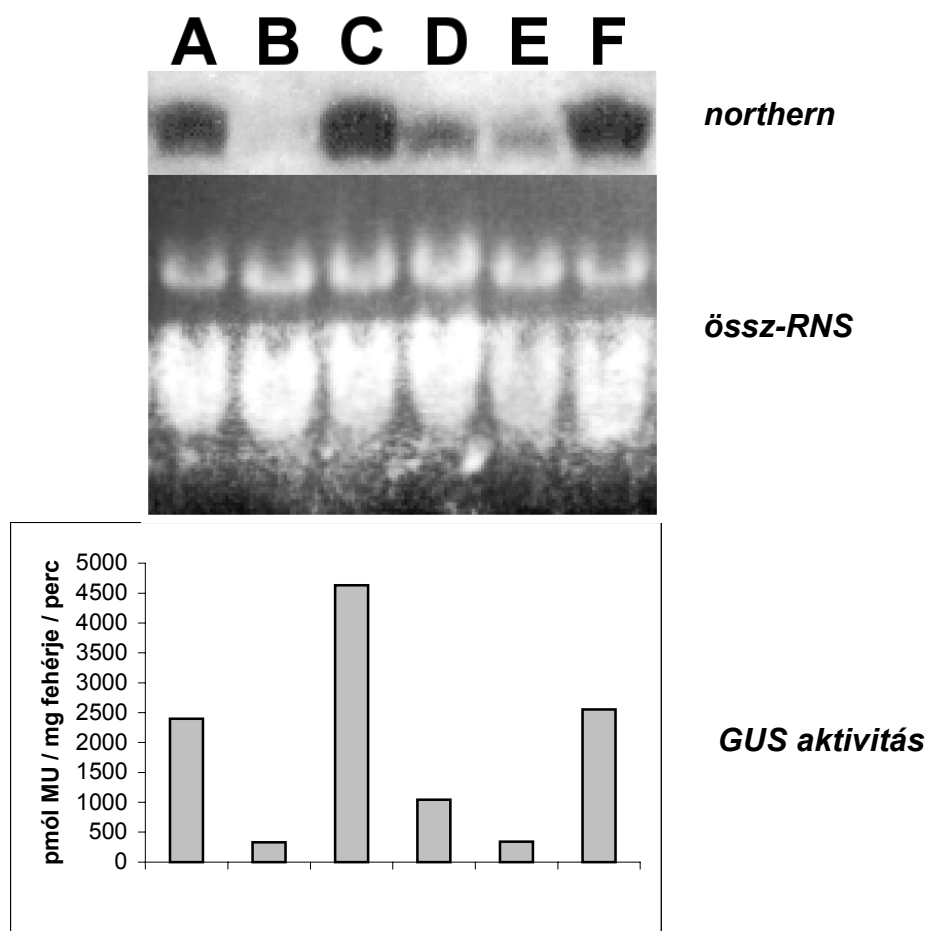
**6. ábra** GUS aktivitások transzgénikus dohány növényekben. A négyzetek a független vonalak levelében mért értékeket mutatják. Azokban az esetekben, ahol a független vonalak aktivitási értékei az ábrán nem különíthetők el egyértelműen az azonos értékhez tartozó független vonalak számát is feltüntettük. Az egyes konstrukciók esetében az átlagos aktivitást nyíllal jelöltük.

A GUS aktivitás szöveti eloszlásának vizsgálatára a transzgenikus dohány csíranövényeken hisztokémiai GUS festést végeztünk (7. ábra). Erős GUS festődés volt megfigyelhető mindkét konstrukció esetében, ami világosan utal arra, hogy a pBHEX-110::GUS konstrukció az intront nem tartalmazóhoz hasonlóan a csak kevés osztódó sejtet tartalmazó szövetekben is aktív. A H3.2 promóterre jellemző, hogy alacsony GUS aktivitás csak a hipokotil felső részében figyelhető meg (Chaubet-Gigot és mtsai, 1999) (7. ábra), amit ezen konstrukció esetében mi is ki tudtunk mutatni. Ezzel ellentétben korábban megfigyelték, hogy a sejtosztódás-függő lucerna hiszton H3.1 promóter egy azonos expressziós kazettában csak a merisztematikus zónában okozott GUS aktivitást (Kapros és mtsai, 1993).



**7. ábra** A HEX-110::GUS expressziós kazettát hordozó dohány csíranövény hisztokémiai GUS festésének eredménye (A). Kontrollként a pBI121 konstrukcióval transzformált transzgenikus vonalat használtunk (B).

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a mért enzimaktivások arányaikban megfelelnek-e a promóterek transzkripciós aktivitásának *northern* hibridizációt végeztünk. A pBHEX-110::GUS konstrukció esetében négy, a kontroll, CaMV 35 promóter esetében kettő második generációs, eltérő mértékű enzimaktivást mutató vonal GUS mRNS szintjét vizsgáltuk meg. A vizsgálat eredményét a 8. ábra mutatja. Az ábrán jól látható, hogy a megfigyelt hibridizációs jel nagysága arányaiban jó korrelációt mutatott az ugyanezen vonalakon mért GUS enzimaktivásokkal, a mért enzimaktivási különbségek jól tükrözik az mRNS szintű különbségeket.

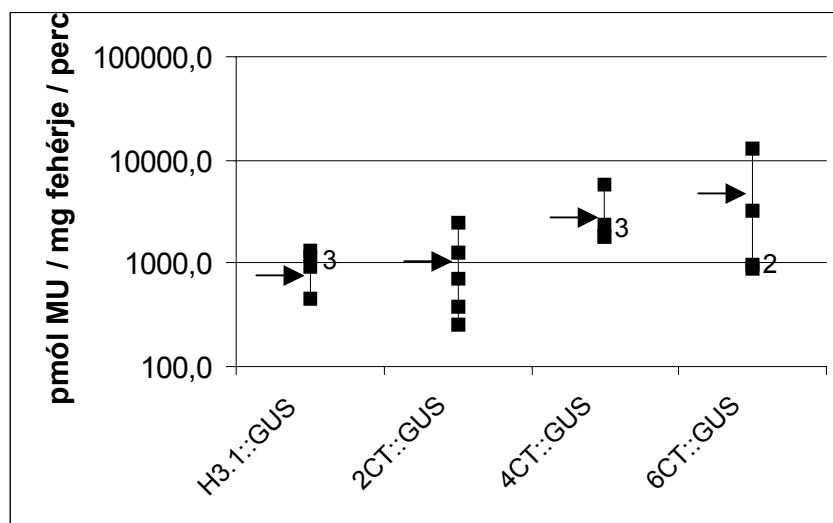


**8. ábra** Második generációs transzgénikus dohány vonalak *northern* hibridizációs eredményei, és GUS aktivitás értékei. Hibridizációs próbaként a pHEX110::GUS konstrukció NcoI / Sac I fragmentjét (GUS) használtuk. A-D: HEX110::GUS; E, F: pBI121.

### ***CT-gazdag szekvencia elemek hatása az merisztéma-specifikus kifejeződésű lucerna hiszton H3.1 promóter működésére***

Az előző kísérletekből világossá vált, hogy a CT gazdag szekvencia elemek fontos szerepet játszanak a lucerna hiszton promóter magas szintű kifejeződésében. A lucerna A2-es sejtszuszpenzió végzett tranzien expressziós kísérletekben kimutattuk, hogy a polipirimidin-gazdag intron jelenléte képes erősíteni a hiszton H3.2 promóter működését, feltehetően hozzájárul az erős génexpresszióhoz. A lucerna H3.2 promóter tartalmazza azokat a szekvencia elemeket, melyek a H3.1 promóter S-fázis specifikus kifejeződését biztosítják. Az egyetlen számottevő különbség a H3.2 gén 5' nemtranszlálódó régiójában és intronjaiban található CT

gazdag szekvenciák jelenléte. Ha igaz az, hogy a polipirimidin szekvenciák is felelősek a H3.2 promóter konstitutív működéséért, akkor ezek a szekvenciák feltételezhetően megváltoztatják a H3.1 promóter szövetspecifitását. Ennek vizsgálatára további konstrukciókat készítettünk a H3.1 promóter, és szintetikus, CT-gazdag oligonukleotidok felhasználásával (2. ábra). A konstrukciókat az “Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak alapján készítettük el. A három új expressziós kazetta tartalmazza a GUS riporter gént a lucerna H3.1 promóter irányítása alatt, valamint a NOS terminációs szignált. A transzkripció és transzláció kezdőpontja közé a CTCTC szekvenciát tartalmazó szakaszokat építettünk be. Ez a szekvencia elem a 2CT::GUS kazetta esetében kétszer, a 4CT::GUS esetében négyszer, a 6CT::GUS esetében pedig hatszor fordul elő. Az expressziós kazettákat pBIN19 bináris vektorba építettük be (pB2CT::GUS, pB4CT::GUS valamint pB6CT::GUS), majd velük *Agrobacterium tumefaciens* segítségével dohány növényeket transzformáltunk. Kontrollként a H3.1 promóter – GUS – NOS kazettát (2. ábra) hordozó plazmidot használtuk (pBH3.1::GUS).



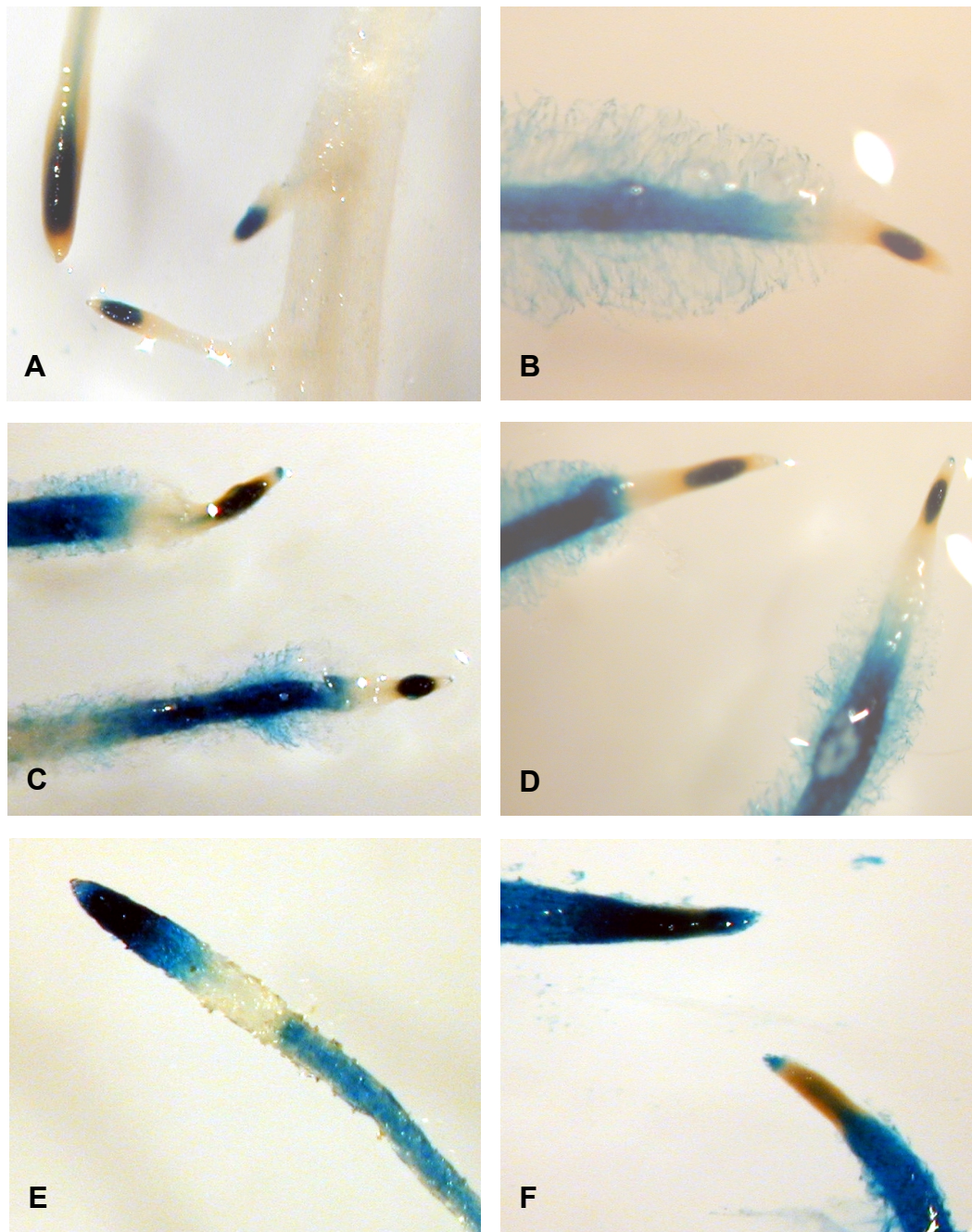
**9. ábra** GUS aktivitások transzgenikus dohány növényekben. A négyzetek a független vonalak levelében mért értékeket mutatják. Azokban az esetekben, ahol a független vonalak aktivitási értékei az ábrán nem különíthetők el egyértelműen az azonos értékhez tartozó független vonalak számát is feltüntettük. Az egyes konstrukciók esetében az átlagos aktivitást nyíllal jelöltük.

A GUS expresszió erősségét és szöveti megoszlását második generációs transzgenikus dohány növényeken vizsgáltuk. A pB2CT konstrukció esetében öt, a másik három konstrukció esetében pedig négy-négy független transzformáns vonalon végeztünk GUS aktivitás mérést és hisztokémiai GUS festést.

A GUS aktivitás mérés eredménye a 9. ábrán látható. Valamennyi független vonal jól mérhető aktivitást mutatott, jelentős különbségekkel az azonos expressziós kazettát hordozó vonalak esetében. Ennek ellenére jól megfigyelhető enzimaktivitás erősödés mutatható ki a CT-gazdag elemek számának a növekedésével. A polipirimidin-gazdag szekvencia részletek beépítése egyértelműen aktivitás növekedést okozott.

Annak eldöntésére, hogy vajon a CT-gazdag szekvenciák beépítése megváltoztatta-e az S-fázis specifikus hiszton promóter szövetspecificitását a transzformáns dohány növények gyökereiben hisztokémiai GUS festést végeztünk. Az azonos expressziós kazettákat hordozó vonalak hasonló festődést mutattak, vonalanként egy-egy jellemző festődés eredménye látható a 10. ábrán. További kontrollként pBHEX110::GUS valamint pBI121 konstrukciókkal transzformált dohány növényeket használtunk. Az ábrán jól megfigyelhető, hogy míg a H3.1::GUS expressziós kazetta esetében csak a gyökércsúcsban figyelhető meg festődés, addig a CT-gazdag szekvenciákkal kiegészített lucerna H3.1 promóter a konstitutív H3.2 promóterhez és a CaMV 35S promóterhez hasonlóan a nem osztódó szövetekben is működik, a gyökércsúcsban megfigyelhetővel közel azonos mértékben. A fent bemutatott kísérletek eredménye arra utal, hogy a konstitutívan kifejeződő lucerna H3.2 gén 5' nem átíródó régiójában illetve intronjaiban előforduló polipurin/polipirimidin szekvenciákhoz hasonló CT gazdag elemek képesek megváltoztatni az S-fázis specifikus hiszton H3.1 promóter erősségét és szövetspecificitását, ezáltal alátámasztva azt a feltételezést, mely szerint ezek az elemek fontos szerepet játszhatnak abban, hogy a lucerna H3.2 gén a promóterében megtalálható sejtciklus-függő expresszióért felelős *cis* regulátor elemek ellenére konstitutívan, magas szinten fejeződik ki.





**10. ábra** Transzgénikus dohány növények gyökerének hisztokémiai GUS festése. A - H3.1::GUS; B - 2CT::GUS; C - 4CT::GUS; D - 6CT::GUS; E - HEX110::GUS; F - pBI121.

## 6. Eredmények megvitatása

Míg a legtöbb hiszton gén S-fázis specifikus, a DNS szintézis idejével megegyező génexpressziót mutat, a növényi és állati H3 hiszton gének egy meghatározott csoportja ettől eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. Erre a csoportra a sejtciklustól független kifejeződés a jellemző. Génjeikben intronok találhatóak, és a kódolt fehérjék csak néhány aminosavban térnek el a sejtciklus-függő társaiktól. Lucerna haploid genomában három-három ilyen, úgynevezett replacement hiszton H3 gén jelenléte valószínűsíthető (Robertson és mtsai, 1996). Ez a három gén a logaritmus növekedés fázisában levő A2 lucerna sejtszuszpenzióban kétszer annyi új hiszton H3 proteint termel, mint a több, mint ötven sejtciklus-függő kifejeződésű hiszton H3 gén összesen (Waterborg, 1993; Wu és mtsai, 1989). Ha figyelembe vesszük a két csoport eltérő expressziós mintázatát (Robertson és mtsai, 1996), valamint a hiszton H3.2 transzkript háromszor nagyobb stabilitását (Kaprocs és mtsai, 1995) azt mondhatjuk, hogy egy génre vetítve egy rHis gén háromszor-öttször gyakrabban íródik át, mint egy S fázis specifikus hiszton H3 gén (Robertson és mtsai, 1996).

A lucerna és *Arabidopsis* rHis hiszton H3 gének tartalmazzák azokat a promóter elemeket, melyek a sejtciklus függő hiszton gének S fázis specifikus kifejeződéséért felelősek (Lepetit és mtsai, 1992; Robertson, 1997). Filogenetikai analízis arra utal, hogy az intronokat tartalmazó rHis hiszton gének az állatokban és a növényekben egymástól függetlenül fejlődtek ki (Kladde and Simpson, 1994; Thatcher és mtsai, 1994; Waterborg and Robertson, 1996), és az intronok beépülése minden esetben együtt járt a konstitutív kifejeződés megjelenésével (Waterborg and Robertson, 1996). Valamennyi ismert növényi hiszton gén promóterében, függetlenül azok expressziós mintázatától, hasonló elemek találhatóak (Chaboute és mtsai, 1993; Chaubet és mtsai, 1992; Robertson és mtsai, 1996, 1997), de egyikük sem tűnik felelősnek a replacement hiszton gének konstitutív kifejeződéséért (Robertson és mtsai, 1997). A rHis hiszton gének jellemzője az 5' nem transzlálódó régióban található intron (Waterborg and Robertson, 1996). Az egyetlen ismert kivétel ez alól a lucerna hiszton H3.2 gén (Oberto és mtsai, 1994), 5' nemtranszlálódó régiója azonban megtartotta az 5' UTR-ben található intronok azon szekvencia elemeit, melyek valószínűleg a konstitutív kifejeződéséért felelősek (Robertson és mtsai,

1997). Polipirimidinekben gazdag szekvenciák nagy mennyiségben fordulnak elő a lucerna H3.2 gének 5' nemtranszlálódó régiójában és intronjaiban, a két *Arabidopsis* replacement H3.III gén intronjaiban (Chaubet és mtsai, 1992; Waterborg and Robertson, 1996), valamint valamennyi állati replacement hiszton gén intronjaiban (Waterborg and Robertson, 1996). Polipirimidin-gazdag szekvenciák általában nem gyakoriak sejtciklus-függő H3 génekben. Chaubet-Gigot és munkatársai (2001) kimutatták, hogy *Arabidopsis* H3 replacement hiszton variáns polipirimidin-gazdag intronját sejtciklus-függő kifejeződést mutató *Arabidopsis* H3 gén 5' nemtranszlálódó régiójába építve a kiméra promóter elveszítette merisztéma-specifikus aktivitását, és a promóter erőssége jelentősen megnőtt. Ezek az eredmények egybeesnek az általunk megfigyelt expressziós sajátosságokkal, miszerint a polipirimidin-gazdag lucerna replacement H3.2 promóter a sejtciklus-függő expressziót biztosító kontroll elemek jelenlétének ellenére szintén magas szintű, konstitutív kifejeződést mutathat.

Munkánk során először azt vizsgáltuk, hogy az izolált, 424 nukleotid hosszúságú lucerna H3.2 promóter képes-e magas szintű, sejtciklustól független kifejeződést biztosítani az irányítása alatt álló riporter génnek. Kimutattuk, hogy a H3.2 promóter, mely nem tartalmaz intront az 5' UTR régióban, de megtartotta ugyanitt a polipirimidin/polipurin szekvencia elemeket magas riporter génexpressziót mutat. Teszi ezt annak ellenére, hogy a promóter tartalmazza mindazon elemeket, melyek bizonyítottan az S-fázis indukálható, merisztéma-specifikus kifejeződésért felelősek. Ezek az eredmények nagy mértékben valószínűsítik, hogy a PPY/PPU szekvenciák okozzák ezt a erős, konstitutív kifejeződést. Erre utal az a kísérletünk is, melyben a promótert a hiszton gén első intronjával egészítettük ki. Lucerna tranziens expressziós rendszerben valamint stabil transzformáns dohány növényekben az intron beépítése bizonyítottan expresszió növekedést okozott, mind az intron nélküli promóterhez, mind pedig a kontrollként használt CaMV 35S promóterhez viszonyítva. A PPY/PPU szekvenciák hatása kifejeződik specifikus bázispárosodások vagy helyi DNS konformáció fehérjék általi felismerésében, vagy pedig intramolekuláris triplex DNS szerkezet kialakításában (Maher III, 1992) mely valószínűleg direkt módon szabályozza a génkifejeződést (Firulli és mtsai, 1994; Maher III, 1992; Sarkar és Brahmachari, 1992). A hiszton H3 cDNS klón (Robertson és mtsai, 1996) 5' UTR-jében egyes szál-specifikus nukleáz hasítás segítségével a triplex DNS molekula kimutatása nem volt lehetséges.

A génexpresszió intron közvetítette növekedését (IME) riporter gének felhasználásával számos két- és egyszikű növényben leírták. A kétszikűekben leírt tipikusan 10 szerez expresszió növekedés egyszikűek esetében meghaladhatta a százszorosát (Callis és mtsai, 1987; Rethmeier és mtsai, 1997; Rose és Beliakoff, 2000). Az IME-t mint poszttranszkripcionális folyamatot írták le, mely a transzkript sejtmagi stabilizációján keresztül megnövekedett riporter gén kifejeződéshez vezet (Rethmeier és mtsai, 1997; Rose és Beliakoff, 2000). A folyamat egy, a promóter és a kódoló szekvencia között elhelyezkedő intront igényel (Callis és mtsai, 1987; Snowden és mtsai, 1996), és az intron orientációja normális kell, hogy legyen (Luehrsen és Walbot, 1991; Rose és Beliakoff, 2000). *Arabidopsis*on végzett kísérletek arra utalnak, hogy a splicing folyamat által felismert intron szerkezet a meghatározó, maga a szekvencia kevésbé lényeges (Rose és Beliakoff, 2000). Azonban míg bizonyos intronok erősítik a riporter gén kifejeződését, mások nincsenek rá hatással (Macarenhas és mtsai, 1990; Luehrsen és Walbot, 1991; Rose és Beliakoff, 2000). Kimutatták azt is, hogy az intronok jelenléte egyéb folyamatokat is befolyásolhat, mint például a transláció (Gallie és Young, 1994), vagy funkcionálhatnak promóterként (Warnecke és mtsai, 1999) illetve enhanszerként (Gidekel és mtsai, 1996; Battacharyya és Banerjee, 1999). Rövid CT gazdag szekvenciákról bizonyították, hogy TATA box hiányában a promóteren szolgálhatnak transzkripcionális kezdőpontként (Xu és Goodridge, 1998). Habár a lucerna és *Arabidopsis* replacement hiszton gének promóterei tartalmazzak TATA boxot, transzgénikus *Arabidopsis* növényekben vizsgálták ennek lehetőségét. Ezek a kísérletek azt igazolták, hogy az 5' UTR PPY/PPU gazdag intronja nem tud transzkripció startpontként funkcionálni (Chaubet-Gigot és mtsai, 2001). Felmerül a kérdés, hogy a kísérleteinkben tapasztalt expresszió növekedés a polipirimidin-gazdag szekvenciáknak, vagy pedig a funkcionális intron jelenlétének köszönhető, függetlenül annak bázisösszetételétől. *Arabidopsis*on végzett kísérletek arra utalnak, hogy a rHis gének intronjai az IME-re jellemzőtől eltérő módon befolyásolják a riporter gén kifejeződését (Chaubet-Gigot és mtsai, 2001). Míg az IME általánosságban, sejttípustól függetlenül növeli a génexpressziót, addig az *Arabidopsis* konstitutív hiszton gének intronjaival végzett kísérletek azt mutatják, hogy az különböző sejttípusokban eltérő mértékű promóteraktivitás növekedést okozott (Chaubet-Gigot és mtsai, 2001).

A lucerna H3.2 promóterrel végzett kísérleteink az irodalmi adatokkal egybehangzóan arra utalnak, hogy a PPY/PPU szekvenciáknak fontos szerepe van a sejtosztódástól független génkifejeződés biztosításában. Ezt a feltételezést méginkább alátámasztja az a kísérletünk, melyben az S-fázis specifikus lucerna H3.1 promótert egészítettük ki CT gazdag szekvencia elemekkel. Ki tudtuk mutatni, hogy ezen elemek jelenléte megváltoztatta a H3.1 promóter erősségét és szövetspecifikusságát, hasonlóvá téve azt a rHis H3.2 promóteréhez. Ez a megfigyelésünk jó egyezést mutat az *Arabidopsis*-on végzett kísérletekkel (Chaubet-Gigot és mtsai, 2001), melyben az *Arabidopsis* merisztéma-specifikus H4 promóter működését változtatták meg hasonló módon.

Az, hogy ezek a faktorok hogyan változtathatták a replikáció-függő hiszton gént konstitutívá, egyelőre nem ismert. Mindenesetre, a *Drosophila* GAGA faktor egy lehetséges magyarázat. A GAGA fehérjék a GAGAG polipurin szekvenciát ismerik fel (Omichinski és mtsai, 1997), függetlenül attól, hogy az a kódoló vagy a nemkódoló szálon helyezkedik el. Ezen motívumok szekvenciája nagyfokú variabilitást mutat, miközben fennmarad a gél shift és DNáz footprinting vizsgálatokkal kimutatható erős, specifikus kötés. Számos *Drosophila* gén promóterében megtalálhatóak ezek a kötőhelyek (Biggin és Tjian, 1988; Kolluri és mtsai, 1992; Lu és mtsai, 1993; O'Brien és mtsai, 1995), mint például a hősokk érzékeny hsp26 gén (Wall és mtsai, 1995) promóterében közel a hősokk válasz elemhez, és intronokban, mint például az  $\alpha$ 1-tubulin gén első intronja (O'Donell és Wensink, 1994; O'Donell és mtsai, 1994), valamint a lucerna és *Arabidopsis* rHis génekben (2. táblázat). Carl Wu és mások munkája nyomán a GAGA faktor transzkripciós aktivátornak bizonyult. Kimutatták, hogy a GAGA faktor egyrészt megakadályozza a nukleoszómák kialakulását, valamint ATP jelenlétében eltávolítja azokat (Lu és mtsai, 1993; Tsukiyama és mtsai, 1994; Wall és mtsai, 1995). Ezáltal a transzkripciós faktorok számára hozzáférhetővé teszi a DNS-t és visszafordítja az erős repressziót biztosító hajtogatottságát, mely elősegíti a génátíródást. A nukleoszóma sűrűség 80-90 százalékosra való redukciója és a hiszton H1 10-50 százalékos elvesztése (Felsenfeld, 1996; Van Holde, 1989), valamint a core hisztonok dinamikus acetilálódása (Brownell és mtsai, 1996; Matthews és Waterborg, 1985) vagy szükséges a génexpresszióhoz, vagy pedig annak következtében alakul ki.

*Drosophila* GAGA faktor célszekvenciái      Polipirimidin gazdag szekvenciák változatai a növényi rHis hiszton H3 génekben

	H3.2 gének	<i>Arabidopsis</i> H3.III gének	
CTCTCTC	<b>TCTCTCT</b>	<b>CTCTCCTT</b>	<b>CCTCTTCTTT</b>
TCTCTCT	<b>TCTCTCTC</b>	CTTCCCTT	CCTTTCCTCC
CTCTgCC	CCCCTTTC	CTTCTCCC	CTCCCCTTCC
CCTCTCCC	CCTTCCTT	<b>TTCTCTTT</b>	CTCCCTTTCC
TTTCTCTTT	CTTCTCTC	TCCTCTTT	<b>CTTCTCTTTC</b>
CTCTaCTTT	TTTTCTTC	TCTCTTCT	<b>CTTTCTCTTC</b>
CTCTCTgTTTCT	<b>TTTCTCTCT</b>	TCTTTTTC	CTTTTCTCTC
CgCCTCTCgTTC	TCTTTTCTT	TTCTTCTC	TCCCTTCTTC
CCTCTCCCaCTTC	TTCCTCTTT	TTCTTCTT	TCTCTTTTTC
	CTTCTCTTC	TTCTTTTC	<b>TCTTCTCTTT</b>
	TTCCTTCTTT	TTCCCTCT	TTCTTTTCCC
	CTTCTTTCCT	<b>TTTCTCTT</b>	TTCCCTCCC
	CTCCCCTTCC	TTTCTTCC	TTTCTTCCC
	CTTTTCCCTCTC	TTTTCTCT	TTTCTTCTC
	TTTCCTTTTCCC	CTTTCTCTC	<b>CTTTCTTCTTT</b>
	<b>TTTCTTCTCTTT</b>	CTTTCTTTT	TCCCCTTCCTC
	TTTCTTCTTTCT	TCTTCTTCC	TTTCTTCTTT
	<b>CCCTCTCTCCTCT</b>	TCTTTCCTC	TCTCCTTCTTT
	<u>CTTTCTCTCTCC</u>	TCTTCTTC	CTTTCTTTTTTC
	<u>CTTTCTCTCTCTTC</u>	TTCCCTCTT	TCTTCT <b>CCTCTCTT</b>
	<u>TCTTCCCTCTCTTC</u>	TTCCCTCTT	TCTTCTTCTTCTTC
		TTCTCCTCT	
		TTTCTTCTT	

**2. táblázat** Feltételezett GAGA faktor célszekvenciák növényi kicserélődési hiszton H3 génekben.

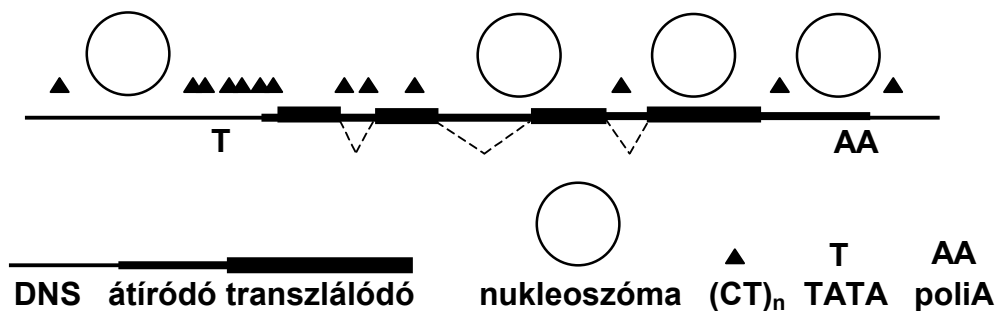
1. oszlop: PPY/PPU szekvenciák, melyek a *Drosophila* hsp26 és  $\alpha$ -1 tubulin gének esetében bizonyítottan kapcsolódnak a *Drosophila* GAGA faktorhoz (O'Donnell és Wensink, 1994; O'Donnell és mtsai. 1994; Wall és mtsai, 1995).

2. oszlop: a lucerna H3.2 gén promóterében, valamint átíró régióiban megfigyelhető hét, vagy annál több nukleotidból álló PPY/PPU szekvencia motívumok (Robertson és mtsai, 1996).

3-4. oszlop: az *Arabidopsis* kicserélődési hiszton H3.III gének promótereiben és intronjaiban található PPY/PPU szekvenciák (Chaubet és mtsai, 1992).

A növényi gének esetében azokat a szekvenciákat, melyek az első oszlopban is megtalálhatók vastag betű jelzi.

A lucerna H3.2 gén 5' nemtranszlálódó régiójának ismétlődő polipirimidin szekvenciáit aláhúzás mutatja.



**11. ábra** A lucerna H3.2 gének (msH3g1) valószínűsíthető nukleoszómális csomagoltsága. Az ábra azon a feltételezésen alapul, hogy a polipirimidin/purin szekvencia elemek GAGA-szerű fehérjékhez kötődnek, amely eltávolítja a nukleoszómákat. A törött vonalak intron szekvenciákat jelölnek.

A GAGA faktort eddig csak *Drosophilában* írták le, ahol, úgy tűnik számos gén expressziójának szabályozásában részt vesz. GAGA faktor-szerű fehérjék megtalálhatóak *Xenopus*-ban (Li és mtsai, 1998) és emberben (Desjardins és Hay, 1993). A 11. ábra a lucerna H3.2 gének feltételezett nukleoszómális csomagoltságát mutatja (Waterborg és Robertson, 1996). Az ábra azon feltevéseken alapul, mely szerint GAGA-szerű faktor létezik lucernában, és a *Drosophiláéval* azonos tulajdonságokkal rendelkezik. A CT-gazdag szekvenciáknak köszönhetően a feltételezett nukleoszóma sűrűség kevesebb, mint kétharmada a replikáció függő variáns esetében várhatóan. A csökkentett nukleoszóma sűrűség teljesen visszafordíthatja a hiszton gének S-fázison kívüli represszióját, a legnagyobb derepressziót a promóter közelében, a gének 5' régiójának közelében mutatva. Kapros és munkatársai (nem közölt adatok) gél shift kísérletekben vizsgálták annak a lehetőségét, hogy léteznek-e GAGA-szerű fehérjék a növényekben. Próbaként jelölt, duplaszálú oligonukleotidot használtak, mely a lucerna H3.2 gén 5' nemtranszlálódó régiójában található szekvencia motívumot (CTTTCTCTCTCCGA) tartalmazott (Robertson és mtsai, 1996). Ennek a kísérletnek az eredménye azt mutatja, hogy a lucerna és a brokkoli tartalmaz olyan fehérjéket, melyek képesek specifikusan kötődni a próbához. Ez alapján feltételezhető, hogy bizonyos proteinek képesek *in vivo* kölcsönhatásba lépni a lucerna hiszton H3.2 gén 5' nemtranszlálódó régiójával. Különbség volt kimutatható a brokkoli, valamint a dedifferenciálódott lucerna kallusz kultúra sejtmag-kivonatai által képzett komplexek között, ami arra utal, hogy a

különböző fajok és/vagy szövetek PPY/PPU specifikus kötő faktoraikat tekintve különbözhetnek egymástól. Az általános nukleinsav kompetitor, a poli dl-dC koncentráció növelése nem volt hatással a kötési reakcióra. A jelölt próbával megegyező szekvenciájú dupla szálú oligonukleotid 200 szoros moláris mennyiségben megakadályozta a próba komplexképzését. Azonos mennyiségű nem specifikus oligonukleotid, azonos átlagos bázieseloszlással, de a polipurin és polipirimidin szekvenciák hiányában nem váltotta ki ezt a hatást. Ez a megfigyelés az első kísérleti bizonyíték arra, hogy PPY/PPU kötő faktorok léteznek magasabbrendű növényekben, és specifikusan kölcsönhatnak a replacement hiszton H3 gén 5' nemátíródó régiójával. Az 5' nemtranszlálódó régióban található polipirimidin/purin szekvenciákhoz hasonló méretű, vagy hosszabb elemek előfordulnak a lucerna hiszton H3.2 gének intronjaiban is. Előfordulásuk gyakorisága szignifikánsan magasabb, mint az véletlenszerűen várható lenne (Waterborg és Robertson, 1996). Annak a lehetőségnek a vizsgálatára, hogy vajon azok a fehérjék, melyek kötődtek a lucerna hiszton H3 gén 5' nemtranszlálódó régiójához képesek-e azok intronjaival is kölcsönhatni, gél-shift kísérletet végeztek intron szekvencia-specifikus kompetitorok használatával. Ezekben a kísérletekben nagyfokú kompetíció volt megfigyelhető annak ellenére, hogy a próba és a kompetitor DNS csak kis mértékű szekvencia azonosságot mutatott. A kísérlet azt a feltételezést támasztotta alá, hogy az 5' nemtranszlálódó régió és az intron szekvencia olyan kötő helyeket tartalmazhat, melyek ugyanazokkal a sejtmagi faktorokkal lépnek kapcsolatba.

Tudomásunk szerint a *Drosophila* GAGA faktorról homológ fehérjét növényekből még nem klónoztak, de érdekes hasonlóságok fedezhetők fel a *Drosophila* GAGA faktor és azon proteinek között melyeket munkájukban vizsgáltak. Úgy tűnik, mindegyikük képez komplexeket (Benyajati és mtsai, 1997), és mind egyes szálú, mind dupla szálú DNS kötő aktivitással rendelkeznek, erősebb aktivitást mutatva a GA-gazdag szálhoz, mint az a *Drosophila* esetében látható (Wilkins és Lis, 1998) és ahogyan lucernában is megfigyelték. A növényi faktorok DNS kötése, legalábbis néhány komplex esetében cink iont igényel, és szintén ez szükséges a *Drosophila* GAGA faktor cink-finger doménjéhez (Benyajati és mtsai, 1997; Omichinski és mtsai, 1997; Pedone és mtsai, 1996). Az, hogy a DNS-kötés nem igényel magasfokú szekvencia-azonosságot, szintén egy közös jellemzőnek tűnik. A *Drosophila* GAGA faktorok és a növényi PPY/PPU kötő fehérjék célszekvenciáinak és a DNS kötő körülmények hasonlóságára utal az a megfigyelés is, hogy a

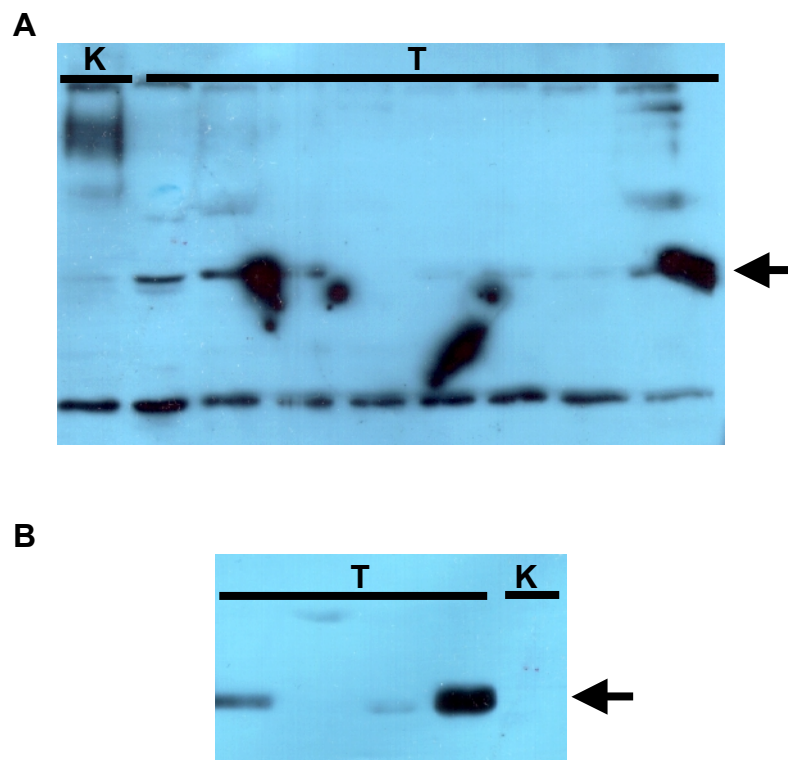


rekombináns *Drosophila* GAGA proteinek gél shift kísérletben kötődtek a H3.2 gén 5' UTR szekvenciájához (Kaprocs és mtsai, nem közöl adatok).

Azonban a PPY/PPU szekvenciák, és azok kötő faktorai magukban nem tűnnek elégségesnek a magas promóter aktivitáshoz. A TATA boxtól felfelé elhelyezkedő szekvenciák törlése nagymértékben csökkentette a hiszton promóterrel fúzionáltatott riporter gén működését az 5' UTR PPY/PPU szekvenciái ellenére. A *cis* promóter elemek hasonló szükségességét szintén megfigyelték transzgenikus *Arabidopsis* növényeken végzett kísérletekben (Chaubet-Gigot és mtsai, 2001). Ez arra utal, hogy a nyitott kromatin szerkezet a konstitutív génexpresszió szempontjából lehet, hogy szükséges, de nem elégséges követelmény. Jövőbeni fontos vizsgálandó kérdés, hogy a PPY/PPU gazdag szekvencia elemek miként befolyásolják a nem hiszton gének szövetspecifikus vagy konstitutív működését.

A 35S CaMV virális promóter széleskörűen használt idegen gének kifejeztetésére transzgenikus növényekben (Holtorf és mtsai, 1995; Razida és Walbot, 2000; Gallardo és mtsai, 1999). Viták alakultak ki a virális szekvenciák használatáról a növényi biotechnológiában. A 35S promóterben rekombináns ún. "forró pontokat" találtak (Kohli és mtsai, 1999). A 35S promóter patogén indukált védelmi reakciók által szabályozott. A természetes CaMV fertőzés transzgen inaktivációhoz, ezáltal a 35S irányított herbicid rezisztencia elvesztéséhez vezethet (Al-Kaff és mtsai, 1998, 2000). Ezért lényeges nem virális promóter-alternatívák keresése, elsősorban magasabbrendű növények esetében, amely stabil, magas szintű, konstitutív transzgen kifejeződést biztosíthat. Összehasonlítva az erős, virális 35S kariofil mozaik vírus (CaMV) promóter működésével, a H3 promóter intronnal kombinálva tranziens kísérletekben és stabil transzformáns növényekben erősebbnek bizonyult. A megfigyelt promóter erősség jó egyezést mutat az irodalomban korábban leírtakkal, mely szerint a replacement hiszton H3 gének magas szinten fejeződnek ki lucernában (Robertson és mtsai, 1996). A HEX110::GUS expressziós kazettából kiindulva egy olyan vektort hoztunk létre, melyben a GUS riporter gént a pUC19 klónozó vektor multiklónozó régiójára (MCS) cseréltük ki. Az így elkészített konstrukciót csoportunkban eredményesen használtuk különböző sejtciklus gének, ciklinek, ciklin függő kinázok túltermeltetésére transzgenikus kétszikű (dohány, lucerna) és egyszikű (rizs, kukorica) növényekben (12. ábra, nem közölt adatok). Ezzel egy új, univerzális génkifejeztési rendszert hoztunk létre, amely széleskörű biotechnológiai alkalmazásra érdemes.

Jelenleg nincs direkt bizonyítékunk arra nézve, hogy a PPY/PPU faktorok a növényekben kromatin derepressziót okoznának, de a transzgénikus növényeken végzett kísérleteink egybehangzanak ezzel a lehetőséggel. A PPY/PPU kötő faktorok működési módjának megértése jobb betekintést nyújthat a növényi kromatin transzkripció és génregulációs működésébe, valamint lehetőséget nyújtott arra, hogy olyan, nagy hatékonyságú növényi transzformációs konstrukciót hozzunk létre, amely védelmet nyújthat a kromatin represszió keresztül működő silencing mechanizmussal szemben.



**12. ábra** Lucerna hiszton H3.2 promóter által túltermeltetett ciklin függő kinázok kimutatása nyers növényi fehérjekivonatban immunológiai módszerekkel (Lendvai Ágnes és Török Katalin kísérletei, nem közölt adatok). A – cdc2MsF fehérje mennyisége rizs növényekben. B – cdc2MsD fehérje mennyisége dohány növényekben. A fehérje tisztítás és kimutatás menetét, a vizsgált gének és az alkalmazott specifikus ellenanyagok leírását Magyar Zoltán és munkatársai (1997) közleménye tartalmazza. Jelölések: T – független transzgénikus vonalak, K – nem transzformált vonal. A vizsgált fehérjét az ábrán nyíl mutatja.

## 7. Eredmények összefoglalása

Az MsH3g1 genomi klón szabályozó régióinak vizsgálata során kimutattuk a következőket:

1. Az izolált H3.2 promóter magas szintű, konstitutív kifejeződést biztosít a hozzá kapcsolt riporter génnek.
2. A lucerna hiszton H3.2 gén CT-gazdag, első intronja képes megnövelni az izolált promóter aktivitását, az így kialakított kiméra promóter az általánosan használt virális CaMV 35S promóter által mutatottnál magasabb riporter gén aktivitást biztosít.
3. Az izolált promóter és a genomi klón első intronjának felhasználásával egy olyan növényi expressziós kazettát hoztunk létre, mely nem tartalmaz vírus eredetű szekvenciákat, magas szintű, konstitutív kifejeződést biztosít a beépített transzgénnek, a transzgén elhallgatásának és rekombinációjának veszélye nélkül.
4. A hiszton H3.2 5' nemkódoló régiójában és intronjaiban található CT-gazdag szekvenciák képesek voltak megváltoztatni az S-fázis specifikus kifejeződésű lucerna hiszton H3 variáns (H3.1) kifejeződési mintázatát hasonlóvá téve azt a 35S promóterhez és a konstitutív variánshoz (H3.2). A CT-gazdag szekvencia elemek számának növelése a promóter aktivitásának erősödését okozta.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton mondok köszönetet témavezetőimnek Dr. Györgyey Jánosnak és Prof. Dr. Dudits Dénesnek a Ph.D dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségükért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Dudits Dénesnek a lehetőségért, hogy a csoportjában készíthettem el dolgozatomat.

Külön szeretném megköszönni Dr. Kapros Tamásnak, hogy szinte témavezetőként segítette munkámat.

Hálás vagyok valamennyi munkatársamnak, különösen Dr. Mai Antalnak, Hajós Jánosnének és Török Katalinnak a sok segítségért, amit a munka minden fázisában nyújtottak.

Végül feleségemnek, Dr. Kelemen Krisztinának köszönöm, hogy az élet minden területén mellém állt, és a támogatásáról biztosított.

## Summary

While most histone genes display a marked dependence of gene expression on the concurrent synthesis of DNA during the S phase of the cell cycle, a distinct type of histone genes exists in plants as in animals. These type of histone H3 genes are characterized by a cell cycle-independent pattern of expression, the presence of introns in the gene and a few specific amino acid changes in the protein, relative to the common, replication-specific histone H3 forms (Waterborg and Robertson, 1996). It participates in the assembly of new nucleosomes across gene sequences that have lost nucleosomes as a consequence of gene transcription. Since these histone variants replace the more common, replication-dependent histone forms in terminally differentiated tissues, they have been named replacement H3 histones.

In alfalfa, three replacement histone H3 genes exist per haploid genome (Robertson et al., 1996). These three genes produce two times more new histone H3 proteins than the more than 50 replication-dependent histone H3 genes do together in logarithmically growing suspension cultures of alfalfa A2 cells (Waterborg, 1993; Wu et al., 1989).

Promoters of all known plant histone genes share many common elements, irrespective of the pattern of gene expression (Chaboute et al., 1993; Chaubet et al., 1992; Robertson et al., 1996, 1997). Promoter elements which drive S-phase specific expression of cell cycle-regulated histone genes in plants are present in the replacement histone H3 genes of alfalfa and *Arabidopsis* (Lepetit et al., 1992; Robertson, 1994; Robertson et al., 1997), but S-phase histone H3 genes fail to contain introns (Chaboute et al., 1993; Chaubet et al., 1992; Robertson et al., 1996; Waterborg and Robertson, 1996). The characteristic intron of replacement histone H3 genes is the one located mainly inside the 5' untranslated region (UTR) of the gene (Waterborg and Robertson, 1996). The only known exceptions are the alfalfa histone H3.2 genes (Oberto et al., 1994). However, the 5'UTR of alfalfa H3.2 genes appears to have retained the functional elements of the 5'UTR introns that confer constitutive expression (Robertson et al., 1996). In contrast to the replication-dependent H3 genes polypyrimidine elements are present in high abundance in the 5'UTR and introns of the alfalfa H3.2 genes and in the introns of the two replacement

H3.III genes of *Arabidopsis* (Chaubet et al., 1992; Waterborg and Robertson, 1996), similarly to the animal replacement H3 genes (Waterborg and Robertson, 1996).

Despite the fact that the *Medicago* histone H3.2 genes contain promoter elements, characteristic to replication-dependent histone genes *northern* analyses have clearly shown a constitutive mode of expression for these genes, with steady state mRNA levels far exceeding those of the replication-dependent H3.1 genes (Kapros et al., 1992, 1995; Robertson et al., 1996). In order to evaluate whether these mRNA levels reflected promoter strength, we have analyzed tobacco plants carrying a 424 bp promoter fragment of alfalfa replacement histone H3.2 gene *msH3g1* (Robertson et al., 1996) in a transcriptional fusion with the GUS reporter gene. As a control, we used pBI121, which contains the GUS gene driven by the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter.

GUS activities were determined in the extracts from old leaves, i.e. longer than 5 cm. Such leaves contain few actively dividing cells, as reflected by the low promoter activity of a cell cycle variant histone H3.1 gene (Kapros et al., 1993). Here, fluorimetric GUS analysis of the transformants revealed high GUS activities for the H3.2 promoter construct. On average, GUS activity in plants transformed with CaMV-35S promoter construct pBI121 was 5-fold higher. In order to analyze spatial distribution of GUS activity, that is, to test whether the histone H3.2 promoter possesses tissue specific activity, GUS histochemical staining of transgenic tobacco plantlets was carried out. Strong GUS staining resulted in most parts of the plants containing either construct.

In order to analyze the influence of further sequence elements on the expression of the histone H3.2 promoter we have built further expression cassettes beyond the pHEX-N::GUS vector. The pHEX110::GUS construct contains, in addition to the H3 promoter, the 120 bp first intron of the *Msh3g1* genomic clone inserted between the start sites of transcription and translation, and the NOS 3' UTR and polyadenylation sequences. In construct pHEX111::GUS the NOS sequence was replaced by the 3' UTR of the *Msh3g1* gene.

To assess the activity of these constructs, alfalfa A2 cells were protoplasted and transformed. As reference, cells were transformed with expression plasmid pIDS211 with the GUS reporter gene driven by the 35S CaMV promoter (Stefanov et al., 1991). In three independent experiments, measuring GUS enzyme levels on days 2 and 3, the replacement H3 promoter in pHEX-N::GUS appeared six-fold stronger

than the 35S promoter in the control pIDS211. For highest expression the intron sequence was required, increasing GUS levels an additional four-fold. Replacement of the NOS terminator by the 3' UTR of the Msh3g1 clone in pHEX111::GUS reduced GUS activity three-fold.

Based on the highest expression of pHEX110::GUS in transient expression, it was further studied in stable transformation of tobacco. Second generation plants were analyzed for GUS expression. Data from HEX110 transformants were compared with the CaMV 35S promoter pBI121 controls. The HEX-110::GUS transformants produced GUS expression that was, on average, three times higher than observed in pBI121 controls.

It was of interest to assess whether the variability in GUS activity reflected steady-state GUS transcript levels. *Northern* analyses were carried out on total RNA from second generation of transformant plants and GUS mRNA signals indeed mirrored the variability in GUS activity levels.

The spatial distribution of GUS activity was determined by histochemical staining of tobacco plantlets for GUS. Strong GUS expression was observed in all parts of plantlets transformed with HEX-110, consistent with the general, high, constitutive expression of the endogenous replacement H3.2 genes. It was quite similar to the distribution of GUS expression, driven by the viral 35S promoter.

The alfalfa histone H3.1 promoter has been demonstrated to be an effective promoter for GUS expression, retaining the replication dependence of the promoter with clear preference for expression in the meristems (Kapatos et al., 1993). Insertion of CT-rich sequence elements between this promoter and GUS coding sequence in transformation plasmids caused major quantitative and qualitative changes in GUS activity. The CT-rich sequences were capable of increasing the strength of the H3.1 promoter. In addition, the meristem specificity of the cell cycle-dependent promoter was diminished.

In conclusion we have shown that:

1. – the alfalfa H3.2 promoter itself is a strong, constitutive promoter, drives a high GUS expression in all the parts of the plant.
2. – the insertion of the intron sequence enhanced further the strength of the promoter, the alfalfa replacement H3 promoter-intron cassette has been shown to produce high, constitutive transgene expression in all plant tissues at levels exceeding 35S CaMV promoter strength.

3. – the CT-rich sequences were able to cause the loss of preferential meristematic expression of the S-phase specific alfalfa histone H3 promoter.
4. We have designed high efficiency plant transformation construct that does not contain viral sequences and might prevent gene silencing mechanisms that act by chromatin repression.

The mode, by which these factors might have changed a replication-dependent histone gene into a gene that is continuously active, is still unknown. Nevertheless, we considered the paradigm of GAGA Factor in *Drosophila* as a possible explanation. GAGA proteins recognize the polypurine core sequence GAGAG (Omichinski et al., 1997), irrespective whether present in the coding or non-coding DNA strand. These motifs have quite a degree of sequence variability, while retaining strong and specific binding as measured by gel mobility shift assays and DNase I footprinting. Analyses by Carl Wu and others have revealed the way GAGA factors act as a transcriptional activator. They have shown that GAGA Factor (1) prevents nucleosome formation and (2), in the presence of ATP, displaces nucleosomes (Lu et al., 1993; Tsukiyama et al., 1994; Wall et al., 1995). GAGA Factor binding to intron-bearing replacement H3 genes in animals has been predicted to reduce the nucleosomal density to 61 percent, fully reversing the characteristic repression of histone genes in cells outside of S phase (Waterborg and Robertson, 1996). A putative plant GAGA-like Factor has been predicted to reduce the nucleosomal packaging of the alfalfa and *Arabidopsis* replacement histone H3 genes to 65 percent (Robertson et al., 1996; Waterborg and Robertson, 1996), with the strongest localized derepression near the promoters and across the 5' parts of these genes.

PPY/PPU sequences and their binding factors by themselves, however, do not seem to be sufficient for high promoter activity of the alfalfa H3.2 gene. Deletion of sequences upstream of the TATA box greatly reduced reporter gene expression from the histone promoter, despite the presence of PPY/PPU elements in the 5'UTR. A similar requirement for *cis* promoter elements was also observed in transgenic *Arabidopsis* experiments (Chaubet-Gigot et al., 2001). This points to the fact that an open chromatin structure may be a necessary but not sufficient requirement for constitutive gene transcription. Currently, we have no direct evidence that PPY/PPU factors in plants cause chromatin derepression, but our results in transgenic plant



experiments are consistent with this possibility. Understanding the mode of action of PPY/PPU-binding proteins may provide a better insight into the role of chromatin organisation on gene regulation in plants.

## Referenciák

**Ascenzi R. and Gantt J. S.** (1997) A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol.Biol.* **34**, 629-641.

**Atanassova R., Chaubet N. and Gigot C.** (1992) A 126 bp fragment of a plant histone gene promoter confers preferential expression in meristems of transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* **2**, 291-300.

**Atanassova R., Flenet M., Gigot C. and Chaubet N.** (1998) Functional analysis of the promoter region of a maize (*Zea mays* L.) H3 histone gene in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **37**, 275-285.

**Al-Kaff N. S., Covey S. N., Kreike M. M., Page A. M., Pinder R. and Dale P. J.** (1998) Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279**, 2113-2115.

**Al-Kaff N. S., Kreike M. M., Covey S. N., Pitcher R., Page A. M. and Dale P. J.** (2000) Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nat Biotechnol* **18**, 995-999.

**Bhattacharyya N. and Banerjee D.** (1999) Transcriptional regulatory sequences within the first intron of the chicken apolipoproteinAI (apoAI) gene. *Gene* **234**, 371-380.

**Benyajati, C., Mueller, L., Xu, N., Pappano, M., Gao, J., Mosammamarast, M., Conklin, D., Granok, H., Craig, C. and Elgin, S.** (1997) Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3345-3353.

**Bevan M.** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**, 8711-8721.

**Biggin, M. D. and Tjian, R.** (1988) Transcription factors that activate the ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* **53**, 699-711.

**Birnstiel M. L., Busslinger M. and Strub K.** (1985) Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* **41**, 349-359.

**Bögre L., Olah Z. and Dudits D.** (1988) Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase from alfalfa (*Medicago varia*): partial purification and autophosphorylation. *Plant Sci* **58**, 135-144.

**Brandstadter J., Rossbach C. and Theres K.** (1994) The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* **192**, 69-74.

**Brignon P., Lepetit M., Gigot C. and Chaubet N.** (1993) Nuclease sensitivity and functional analysis of a maize histone H3 gene promoter. *Plant Mol.Biol.* **22**, 1007-1015.

**Brignon, P. and Chaubet, N.** (1993) Constitutive and cell-division-inducible protein-DNA interactions in two maize histone gene promoters. *Plant J.* **4**, 445-457.

**Brownell, J. E., Zhou, J. X., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D.** (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5 linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-852.

**Callard D. and Mazzolini L.** (1997) Identification of proliferation-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. Characterization of a new member of the highly evolutionarily conserved histone H2A.F/Z variant subfamily. *Plant Physiol* **115**, 1385-1395.

**Callis J., Fromm M. and Walbot V.** (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**, 1183-1200.

**Chaboute, M. E., Chaubet, N., Philipps, G., Ehling, M. and Gigot, C.** (1986) Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **8**, 179-191.

**Chaboute M. E., Chaubet N., Clement B., Gigot C. and Philipps G.** (1988) Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plants. *Gene* **71**, 217-223.

**Chaboute, M. E., Chaubet, N., Gigot, C. and Philipps, G.** (1993) Histones and histone genes in higher plants: structure and genomic organization. *Biochimie* **75**, 523-531.

**Chaubet N., Chaboute M. E., Clement B., Ehling M., Philipps G. and Gigot C.** (1988) The histone H3 and H4 mRNAs are polyadenylated in maize. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1295-1304.

**Chaubet N., Clement B., Philipps G. and Gigot C.** (1991) Organ-specific expression of different histone H3 and H4 gene subfamilies in developing and adult maize. *Plant Mol.Biol.* **17**, 935-940.

**Chaubet, N., Clement, B. and Gigot, C.** (1992) Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. *J. Mol. Biol.* **225**, 569-574.

**Chaubet, N., Flenet, M., Clement, B., Brignon, P. and Gigot, C.** (1996) Identification of cis-elements regulating the expression of an *Arabidopsis* histone H4 gene. *Plant J.* **10**, 425-435.

**Chaubet-Gigot N., Kapros T., Flenet M., Kahn K., Gigot C. and Waterborg J. H.** (2001) Tissue-dependent enhancement of transgene expression by introns of replacement histone H3 genes of *Arabidopsis*. *Plant Mol.Biol.* **45**, 17-30.

**Chomczynski P. and Sacchi N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-158.

**Corlett J. E., Wilkinson S. and Thompson A. J.** (1998) Diurnal control of the drought-inducible putative histone H1 gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.). *J. Exp. Bot.* **49**, 945-952.

**Crane-Robinson C.** (1997) Where is the globular domain of linker histone located on the nucleosome? *Trends Biochem. Sci.* **22**, 75-77.

**Deák M., Donn G., Fehér A. and Dudits D.** (1988) Dominant expression of gene amplification-related herbicide resistance in Medicago cell hybrids. *Plant Cell Rep* **7**, 158-161.

**Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., VanMontagu, M. and Leemans, J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777-4788.

**Desjardins, E. and Hay, N.** (1993) Repeated CT elements bound by zinc-finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5710-5724.

**Doonan J. and Fobert P.** (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 824-830

**Dudits D., Magyar Z., Deák M., Mészáros T., Miskolczi P., Fehér A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bakó L., Koncz C. and Györgyey J.** (1998) Cyclin- and calcium-dependent kinase families: response of cell division to hormones and stress signals. In Francis D, Dudits D, Inzé D (eds). *Plant Cell Division*, pp. 21-46 Portland Press, London.

**Felsenfeld, G.** (1996) Chromatin unfolds. *Cell* **86**, 13-20.

**Firulli, A. B., Maibenco, D. C. and Kinniburgh, A. J.** (1994) Triplex formation ability of a c-myc promoter element predicts promoter strength. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 236-242.

**Fisher D. K. and Gultinan M. J.** (1995) Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Mol Biol Rep* **13**, 278-289.

**Fleming A. J., Mandel T., Roth I. and Kuhlemeier C.** (1993) The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* **5**, 297-309.

**Fobert P. R., Coen E. S., Murphy G. J. and Doonan J. H.** (1994) Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *EMBO J.* **13**, 616-624.

**Gallardo F., Fu J., Canton F. R., Garcia-Gutierrez A., Canovas F. M. and Kirby E. G.** (1999) Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* **210**: 19-26.

**Gallie D. R. and Young T. E.** (1994) The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts. Analysis of promoter activity, intron enhancement, and mRNA untranslated regions on expression. *Plant Physiol* **106**, 929-939.

**Gantt J. S. and Lenvik T. R.** (1991) Arabidopsis thaliana H1 histones. Analysis of two members of a small gene family. *Eur.J.Biochem.* **202**, 1029-1039.

**Gidekel M., Jimenez B. and Herrera-Estrella L.** (1996) The first intron of the Arabidopsis thaliana gene coding for elongation factor 1 beta contains an enhancer-like element. *Gene* **170**, 201-206.

**Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T. and Murfett, J.** (1998) How does Auxin turn on genes? *Plant Physiol.* **118**, 341-347.

**Heintz N.** (1991) The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim.Biophys.Acta* **1088**, 327-339.

**Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., VanMontagu, M. and Schell, J.** (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **163**, 181-187.

**Holtorf S., Apel K. and Bohlmann H.** (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **29**, 37-46.

**Huh G. H., Matsuura Y., Meshi T. and Iwabuchi M.** (1995) Differential expression of the two types of histone H2A genes in wheat. *Biochim.Biophys.Acta* **1261**, 155-160.

**Huh G. H., Nakayama T., Meshi T. and Iwabuchi M.** (1997) Structural characteristics of two wheat histone H2A genes encoding distinct types of variants and functional differences in their promoter activity. *Plant Mol.Biol.* **33**, 791-802.

**Inoue H., Nojima H. and Okayama H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96** 23-28.

**Ito M., Iwase M., Kodama H., Lavisse P., Komamine A., Nishihama R., Machida Y. and Watanabe A.** (1998) A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell* **10**, 331-341.

**Ito T., Fujimoto Y., Nakayama T. and Iwabuchi M.** (1995) A far-upstream sequence of the wheat histone H3 promoter functions differently in rice and tobacco cultured cells. *Plant Cell Physiol* **36**, 1281-1289.

**Iwabuchi M., Nakayama T. and Meshi T.** (1998) Transcriptional control of histone genes. In Francis D, Dudits D, Inzé D (eds). *Plant Cell Division*, pp. 285-300 Portland Press, London

**Jayawardene N. and Riggs C. D.** (1994) Molecular cloning, sequence analysis and differential expression of an intron-containing gene encoding tomato histone H1. *Eur.J.Biochem.* **223**, 693-699.

**Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.

**Joanin P., Gigot C. and Philipps G.** (1994) Molecular cloning and sequence analysis of two genes encoding two histone H2B variants of maize. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 693-696.

**Joanin P., Gigot C. and Philipps G.** (1992) Nucleotide sequence and expression of two cDNA coding for two histone H2B variants of maize. *Plant Mol.Biol.* **20**, 581-588.

**Kao K. N. and Michayluk M. R.** (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**, 355-367.

**Kanazin V., Blake T. and Shoemaker R. C.** (1996) Organization of the histone H3 genes in soybean, barley and wheat. *Mol.Gen.Genet.* **250**, 137-147.

**Kapros, T., Bögre, L., Németh, K., Bakó, L., Györgyey, J., Wu, S.-C. and Dudits, D.** (1992) Differential expression of histone H3 gene variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Physiol.* **98**, 621-625.

**Kapros, T., Stefanov, I., Magyar, Z., Ocsosvzky, I. and Dudits, D.** (1993) A short histone H3 promoter from alfalfa specifies expression in S phase cells and meristems. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **29**, 27-32.

**Kapros, T., Robertson, A. J. and Waterborg, J. H.** (1995) Histone H3 transcript stability in alfalfa. *Plant Mol. Biol.* **28**, 901-914.

**Kladde, M. P. and Simpson, R. T.** (1994) Positioned nucleosomes inhibit Dam methylation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1361-1365.

**Kohli A., Griffiths S., Palacios N., Twyman R. M., Vain P., Laurie D. A. and Christou P.** (1999) Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *The Plant J* **17**, 591-601.

**Kolluri, R., Torrey, T. A. and Kinniburgh, A. J.** (1992) A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Res.* **20**, 111-116.

**Koning A. J., Tanimoto E. Y., Kiehne K., Rost T. and Comai L.** (1991) Cell-specific expression of plant histone H2A genes. *Plant Cell* **3**, 657-665.

**Kouchi H., Sekine M. and Hata S.** (1995) Distinct classes of mitotic cyclins are differentially expressed in the soybean shoot apex during the cell cycle. *Plant Cell* **7**, 1143-1155.

**Lepetit, M., Ehling, M., Chaubet, N. and Gigot, C.** (1992) A plant histone gene promoter can direct both replication-dependent and -independent gene expression in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 276-285.

**Li, J. W., Liang, V. C. T., Sedgwick, T., Wong, J. M. and Shi, Y. B.** (1998) Unique organization and involvement of GAGA factors in transcriptional regulation of the *Xenopus* stromelysin-3 gene. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3018-3025.

**Lu, Q., Wallrath, L. L., Granok, H. and Elgin, S. C.** (1993) (CT)<sub>n</sub> (GA)<sub>n</sub> repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2802-2814.

**Luehrsen K. R. and Walbot V.** (1991) Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 81-93.

**Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi É, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D.** (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-35

**Maher III, L. J.** (1992) DNA triple-helix formation: an approach to artificial gene repressors? *Bioessays* **14**, 807-815.

**Marzluff W. F. and Pandey N. B.** (1988) Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 49-52.

**Mascarenhas D., Mettler I. J., Pierce D. A. and Lowe H. W.** (1990) Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Mol. Biol.* **15**, 913-920.

**Matthews, H. R. and Waterborg, J. H.** (1985) Reversible Modifications of Nuclear Proteins and Their Significance. In Volume 2 (Freedman, R. B. and Hawkins, H. C., eds). *The Enzymology of Post-Translational Modification of Proteins*. London: Academic Press, pp. 125-285.

**Medford J. I., Elmer J. S. and Klee H. J.** (1991) Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *Plant Cell* **3**, 359-370.

**Meshi T. and Iwabuchi M.** (1995) Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol* **36**, 1405-1420.

**Meshi T., Taoka K. and Iwabuchi M.** (1998) S phase-specific expression of plant histone genes. *J. Plant Res.* **111**, 247-251.

**Meshi T., Taoka K. I. and Iwabuchi M.** (2000) Regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Plant Mol.Biol.* **43**, 643-657.

**Mikami K., Tabata T., Kawata T., Nakayama T. and Iwabuchi M.** (1987) Nuclear protein(s) binding to the conserved DNA hexameric sequence postulated to regulate transcription of wheat histone genes. *FEBS Lett.* **223**, 273-278.

**Mikami K. and Iwabuchi M.** (1993) Regulation of cell cycle-dependent gene expression. In: D.P.S. Verna (Ed.) Control of Plant Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 51-68.

**Minami M., Huh G. H., Yang P. and Iwabuchi M.** (1993) Coordinate gene expression of five subclass histones and the putative transcription factors, HBP-1a and HBP-1b, of histone genes in wheat. *Plant Mol.Biol.* **23**, 429-434.

**Nakayama T., Ohtsubo N., Mikami K., Kawata T., Tabata T., Kanazawa H. and Iwabuchi M.** (1989) *Cis*-acting sequences that modulate transcription of wheat histone H3 gene and 3' processing of H3 premature mRNA. *Plant Cell Physiol.* **30**, 825-832.

**Nakayama T., Sakamoto A., Yang P., Minami M., Fujimoto Y., Ito T. and Iwabuchi M.** (1992) Highly conserved hexamer, octamer and nonamer motifs are positive *cis*- regulatory elements of the wheat histone H3 gene. *FEBS Lett.* **300**, 167-170.

**Nakayama T., Ito T. and Iwabuchi M.** (1995) Trans-activation of the wheat histone H3 promoter by Gal4 DNA-binding domain (1-94) in plant cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1263**, 281-284.

**Negrutiu I., Shillito R., Potrykus I., Biasini G. and Sala F.** (1987) Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. *Plant Mol. Biol.* **8**, 363-373.

**Oberto, J., Drlica, K. and Rouviere-Yaniv, J.** (1994) Histones, HMG, HU, IHF: Meme combat. *Biochimie* **76**, 901-908.

**O'Brien, T., Wilkins, R. C., Giardina, C. and Lis, J. T.** (1995) Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes *in vivo*. *Genes Dev.* **9**, 1098-1110.

**O'Donnell, K. H. and Wensink, P. C.** (1994) GAGA factor and TBF1 bind DNA elements that direct ubiquitous transcription of the  $\alpha$ 1-tubulin gene. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4712-4718.

**O'Donnell, K. H., Chen, C. T. and Wensink, P.** (1994) Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster*  $\alpha$ 1-tubulin gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6398-6408.



**Ohtsubo N., Nakayama T., Terada R., Shimamoto K. and Iwabuchi M.** (1993) Proximal promoter region of the wheat histone H3 gene confers S phase-specific gene expression in transformed rice cells. *Plant Mol.Biol.* **23**, 553-565.

**Ohtsubo N. and Iwabuchi M.** (1994) The conserved 3'-flanking sequence, AATGGAAATG, of the wheat histone H3 gene is necessary for the accurate 3'-end formation of mRNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1052-1058.

**Ohtsubo, N., Nakayama, T., Kaya, H., Terada, R., Shimamoto, K., Meshi, T. and Iwabuchi, M.** (1997) Cooperation of two distinct cis-acting elements is necessary for the S phase-specific activation of the wheat histone H3 promoter. *Plant J.* **11**, 1219-1226.

**Omichinski, J. G., Pedone, P. V., Felsenfeld, G., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M.** (1997) The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 122-132.

**Osley M. A.** (1991) The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu.Rev.Biochem.* **60**, 827-861.

**Pedone, P. V., Ghirlando, R., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Felsenfeld, G. and Omichinski, J. G.** (1996) The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2822-2826.

**Philipps G., Chaubet N., Chaboute M. E., Ehling M. and Gigot C.** (1986) Genomic organization and nucleotide sequences of two corn histone H4 genes. *Gene* **42**, 225-229.

**Raizada M. N. and Walbot V.** (2000) The late developmental pattern of Mu transposon excision is conferred by a cauliflower mosaic virus 35S-driven MURA cDNA in transgenic maize. *Plant Cell* **12**, 5-21.

**Razafimahatratra P., Chaubet N., Philipps G. and Gigot C.** (1991) Nucleotide sequence and expression of a maize H1 histone cDNA. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1491-1496.

**Reichheld J. P., Gigot C. and Chaubet-Gigot N.** (1998) Multilevel regulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3255-3262.

**Rethmeier N., Seurinck J., Van Montagu M. and Cornelissen M.** (1997) Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. *Plant J.* **12**, 895-899.

**Robertson, A. J., Kapros, T., Dudits, D. and Waterborg, J. H.** (1996) Identification of three highly expressed replacement histone H3 genes of alfalfa. *DNA Seq.* **6**, 137-146.

**Robertson, A. J., Kapros, T. and Waterborg, J. H.** (1997) A cell cycle-regulated histone H3 gene of alfalfa with an atypical promoter structure. *DNA Seq.* **7**, 209-216.

**Rose A. B. and Beliakoff J. A.** (2000) Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol* **122**, 535-542.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (eds) (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* . Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Sakamoto A., Minami M., Huh G. H. and Iwabuchi M** (1993) The putative zinc-finger protein WZF1 interacts with a cis-acting element of wheat histone genes. *Eur.J.Biochem.* **217**, 1049-1056.

**Sakamoto A., Omirulleh S., Nakayama T. and Iwabuchi M.** (1996) A zinc-finger-type transcription factor WZF-1 that binds to a novel cis- acting element of histone gene promoters represses its own promoter. *Plant Cell Physiol* **37**, 557-562.

**Sarkar, P. S. and Brahmachari, S. K.** (1992) Intramolecular triplex potential sequence within a gene down-regulates its expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5713-5718.

**Shen, W. H. and Gigot, C.** (1997) Protein complexes binding to cis elements of the plant histone gene promoters: multiplicity, phosphorylation and cell cycle alteration. *Plant Mol. Biol.* **33**, 367-380.

**Snowden K. C., Buchholz W. G. and Hall T. C.** (1996) Intron position affects expression from the tpi promoter in rice. *Plant Mol.Biol.* **31**, 689-692.

**Sundas A., Tandre K., Kvarnheden A. and Engstrom P.** (1993) cDNA sequence and expression of an intron-containing histone H2A gene from Norway spruce, *Picea abies*. *Plant Mol.Biol.* **21**, 595-605.

**Stefanov I., Ilubaev S., Fehér A., Margoczi K. and Dudits D.** (1991) Promoter and genotype dependent transient expression of a reporter gene in plant protoplasts *Acta Biol Hung* **42**, 323-330.

**Stein G. S., Stein J. L., van Wijnen A. J. and Lian J. B.** (1996) Transcriptional control of cell cycle progression: the histone gene is a paradigm for the G1/S phase and proliferation/differentiation transitions. *Cell Biol.Int.* **20**, 41-49.

**Szekeres M., Haizel T., Adam E. and Nagy F.** (1995) Molecular characterization and expression of a tobacco histone H1 cDNA. *Plant Mol.Biol.* **27**, 597-605.

**Taoka K., Ohtsubo N., Fujimoto Y., Mikami K., Meshi T. and Iwabuchi M.** (1998) The modular structure and function of the wheat H1 promoter with S phase-specific activity. *Plant Cell Physiol* **39**, 294-306.

**Taoka K., Kaya H., Nakayama T., Araki T., Meshi T. and Iwabuchi M.** (1999) Identification of three kinds of mutually related composite elements conferring S phase-specific transcriptional activation. *Plant J.* **18**, 611-623.

**Terada R., Nakayama T., Iwabuchi M. and Shimamoto K.** (1993) A wheat histone H3 promoter confers cell division-dependent and - independent expression of the gus A gene in transgenic rice plants. *Plant J.* **3**, 241-252.

**Terada R., Nakayama T., Iwabuchi M. and Shimamoto K.** (1995) A type I element composed of the hexamer (ACGTCA) and octamer (CGCGGATC) motifs plays a role(s) in meristematic expression of a wheat histone H3 gene in transgenic rice plants. *Plant Mol.Biol.* **27**, 17-26.

**Thatcher, T. H., MacGaffey, J., Bowen, J., Horowitz, S., Shapiro, D. L. and Gorovsky, M. A.** (1994) Independent evolutionary origin of histone H3.3-like variants of animals and Tetrahymena. *Nucleic Acids Res.* **22**, 180-186.

**Tsukiyama, T., Becker, P. B. and Wu, C.** (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor [see comments]. *Nature* **367**, 525-532.

**van den Heuvel K. J., van Esch R. J., Barendse G. W. and Wullems G. J.** (1999) Isolation and molecular characterization of gibberellin-regulated H1 and H2B histone cDNAs in the leaf of the gibberellin-deficient tomato. *Plant Mol.Biol.* **39**, 883-890.

**Van Holde, K. E.** (1989) Chromatin. In *Chromatin*. New York.: Springer Verlag, pp. 1-497.

**Wall, G., Varga-Weisz, P. D., Sandaltzopoulos, R. and Becker, P. B.** (1995) Chromatin remodeling by GAGA factor and heat shock factor at the hypersensitive *Drosophila* hsp26 promoter *in vitro*. *EMBO J.* **14**, 1727-1736.

**Waterborg J. H.** (1991) Multiplicity of histone H3 variants in wheat, barley, rice, and maize. *Plant Physiol* **96**, 453-458.

**Waterborg J. H.** (1992) Existence of two histone H3 variants in dicotyledonous plants and correlation between their acetylation and plant genome size. *Plant Mol Biol* **18**, 181-187.

**Waterborg, J. H.** (1993) Histone synthesis and turnover in alfalfa. Fast loss of highly acetylated replacement histone H3.2. *J. Biol. Chem.* **268**, 4912-4917.

**Waterborg, J. H. and Robertson, A. J.** (1996) Common features of analogous replacement histone H3 genes in animals and plants. *J. Mol. Evol.* **43**, 194-206.

**Wei T. and O'Connell M. A.** (1996) Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene. *Plant Mol.Biol.* **30**, 255-268.

**Wilkins, R. C. and Lis, J. T.** (1998) GAGA factor binding to DNA via a single trinucleotide sequence element. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2672-2685.

**Wilkins, R. C. and Lis, J. T.** (1999) DNA distortion and multimerization: Novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor. *J. Mol. Biol.* **285**, 515-525.

**Wolffe A.** (1995) Chromatin. Structure and Function. 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press. London

**Woo H. H., Brigham L. A. and Hawes M. C.** (1995) Molecular cloning and expression of mRNAs encoding H1 histone and an H1 histone-like sequences in root tips of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Mol.Biol.* **28**, 1143-1147.

**Wu, S. C., Boegre, L., Vincze, E., Kiss, G. B. and Dudits, D.** (1988) Isolation of an alfalfa histone H3 gene: Structure and expression *Plant Mol. Biol.* **11**, 641-649

**Wu, S. C., Györgyey, J. and Dudits, D.** (1989) Polyadenylated H3 histone transcripts and H3 histone variants in alfalfa. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3057-3063.

**Xu, G. and Goodridge, A. G.** (1998) A CT repeat in the promoter of the chicken malic enzyme gene is essential for function at an alternative transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 83-97.

**Yang P., Taoka K., Nakayama T. and Iwabuchi M.** (1995) Structural and functional characterization of two wheat histone H2B promoters. *Plant Mol.Biol.* **28**, 155-172.