

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

на правах рукописи

Лезжов Александр Александрович

Системный транспорт
РНК с выраженной вторичной структурой
в растениях

03.01.03 - молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Соловьев Андрей Геннадьевич

Москва – 2022

Оглавление

Список сокращений	4
Введение.....	5
Обзор литературы.....	11
Сосудистая система растений и системный транспорт РНК.....	11
Структура и функции флоэмы.....	11
Транспорт мРНК по флоэме	12
Транспорт миРНК по флоэме	15
рРНК, тРНК и другие некодирующие РНК, присутствующие в СЭ.....	18
РНК-связывающие белки флоэмы	18
Сигналы транспорта по флоэме.....	21
тРНК-подобные структуры в геномных РНК вирусов растений.....	24
Обнаружение тРНК-подобных структур.....	24
Функция ТПС в усилении трансляции белков вирусов.....	25
Теломерная функция ТПС	26
Роль ТПС в регуляции инициации репликации вирусных геномов.....	27
Функции ТПС в системном транспорте вирусных геномных РНК.....	28
Биогенез и функционирование миРНК.....	28
миРНК растений.....	28
Транскрипция генов миРНК	29
Процессинг при-миРНК	30
Стабильность миРНК	33
Экспорт миРНК из ядра	34
Функционирование миРНК растений	35
Материалы и методы	38
Реактивы.....	38
Ферменты и наборы	38
Растительный материал.....	39
Получение компетентных клеток.....	39
Выделение РНК из растительного материала.....	39
Получение кДНК методом обратной транскрипции.....	40

Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)	40
Очищение продукта ПЦР	41
Рестрикция	41
Электрофорез в агарозном геле	42
Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	42
Трансформация клеток <i>E.coli</i>	42
Выделение плазмидной ДНК.....	42
Лигирование	43
Трансформация клеток <i>A.tumefaciens</i>	43
Рекомбинантные конструкции.....	44
Агроинфильтрация растений	45
Анализ инфильтрированных растений	46
Анализ первичных данных RNAseq.....	47
Выделение и анализ РНК флоэмного экссудата	48
Прививка растений.....	48
Результаты и обсуждение.....	50
Экспериментальная система для визуализации дальнего транспорта РНК	50
Вирусные 3'НТО, содержащие тРНК-подобные структуры, направляют дальний транспорт PVX-REP.....	57
Непроцессированная пре-миРНК390 может направлять дальний транспорт PVX-REP	59
Идентификация предшественников миРНК в данных транскриптомного анализа флоэмы <i>Cucurbita maxima</i>	64
Детекция предшественников миРНК во флоэмном экссудате <i>C. maxima</i> и анализ их способности к системному транспорту.....	70
Заключение	76
Выводы	77
Список литературы	78

Список сокращений

БО – белок оболочки ХВК

ВТМ – вирус табачной мозаики

ВЖМТ – вирус желтой мозаики турнепса

ВМК – вирус мозаики костра

ВВКК - вириод веретеновидности клубней картофеля

КС – клетки-спутницы

миРНК – микроРНК

нт – нуклеотидов

НТО – нетранслируемая область

ОРТ – открытая рамка трансляции

ППС – предельная пропускная способность плазмодесм

ПТУ – посттранскрипционное умолкание

пре-миРНК – предшественник миРНК

при-миРНК – первичный транскрипт миРНК

СМК - сайт множественного клонирования

СЭ – ситовидные элементы

ТБ – транспортный белок

ТПП – тРНК-подобная последовательность

ТПС - тРНК-подобная структура

ТР - трансляционная репрессия

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ХВК – X-вирус картофеля

AGO – белки семейства аргонавт

CaMV – вирус мозаики цветной капусты

DCL - дайсер-подобные белки

NES – сигнал ядерного экспорта

NLS – сигнал ядерного импорта

PTS - сигнал транспорта по флоэме

RBP – РНК-связывающие белки

siРНК – малые интерферирующие РНК

Введение

Актуальность проблемы

Настоящая работа посвящена изучению механизмов дальнего транспорта РНК по сосудистой системе растений и идентификации структурных элементов клеточных и вирусных РНК, способных направлять этот процесс. Сосудистая система растений, состоящая из ксилемы и флоэмы, служит для доставки различных веществ, необходимых для развития и функционирования тканей и органов (Lough, Lucas, 2006; Lucas et al., 2013). Ключевую роль в транспорте сахаров из тканей-источников в растущие ткани играет флоэма. Кроме того, во флоэмном экссудате ряда растений были обнаружены различные белки и РНК. Дальнейшие исследования показали, что развитие растений и их ответ на изменение условий окружающей среды во многом зависят от мобильных сигналов, в том числе связанных с транспортом РНК и белков по флоэме (Kehr, Kragler, 2018; Lough, Lucas, 2006).

Степень разработанности

В настоящий момент экспериментальных данных, убедительно показывающих функциональную важность дальнего транспорта РНК, сравнительно немного. Первоначально транспорт РНК по флоэме изучали на модели РНК-вирусов растений и вириодов (Carrington et al., 1996; Palukaitis, 1987). На сегодняшний день удалось картировать районы в РНК вириода веретеновидности клубней картофеля, способные обеспечивать транспорт ВККК в различные ткани листа, а так же идентифицировать структурный элемент, способный обеспечивать системный транспорт данного патогена (Zhong et al., 2007).

Позднее методом прививок разных генотипов *A. thaliana* и высокопроизводительного секвенирования было идентифицировано более двух тысяч потенциально мобильных мРНК (Thieme et al., 2015). Несмотря на это, функциональное значение транспорта по флоэме показано лишь для

отдельных мРНК. Одним из наиболее изученных примеров является транспорт мРНК BEL1-подобного фактора транскрипции StBEL5 из листьев в подземные части растения. У картофеля (*Solanum tuberosum subsp. Andigena*) StBEL5 и его белковый партнер KNOX регулируют образование клубней в ответ на изменение длины светового дня (Natarajan et al., 2019).

Кроме того, во флоэмном экссудате обнаружен целый ряд миРНК. Специфические миРНК детектируются во флоэме во время недостатка элементов питания и могут действовать как сигнальные молекулы. Было обнаружено, что миРНК399 способна транспортироваться из побегов к корням и регулировать уровень экспрессии гена PHOSPHATE 2 (PHO2), регулирующего гомеостаз фосфатов (Pant et al., 2008). Помимо этого показано, что миРНК395 также способна транспортироваться из побегов в корни и регулировать уровень экспрессии АТФ-сульфуриаз и транспортеров сульфатов в корневой системе (Buhtz et al., 2010). миРНК2111 *Lotus japonicus* транспортируется из побегов в корни для регуляции симбиоза с бактериями рода *Rhizobium* посредством пост-транскрипционной регуляции супрессора симбиоза TOO MUCH LOVE и функционирует как активатор симбиоза (Tsikou et al., 2018). Помимо мРНК и миРНК, во флоэме обнаружен целый ряд других классов РНК, включая малые ядерные РНК (snoРНК), все виды рРНК, тРНК и РНК SRP (signal recognition particle). Функция этих РНК во флоэме остается неясной (Buhtz et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Цель работы

Целью данной работы являлось изучение механизмов дальнего транспорта РНК по сосудистой системе растений и идентификация структурных элементов клеточных и вирусных РНК, способных направлять этот процесс.

Задачи:

При выполнении работы решались следующие задачи:

1) Создание экспериментальной системы на основе модифицированного генома X-вируса картофеля (PVX-REP) для

тестирования способности различных последовательностей РНК направлять дальний транспорт.

2) Анализ способности тРНК-подобных структур вирусов растений направлять дальний транспорт гетерологичной РНК в системе PVX-REP.

3) Анализ способности непроцессированной пре-миРНК390 направлять дальний транспорт РНК в системе PVX-REP.

4) Идентификация предшественников миРНК во флоэме *Cucurbita maxima*.

Научная новизна

Создана система на основе модифицированного генома X-вируса картофеля (PVX-REP) для тестирования способности различных последовательностей РНК направлять дальний транспорт. Система основана на модифицированном варианте генома ХВК, который неспособен к транспорту, и на способности транспортного белка вируса табачной мозаики (ВТМ) восстанавливать межклеточный транспорт такого дефектного вирусного генома.

Показано, что тРНК-подобные последовательности, содержащиеся в геномных РНК ВТМ, вируса мозаики костра (ВМК) и вируса желтой мозаики турнепса (ВЖМТ), способны направлять дальний транспорт гетерологичной РНК PVX-REP.

С помощью системы PVX-REP показана способность пре-миРНК390 направлять дальний транспорт гетерологичной РНК. Впервые проведен биоинформатический анализ транскриптома флоэмного экссудата тыквы (*Cucurbita maxima*) с целью идентификации последовательностей предшественников миРНК во флоэме. Дальнейшая верификация данных анализа транскриптомов позволила сделать вывод о дифференциальном накоплении предшественников миРНК во флоэме и в тканях листа, а также показать, что системный транспорт миРНК может происходить в форме транскрипта-предшественника.

Научная и практическая значимость

Полученные данные расширяют знания о механизмах взаимодействия растений и вирусов на уровне функции *cis*-элементов вирусной РНК в системном транспорте. Более того, полученные данные уточняют и расширяют данные о механизмах дальнего транспорта эндогенных транскриптов по флоэме растений.

Личный вклад автора

Все экспериментальные данные в рамках диссертационного исследования получены лично автором или при его непосредственном участии. Комплементарная ДНК миРНК390 была амплифицирована и клонирована совместно с А.К.Атабековой. Количественная оценка уровней накопления производных пре-миРНК390 методом ПЦР в реальном времени проводилась совместно с Е.А.Лазаревой. Анализ данных транскриптома флоэмы проводился при участии Е.А.Толстыко. Помимо этого, личный вклад автора заключался в анализе научной литературы, планировании экспериментов, анализе экспериментальных данных, подготовке статей к публикации и представлении результатов исследований на конференциях.

Методология и методы исследования

Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии, вирусологии и генной инженерии. Работа выполнена с использованием современного оборудования.

Положения, выносимые на защиту:

1. На основе модифицированного генома X-вируса картофеля получена экспериментальная система, позволяющая тестировать способность различных последовательностей РНК направлять дальний (системный) транспорт молекул РНК по флоэме.

2. тРНК-подобные структуры, находящиеся в 3'-нетранслируемых областях геномов ряда РНК-вирусов растений, содержат сигналы, которые могут обеспечивать системный транспорт вирусных геномов по флоэме.

3. Последовательность пре-миРНК390 является достаточной для обеспечения системного транспорта гетерологичной РНК.

4. Ряд при-миРНК *Cucurbita. maxima* может избирательно вовлекаться в транспорт по флоэме.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в повторных экспериментах, наличием положительных и отрицательных контролей. По теме диссертационной работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология». Результаты работы были представлены на Всероссийской научной конференции «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, Россия, 2018) и 44-ом конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (Краков, Польша, 2019).

Список публикаций по теме диссертации:

Lezzhov A.A., Atabekova A.K., Tolstyko E.A., Lazareva E.A., Solovyev A.G. RNA phloem transport mediated by pre-miRNA and viral tRNA-like structures // Plant Science. 2019. V. 287. P. 99-107.

Tolstyko E.A., Lezzhov A.A., Solovyev A.G. Identification of miRNA precursors in the phloem of *Cucurbita maxima* // PeerJ. 2019. V. 7. P. e8269.

Lezzhov A.A., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Phloem exit as a possible control point in selective systemic transport of RNA // Frontiers in Plant Science. 2021. V. 12. P. 739369.

Материалы конференций

Lezzhov A., Atabekova A., Tolstyko E., Lazareva E., Solovyev A. (2019) Viral tRNA-like structures and pre-miRNA can mediate RNA phloem transport. The 44th FEBS Congress. Краков, Польша.

Tolstyko E., Lezzhov A., Solovyev A. (2019) Precursors of particular miRNAs are present in the phloem of *Cucurbita maxima*. The 44th FEBS Congress. Краков, Польша.

Соловьев А.Г., Толстыко Е.А., Морозов С.Ю., Панкратенко А.В., Лазарева Е.А., Лезжов А.А. (2018) Транспорт РНК по флоэме: роль в вирусной инфекции и защитном ответе растений. «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» Всероссийская научная конференция с международным участием, Иркутск, Россия.

Обзор литературы

Сосудистая система растений и системный транспорт РНК

Структура и функции флоэмы

Сосудистая система растений, состоящая из ксилемы и флоэмы, обеспечивает транспорт различных веществ, необходимых для развития и функционирования тканей и органов (Lough, Lucas, 2006; Lucas et al., 2013).

Ксилема покрытосеменных растений, состоящая из мертвых клеток трахеид и сосудистых элементов, образует канал с низким сопротивлением для транспорта воды и минеральных веществ из почвы в надземные органы растения (Sperry, 2003).

В отличие от ксилемы, флоэма покрытосеменных растений является живой тканью и состоит из двух основных типов клеток, называемых ситовидными элементами (СЭ) и клетками-спутницами (КС). Эти клетки тесно связаны друг с другом через специализированные разветвленные плазмодесмы (ПД), образуя комплекс КС-СЭ. Ситовидные элементы образуют ситовидные трубки (СТ), через которые питательные вещества (сахара и аминокислоты), а также макромолекулы, могут транспортироваться в активно растущие и запасующие ткани (Knoblauch et al., 2016).

Ситовидные трубки флоэмы состоят из отдельных ситовидных элементов, связанных между собой через каналы ситовидной пластины. Во время дифференциации СЭ клеточное содержимое сильно изменяется и упрощается (Knoblauch et al., 2018). Высвобождение продуктов деградации из дифференцирующихся СЭ во флоэму может иметь важное значение в развитии растений. Показано, что доставка этих продуктов в зоны роста корня может обеспечить приток предшественников для биосинтетических процессов, происходящих при росте и развитии корневой системы (Ross-Elliott et al., 2017).

В противоположность СЭ, клетки-спутницы имеют густую цитоплазму, демонстрирует высокий уровень биохимической активности и функционируют как некий центр управления флоэмой, синтезируя, как полагают, белки и РНК, участвующие как в физиологическом поддержании биосинтетически неактивных СЭ, так и в дальних взаимодействиях в организме растения (Haywood et al., 2002; Oparka, Turgeon, 1999).

Как отмечено выше, СЭ связаны с соседними КС с помощью специализированных плазмодесм, что служит основанием для сложившегося представления о том, что макромолекулы, выявляемые в СЭ, вероятно, доставляется туда через плазмодесмы из ассоциированных с ними КС (Ruiz-Medrano et al., 2004). Это предположение подтверждается данными, согласно которым, кроме транспорта продуктов фотосинтеза, по флоэме осуществляется функциональный транспорт фитогормонов, малых РНК, мРНК и белков.

Следует отметить, что предельная пропускная способность плазмодесм, соединяющих СЭ и КС, которая составляет 70 кДа (Paultre et al., 2016), делает невозможным попадание в СЭ крупных комплексов, таких как рибосомы и фрагменты протеасом, идентификация которых во флоэмном экссудате может быть объяснена их попаданием туда в процессе дифференцировки СЭ из клеток протофлоэмы, являющихся полностью функциональными (Knoblauch et al., 2018). Высказывалось предположение, что и существенная часть макромолекул, обнаруживаемых в СЭ, попадает в них аналогичным образом (Knoblauch et al., 2018).

Транспорт мРНК по флоэме

Дальний транспорт РНК по сосудистой системе флоэмы впервые был продемонстрирован на модели РНК-содержащих вирусов растений (Carrington et al., 1996) и вириода веретеновидности клубней картофеля (Palukaitis, 1987). В дальнейшем в функциональных ситовидных элементах были обнаружены эндогенные мРНК и ряд некодирующих РНК. Методом

реципрокных (обратных) прививок нескольких генотипов и высокопроизводительного секвенирования удалось идентифицировать большое количество различных мРНК *Arabidopsis thaliana*, способных к дальнему транспорту (Thieme et al., 2015). Примерами мРНК, способность к флоэмному транспорту которых была подтверждена экспериментально, могут служить следующие РНК: для *Arabidopsis thaliana* - FT (Lu et al., 2012) и Aux/IAA (Notaguchi et al., 2012); для *Cucurbita maxima* - PP16 (Хоconostle-Cázares et al., 1999) и NACP (Ruiz-Medrano et al., 1999); для *Solanum tuberosum* - BEL5 (Banerjee et al., 2006), POTH1 (Mahajan et al., 2012); для *Solanum lycopersicum* - PFP-T6 (Kim et al., 2001) и PS (Zhang et al., 2018).

Белок FT, входящий в состав флоригена цветковых растений, образуется в листьях в ответ на изменение длины светового дня и способен перемещаться по флоэме к апикальной меристеме, чтобы индуцировать цветение (Corbesier et al., 2007). Обнаружено, что FT экспрессируется преимущественно в сосудистых тканях (Takada, Goto, 2003). Показано, что транспорт белка FT из клеток-спутниц в ситовидные элементы происходит в составе эндосомных везикул и регулируется белками QKY(MCTP) и SYP121(SNARE) (Liu et al., 2019). Ряд экспериментальных данных показывает, что мРНК FT *A. thaliana*, независимо от белка FT, может перемещаться в апикальную меристему. Однако, несмотря на наличие данных, демонстрирующих вклад мобильной мРНК FT в регуляцию цветения, точный механизм этого процесса предстоит выяснить. Предполагается, что мРНК FT может функционировать как переносчик интегрированного комплекса флоригена (Li et al., 2011a; Lu et al., 2012).

BEL1-подобные факторы транскрипции широко распространены в растениях и взаимодействуют с KNOTTED1-подобными транскрипционными факторами (ТФ) для регуляции различных процессов в развитии растений (Kanrar et al., 2008; Ragni et al., 2008). У картофеля (*Solanum tuberosum subsp. Andigena*) BEL1-подобный фактор транскрипции StBEL5 и его белковый партнер KNOX регулируют образование клубней (Hannapel, Banerjee, 2017).

Два основных фактора, индуцирующих клубнеобразование в растениях картофеля, StSP6A (ортолог FT) и мРНК StBEL5, действуют как мобильные сигналы (Natarajan et al., 2019). Анализ функции StBEL5 с использованием линий растений с повышенным и пониженным уровнем экспрессии StBEL5 позволил установить устойчивую корреляцию между накоплением StBEL5 и урожайностью клубней картофеля. Анализ транскриптомов растений с измененным уровнем накопления StBEL5, в свою очередь, позволил идентифицировать тысячи генов-мишеней, экспрессия которых регулируется белком StBEL5; многие из этих генов участвуют в ростовых процессах, происходящих в формирующемся клубне (Sharma et al., 2016). Примеры генов-мишеней StBEL5, которые участвуют в клубнеобразовании, включают: GA2 OXIDASE1, GA20 OXIDASE1, LONELYGUY, AGL8, PINs, AUX/IAA и ROTLX1 (Hannapel, Banerjee, 2017).

Анализ мобильности мРНК StBEL5 показал, что транскрипты перемещаются по сосудам флоэмы в кончики столонов - месту индукции клубнеобразования. мРНК StBEL5 синтезируется в листе, и ее движение к столонам индуцируется коротким световым днем (Lin et al., 2013; Sharma et al., 2016). Анализ стабильности транскриптов мРНК StBEL5 показал, что нетранслируемые области и длинный световой день увеличивают стабильность данной мРНК в кончиках побегов. Как 5'-, так и 3'-нетранслируемые области (НТО) способствуют увеличению периода полужизни мРНК StBEL5, при этом 3'-НТО может вносить больший вклад непосредственно в транспорт мРНК StBEL5 из листа в стебель и столоны (Banerjee et al., 2009).

Была отмечена корреляция между количеством (представленностью) мРНК и способностью транспортироваться по флоэме (Calderwood et al., 2016), что привело к предположению, что транспорт мРНК может происходить как селективным, так и неселективным образом (Kim et al., 2014; Notaguchi, 2015). Полученные данные позволяют предполагать, что большинство идентифицированных мобильных мРНК являются таковыми из-

за высокой локальной представленности. В рамках этой модели количество мРНК составляет ключевой фактор мобильности. Следует заметить, что описанная модель не подразумевает, что все идентифицированные виды мобильных мРНК являются сигнальными молекулами, транспорт которых имеет функциональное значение. Согласно предложенной модели, баланс между периодом полураспада данной мРНК и скоростью ее транскрипции определяет способность мРНК достигать поверхности клетки и, как следствие, выходить через плазмодесмы в СЭ и транспортироваться по флоэме (Calderwood et al., 2016).

Дифференцирующиеся СЭ могут быть альтернативным источником макромолекул, в том числе и различных видов РНК, обнаруживаемых в экссудатах флоэмы (Knoblauch et al., 2018). Клетки-предшественники СЭ содержат полный набор органелл, но на заключительной стадии дифференцировки отдельные клеточные структуры деградируют. Дифференцировка протофлоэмных клеток с образованием зрелых СЭ сопряжена с присоединением последних к флоэмной системе растения, в результате чего содержимое клеток, в том числе РНК, может попадать во флоэму (Knoblauch et al., 2018).

Транспорт миРНК по флоэме

Анализ транскриптомов флоэмного экссудата ряда растений позволил идентифицировать присутствие во флоэме малых РНК, дальний транспорт которых в ряде случаев имеет подтвержденное функциональное значение.

Малые РНК, продуцируемые белками DCL и связывающиеся с белками AGO, могут перемещаться локально между клетками и на большие расстояния по флоэме (Lin et al., 2009). Согласно имеющимся данным, наиболее вероятной транспортной формой малых РНК в растениях является дуплекс малых РНК в комплексе с белком AGO при межклеточном транспорте и одноцепочечная форма в случае дальнего транспорта (Dunoyer et al., 2010). Следует заметить, что ортолог AGO1 *A. thaliana* был обнаружен

в протеоме экссудата флоэмы тыквы, но при анализе флоэмных экссудатов других видов растений этот белок идентифицирован не был (Lin et al., 2009).

Исследования, проводившиеся в последние десятилетия, показали, что siРНК в растениях могут функционировать за пределами клетки, в которой они были синтезированы, и способны к системному транспорту по сосудистой системе (Devers et al., 2020). Было показано, что пост-транскрипционное умолкание (ПТУ) экспрессии GFP в верхних листьях трансгенных растений *N. benthamiana*, было вызвано транспортом соответствующих GFP-специфических siРНК из нижних листьев растения, где наблюдался синтез этих siРНК после индукции ПТУ в результате инфильтрации культурой агробактерии, несущей конструкцию, направляющую синтез мРНК GFP (Voinnet, Baulcombe, 1997). В дальнейшем системное распространение siРНК было показано на растениях табака методом прививок (Palauqui et al., 1997). Кроме того, было обнаружено, что пост-транскрипционное умолкание генов в растениях и устойчивость к вирусам основаны на одном механизме (Ratcliff et al., 1997).

Показано, что белки VAM1 и VAM2 *Arabidopsis*, ассоциированные с плазмодесмами, способны влиять на эффективность межклеточного транспорта siРНК (Rosas-Diaz et al., 2018).

миРНК играют важную роль в регуляции процессов развития растений и реакциях на условия окружающей среды. В отличие от siРНК, миРНК отличаются относительно меньшей мобильностью, поскольку сайты их транскрипции и функции в большинстве случаев совпадают (Parizotto et al., 2004). Однако существуют примеры действия миРНК за пределами клетки, в которой они синтезированы. Так, предшественник миРНК390 *A. thaliana* локализуется в сосудистой системе и области, прилегающей к апикальной меристеме побега, но не в самой меристеме или листовых зачатках. Накопление же зрелых миРНК390, напротив, происходит в тканях меристемы и листовых зачатках, свидетельствуя о том, что данная миРНК

способна перемещаться от клетки к клетке на короткие расстояния (Chitwood et al., 2009).

миРНК165/166, вероятно, также способны к межклеточному транспорту; промоторы генов этих миРНК активны только в слое эндодермы корня *Arabidopsis*, в то время как зрелые миРНК накапливаются во всех радиальных слоях клеток корня (Carlsbecker et al., 2010).

Специфические миРНК детектируются во флоэме во время недостатка элементов питания и могут действовать как сигнальные молекулы. Используя растения *A. thaliana* с повышенным уровнем экспрессии миРНК399 в качестве привоя и растений дикого типа в качестве подвоя, было показано, что миРНК399 способна транспортироваться из побегов к корням и регулировать уровень экспрессии PHOSPHATE 2 (PHO2), регулирующего гомеостаз фосфатов (Pant et al., 2008). Помимо этого, показано, что миРНК395 также способна транспортироваться из побегов в корни и регулировать уровень экспрессии АТФ-сульфуриаз и транспортеров сульфатов в корневой системе (Buhtz et al., 2010). миРНК2111 *Lotus japonicus* транспортируется из побегов в корни для регуляции симбиоза с бактериями рода *Rhizobium* посредством пост-транскрипционной регуляции супрессора симбиоза TOO MUCH LOVE и функционирует как активатор симбиоза (Tsikou et al., 2018).

Согласно имеющимся данным, миРНК827, миРНК2111 и миРНК399 *A. thaliana* ассоциированы с недостатком фосфора и способны к транспорту из побегов в корневую систему, в то время как их комплементарная нефункциональная («пассажирская») цепь, обозначаемая миРНК*, к транспорту не способна (Huen et al., 2017). Эти данные позволяют предполагать, что способность к транспорту миРНК на большие расстояния является избирательной, и что транспорт миРНК может происходить без пассажирской цепи миРНК-дууплекса. Важно отметить, что, как показано в экспериментах с использованием прививок и растений дефектных по HEN1, миРНК395, миРНК399, миРНК827 и миРНК2111 транспортируются по

флоэме в виде зрелых миРНК, а не соответствующих предшественников (Buhtz et al., 2010; Huen et al., 2017).

рРНК, тРНК и другие некодирующие РНК, присутствующие в СЭ

Все виды рРНК растений, включая 5S, 5.8S, 18S и 25S рРНК, были обнаружены в экссудате флоэмы *B. napus* и *C. maxima* (Buhtz et al., 2008; Zhang et al., 2009), но функциональное значение этих РНК во флоэме остается неясным (Tolstyko et al., 2020a).

Большое количество тРНК было идентифицировано в тотальной РНК флоэмного экссудата *C. maxima*. Высокопроизводительное секвенирование показало, что различные виды тРНК во флоэмном экссудате представлены в разных количествах. Например, в то время как тРНК-Asp и тРНК-Lys были обнаружены в большом количестве, тРНК-Phe и тРНК-Thr почти не встречались или не были обнаружены вовсе. Более того, значительная часть тРНК, как было обнаружено, присутствует во флоэме в укороченной форме или в виде двух половин тРНК, образовавшихся в результате расщепления тРНК в антикодоновой петле (Zhang et al., 2009).

Другие виды РНК, идентифицированные во флоэмном экссудате, включают малые ядерные РНК (snoРНК), митохондриальные и хлоропластные рРНК, а также тРНК и РНК SRP (Zhang et al., 2009).

РНК-связывающие белки флоэмы

Первые данные о присутствии в ситовидных трубках РНК-связывающих белков (RBP) были получены при анализе флоэмного экссудата *Cucurbita maxima* (Хоconostle-Cázares et al., 1999). Сходным образом, большое количество РНК-связывающих белков было обнаружено позднее в соке флоэмы *Brassica napus* (Ostendorp et al., 2017).

Одними из первых эндогенные РНК-связывающие белки флоэмы, взаимодействующие с мобильными РНК, были обнаружены при изучении факторов растения-хозяина, взаимодействующих с вириоидами. Было высказано предположение, что флоэмный лектин PHLOEM PROTEIN 2

(PP2), по-видимому, неспецифическим образом связывает РНК и участвует в транспорте РНК вириона по сосудам флоэмы из тканей подвоя *Cucumis sativum* в ткани привоя *C. maxima* (Gómez, Pallás, 2004).

Было показано, что два других белка флоэмы, а именно PHLOEM PROTEIN 16 (CmPP16) *C. maxima* и PHLOEM SMALL RNA-BINDING PROTEIN 1 (PSRBP1), способны связывать мРНК и малые РНК, соответственно, и обеспечивать транспорт этих РНК (Хоconostle-Cázares et al., 1999; Yoo et al., 2004).

Последующие работы подтвердили и расширили список потенциальных РНК-связывающих белков, присутствующих в экссудатах флоэмы тыквенных (Tolstyko et al., 2020b; Zhang et al., 2009).

Был определен вероятный состав рибонуклеопротеидного (РНП) комплекса, в составе которого РНК, как предполагается, транспортируется по флоэме. Этот комплекс включает белок, связывающий полипиримидиновый тракт, названный *C. maxima* RNA-BINDING PROTEIN 50 (CmRBP50), TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (ТСТР), HEATSHOCK COGNATE PROTEIN 70 и CmPP16 (Ham, Lucas, 2017). Связывание тыквенного CmRBP50 и его ортолога из растений томата с мРНК GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE PHLOEM (CmGAIP) и BEL5 (StBEL5) *Solanum tuberosum*, как полагают, также обеспечивается наличием полипиримидинового тракта (Cho et al., 2015; Hannapel, Banerjee, 2017). Остатки фосфосерина, расположенные в С-концевой области CmRBP50, имеют решающее значение для сборки этого сложного РНП-комплекса. Показано, что три флоэмных белка: CmPP16, GTP-связывающий белок и фосфоинозитид-специфичный фосфолипаза-подобный белок *C. maxima*, связываются непосредственно с CmRBP50, и это взаимодействие требует фосфорилирования CmRBP50. Сборка такого белкового комплекса на основе CmRBP50 приводит к повышенной аффинности связывания с мРНК, содержащих пиримидин-богатые последовательности (Li et al., 2011b).

В работе (Aoki et al., 2005) возможность селективного транспорта белков по системе ситовидных трубок иллюстрируется направленным перемещением белка SmPP16-1 *Cucurbita maxima* к корням. Меченные биотином белки SmPP16-1 и SmPP16-2 вводили в систему ситовидных трубок риса с помощью стилектомии. Это позволило отслеживать их последующее перемещение к дистальным органам - листьям и корням. В этих экспериментах было показано, что основная часть белков SmPP16-1 и SmPP16-2 транспортировалась с основным током флоэмы в верхнюю часть растения и оказывалась в листьях.

Однако в случае белка SmPP16-1 также наблюдалось движение к корням, вероятно, вследствие наличия дополнительных факторов, приводящих к преимущественной транслокации. Такой вывод был сделан на основании экспериментов, в которых было показано, что эта способность SmPP16-1 белка блокировалась, если до его повторного введения в систему ситовидных трубок он был хроматографически очищен от других белков флоэмного экссудата (Aoki et al., 2005).

Движение, основанное на диффузии в системе СЭ-КС, характерно для ряда белков, попадающих в систему ситовых трубок. Пожалуй, лучший пример, иллюстрирующий это, основан на проведенных исследованиях, в которых экспрессия GFP контролировалась КС-специфическим промотором (Imlau et al., 1999). Этот небольшой гетерологичный белок размером 27 кДа был обнаружен в СЭ и переносился в другие ткани. Эксперименты с экспрессией белков КС, слитых GFP, позволяют предполагать, что предельная пропускная способность (ППС) плазмодесм, соединяющих КС и СЭ, составляет примерно 50 кДа (Oparka, Turgeon, 1999). Хотя следует отметить, что согласно другим данным ППС плазмодесм, соединяющих КС и СЭ, составляет примерно 70 кДа (Paultre et al., 2016). Эти данные частично объясняют способность многих белков и, возможно, РНК перемещаться из КС в СЭ.

Сигналы транспорта по флоэме

В составе некоторых мРНК были идентифицированы участки, названные впоследствии «сигналами транспорта по флоэме» (phloem transport signals, PTS), ответственные за способность мРНК к системному транспорту по сосудистой системе. Один из известных из типов PTS представлен полипиримидиновыми участками, обнаруженными в мРНК, кодирующих белки CmGAI и CmPP16-1 тыквы (Ham et al., 2009; Хоconostle-Cázares et al., 1999) и белки StBEL5 и POTH1 картофеля (Banerjee et al., 2006; Mahajan et al., 2012). У тыквы полипиримидиновые участки мобильных РНК могут взаимодействовать с белком RBP50, полипиримидин-связывающим белком флоэмы, выступающим в качестве основного компонента мультибелкового РНП-комплекса, являющегося предполагаемой транспортной формой РНК (Ham et al., 2009) (см. выше). Другой тип PTS представлен разнообразными высокоструктурированными областями РНК, такими как последовательности тРНК (Zhang et al., 2016), PTS в составе РНК вириона (Wu et al., 2020; Zhong et al., 2007) и мРНК TCTP (Yang et al., 2019).

В настоящий момент среди всех РНК, обладающих выраженной вторичной структурой и способных к дальнему транспорту, наиболее исследованным является PTS в составе РНК вириона веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) (Qi et al., 2004; Takeda et al., 2011; Takeda et al., 2018; Wu et al., 2019; Wu et al., 2020; Zhong et al., 2007). Однако общие принципы структурной организации таких сигналов могут быть применимы, вероятно, и к другим структурированным РНК, способным к транспорту по флоэме. Картированный в составе ВККК PTS содержит короткий дуплекс РНК из 11 пар оснований, прерванный некоплементарными остатками С и U (Zhong et al., 2007). Исследования этого сигнала с использованием нескольких подходов, включающих сравнение с известными структурами РНК, изученными с помощью рентгеноструктурного анализа, мутагенез и ковариационный анализ, подтвердили гипотезу о том, что остатки С и U образуют пару оснований через молекулу воды, которая формирует

водородные связи с обоими остатками (Zhong et al., 2007). Такая структура не является чем-то необычным, т.к. известно, что остатки в структурированных РНК, которые, по предсказаниям, являются неспаренными или представляют собой петли в областях дуплексов, образуют пары, отличные от пар Уотсона-Крика AU, GC и GU и могут участвовать в других неканонических взаимодействиях (Chojnowski et al., 2014; Leontis et al., 2006). Как правило, такие взаимодействия приводят к образованию локальных элементов структуры РНК, известных как «локальные трехмерные мотивы» (three-dimensional motifs, 3D-мотивы), которые определяются как локальное пространственное расположение взаимодействующих нуклеотидов РНК, участвующих как в образовании Уотсона-Криковских пар, так и во взаимодействиях других типов. 3D-мотивы в молекулах РНК могут участвовать в специфических взаимодействиях с белками, поскольку каждый 3D-мотив представляет собой уникальный субстрат для взаимодействия (Chojnowski et al., 2014; Leontis et al., 2006). Таким образом, локальные 3D-мотивы могут определять взаимодействия между РНК и белками благодаря узнаванию РНК-связывающим белком определенной пространственной структуры РНК, а не последовательности нуклеотидных остатков в ней. Согласно структурному моделированию, введение молекулы воды в пару оснований C-U в PTS ВВКК приводит к изгибу спирали и локальному расширению малой бороздки (Zhong et al., 2007). Этот локальный 3D-мотив предположительно распознается пока неизвестным белком растения-хозяина, ответственным за транспорт ВВК в КС и СЭ (Zhong et al., 2007). Показано, что, по аналогии с PTS, сигналы, обеспечивающие транспорт ВВКК между другими типами клеток, также образуют локальные 3D-мотивы благодаря неканоническим взаимодействиям (Takeda et al., 2011; Takeda et al., 2018; Wu et al., 2019; Zhong et al., 2007).

Помимо этого, метилирование остатков РНК может играть важную роль в формировании локальных 3D-мотивов. Было показано, что метилирование остатка аденозина, приводящее к образованию N6-

метиладенозина, приводит к локальному изменению структуры несовершенного дуплекса в длинной некодирующей РНК MALAT1 и появлению 3D-мотива, стимулирующего связывание с HNRNPG (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин G) (Liu et al., 2017).

Поскольку дальний транспорт мРНК ТСТР ингибируется в линиях растений с нарушением метилирования РНК по остатку цитозина и образования m5C (Yang et al., 2019), а идентифицированные остатки m5C мРНК ТСТР находятся в высокоструктурированной области, можно предположить, что метилирование некоторых остатков цитозина в мРНК ТСТР способствует образованию локальных 3D-мотивов, распознаваемых белком, ответственным за флоэмный транспорт этой РНК (Yang et al., 2019). В этой модели метилирование цитозина, приводящее к изменению локальной структуры РНК, может служить триггером, который преобразует существующий структурный элемент РНК в функциональный PTS. Однако необходима дальнейшая экспериментальная работа, чтобы проверить эту гипотезу, а также идентифицировать растительный белок (белки), взаимодействующий с PTS в РНК ТСТР.

Таким образом, совершенные дуплексы РНК не имеют каких-либо особенностей на уровне третичной структуры, тогда как несовершенные дуплексы РНК способны к формированию разнообразных 3D-мотивов, которые могут служить уникальными субстратами для специфического взаимодействия с РНК-связывающими белками. Следовательно, подобно вироидной РНК, кодирующие и некодирующие клеточные РНК могут образовывать локальные 3D-мотивы, которые специфически взаимодействуют с белками, участвующими в транспорте РНК по флоэме.

тРНК-подобные структуры в геномных РНК вирусов растений

Обнаружение тРНК-подобных структур

тРНК, вероятно, является наиболее изученной молекулой РНК. Она является важной частью механизма биосинтеза белка, опосредуя перенос аминокислот на рибосомы. Для участия тРНК в трансляции аминоксил-тРНК-синтетаза катализирует присоединение аминокислоты к 3'-ССА-концу тРНК (Carter, 1993; Giegé et al., 1993). Некоторые геномы (+)РНК-содержащих вирусов растений могут быть специфически аминокислотированы, аналогично аминокислотированию клеточных тРНК, вследствие присутствия в составе геномных РНК тРНК-подобных структур (ТПС). В настоящее время известны вирусы восьми родов, обладающие геномами с такими ТПС. Во всех случаях ТПС представляют собой 3'-концевые элементы вирусных РНК. ТПС впервые была идентифицирована в геномной (+)РНК вируса желтой мозаики турнепса (ВЖМТ) в 1970 г. (Pinck et al., 1970; Yot et al., 1970). Позднее ТПС были найдены не только у вирусов растений, но и в других вирусах, бактериях и эукариотах (Mans et al., 1991; Sherlock et al., 2021). При этом для определения структуры РНК как тРНК-подобной использовалось несколько критериев: способность взаимодействовать с одним или несколькими тРНК-специфичными ферментами, такими как РНКаза Р, РНКаза Z, ССА-нуклеотидилтрансфераза и аминоксил-тРНК-синтетаза, а также образование тройственного комплекса с GTP и фактором элонгации, сходство последовательности с известными тРНК и предполагаемая вторичная структура, подобная листу клевера (Mans et al., 1991). Однако не все эти критерии должны удовлетворяться для того, чтобы структура считалась тРНК-подобной. Например, некодирующая *mas*РНК не аминокислотирована, но соответствует всем остальным критериям (Wilusz et al., 2008). Такого рода специфические вариации могут играть существенную роль в индивидуальных функциях ТПС-содержащих РНК.

Функция ТПС в усилении трансляции белков вирусов

Было показано, что ТПС ВЖМТ усиливает трансляционную активность генов в растительных клетках способом, который зависит от аминоацилирования и 5'-кэп-структуры (Matsuda, Dreher, 2004). Эта роль ТПС аналогична роли поли(А)-хвоста мРНК в стимулировании трансляции и предполагает циркуляризацию мРНК (Sonenberg, Hinnebusch, 2009). Неизвестно, как именно аминоацилирование ТПС ВЖМТ усиливает трансляцию, но на основании эффектов мутаций, ослабляющих связывание eEF1A-GTP с ТПС, было высказано предположение, что усиление трансляции (УТ) опосредовано именно EF1A (Matsuda, Dreher, 2004). Синергическое действие 5'-кэпа и ТПС ВЖМТ предполагает, что eEF1A, связанный с валилированной ТПС, каким-то образом взаимодействует с комплексом eIF4F, связанным с 5'-кэпом, что напоминает взаимодействие PABP-eIF4G в случае полиаденилированных клеточных мРНК (Matsuda, Dreher, 2004).

Было показано, что 3'-НТО ВМК обеспечивает УТ, и предполагается, что УТ зависит от тирозилирования ТПС (Gallie, Kobayashi, 1994). Было замечено, что нарушение ТПС снижает эффективность трансляции на матрице РНК ВМК *in vitro* (Barends et al., 2004). Таким образом, ВЖМТ и ВМК могут иметь общий механизм УТ, который обеспечивает ключевую роль ТПС в повышении инфекционности вирусной РНК аналогично тому, как связывание белка оболочки с 3'-концевыми структурами РНК вируса мозаики люцерны увеличивает эффективность трансляции и является необходимым для инфекционности (феномен, известный как активация генома) (Vol, 2005).

В настоящее время неизвестно, является ли УТ свойством всех аминоацилируемых ТПС. Эта функция не обязательно должна обеспечиваться 3'-концевым элементом РНК, так как участок из трех последовательных псевдоузлов непосредственно перед ТПС ВТМ способен обеспечивать мощное УТ (Leathers et al., 1993). Таким образом, функция УТ

могла быть «передана» от ТПС ВТМ другим элементам структуры РНК за счет приобретения в процессе эволюции вирусного генома расположенного выше участка псевдоузлов, что также могло иметь место в случае РНК вируса узловатости арахиса, чья валилированная ТПС почти не взаимодействует с eEF1A-GTP (Goodwin, Dreher, 1998). 3'-НТО тимовируса латентного вируса желтушника и вируса крапчатости паслена, у которых отсутствуют ТПС, предположительно обеспечивают функцию УТ каким-то принципиально другим способом, не связанным с ТПС (Goodwin, Dreher, 1998).

Теломерная функция ТПС

Линейные геномы (+)РНК-вирусов подвержены риску потери жизнеспособности при утрате терминальных нуклеотидов. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ССА-нуклеотидилтрансфераза клетокхозяина может служить 3'-теломеразой для геномов с ТПС, обеспечивая наличие полных 3'-ССА-концов. Для ВЖМТ и других тимовирусов, большая часть вирионных РНК имеет на 3'-конце остатки СС (Giege et al., 1978), аденилирование с помощью ССА-нуклеотидилтрансферазы должно происходить сразу после разборки капсида, поскольку оно необходимо для валилирования, которое, в свою очередь, необходимо для трансляции и экспрессии вирусных генов. Поскольку синтез (-)цепи вирусной геномной РНК весьма чувствителен к удалению 3'-А, 3'-аденилирование важно также и для эффективной репликации (Deiman et al., 1998; Singh, Dreher, 1997).

Для РНК ВМК было показано, что мутации в ТПС, специфически нарушающие *in vitro* 3'-аденилирование с помощью ССА-нуклеотидилтрансферазы (Dreher, Hall, 1988), снижали уровень накопления вирусной РНК *in vivo* и приводили к отсутствию 3'-концевого остатка А (Dreher et al., 1989). Замены в 3'-ССА-конце, предотвращающие как синтез (-)цепи, так и аминокислотилирование (Dreher et al., 1984), не приводили к задержке

начала инфекции, поскольку подвергались реверсии, и происходило восстановление последовательности дикого типа в вирусном потомстве (Rao et al., 1989). Был сделан вывод о том, что вероятный механизм коррекции 3'-конца включает в себя удаление мутантных нуклеотидов с последующим восстановлением 3'-ССА с помощью ССА-нуклеотидилтрансферазы. Такая теломерная роль, вероятно, может существовать для всех вирусных ТПС.

Роль ТПС в регуляции инициации репликации вирусных геномов

Свойства ТПС вполне допускают возможность регулировать синтез (-) цепей при репликации вирусных геномов. На сегодняшний день эта идея была экспериментально проверена только для ВЖМТ, для которого было показано, что связывание eEF1A-GTP с аминокцилированной РНК подавляет синтез (-)цепи в экспериментах *in vitro* (Matsuda et al., 2004). Альтернативный способ регулирования доступа полимеразы к 3'-концу был описан для РНК вируса мозаики люцерны, где было продемонстрировано конформационное равновесие между двумя структурными формами: одна, имеющая сходство с ТПС бромовирусов, может быть 3'-аденилирована и активна в синтезе (-) цепи, а другая, образующаяся в присутствии белка оболочки, имеет недоступный для инициации синтеза (-)цепи 3'-конец (Chen, Olsthoorn, 2010; Olsthoorn et al., 1999).

Предполагают, что механизм регулирования, показанный для ТПС ВЖМТ, может функционировать и в случае других ТПС, способных связывать eEF1A-GTP. Для ВТМ, вероятно, такая регуляция может осуществляться параллельно с другими процессами, происходящими с участием eEF1A. Известно, что eEF1A связывается с областью псевдоузлов непосредственно перед ТПС ВТМ (Zeenko et al., 2002), который является сайтом, действующим как 3'-трансляционный энхансер (Leathers et al., 1993). eEF1A также взаимодействует с метилтрансферазным доменом РНК-зависимой РНК-полимеразы ВТМ и, возможно, служит субъединицей вирусной репликазы (Yamaji et al., 2006). Неизвестно, участвует ли eEF1A в

функции УТ за счет области псевдоузлов, или эта функция обеспечивается за счет другого фактора, который конкурирует с eEF1A за связывание. Понимание событий, которые регулируют переход от трансляции к репликации в инфекционном цикле ВТМ, требует дальнейших исследований. Поскольку похожие области псевдоузлов обнаружены у гордеивирусов, фуоровирусов и помовирусов, вирусы этих родов могут иметь общие механизмы регуляции с ВТМ (Koenig et al., 2005; Leathers et al., 1993).

Функции ТПС в системном транспорте вирусных геномных РНК

В работе (Gopinath, Као, 2007) было показано, что все три геномные РНК ВМК способны к дальнему транспорту в растениях *N. benthamiana* в присутствии ТБ. Более того, обнаружено, что РНК3 ВМК способна системно транспортироваться в растениях *Nicotiana benthamiana* в отсутствие РНК1 и РНК2, а также в отсутствие ТБ. Кроме того, показано, что транспорт РНК ВМК не требует предварительного раунда репликации РНК или инкапсидации. Эти результаты исключают существенную роль вирусных белков в системном транспорте РНК3 ВМК и, поскольку РНК1 и РНК2 ВМК также способны транспортироваться, хотя и с более низкой эффективностью, можно предположить, что ТПС, являющаяся единственным элементом, общим для трех РНК ВМК, может участвовать в транспорте РНК ВМК по флоэме (Gopinath, Као, 2007).

Биогенез и функционирование миРНК

миРНК растений

МикроРНК (миРНК) - это малые некодирующие РНК длиной 20-24 нуклеотидов (нт), регулирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством расщепления мРНК-мишеней или ингибирования трансляции на матрице соответствующих мРНК. Направляемые комплементарностью к РНК-мишеням, миРНК функционируют в составе сложного комплекса белков (RNA-induced

silencing complex, RISC), ключевым компонентом которого являются белки ARGONAUTE (AGO).

Большинство миРНК растений имеют длину 21 нуклеотид (нт), и для их биогенеза и функционирования необходимы белки DCL и AGO. Эти белки довольно консервативны и принадлежат к мультигенным семействам (Rogers, Chen, 2013). миРНК растений часто имеют узкие наборы транскриптов-мишеней. В большинстве случаев мРНК, являющиеся мишенями миРНК, кодируют транскрипционные факторы и белки, ассоциированные с реакциями на стресс, а также факторы, контролирующие идентичность клеток, рост и развитие.

Транскрипция генов миРНК

Большинство генов миРНК растений являются независимыми транскрипционными единицами, кодирующими при-миРНК (первичный транскрипт миРНК), который содержат одну шпилечную структуру, в результате процессинга дающую начало зрелой миРНК, что отличает при-миРНК растений от подобных РНК животных, которые часто содержат разветвленные шпилечные структуры (Griffiths-Jones et al., 2008). Кроме того, в отличие от миРНК животных, которые часто происходят из интронов или нетранслируемых областей (Carthew, Sontheimer, 2009), локусы миРНК растений редко встречаются внутри генов, кодирующих белки.

Гены миРНК транскрибируются РНК-полимеразой II (Pol II) при участии ко-активаторов, таких как медиаторный комплекс и NOT2b. ТАТА-боксы и разнообразные *cis*-регуляторные мотивы, представленные в промоторах миРНК растений, обеспечивают их пространственно-временную и стресс-зависимую регуляцию с помощью различных транскрипционных факторов и эффективно регулируют дифференциальное накопление изоформ миРНК (Kim et al., 2011; Wang et al., 2013). Например, POWERDRESS-зависимое привлечение Pol II к промоторной области гена миРНК172 необходимо для регулирования экспрессии только некоторых членов

семейства миРНК172 (Yumul et al., 2013). Схожим образом, привлечение специфичного для локуса миРНК156 фактора транскрипции FUSCA3 лежит в основе дифференциального накопления миРНК некоторых членов этого семейства (Wang, Perry, 2013).

Процессинг при-миРНК

При-миРНК экспонированы и полиаденилированы (Xie et al., 2005), некоторые затем претерпевают сплайсинг интронов, локализованных в основном в области первичного транскрипта, расположенной к 3'-концу относительно шпилечной структуры, содержащей последовательность зрелой миРНК (Schwab et al., 2013).

Сплайсинг и процессинг при-миРНК скоординированы. Это согласуется с данными по ко-локализации в DCL1-содержащих тельцах сплайсосомных маркеров SmD3 и SmB, фактора SR33, а так же фактора альтернативного сплайсинга SRp34 (Fang, Spector, 2007; Fujioka et al., 2007). Показано, что ко-транскрипционный процессинг в клетках человека может происходить при участии H1-подобного гистона HP1BP3, который взаимодействует с микропроцессором и при-миРНК (Liu et al., 2016). Вполне вероятно, что похожий механизм регуляции существует и у растений.

Кроме того, общие факторы сплайсинга пре-мРНК способствуют процессингу при-миРНК, включая белок SERRATE (SE), содержащий цинковые пальцы C2H2, и субъединицы CAP-BINDING PROTEIN 80 (CBP80) и CBP20 кэп-связывающего комплекса (CBC) (Laubinger et al., 2008). Все эти белки взаимодействуют с NOT2b ко-активатором транскрипции при-миРНК (Wang et al., 2013).

Растения *A. thaliana* с пониженным уровнем экспрессии STABILIZED 1 (STA1), гомолога человеческого белка PRPF6, ассоциированного с малой ядерной рибонуклеиновой частицей U5, демонстрирует сильное ингибирование сплайсинга интронов и способствует накоплению несплайсированных при-миРНК (Bielewicz et al., 2013). Мутантные линии

арабидопсиса *cbp20* и *cbp80*, *sta1* демонстрирует сниженные уровни зрелой миРНК, вероятно, в результате комбинированного дефектов сплайсинга при-миРНК и мРНК DCL1 (Bielewicz et al., 2013). Растения арабидопсиса, лишённые пролин-богатого белка SICKLE (SIC), также демонстрирует снижение накопления зрелых миРНК и tasiРНК и накопление несплайсированных при-миРНК (Zhan et al., 2012).

Шпилечная структура стебель-петля, содержащаяся при-миРНК, определяет процессинг. Структурные детерминанты иницируют не менее двух событий разрезания в пределах стебля пре-миРНК, высвобождающих миРНК и ее пассажирскую цепь (миРНК*). Ключевое значение имеет положение первого сайта разрезания, определяющее последовательность зрелой миРНК и, следовательно, ее целевую специфичность. Второй акт разрезания обычно происходит на фиксированном расстоянии от конца предшественника. Процессинг пре-миРНК обеспечивается белком DCL1 с помощью дцРНК-связывающих белков HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) и SE (Laubinger et al., 2008; Vazquez et al., 2004).

Белок HYL1 специфически связывается с DCL1 DUF283-доменом, в то время как для обеспечения взаимодействия между DCL1 и SE необходимы N-концевой домен и домен с цинковыми пальцами SE. *In vivo* белки HYL1, SE и DCL1 образуют комплекс на матрице при-миРНК в ядерных тельцах. HYL1 и SE улучшают эффективность и точность DCL1-опосредованного разрезания и, соответственно, сильные мутантные аллели HYL и SE являются летальными на эмбриональной стадии развития, тогда как нокауты *hyl1* вызывают серьезные дефекты развития (Dong et al., 2008; Laubinger et al., 2008; Vazquez et al., 2004).

Белок SIC, необходимый для сплайсинга при-миРНК, также локализуется в ядре с HYL1, что предполагает дополнительное участие в процессинге при-миРНК (Zhan et al., 2012).

Инактивация РНК-связывающих белков TOUGH (TGH) и MODIFIER OF SNC1 2 (MOS2) увеличивает общий уровень при-миРНК в клетке с

одновременным снижением количества при-миРНК в иммунопреципитатах белка HYL1. Эти данные говорят о том, что белки TGH и MOS2 участвуют в процессинге при-миРНК. Оба эти белка эффективно связывают при-миРНК, но в то время как TGH ассоциируется с DCL1, HYL1 и SE в ядерных тельцах, MOS2 равномерно распределяется в ядре. Таким образом, TGH, по видимому, является неотъемлемой частью комплекса, модулирующего активность DCL1, тогда как MOS2, возможно, в качестве дополнительного фактора способствует рекрутированию при-миРНК в этот комплекс (Ren et al., 2012b; Wu et al., 2013).

Белок DAWDLE (DDL) также связывает при-миРНК, но мутанты *ddl*, в отличие от *mos2* и *tgh*, не накапливают избыточно количества при-миРНК (Yu et al., 2008). DDL взаимодействует с DCL1 через участок белка, который, вероятно, фосфорилируется *in vivo*, и таким образом может способствовать доступу или распознаванию при-миРНК белком DCL1. В отсутствие DDL часть при-миРНК неправильно взаимодействует с DCL1 и, по всей видимости, деградирует, в результате чего у мутантов *ddl* происходит снижение уровня при-миРНК (Machida, Yuan, 2013).

РЕСЕПТОР FOR ACTIVATED C KINASE 1 (RACK1), специфически взаимодействует с SE, локализуется в ядерных тельцах, чтобы модулировать процессинг и транскрипцию/стабильность только некоторых при-миРНК. Слитный белок RACK1-GFP ко-иммунопреципитируется и ко-локализуется с AGO1 как в ядре, так и в цитозоле (Speth et al., 2013).

C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1 (CPL1) является другим белком взаимодействующим с SE. В отличие от *hyll*, *se*, *tgh* и *mos2*, в мутантах *cpl1* не накапливаются непроцессированные при-миРНК, но несколько миРНК процессируются неправильно. Была предложена модель, согласно которой взаимодействие CPL1 с SE привлекает CPL1 к DCL1-комплексу, где он может изменять активность HYL1 посредством дефосфорилирования (Manavella et al., 2012).

Было обнаружено, что позиции 1, 3 и 23 в составе предшественников миРНК являются в основном спаренными, и показано, что замена неспаренного нуклеотида в положении 1 на комплементарный у миРНК172А *Arabidopsis* увеличивала накопление миРНК172. Аналогичным образом, нарушение комплементарности в положении 23 миРНК164С сильно снижало эффективность биогенеза зрелой миРНК (Rojas et al., 2020). Кроме того, недавние результаты показали, что процессинг предшественников миРНК также зависит от GC-состава дуплекса миРНК/миРНК* (Narjala et al., 2020), подчеркивая важность стабильной вторичной структуры в определенных регионах предшественников миРНК растений.

Стабильность миРНК

После высвобождения дуплекса миРНК/миРНК* 3'-концы обеих цепей 2'О-метируются белком HEN1. Потеря функции HEN1 приводит к экзонуклеазной деградации миРНК, при этом происходит олигоуридилирование миРНК белком HESO1, который добавляет 3'-«хвосты» к неметилованным миРНК, что приводит к их деградации (Ren et al., 2012a; Yu et al., 2005; Zhai et al., 2013; Zhao et al., 2012). HESO1 ко-локализуется с AGO1, и для добавления олигоU и последующей деградации требуется AGO1, но не его нуклеазная активность, что позволяет предположить, что 3'-концевые модификации неметилованных миРНК возникают после их связывания белком AGO1.

Нормальный оборот миРНК у растений происходит с участием белков семейства SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN) с 3'-5' экзорибонуклеазной активностью, способных расщеплять 2'О-метилованную оцРНК (Ramachandran, Chen, 2008). Поскольку активность SDN ингибируется 3'-олигоуридилированием, они вряд ли могут способствовать деградации 3'-олигоуридилированных миРНК, накапливающихся в растениях с мутацией *hen1* (Ren et al., 2012a; Zhao et al., 2012).

Выбор направляющей цепи в дуплексе миРНК/миРНК* растений частично регулируются более низкой термодинамической стабильностью 5'-конца направляющей цепи относительно пассажирской. NYL1 и CPL1 также влияют на этот процесс, позволяя предполагать наличие связи с биогенезом миРНК (Eamens et al., 2009; Manavella et al., 2012). В отличие от дуплексов siРНК, удаление пассажирской цепи миРНК из AGO1 не зависит от разрезания и требует диссоциации AGO1 от HSP90 и SQN (Iki et al., 2010; Iki et al., 2012), что приводит необходимому изменению конформации AGO1 (Gu et al., 2012; Kwak, Tomari, 2012). После выбора направляющей цепи пассажирская цепь обычно деградирует, хотя некоторые такие молекулы могут быть стабильны и функциональны, в том числе в стрессовых условиях и при их загрузке в AGO2 (Devers et al., 2011).

Экспорт миРНК из ядра

Зрелые миРНК функционируют в цитоплазме, что подразумевает их ядерный экспорт. Роль растительного гомолога экспортина-5, также называемого HASTY (HST), в этом процессе не так ясна, как у млекопитающих, где пре-миРНК (в отличие от зрелых миРНК) являются экспериментально подтвержденными «грузами» экспортина-5 (Mee et al., 2005; Zeng, Cullen, 2004). Фактически, мутанты *hst* демонстрируют пониженное накопление некоторых (но не всех) миРНК в ядерных и цитоплазматических фракциях, что позволяет предположить, что существует HST-опосредованный контроль накопления миРНК, а не их экспорта (Mee et al., 2005).

Дефекты в белке EMA1 *A. thaliana*, являющемся гомологом импортина- β , усиливают активность миРНК, но не влияют на их накопление и нуклео-цитоплазматическое распределение (Wang et al., 2011). Очевидно, что механизм экспорта миРНК из ядра в растениях имеет отличия от такового в клетках животных.

В работе (Bologna et al., 2018) показано, что N-концевая α -спираль белка AGO1 *A. thaliana* (AtAGO1) содержит консервативные и функциональные сигналы ядерного импорта и экспорта (NLS и NES, соответственно), позволяя AtAGO1 перемещаться между цитоплазмой и ядром. Показано, что мутации, нарушающие функции NES, приводят к нарушению выхода AGO1 из ядра и нарушению миРНК-опосредованной регуляции, при этом в настоящее время неизвестно, будет ли наблюдаться похожий эффект при внесении мутаций в область NLS. Важно, что ядерный AGO1 содержит 2'-О-метилованные популяции зрелых миРНК. Полученные результаты позволяют предположить, что миРНК растений созревают, метилируются и загружаются в AGO1 в ядре и в составе такого комплекса экспортируются цитоплазму (Bologna et al., 2018).

Функционирование миРНК растений

5'-RACE (быстрая амплификация концов кДНК) и анализ деградомы показывают, что снижение количества транскриптов-мишеней в результате действия миРНК растений коррелирует с AGO-опосредованным разрезанием между спаренными позициями 10–11 миРНК; продукты расщепления затем уничтожаются цитоплазматической экзосомой и 5'–3' экзорибонуклеазой XRN4 (German et al., 2008).

Следует заметить, что, несмотря на наличие соответствующих миРНК, некоторые мишени не подвергаются разрезанию вовсе и, в более общем плане, вклад разрезания мишеней в миРНК-опосредованную регуляцию у растений по-прежнему трудно измерить. Тем не менее, решающая роль AGO1 в этом процессе подтверждается сильными дефектами развития у растений с каталитически-дефектным аллелем AGO1, экспрессирующегося на фоне генотипа *ago1*, а также доминантно-негативным эффектом такого дефектного белка в присутствии AGO1 дикого типа (Carbonell et al., 2012). Показано, что часть мишеней ускользает от разрезания AGO1 и вместо этого подвергаются репрессии на уровне трансляции. Вероятно, трансляционная

репрессия (ТР) связана со способностью миРНК растений взаимодействовать с полисомами AGO1-зависимым образом (Brodersen et al., 2008; Brodersen et al., 2012). Показано, что на уровень трансляционной репрессии способен влиять AGO10, регулируя уровень белка AGO1 через миРНК168.

Примечательно, что степень ТР по сравнению с разрезанием варьирует в зависимости от пары миРНК/siРНК:мРНК-мишень без явной корреляции со степенью комплементарности малой РНК и ее мишени или положением мишени в мРНК (Brodersen et al., 2008).

Неясно, разделены ли пространственно AGO1-опосредованная ТР и разрезание между клетками или в пределах отдельных клеток. В первом случае отсутствие/наличие антагониста/ов AGO1-опосредованного разрезания в некоторых типах клеток, но не в других, могут лежать в основе очевидного обнаружения обоих процессов при анализе всей ткани. Во втором случае разделение пулов комплексов AGO1:мРНК, предназначенных для ТР или разрезания, в результате их дифференциальной компартиментализации могут приводить к взаимодействию AGO1 с определенными компартимент-специфическими клеточными факторами, определяющими либо ТР, либо разрезание. В поддержку этой точки зрения имеются данные, согласно которым ТР возникает на шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и требует трансмембранного белка ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1), ассоциированного с ЭПР и ко-локализующегося с AGO1 (Li et al., 2013). Количественное определение уровня синтеза белка с помощью импульсного мечения дало прямые доказательства того, что по крайней мере одна растительная миРНК может ингибировать синтез белка AMP1-зависимым способом. Анализ нескольких пар миРНК:мишень показал, что AMP1 каким-то образом способствует исключению транскриптов-мишеней из мембранно-связанных полисом (Li et al., 2013). Хотя эти результаты предполагают нарушение инициации трансляции, необходимо больше экспериментальных данных для понимания точных молекулярных механизмов ТР, опосредованной миРНК растений.

У многоклеточных животных миРНК-опосредованная ТР связана со сниженными уровнями мРНК через независимые от разрезания механизмы в цитоплазматических агрегатах, называемых Р-тельцами. Р-тельца представляют собой места деградации мРНК, в том числе посредством декэпирования/деаденилирования (Iwakawa, Tomari, 2013).

Хотя разрезание, опосредованное миРНК в растениях, затрудняет анализ и изучение вклада ТР-ассоциированной деградации мРНК, было обнаружено, что белок VCS, взаимодействующий в Р-тельцах с белками, регулирующих процессы деградации мРНК: DECAPPING 2 (DCP2), DCP1, DCP5 и XRN4, необходим для миРНК-зависимой ТР (Brodersen et al., 2008). К тому же показано, что часть цитоплазматического AGO1, по-видимому, локализуется в Р-тельцах (Xu, Chua, 2011).

Эксперименты, проведенные в растительных лизатах, показали, что AtAGO1-RISC обладает способностью репрессировать трансляцию, не способствуя деаденилированию или деградации мРНК. Более того, показано, что AtAGO1-RISC, связываясь в 5'-нетранслируемых областях или открытых рамках считывания, может блокировать рекрутирование или движение рибосом (Iwakawa, Tomari, 2013). Таким образом, механизм миРНК-опосредованной ТР в растениях понятен не до конца и требует дальнейшего изучения.

В целом можно заключить, что как биогенез, так и функционирование миРНК в клетках растений являются сложными процессами, которые происходят с участием многих белковых факторов и регулируются большим количеством клеточных белков, и далеко не все детали этих процессов в настоящее время известны.

Материалы и методы

Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: стрептомицин, спектиномицин, рифампицин, ампициллин, тетрациклин производства фирмы «Duchefa Biochemie» (Нидерланды); ацетосирингон «Sigma-Aldrich» (США); ЭДТА «VWR international LLC» (США), LiCl «Хеликон» (Россия), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ «Хеликон» (Россия), H_3BO_3 «Хеликон» (Россия), MgCl_2 «Хеликон» (Россия), CH_3COOK «Хеликон» (Россия), глицин «VWR international LLC» (США), ДМСО «MP Biomedicals» (Франция), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) «Fisher Scientific» (Бельгия), бромид этидия «AppliChem» (Германия), агароза «Lonza» (США), бакто-триптон «VWR international LLC» (США), трис «VWR international LLC» (США), бактоагар «VWR international LLC» (США), NaCl «Хеликон» (Россия), дрожжевой экстракт «Bio Springer» (Франция); глицерин «AppliChem» (Германия), бромфеноловый синий «Sigma-Aldrich» (США), минеральное масло «ICN Biomedicals» (США); хлороформ «Мосреактив» (Россия); ледяная уксусная кислота «Химмед» (Россия), HCl «Химмед» (Россия); высокоочищенная вода Milli-Q «Millipore» (Франция); изопропанол «Химмед» (Россия).

Ферменты и наборы

В работе использовались ферменты: T4-ДНК-лигаза, РНКазы А, Ribolock (ингибитор РНКаз) производства фирмы «Thermo Scientific» (США). RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (обратная транскриптаза), эндонуклеазы рестрикции производства «Thermo Scientific» (США). ДНК-полимераза (Encyclo) производства «Evrogen» (Россия). В работе использовался набор для выделения ДНК из геля "DNA Extraction Kit" производства «Thermo Scientific» (США).

Растительный материал

В работе использовали растения *Nicotiana benthamiana*, которые выращивали из семян в климатической камере. Растения содержали при 24°C и 16-часовом световом дне, а также растения *Cucurbita maxima* (Big Max) и *Cucumis melo*, выращенные в аналогичных условиях.

Получение компетентных клеток

5 мл ночной культуры клеток *E.coli* высевали в 300 мл среды LB (бакто-триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л), содержащей тетрациклин в концентрации 1 мг/л, и выращивали, качая, около трех часов при 37°C до оптической плотности суспензии 0,4-0,6 о.е. (λ 600нм). Клетки выдерживали во льду в течение 15 минут, а затем осаждали центрифугированием при 5000 g при 4°C. Далее все операции проводили во льду. Осадок ресуспендировали в 2,5 мл охлажденного буфера TSS (среда LB, 10% (вес/объем) полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000, 5% диметилсульфоксид, 50 mM MgCl₂, pH 6.5) и выдерживали во льду в течение 20-30 минут. Суспензию разделяли на аликвоты по 100 мкл, которые замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Выделение РНК из растительного материала

100-150 мг листьев без жилок растирали в жидком азоте в пробирках Eppendorf. К полученному порошку добавляли 600 мкл фенола, смешанного с автоклавированным экстракционным буфером (0,1 M LiCl; 100 mM Трис-HCl pH 8,0; 10 mM ЭДТА pH 8,0; 1% SDS) в соотношении 1:1. Пробы нагревали до 80°C и перемешивали на вортексе, после чего добавляли 300 мкл хлороформа, вновь перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 4 минут при 20800 g при 4°C. К водной фазе добавляли равный объем автоклавированного 4 M LiCl и инкубировали в течение ночи при 4°C. Далее пробы центрифугировали в течение 10 минут при максимальных оборотах; к осадку добавляли 50 мкл Milli-Q, 4 мкл 3 M ацетата натрия, холодный 96%

спирт до верха пробирки. Центрифугировали в течение 10 минут при максимальных оборотах при 4°C. К осадку добавляли 0,5 мл холодного 96% спирта и центрифугировали в течение 10 минут на максимальных оборотах при 4°C. Далее к осадку добавляли 0,5 мл холодного 75% спирта и центрифугировали в течение 10 мин при максимальных оборотах при 4°C. Осадок сушили при комнатной температуре 15-30 мин и затем растворяли в 30 мкл Milli-Q.

Получение кДНК методом обратной транскрипции

Синтез кДНК проводили с помощью фермента обратной транскрипции “RevertAid H Minus Reverse Transcriptase” фирмы «Thermo Scientific» (США) и ген-специфического ген праймера.

Реакцию проводили в объеме 20 мкл в пробирках Eppendorf. На первом этапе смешивали РНК-матрицу с праймером и проводили денатурацию. Для этого на общий объем реакционной смеси 12,5 мкл брали 5 мкл РНК-матрицы, 2 мкл генспецифического праймера (10 пмоль/мкл) и 5,5 мкл Milli-Q. Затем пластиковая пробирка с реакционной смесью плотно закрывалась и прогревалась 5 мин при температуре 65°C, после чего быстро охлаждалась в воде со льдом 5 мин. Далее добавляли 4 мкл 5х буферного раствора (Reaction Buffer, «Thermo Scientific»), 2 мкл 10 мМ раствора дезоксинуклеотидтрифосфатов, 1 мкл фермента обратной транскриптазы и выдерживали пробирку с реакционной смесью 60 мин при 42°C для синтеза кДНК, после чего для инактивации фермента смесь нагревали 10 мин до 70°C. Продукт хранили при -20°C.

Аmplификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР проводили в объеме 50 мкл в пробирках Eppendorf для ПЦР объемом 0,5 мл. Для реакции использовали набор, содержащий смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов производства фирмы «Thermo Scientific»

(США), 10-ти кратный буфер и Encyclo полимеразу производства фирмы «Евроген» (Россия). Амплификацию проводили согласно прилагаемому протоколу. Сверху на реакционную смесь наслаивали 50 мкл минерального масла, производства «ICN Biomedicals» (США). В работе использовался амплификатор ДНК "Терцик" (ДНК-технология, Россия). Плавление ДНК проходило в течение 30 сек. при 95°C, отжиг специфических олигонуклеотидов - в течение 30 секунд при температуре, рассчитанной с помощью веб-сервиса OligoCalc, время элонгации ставили из расчета 1000 нуклеотидов за 1 минуту при 72°C. Амплификация происходила в течение 30 циклов.

Очищение продукта ПЦР

Полученный продукт переносили в чистую пробирку Eppendorf и добавляли пятикратный объем Milli-Q. Далее приливали равный объем смеси фенола с хлороформом в соотношении 1:1 и перемешивали на вортексе. После этого пробы центрифугировали 4,5 мин при максимальных оборотах. К водной фазе добавляли трехкратный объем 96% этилового спирта и 5 мкл 3 М раствора ацетата натрия, перемешивали и погружали в жидкий азот на 5 мин. Далее пробы центрифугировали 10 мин при максимальных оборотах в минуту, осадок промывали 70% раствором этилового спирта, сушили и растворяли в 50 мкл Milli-Q.

Рестрикция

Для реакции расщепления использовали ферменты фирм «Thermo Scientific» (США). Для каждого фермента использовался оптимальный буферный раствор согласно рекомендованной методике. Стандартная реакция проводилась в соответствии с протоколом производителя фермента в объеме 20 мкл.

Электрофорез в агарозном геле

ДНК пробы смешивали с 6х буфером для нанесения (6X DNA Loading Dye) производства «Thermo Scientific» (США) и наносили на гель (0,8-2,0%) под слой электрофорезного буфера ТБЭ (0,089 М трис-борат, 0,002 М ЭДТА рН 7,8). Электрофорез проводили при напряжении 150 В.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Под ультрафиолетовой лампой из геля вырезали кусочки агарозного геля, содержащие фрагменты ДНК, и помещали их в 1,5мл пробирки фирмы Eppendorf. Экстракцию фрагментов ДНК из геля проводили с использованием набора "DNA Extraction Kit" фирмы «Thermo Scientific» (США) согласно прилагаемой инструкции.

Трансформация клеток *E.coli*

100 мкл замороженных компетентных клеток размораживали во льду в течение 15 мин, после чего смешивали с 50-100 нг плазмидной ДНК или 10 мкл лигазной смеси и выдерживали во льду в течение 10 мин. Полученную суспензию клеток подвергали кратковременному тепловому шоку, путем нагревания до 42°C в течение 1,5 минут и быстрого охлаждения во льду в течение 5 минут. Далее к суспензии добавляли 400 мкл питательного бульона LB и инкубировали при 37°C. По истечении 60 минут клетки высевали в чашки Петри на твердую LB среду с 1,5% агаром, содержащую соответствующий антибиотик. Чашки Петри инкубировали при 37°C около 18 часов.

Выделение плазмидной ДНК

Бактериальный клон высевали в 2 мл бульона LB (бакто-триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л), содержащего соответствующий антибиотик, и выращивали в течение ночи при 37°C, поместив суспензионные культуры на качалку. Ночную культуру бактерий отбирали в

2 мл центрифужную пробирку Eppendorf. Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 6000 g. Полученный осадок ресуспендировали в 250 мкл дистиллированной воды и добавляли 250 мкл лизирующего раствора 2 (0,2 М NaOH, 1% SDS), осторожно перемешивали и выдерживали во льду четыре минуты. К лизату клеток добавляли 250 мкл 3 М ацетата калия (pH 4,5), встряхивали, выдерживали во льду 10 минут и центрифугировали 10 минут при максимальных оборотах. Супернатант переносили в новые пробирки, добавляли 750 мкл 96% этанола и центрифугировали 10 мин при максимальных оборотах. Осадок промывали 500 мкл 70% этанола, после чего высушивали и растворяли в 30 мкл дистиллированной воды.

Лигирование

Реакцию лигирования фрагментов с совместимыми липкими концами проводили согласно протоколу, поставляющемуся в наборе с T4 ДНК – лигазой «Thermo Scientific» (США). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение часа.

Трансформация клеток *A.tumefaciens*

Ночную культуру штамма C58C1 растили в 5 мл среды LB с рифампицином в концентрации 100 мкг/мл. Аликвоту суспензии клеток 500 мкл смешивали с 3-5 мкл плазмидной ДНК в концентрации 0,2 мкг/мкл, аккуратно перемешивали и оставляли во льду на 10 минут. После этого смесь быстро замораживали в жидком азоте, а затем помещали в термостат на 37°C на 15 минут до полного размораживания. После этого смесь добавляли 1 мл среды LB без антибиотиков и ставили качаться 120 об/мин при 28°C в течение 2-3 часов. После чего высевали на чашки Петри с 1,5 % агаром, приготовленным на среде LB, содержащей рифампицин (100 мкг/мл), спектиномицин (50 мкг/мл) и стрептомицин (20 мкг/мл) и инкубировали при 28°C в течение 2 суток.

Рекомбинантные конструкции

Для временной экспрессии ТБ ВТМ, ген ТБ был субклонирован из ранее описанной конструкции pRT-TMV.30K (Fedorkin et al., 2001) в составе бинарного вектора pLH* (Solovyev et al., 2013).

Конструкция PVX-REP была получена в два этапа. Во-первых, ген Cycle-3 GFP из конструкции 30B-GFPC3 (Shivprasad et al., 1999) был модифицирован для удаления внутренних сайтов рестрикции XhoI, SalI и SacI и, дополнительно, для добавления последовательности CTCGAGACGCGTGAATTCTAGA, содержащей сайты рестрикции XhoI, MluI, EcoRI и XbaI после терминирующего кодона GFP. Затем полученный модифицированный ген GFP в виде фрагмента SalI-XbaI был вставлен в инфекционную кДНК PVX (Cruz et al., 1996), которая была клонирована в бинарном векторе под контролем 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, между сайтом XhoI, созданным для замены инициаторного кодона гена TGB1 и сайтом XbaI, сконструированным в терминирующем кодоне гена капсидного белка. Таким образом, полученная конструкция PVX-REP включала нуклеотиды 1–4488 и 6441–6512 последовательности генома ХВК.

Для получения конструкций pLH-390L и pLH-390S фрагменты, содержащие последовательность пре-миРНК390b, амплифицировали на матрице геномной ДНК *A.thaliana* с парой специфических праймеров и клонировали в составе бинарного вектора pLH* (Solovyev et al., 2013).

Для получения конструкций, производных от PVX-REP, фрагменты последовательности мРНК FT, актина-1 и большой субъединицы рубиско *A. thaliana* амплифицировали со ген-специфическими праймерами, обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции и клонировали в сайт множественного клонирования PVX-REP. Для клонирования в PVX-REP, пре-миРНК390b амплифицировали на матрице pLH-390S. ТПП-содержащие 3'НТО РНК3 ВТМ и ВМК были амплифицированы после обратной транскрипции на геномной РНК ВТМ и тотальной РНК из растений

зараженных ВМК. Фрагмент ДНК, соответствующий ТПП ВЖМК, получали путем отжига двух частично комплементарных праймеров с последующим удлинением 3'-конца. Все конструкции были проверены секвенированием. Полученными конструкциями трансформировали *Agrobacterium tumefaciens* (штамм C58C1) методом заморозки-оттаивания.

Агроинfiltrация растений

Для всех экспериментов с PVX-REP и его производными использовали четырехнедельные растения *Nicotiana benthamiana*, выращенные в климатической камере при стандартных условиях (день - 16 ч при 24°C; ночь - 8 ч при 20°C; влажность 50%).

Готовили культуры клеток *A. tumefaciens* для агроинfiltrации описанным ранее методом (Lazareva et al., 2017). Вкратце, ночная агробактериальная культура выращивалась в среде LB с соответствующими антибиотиками, 10 mM 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES) и 20 мкМ ацетосирингона при 28°C с постоянным помешиванием. Клетки агробактерий осаждали центрифугированием, ресуспендировали в буфере для инfiltrации (10 mM MES, pH 5,5, 10 mM MgCl₂, 150 мкМ ацетосирингон) и инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. Перед инfiltrацией суспензию агробактерий разбавляли в буфере для инfiltrации до конечной оптической плотности 0,3 при 600 нм (OD₆₀₀).

Для инfiltrации культур агробактерий, в абаксиальную поверхность двух нижних листьев растений *N. benthamiana*, использовали шприц без иглы. Аналогичным образом, агробактерии, несущие конструкцию с геном ТБ ВТМ, использовали для инfiltrации двух верхних небольших листьев тех же растений. Для агроинfiltrации конструкций 390L и 390S использовали полностью развитые листья пятинедельных растений *N. benthamiana*.

Анализ инфильтрированных растений

Накопление PVX-REP в агроинфильтрованных растениях наблюдали в длинноволновом УФ-свете (365 нм) с использованием лампы Black-Ray В-100АР (UVP, Кембридж, Великобритания). Образцы верхних листьев, агроинфильтрированных для экспрессии ТБ ВТМ, отбирали на четвертый день после инфильтрации.

Тотальную РНК выделяли из образцов с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) и обработанные ДНКазой I, не содержащей РНКаз (ThermoFisher Scientific). Обратная транскрипция проводилась с использованием oligo-dT в качестве праймера. Для амплификации последовательностей, которые были клонированы в конструкцию PVX-REP, использовали пары специфических праймеров. Полуколичественная ПЦР пре-миРНК390b проводилась при 19 циклах. Для ПЦР-анализа в реальном времени использовали 2 мкл аликвоты 50-кратно разведенных образцов кДНК; мастер-микс, содержащий EVA Green (Syntol, Москва, Россия) и прибора CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad, США). Реакции проводили в трех экземплярах. Для обнаружения пре-миРНК390 использовали праймеры 5'-ATGGCTCACCAAGTGCTGTATG и 3'-AAGAAGAAGCTATGGAACTCAGGA. В качестве контрольного гена мРНК белка F-бокса *N. benthamiana* (Niben.v0.3.Ctg24993647 на <https://solgenomics.net/>) была амплифицирована с праймерами 5'-GGCACTCACAAACGTCTATTTC и 5'-ACCTGGGAGGCATCCTGCTTAT. Эти праймеры F-бокса также использовали для подтверждения того, что равные количества РНК были взяты для анализов образцов RT-PCR из верхних листьев растений, агроинфильтрованных PVX-REP и конструкциями на его основе.

Чтобы обнаружить присутствие бинарных векторных последовательностей, была выделена ДНК из листьев *N. benthamiana* модифицированным СТАВ методом. Образцы листьев измельчали в жидком азоте и инкубировали в буфере СТАВ (3% СТАВ, 1,4 М NaCl, 20 мМ EDTA,

0,1 М трис-НСl рН 8,0 и 20 мкг / мл РНКазы А) в течение 1 часа при 65 ° С. После центрифугирования при 20000 g в течение 10 мин супернатант обрабатывали хлороформом, а ДНК осаждали изопропанолом. Последовательность терминатора NOS амплифицировали с использованием праймеров 5'-CCCGATCGTTCAAACATTTGGCA и 5'-AACCCATCTCATAAATAACGTCATGC. Флуоресцентную микроскопию проводили на приборе Zeiss Axiovert 200M; изображения были получены с помощью камеры Hamamatsu C4742.

Анализ первичных данных RNAseq

Первичные данные секвенирования экссудата флоэмы *C. maxima* (SRX146322) и мезофилла листа (SRX4058941) были загружены с помощью fastq-dump NCBI SRA Toolkit 2.9.0 (<http://ncbi.github.io/sra-tools/>). Проверка качества чтения проводилась FastQC с помощью (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Транскриптомы флоэмы и ткани листа были собраны *de novo* с помощью SPAdes 3.12.0 (Bankevich et al., 2012) в режиме «РНК». Транскрипты, содержащие потенциальные предшественники миРНК, были идентифицированы с помощью BLAST (Altschul et al., 1990) с пре-миРНК *Cucumis melo*, аннотированными в miRBase (Kozomara, Griffiths-Jones, 2014) в качестве запросов. Выравнивание первичных чтений с собранными контигами было выполнено с использованием Bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012) и визуализировано с помощью Integrative Genomics Viewer (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Все выбранные контиги были индивидуально проанализированы с помощью BLAST для подтверждения присутствия полноразмерной области пре-миРНК. Графики распределения локального покрытия были построены с использованием надстройки «ggplot2» к языку R, а тест Шапиро – Уилка был выполнен с помощью языка R встроенной функции «shapiro.test». Предсказание вторичной структуры РНК были сделаны с использованием веб-сервера RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at//cgibin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Выделение и анализ РНК флоэмного экссудата

Для получения экссудата флоэмы *C. maxima* (сорт Big Max) листья растений отрезали лезвием, и капли экссудата, появившиеся на срезах черешков, собирали микропипеткой, сразу же смешивая с ледяным буфером (0,08 М Tris -HCl, 4 мМ ЭДТА, 0,08 М 2-меркаптоэтанол, рН 8,6) и хранили при -70°C.

Тотальную РНК выделяли из экссудата флоэмы и образцов листьев с использованием реагента ExtractRNA (Евроген) и обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (ThermoFisher Scientific). Равные количества РНК, измеренные на NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) использовали для обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы RevertAid (ThermoFisher Scientific) и oligo-dT в качестве праймера. Для детекции при-миРНК и мРНК ТСТР использовались специфические праймеры; 30 и 40 циклов амплификации использовали для обнаружение мРНК ТСТР и при-миРНК, соответственно.

Прививка растений

Эксперименты по межвидовой прививке проводили методом «боковой прививки» (Tiedemann, 1989). Срезанные эпикотили *C. melo* с одним настоящим листом прививали на растения *C. maxima* с десятью листьями. Срез стебля *C. maxima* производили в области интеркалярной меристемы третьего настоящего листа, куда помещали отрезанный эпикотиль *C. melo*. Место надреза обматывали Parafilm, и растения держали в условиях высокой влажности до тех пор, пока привитые побеги не начинали расти.

Табл.1 Список праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймера (от 5'-конца к 3'-концу)
C3-ApaSal-P	GCGGGCCCGTCGACCATGGTGAGTAAAGGAGAAGAACT
C3-ovlXho-P	CGGACACAAACTGGAGTACAACATAT

C3-ovlXho-M	ATAGTTGTACTCCAGTTTGTGTCCG
C3-ovlSal-P	CAACCATTACCTCTCGACACAATCT
C3-ovlSal-M	AGATTGTGTGTCGAGAGGTAATGGTTG
C3-XMEX-M	GCTCTAGAATTCACGCGTCTCGAGTTATTTGTACAGCTCATCCAT GCCAT
NOSterm-Sac-M	CGCGAGCTCCCAGTCTAGTAACATAGATGAC
PVX-3-ovl	CCGGCGCCTAATCTAGAGCTACGTCTACATAACCGACGCCT
mRFP-Xho-P	CGCTCGAGAACATGGCCTCCTCCGAGGACGTCAT
mRFP-X-M	GCTCTAGATTAGGCGCCGGTGGAGTGGCGGC
miR390S-P	GCGGTACCGAGAAATAGCTATAAAGCTCAGGAG
miR390S-M	GCGGATCCAAGAAGAAGCTATGGAACCTCAGGAT
miR390L-P	GCCTCGAGGATCCGAAAGAAATAAAGTTATTGTGGGTATGGGA
miR390L-M	GCTCTAGACTTAACTCAAATTGACAATACCTGCG
AtFT-Xho-P	CGCTCGAGTCTATAAATAAAGAGACCCTCTTATAGT
AtFT-Xba-M	GCTCTAGATTGCCAAAGGTTGTTCCAGTTGT
BMV-PN-Xba	CGTCTAGACTAGACACTCTTGTAAGAGGTC
BMV-tR-P-Mlu	GCGACGCGTCTAGGTGCCTTTGAGAGTTA
BMV-3UTR-P-Mlu	GCGACGCGTGCCCCTGCTCGGAGAG
30K-P	GCCCATGGCTCTAGTTGTTAAAGGAAAAG
30K-ovl-P	AGACGGAGGGCCTATGGAACCTTACA
30K-ovl-M	TGTAAGTTCCATAGGCCCTCCGTCT
30K-M	GCTCTAGATTAACCGAATCCGATTTCGGCGA
TMV-tR-P	CGCTCGAGGTAGTCAAGATGCATAATAAATAACGG
TMV-tR-M	GCTCTAGATGGGCCCTACCGGGGGT
TYMV-tR-P	CGCTCGAGTTAGCTCGCCAGTTAGCGAGGTCTGTCCCCACACGAC AGATAATCGGGTGCAAC
TYMV-tR-M	GCTCTAGATGGTTCCGATGACCCTCGGAAGAGGGGCGGGAGTTG CACCCGATTATCTGTCGT
Actin1-F	CGCTCGAGTTCAAAGTTGATCATTTTTCAGAGA
Actin1-R	GCTCTAGACGATTTATATCTTTACATGTGTAAATTCAAG
RBL5-F	CGCTCGAGTGGCCTACTTCTTCACATCCAC
RBL5-R	GCTCTAGATGTGGTATGGTAGCGAGATCCA
PVX-pre-miR390b-P	GCCTCGAGAAATAGCTATAAAGCTCAGGAG
PVX-pre-miR390b-M	GCGAATTCAAGAAGAAGCTATGGAACCTCAGGAT
pri-miR167b-F	TTAGTCGTAGGAAGAGTTAGGG
pri-miR167b-R	AAGCAATAAGCATGGAGAAGG
pri-miR319a-F	GCTTTCTTCAGTCCACTCAT
pri-miR319a-R	GCTCCCTTCAGTCCAAGTA
pri-miR396b-F	TGTGCGTGTGTTGTTTGTGTTTTC
pri-miR396b-R	TGCTATCAACGGAGAAGATTAGGT
graft pri-miR319a-F	TGAGTCAAAAACCCGACTCTCC
graft pri-miR319a-R	CAAATCTGACTCCAAGCAGACCA
TCTP-F	AGAACATTGAAGGAGCAACTAA
TCTP-R	CTCTCAGCACTTGACTTCC

Результаты и обсуждение

Экспериментальная система для визуализации дальнего транспорта РНК

Модифицированные геномы Х-вируса картофеля (ХВК) и вируса морщинистости турнепса ранее использовались для того, чтобы показать способность мРНК FT к дальнему транспорту по флоэме и для картирования области транскрипта, необходимой для этой функции (Li et al., 2009). В этих исследованиях наличие мобильных молекул РНК в верхних листьях растений *N. benthamiana* оценивали методом ПЦР. В рамках данной работы мы разработали экспериментальную систему, делающую возможным визуальное обнаружение транспорта РНК в растениях. С этой целью мы модифицировали геном ХВК, заменив область, кодирующую вирусные транспортные белки (ТБ) и белок оболочки (БО), на последовательность, кодирующую GFP и включающую сайт множественного клонирования (СМК), расположенный между геном GFP и 3'-НТО (Рис. 1).

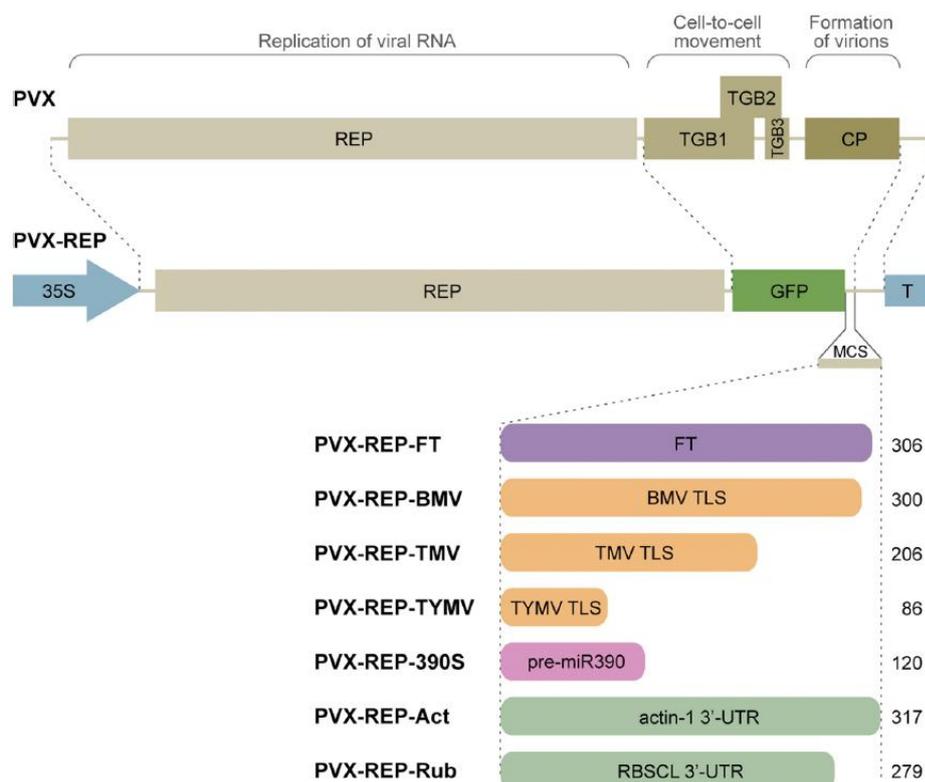


Рисунок 1. Конструкция PVX-REP и ее производные. Геном X-вируса картофеля (PVX) схематично показан вверху. Геномная РНК показана линией, гены изображены прямоугольниками. Белки обозначены следующим образом: REP, репликаза; TGB1, TGB2 и TGB3, три транспортных белка «тройного блока генов»; CP, капсидный белок. Функции белков указаны над генами. Пунктирные линии ниже генома PVX показывают положение геномных элементов в рекомбинантной конструкции PVX-REP. 35S, 35S промотор CaMV; GFP, зеленый флуоресцентный белок; T, транскрипционный терминатор. Расширенный регион ниже гена GFP представляет собой сайт множественного клонирования (MCS), используемый для вставки различных последовательностей. Названия полученных конструкций показаны слева, размеры вставленных фрагментов (в парах оснований) указаны справа. TLS, тРНК-подобная структура; RBSCCL, большая субъединица рибулозобисфосфаткарбоксилазы.

В полученной конструкции, названной PVX-REP, модифицированная вирусная кДНК была клонирована в составе бинарного вектора под контролем 35S промотора. При этом ген GFP находится под контролем субгеномного промотора гена TGB1. Важно отметить, что PVX-REP кодирует единственный вирусный белок, репликазу, и поэтому такой модифицированный вирус способен к репликации в растительных клетках, но неспособен к транспорту, поскольку в нем отсутствуют вирусные гены, кодирующие ТБ и БО, необходимые для межклеточного и дальнего транспорта (Verchot-Lubicz et al., 2010). Таким образом, в отличие от ранее описанной производной ХВК, использовавшейся для анализа транспорта мРНК FT (Li et al., 2009), конструкция PVX-REP не кодирует транспортных белков, что позволяет исключить их возможный вклад в наблюдаемые эффекты (Morozov, Solovyev, 2003; Verchot-Lubicz et al., 2010).

Для визуализации транспорта мы воспользовались способностью транспортного белка (ТБ) вируса табачной мозаики (ВТМ) восстанавливать межклеточный транспорт модифицированного ХВК, неспособного к транспорту (Lazareva et al., 2017). Таким образом, новая экспериментальная система, предложенная в данном исследовании, включает в себя агроинфильтрацию нижних листьев *N. benthamiana* культурой агробактерии, несущей конструкцию PVX-REP, и одновременную агроинфильтрацию верхних листьев тех же растений культурой агробактерии, несущей бинарный вектор для экспрессии ТБ ВТМ. В таких условиях можно ожидать,

что в нижних листьях, агроинфильтрованных конструкцией PVX-REP, будет экспрессироваться GFP, обнаруживаемый под УФ-светом, в то время как в верхних листьях сигнала GFP детектироваться не будет, так как PVX-REP не способен к транспорту. С другой стороны, если PVX-REP несет дополнительную последовательность, обеспечивающую дальний транспорт, то можно ожидать что такой модифицированный PVX-REP попадает в верхние листья, где может реплицироваться и, благодаря ТБ ВТМ, перемещаться из клетки в клетку, давая GFP-содержащие локусы инфекции, видимые в УФ-свете.

Чтобы подтвердить, что экспериментальная система на основе PVX-REP работает так, как ожидалось, фрагмент кДНК FT, соответствующий нуклеотидам с 3 по 309 кодирующей области FT, амплифицировали и клонировали в СМК конструкции PVX-REP. Этот фрагмент, не имеющий инициаторного кодона гена FT, включает область длиной 102 нуклеотида, необходимую и достаточную для обеспечения дальнего транспорта мРНК FT (Li et al., 2009). Полученная конструкция PVX-REP-FT была агроинфильтрована в нижние листья 4-недельных растений *N. benthamiana*, несущих от четырех до пяти листьев, тогда как верхние листья этих растений агроинфильтрировали конструкцией ТБ ВТМ. В качестве контроля для агроинфильтрации нижних листьев растений был использован PVX-REP без дополнительных вставок. Через 4 дня после инфильтрации нижние листья, агроинфильтрованные конструкциями PVX-REP и PVX-REP-FT, демонстрировали яркую флуоресценцию GFP (Рис. 2А). При рассмотрении верхних листьев, агроинфильтрованных конструкцией ТБ ВТМ, не было выявлено флуоресценции GFP у восьми растений, инфильтрованных PVX-REP, и обнаружены яркие локусы GFP на пяти из восьми растений, инфильтрованных PVX-REP-FT (Рис. 2А).

Этот эксперимент повторяли еще два раза, и флуоресцентные локусы были обнаружены в четырех из восьми и шести из восьми растениях, инфильтрованных PVX-REP-FT (всего 62,5% растений в трех

экспериментах, N=24) и никогда не наблюдались у растений, инфильтрированных PVX-REP (N=18). Количество флуоресцентных локусов варьировало от 4 до 20 на листьях разных растений, зараженных PVX-REP-FT. Следует отметить, что флуоресцентные локусы на агроинфильтрованных PVX-REP-FT растениях наблюдались только в областях верхних листьев, инфильтрированных конструкцией ТБ ВТМ, но не в неинфильтрированной области тех же листьев или в верхних неинфильтрированных листьях.

Чтобы исключить возможность того, что формирование локусов происходит в результате самого процесса инфильтрации верхних листьев, верхние листья растений агроинфильтрованных PVX-REP-FT были инфильтрированы либо стандартным буфером для инфильтрации, либо культурой агробактерии, несущей пустой бинарный вектор. В этих опытах флуоресцентные локусы в верхних листьях ни разу не наблюдались (данные не показаны). Следовательно, наличие локусов зависело от экспрессии ТБ ВТМ, который делает возможным перемещение PVX-REP-FT от клетки к клетке, в результате чего образуются флуоресцентные локусы, видимые невооруженным глазом.

Препараты тотальной РНК из верхних листьев, агроинфильтрированных конструкцией ТБ ВТМ, анализировали с помощью обратной транскрипции (ОТ) с последующей ПЦР. Амплификация с FT-специфическими праймерами выявила продукт ожидаемого размера для растений, агроинфильтрованных PVX-REP-FT, но не PVX-REP (Рис. 2В).

При использовании GFP-специфичных праймеров продукт амплификации ожидаемого размера был обнаружен в образцах агроинфильтрованных PVX-REP-FT, но не в контрольных растениях, агроинфильтрованных PVX-REP (Рис. 2В). Подобная картина амплификации наблюдалась при анализе тех же образцов с праймерами, специфичными к гену REP конструкции PVX-REP (Рис. 2В).

Кроме того, когда тотальная РНК из верхних листьев, которые не были агроинфильтрованы конструкцией ТБ ВТМ, анализировалась с помощью

ОТ-ПЦР с FT-специфическими праймерами, был обнаружен продукт ожидаемого размера (Рис. 2С), показывающий, что способность PVX-REP-FT достигать верхних листьев не зависела от экспрессии ТБ ВТМ.

Чтобы исключить возможность того, что локусы в верхних листьях могут быть результатом заражения культурой агробактерии несущей PVX-REP-FT, проводили ПЦР с праймерами, специфичными к NOS терминатору, который присутствует в конструкции PVX-REP-FT, но отсутствует в конструкции ТБ ВТМ, содержащую 35S терминатор. ПЦР проводили на ДНК, выделенной из листьев, агроинфильтрованных PVX-REP-FT, используя ее в качестве контроля, и верхних листьев, содержащих флуоресцентные локусы, в качестве опыта. Продукт ожидаемого размера был обнаружен в нижних листьях, но не в верхних листьях даже при 45 циклах амплификации (Рис. 2D). Следовательно, наблюдаемые в верхних листьях флуоресцентные локусы не являются результатом контаминации агробактерией. Можно заключить, что фрагмент мРНК FT способен обеспечивать дальний транспорт PVX-REP. Таким образом, экспериментальная система на основе PVX-REP может быть использована для определения способности различных фрагментов РНК обеспечивать дальний транспорт по флоэме, который детектируется по появлению флуоресцентных локусов в верхних листьях, экспрессирующих ТБ ВТМ.

Флуоресцентная микроскопия показала, что локусы, образованные PVX-REP-FT (Рис. 2H), были подобны тем, что наблюдались при ко-инфильтрации неспособного к транспорту PVX-GFP в присутствии ТБ ВТМ (Lazareva et al., 2017). Интересно, что некоторые локусы PVX-REP-FT располагались в непосредственной близости от малых жилок листа, тогда как другие не показали четкой ассоциации с жилками.

Предположительно, молекула PVX-REP-FT, выгруженная из флоэмы в ткани, экспрессирующие ТБ ВТМ, может перемещаться из клетки в клетку без репликации, что дает возможность инициировать формирование флуоресцентного локуса в клетке, удаленной от малых жилок. В общем

случае, межклеточный транспорт вирусов растений сопряжен с репликацией вирусного генома (Heinlein, 2015; Tilsner et al., 2013) и, как полагают, только копии геномной РНК, являющиеся продуктами репликации, способны перемещаться из клетки в клетку (Christensen et al., 2009).

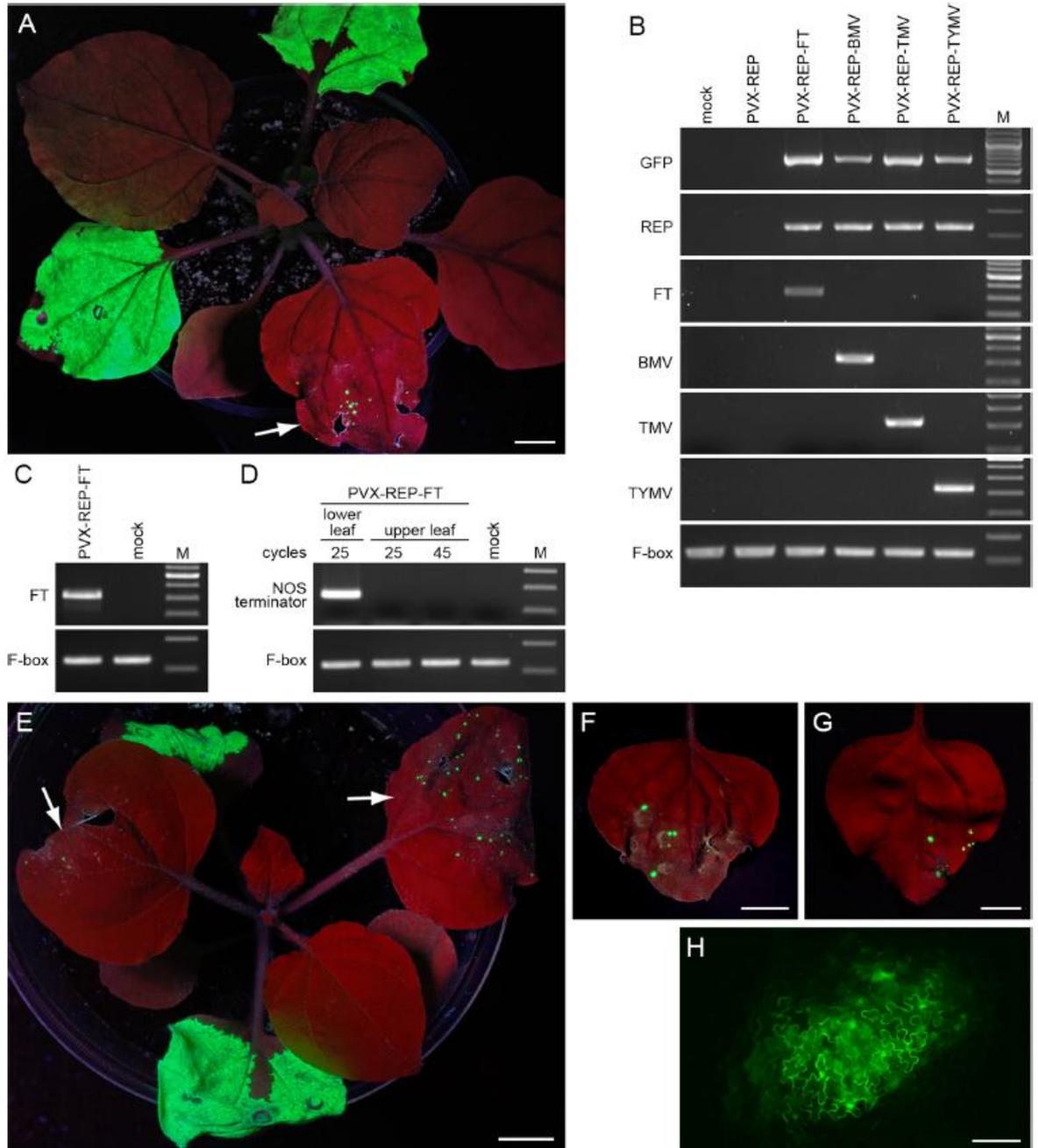


Рисунок 2. Дальний транспорт PVX-REP, опосредованный вирусными ТПС. (А) Дальний транспорт PVX-REP по флоэме может быть активирован фрагментом последовательности FT. Под воздействием длинноволнового УФ-света листья растений *N. benthamiana*, агроинфильтрированные PVX-REP-FT, демонстрируют яркую флуоресценцию. Верхний лист, агроинфильтрированный ТБ ВТМ (показан белой стрелкой), обнаруживает флуоресцентные локусы. Примечание: верхние листья, экспрессирующие ТБ ВТМ в этом и других экспериментах, обычно повреждаются во время процедуры агроинфильтрации,

поскольку их листовая пластинка намного меньше по размеру и более хрупкая, чем те, которые считаются подходящими для обычной агроинфильтрации. (B) ПЦР-анализ с обратной транскрипцией препаратов тотальной РНК из верхних листьев растений, экспрессирующих ТБ ВТМ, и агроинфильтрованные конструкциями PVX-REP, PVX-REP-FT, PVX-REP-BMV, PVX-REP-TMV и PVX-REP-TYMV, как указано выше. Слева указана специфичность используемых праймеров. Контрольные, неинфильтрованные растения; M, маркер размера ДНК. (C) Анализ растений, агроинфильтрованных PVX-REP-FT с помощью ПЦР с обратной транскрипцией с FT-специфическими праймерами, как указано слева, проведенное при 40 циклах амплификации на препаратах тотальной РНК из верхних листьев, которые не подвергались агроинфильтрации для экспрессии ТБ ВТМ и не имели видимых флуоресцентных локусов. Контрольное, неинфильтрованное растение; M, маркер размера ДНК. (D) Анализ растений, агроинфильтрованных конструкцией PVX-REP-FT, методом ПЦР с праймерами на терминатор NOS, как указано слева, проводился на препаратах ДНК из нижних листьев, подвергнутых агроинфильтрации PVX-REP-FT, и верхних листья, которые были подвергнуты агроинфильтрации для экспрессии ТБ ВТМ и демонстрировали флуоресцентные локусы. Количество циклов амплификации указано над гелем. Контрольное, неинфильтрованное растение; M, маркер размера ДНК. (E) Растение *N. benthamiana* с флуоресцентными очагами на листьях, экспрессирующих ТБ ВТМ (показано стрелками), в эксперименте с PVX-REP-BMV. (F, G) Флуоресцентные очаги на верхних листьях растений, экспрессирующих ТБ ВТМ, после агроинфильтрации с PVX-REP-TMV и конструкции PVX-REP-TYMV, соответственно. (H) Флуоресцентная микроскопия репрезентативного GFP-содержащего локуса, продуцируемого PVX-REP-FT в верхнем ТБ ВТМ-экспрессирующем листе. Масштабная линейка, 1 см в (A), (E), (F) и (G); 100 мкм в (H). В (B), (C) и (D) амплификацию мРНК F-бокс-белка использовали для подтверждения равных количеств РНК, взятой для анализа.

Репликация вируса, вероятно, является необходимой для направления потомства репликации по пути транспорта, например, способствуя образованию соответствующих РНК-содержащих компетентных для транспорта комплексов, которые, однажды сформировавшись, пересекают границы нескольких клеток без разборки. Такой транспорт вируса может наблюдаться в определенных условиях для ХВК, кодирующего GUS (Morozov et al., 1997). Таким образом, мы предполагаем, что транспортные комплексы, содержащие РНК PVX-REP-FT, могут образовываться ко-репликационно в нижних агроинфильтрованных листьях и их дальнейший транспорт, как по флоэме, так и после выхода из флоэмы в верхних листьях, может происходить без разборки транспортного комплекса.

Вирусные 3'-НТО, содержащие тРНК-подобные структуры, направляют дальний транспорт PVX-REP

Поскольку транспорт РНК3 вируса мозаики костра (ВМК) по флоэме в отсутствие репликации вируса зависит от его нетранслируемых областей (Gopinath, Као, 2007) и, с другой стороны, последовательность тРНК, вставленная в гетерологичную мРНК, может обеспечивать ее дальний транспорт (Zhang et al., 2016), мы предположили, что тРНК-подобная структура (ТПС), расположенная в 3'-НТО РНК3 ВМК, может быть ответственна за ее системный транспорт. Чтобы проанализировать эту возможность, последовательность 3'-НТО РНК3 ВМК была клонирована в СМК конструкции PVX-REP с получением PVX-REP-BMV (Рис. 1). Кроме того, мы исследовали, действительно ли валин-акцептирующая тРНК-подобная структура вируса желтой мозаики турнепса (ВЖМТ) и гистидин-акцептирующая тРНК-подобная структура ВТМ, которые структурно не похожи друг на друга и тирозин-акцептирующую тРНК-подобную структуру ВМК (Dreher, 2010), могут направлять дальний транспорт по флоэме. С этой целью были получены две дополнительные конструкции на основе PVX-REP: PVX-REP-TMV, несущая тРНК-подобную структуру 3'-НТО РНК ВТМ, и PVX-REP-TYMV, несущая РНК-подобную структуру ВЖМТ (Рис. 1). PVX-REP-BMV, PVX-REP-TMV и PVX-REP-TYMV использовались для агроинфильтрации нижних листьев растений *N. benthamiana* параллельно с PVX-REP-FT и PVX-REP, взятыми в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Верхние листья этих растений агроинфильтрировали конструкцией ТБ ВТМ. Растения исследовали в УФ-свете на четвертый день после инфильтрации. Эксперимент повторяли три раза. Было обнаружено, что всего 66,7% PVX-REP-BMV-агроинфильтрованных растений (N=24), 62,5% PVX-REP-TMV-агроинфильтрованных растений (N=24) и 54,2% PVX-REP-TYMV-агроинфильтрованных растений (N=24) демонстрировали флуоресцентные локусы на верхних листьях, экспрессирующих ТБ ВТМ (Рис. 2E – G). Как и

раньше, в контрольных растениях, агроинфильтрованных PVX-REP, таких локусов обнаружено не было (N=16), тогда как 10 из 16 растений, агроинфильтрованных конструкцией PVX-REP-FT, демонстрировали GFP-содержащие локусы на листьях, агроинфильтрованных ТБ ВТМ. Специфичность наблюдаемых локусов инфекции была подтверждена анализом препаратов тотальной РНК из листьев, экспрессирующих ТБ ВТМ, с помощью ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными для тРНК-подобных последовательностей ВМК, ВЖМТ и ВТМ (Рис. 2В). Специфические продукты ожидаемого размера наблюдались в образцах растений, агроинфильтрованных PVX-REP-BMV, PVX-REP-TMV и PVX-REP-TYMV, но не в агроинфильтрованных с PVX-REP-FT или PVX-REP (Рис. 2В). Таким образом, все три вирусных ТПП, протестированные в этом исследовании, были способны направлять дальний транспорт гетерологичной РНК PVX-REP.

Предполагается, что мобильные РНК транспортируются по флоэме в комплексе с белками, селективно взаимодействующими с сигнальными последовательностями в структуре молекул РНК (Saplaoura, Kragler, 2016). Таким образом, можно предположить, что гипотетический белок(и), ответственный за транспорт тРНК и тРНК-подобных структур, распознает структурный элемент общий для этих РНК. Однако тРНК и тРНК-подобные структуры не имеют общих элементов нуклеотидной последовательности и, кроме того, ТПС трех известных типов также несходны по последовательности. Следовательно, можно предположить, что сигналами, направляющими системный транспорт РНК, могут быть не какие-либо последовательности нуклеотидных остатков в ТПС, а элементы вторичной и третичной структуры. Поскольку, как отмечалось ранее, сложно идентифицировать общие вторичные структуры для тРНК и ТПС (Dreher, 2010), мы предполагаем, что элемент, который узнается белком/белками в ТПС, может представлять собой трехмерный мотив РНК, функционально сходный со структурным мотивом вириона веретеновидного клубня

картофеля, ответственным за его перенос из палисадного мезофилла в губчатый мезофилл листа *N. benthamiana* (Takeda et al., 2011).

Непроцессированная пре-миРНК390 может направлять дальний транспорт PVX-REP

Ранее было показано, что белок *Nicotiana tabacum* NtPBL, который имеет сродство к несовершенным дуплексам РНК, может взаимодействовать с тРНК и предшественниками микро-РНК растений (пре-миРНК) (Atabekova et al., 2017). Это наблюдение может означать, что тРНК и пре-миРНК имеют общие структурные элементы, распознаваемые РНК-связывающими белками. Поэтому нами была поставлена задача определить, может ли пре-миРНК, подобно вирусным ГПС, опосредовать системный транспорт РНК. В этих экспериментах использовалась пре-миРНК390b *A. thaliana*, которая, как было показано, эффективно связывается белком NtPBL *in vitro* (Atabekova et al., 2017).

Поскольку пре-миРНК процессируются DCL1, чтобы дать начало зрелым миРНК, мы сначала проанализировали относительное накопление двух разных производных пре-миРНК390. Для этих экспериментов последовательность *A. thaliana* пре-миРНК390b, содержащая шпилечную структуру пре-миРНК и фланкирующие 200-нуклеотидные области, была клонирована в составе бинарного вектора под контролем 35S промотора, чтобы получить конструкцию рЛН-390L (Рис. 3А). Дополнительно была получена конструкция рЛН-390S, которая несла пре-миРНК390b без фланкирующих областей в аналогичном бинарном векторе (Рис. 3А). Листья *N. benthamiana* подвергали агроинfiltrации конструкциями рЛН-390L или рЛН-390S. Уровни обоих транскриптов были проанализированы с помощью обратной транскрипции и полуколичественной ПЦР с пре-миРНК390b-специфическими праймерами на третий день после infiltration. В экспериментах, повторенных несколько раз, более высокие уровни пре-миРНК390b постоянно выявлялись для рЛН-390S по сравнению с рЛН-390L

(Рис. 3В). Анализ ПЦР в реальном времени выявил статистически значимое различие в 2,35 раза в уровне накопления пре-миРНК390b в образцах листьев, агроинфильтрованных рЛН-390S и конструкции рЛН-390L (Рис. 3С). Эти наблюдения показали, что одна или обе области, фланкирующие последовательность пре-миРНК390b, могут содержать *cis*-элементы, участвующие в процессинге первичного транскрипта миРНК. В контексте данной работы менее эффективный процессинг транскрипта рЛН-390S в сравнении с транскриптом рЛН-390L мог быть полезен для анализа способности пре-миРНК опосредовать дальний транспорт РНК по флоэме. Поэтому последовательность пре-миРНК390b была субклонирована из рЛН-390S в PVX-REP с получением конструкции PVX-REP-390S (Рис. 1).

Дополнительно, чтобы исключить возможность того, что любая гетерологичная последовательность, вставленная в СМК конструкции PVX-REP, может делать ее компетентной для транспорта, мы получили две контрольные конструкции на основе PVX-REP, несущие 3'-НТО мРНК актина-1 и большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы *A. thaliana*, названные PVX-REP-Act и PVX-REP-Rub, соответственно (Рис. 1). Конструкции PVX-REP-390S, PVX-REP-Rub и PVX-REP-Act были использованы для агроинфильтрации нижних листьев растений *N. benthamiana* вместе с конструкциями PVX-REP и PVX-REP-FT, используемыми в качестве контролей. Верхние листья этих растений были агроинфильтрованы конструкцией ТБ ВТМ. На четвертый день после инфильтрации нижние листья, инфильтрованные конструкциями на основе PVX-REP, проявляли яркую флуоресценцию GFP во всех растениях, причем флуоресценция в листьях, инфильтрованных PVX-REP-390S, была сопоставима с флуоресценцией для других конструкций (Рис. 3D), что указывает на то, что пре-миРНК390S не подвергается полному процессингу в контексте PVX-REP. В верхних листьях, инфильтрованных ТБ ВТМ, наблюдались флуоресцентные локусы в случае растений, инфильтрованных PVX-REP-FT и PVX-REP-390S (Рис. 3D), но не в случае растений, которые

были инфильтрованы конструкциями PVX-REP, PVX-REP-Rub и PVX-REP-Act.

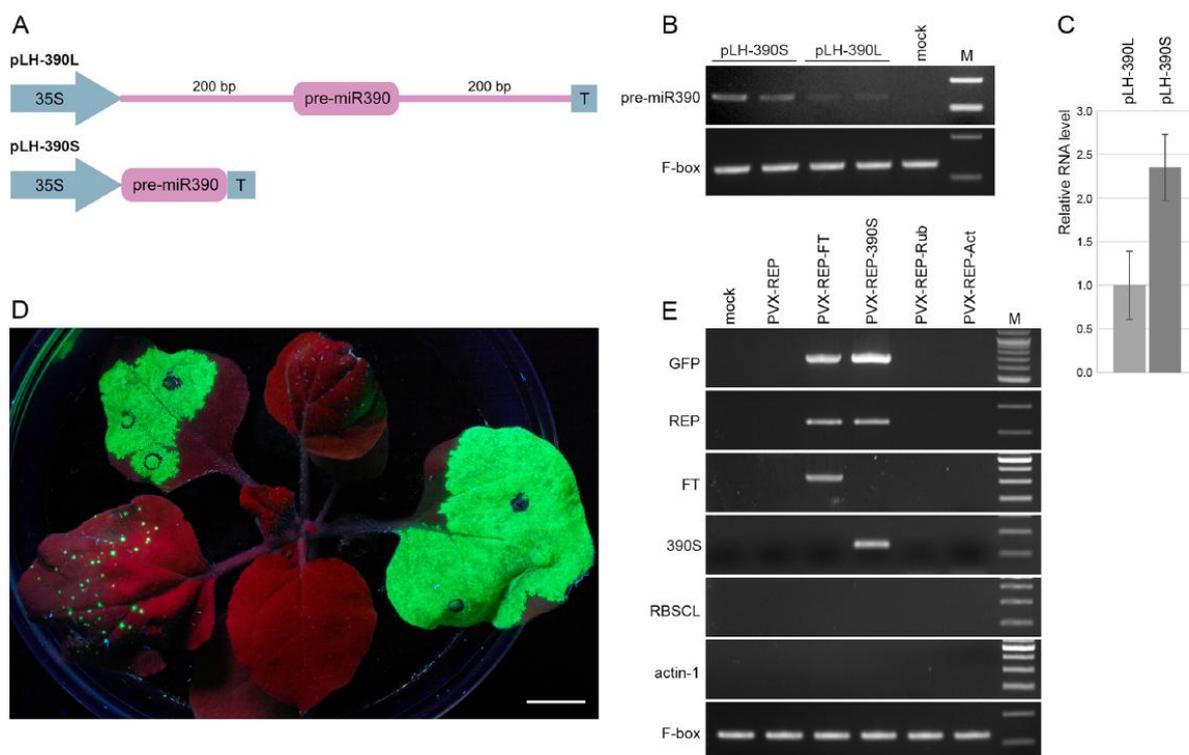


Рисунок 3. Флоэмный транспорт PVX-REP может направляться пре-миРНК390b. (А) Конструкции бинарных векторов, используемые для анализа относительного накопления двух различных миРНК390b-специфических транскриптов. В конструкции рLH-390L пре-миРНК390b фланкирована нативными последовательностями длиной 200 нт. 35S, 35S промотор СаMV; T, терминатор транскрипции. (В) Анализ накопления пре-миРНК390b с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР образцов РНК из листьев *N. benthamiana*, агроинфильтрованных конструкциями рLH-390S и рLH-390L. Показан типичный гель. Контроль, неинфильтрованные растения; М, маркер размера ДНК. (С) Количественная оценка уровней пре-миРНК390b методом ПЦР в реальном времени в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрованных конструкциями рLH-390S и рLH-390 L. Уровень пре-миРНК390b для рLH-390 L принят за 1. Показано стандартное отклонение (N = 5). Разница между рLH-390S и рLH-390 L является статистически значимой согласно t-критерию Стьюдента (P < 0,01). (D) Растение *N. benthamiana*, демонстрирующее яркую флуоресценцию в нижних листьях, подвергнутых агроинфильтрации PVX-REP-390S, и флуоресцентные локусы верхнем листе, агроинфильтрированным ТБ BTM. Масштабная линейка, 1 см. (E) Анализ препаратов тотальной РНК из верхней листьев, экспрессирующих ТБ BTM, растений агроинфильтрированных конструкциями PVX-REP, PVX-REP-FT, PVX-REP-390S, PVX-REP-Rub и PVX-REP-Act, с помощью ОТ-ПЦР. Специфичность использованных праймеров указана слева. Mock, контрольные неинфильтрованные растения; М, маркер размера ДНК. В (В) и (E) амплификацию мРНК F-бокс-белка использовали, чтобы подтвердить, что для анализа взяты равные количества РНК.

В трех повторностях этого эксперимента флуоресцентные локусы были обнаружены в 66,7% растений агроинфильтрованных PVX-REP-390S (N=24), и никогда не детектировались в растениях, агроинфильтрованных PVX-REP-Rub- и PVX-REP-Act (N=24 для каждой конструкции). Анализ препаратов РНК из верхних листьев с помощью ОТ-ПЦР с парами праймеров, специфичных к последовательностям FT, пре-миРНК390, актину-1 и рубиско, клонированным в составе PVX-REP, подтвердили специфичность локусов, наблюдаемых для PVX-REP-FT и PVX-REP-390S, и отсутствие транспорта для PVX-REP-Rub и PVX-REP-Act (Рис. 3E). Таким образом, эти данные демонстрируют, что непроцессированная пре-миРНК390b может направлять системный транспорт РНК в растениях *N. benthamiana*, тогда как 3'-НТО актина-1 и мРНК рубиско не могут сделать транскрипт PVX-REP компетентным для транспорта.

Полученные данные подразумевают, что предшественник миРНК390b способен транспортироваться по флоэме, и можно было предположить, что непроцессированный транскрипт миРНК390b присутствует во флоэме *S. maxima*. Это предположение было проверено с помощью анализа данных секвенирования нового поколения. Следует отметить, что предыдущие поиски последовательностей миРНК в образцах флоэмы были ограничены анализом фракции коротких РНК, направленным на обнаружение зрелых миРНК (Kehr, Kragler, 2018), тогда как транскриптомные данные, полученные для длинных флоэмных РНК, не анализировались на наличие непроцессированных предшественников миРНК. Поэтому мы использовали доступную библиотеку чтений (NCBI Sequence Read Archive accession SRX146322), ранее полученную секвенированием нового поколения длинных РНК, выделенных из флоэмного экссудата *Cucurbita maxima*, чтобы определить, содержат ли эти первичные данные последовательности, соответствующие миРНК390. Было обнаружено 109 чтений, включающих последовательность зрелой миРНК390 или комплементарную ей последовательность. Среди этих чтений 68 последовательностей, которые

образовали «группу 1», могли быть выровнены друг с другом и с пре-миРНК390а *Cucumis melo*, единственного вида *Cucurbitaceae* с аннотированными пре-миРНК, тогда как 41 последовательность, образовавшая «группу 2», соответствовала пре-миРНК390б *C. melo* (Рис. 4А). Предсказания вторичной структуры показали, что последовательности групп 1 и 2 могут образовывать несовершенные шпилечные структуры, типичные для предшественников миРНК390 (Рис. 4В). Таким образом, данные анализа флоэмного транскрипта подтверждают присутствие предшественников миРНК390 в СЭ флоэмы *C. maxima*.

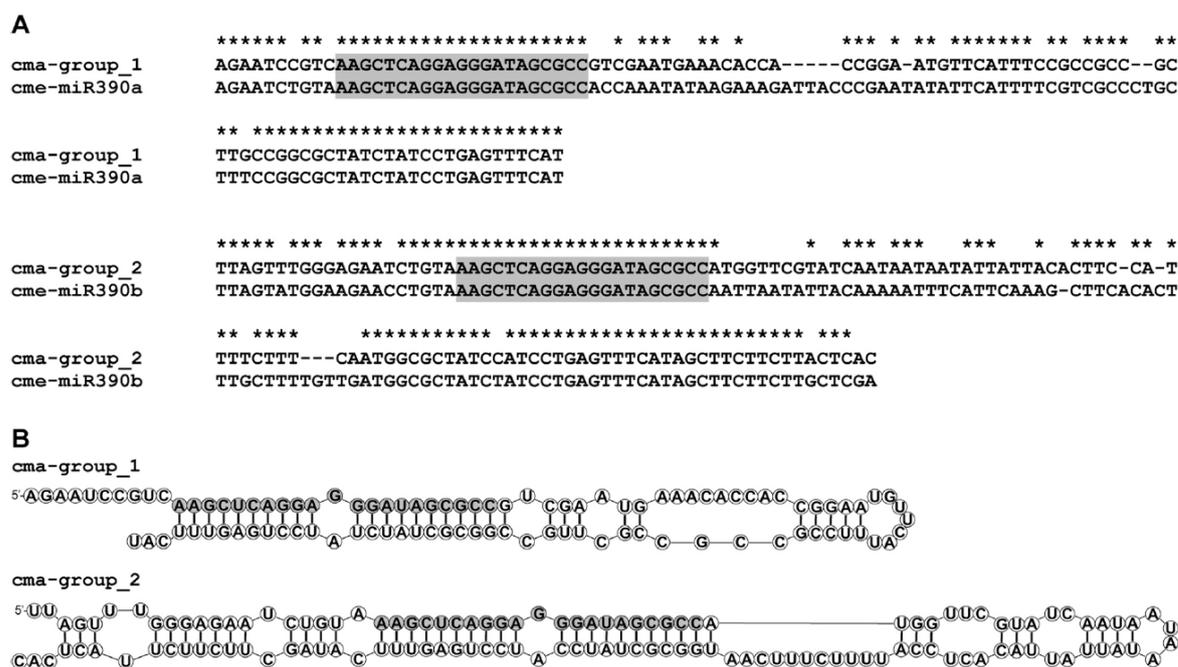


Рисунок 4. Анализ транскриптомных последовательностей флоэмного экссудата *Cucurbita maxima*, содержащих совпадения с миРНК390. (А) Консенсусные последовательности для двух групп идентифицированных чтений (cma-group_1 и cma-group_2) были выровнены с пре-миРНК390а и пре-миРНК390б *Cucumis melo*, соответственно. Последовательность зрелой миРНК390 показана на сером фоне. Идентичные остатки отмечены звездочками. (В) Вторичные структуры РНК, предсказанные для cma-group_1 (-40,6 ккал / моль) и cma-group_2 (-50,2 ккал / моль). Последовательность зрелой миРНК390 показана серыми кружками.

Чтобы оценить значимость и достоверность полученных данных, мы проанализировали первичные данные секвенирования флоэмного транскрипта *C. maxima*, чтобы оценить представленность чтений, соответствующих мРНК ТСТР, которая, как известно, является мобильной

(Thieme et al., 2015; Toscano-Morales et al., 2014), а также мРНК актина-1 и большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (рубиско), предположительно неспособных к транспорту по флоэме. Сравнение числа чтений, нормализованное на 100 нуклеотидов анализируемых РНК, выявили высокое содержание мРНК ТСТР (22708 чтений), весьма низкую представленность мРНК актина-1 и большой субъединицы рубиско (11 и 10 чтений соответственно) и 89 чтений для пре-миРНК390. мРНК актина-1 и рубиско представлены в растительной клетке на высоком уровне, тогда как первичные транскрипты миРНК390 изначально продуцируются на более низком уровне по сравнению с мРНК актина-1 и рубиско и подвергается дальнейшему процессингу, что приводит к очень низкому содержанию непроецированных молекул при-миРНК390. Таким образом, наблюдаемые 8-9-кратное превышение уровня непроецированных предшественников миРНК390 над мРНК актина-1 и рубиско в транскриптом флоэмы могут указывать на то, что при-миРНК390 может избирательно вовлекаться в путь транспорта по флоэме.

Идентификация предшественников миРНК в данных транскриптомного анализа флоэмы *Cucurbita maxima*

Для того, чтобы определить присутствуют ли во флоэме, помимо предшественников миРНК390, предшественники других миРНК, был проведен более детальный, систематический анализ библиотеки первичных чтений, полученной путем секвенирования нового поколения фракции длинных РНК флоэмного экссудата *C. maxima* (NCBI Sequence Read Archive Accession SRX146322) . На первом этапе первичные чтения были собраны в транскриптом флоэмы (Рис. 5). В качестве контроля на основе библиотеки первичных чтений РНК мезофилла листа *C. maxima* (SRX4058941) был собран транскриптом листьев. Чтобы идентифицировать в полученных транскриптомах контиги, содержащие последовательности пре-миРНК, мы провели поиск с использованием последовательностей 120 пре-миРНК *C.*

melo в качестве запросов для BLAST. Использование для поиска пре-миРНК *C. melo* было обусловлено тем, что пре-миРНК *C. maxima* не аннотированы, тогда как *C. melo*, как отмечалось выше, является в настоящий момент единственным видом семейства *Cucurbitaceae* с аннотированными пре-миРНК. Результаты поисковых запросов BLAST были отфильтрованы для выбора последовательностей *C. maxima*, которые можно было достоверно определить как пре-миРНК. В результате только контиги, дающие локальное выравнивание с последовательностями пре-миРНК *C. melo* с ожидаемыми значениями (e) менее $1E-15$, были выбраны для дальнейшего анализа. В результате были идентифицированы 35 и 57 кандидатных последовательности при-миРНК в транскриптомных контигах флоэмы и листа, соответственно (Рис. 5) Чтобы выявить пре-миРНК, наиболее представленные во флоэме, мы дополнительно проанализировали первичные транскриптомные данные для отобранных кандидатных при-миРНК. Представленность данного контига в транскриптоме обычно характеризуется значением «среднего покрытия» (average coverage, AC), то есть средним



Рисунок 5. Процесс транскриптомного анализа. Цифры в овалах указывают количество последовательностей в каждом шаге анализа.

количеств первичных чтений на один нуклеотид в контиге. Чтобы определить, отражает ли высокое значение АС высокую представленность чтений, охватывающих области пре-миРНК, контиги транскриптомов флоэмы и листа с самыми высокими значениями АС были проанализированы более детально. Первичные чтения были выровнены с транскриптомными контигами кандидатных при-миРНК, и были получены графики глубины прочтения, которые отображают количество чтений, перекрывающих каждую позицию контига. Было обнаружено высокое покрытие чтениями областей пре-миРНК в трех контигах флоэмы с наибольшим значения АС (P21134, P19669 и P10713) и в одном контиге листа (L16156) (Рис. 6), тогда как в контигах листьев L5508 и L11031 пики глубины прочтения располагались далеко от регионов пре-миРНК, которые имели ограниченное покрытие. Дальнейший анализ показал, что пики покрытия в этих двух контигах соответствуют областям, кодирующим белки (Рис. 6). Было обнаружено, что открытая рамка считывания (ОРТ) в контиге L11031 кодирует аннотированный 17,8-кДа белок теплового шока класса I (XP_022978137) *S. maxima*, тогда как ОРТ, обнаруженная в контиге L5508, расположена в цепи, противоположной пре-миРНК, и кодировала неохарактеризованный белок *S. maxima* (XP_022987876), несущий VOC-домен. Сравнение с соответствующей геномной последовательности *S. maxima* показала, что контиг L5508 соответствует одному геномному локусу и содержит четыре сайта соединения экзонов в полярности мРНК, содержащей VOC ОРТ. (Рис. 6). Следовательно, наиболее вероятно, что объединение последовательностей пре-миРНК и белок-кодирующих последовательностей в контигах L5508 и L11031 произошло в результате неточности сборки транскриптома *de novo* (Cerveau, Jackson, 2016). Контиг L5508 содержал последовательности двух РНК противоположной полярности, кодируемые соседними генами *S. maxima*, которые резко различались по уровню транскрипции в листе. Аналогично, контиг L11031, вероятно, содержал последовательности двух транскриптов с разными

уровнями экспрессии. Можно заключить, что как в контиге L5508, так и в контиге L11031 значения AC не отражали представленность последовательностей соответствующих пре-миРНК в транскриптом. Мы пришли к выводу, что в целом параметр AC не может быть использован для идентификации наиболее представленных при-миРНК. Чтобы охарактеризовать представленность последовательностей пре-миРНК в транскриптомах более адекватным образом, мы ввели значение «локального покрытия» (local coverage, LC), определяемое как количество чтений, покрывающих центральный нуклеотид зрелой миРНК в данном пре-миРНК-содержащем контиге.

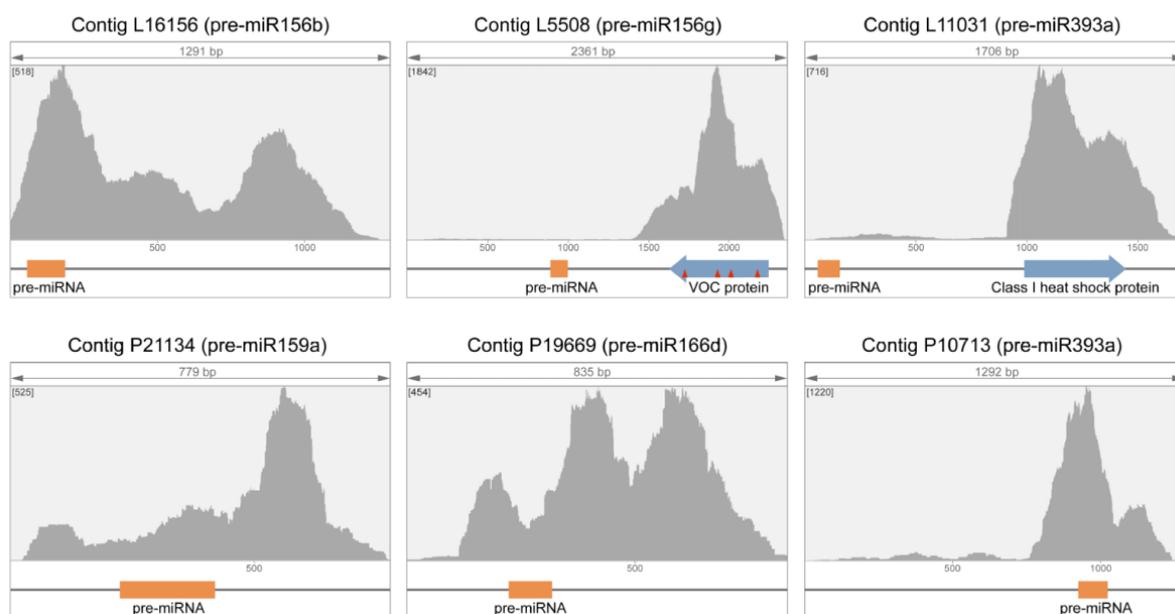


Рисунок 6. Анализ распределения первичных чтений в контигах с наивысшим значением среднего покрытия (AC) в транскриптомах листа и флоэмы. В представленных графиках количество чтений, перекрывающих каждую позицию контига (ось Y), отложено в зависимости от положения в контиге (ось X). Области пре-миРНК показаны оранжевыми прямоугольниками, ОРТ показаны синими стрелками. Точки сплайсинга (соединения экзон-экзон), выявленные при сравнении с соответствующими геномными последовательностями, обозначены красными треугольниками. Максимальное значение покрытия для каждого графика указано в квадратных скобках.

Таблица 2. Относительное количество пре-миРНК-содержащих последовательностей в транскриптах листа и флоэмы *Cucurbita maxima*

pre-miRNA	Сходство с pre-miRNA <i>C.melo</i>		Контиги листа				Контиги флоэмы			
	длина	e-value	название	длина	АС	LC	название	длина	АС	LC
miR156b	45	1E-15	L16156	1300	108.4	268	нет соответствия			
miR156c	103	3E-40	L1898	3420	23.1	73	нет соответствия			
miR156e	93	2E-23	L16749	1261	11.2	48	нет соответствия			
miR156i	121	4E-22	L20685	1010	8.3	31	нет соответствия			
miR159a	209	2E-65	L24286	804	14.7	23	P21134	784	72.9	148
miR166d	120	1E-25	L28720	589	1.8	4	P19669	841	98.0	162
miR166e	287	3E-32	L23584	842	7.2	19	L31502	479	20.7	41
miR167b	98	7E-35	L25833	721	23.9	52	нет соответствия			
miR167e	107	9E-22	L25150	758	74.8	275	нет соответствия			
miR168	218	2E-52	L23344	856	12.5	46	P7902	1508	10.9	56
miR169f	102	3E-26	L31431	494	28.8	82	нет соответствия			
miR171i1	187	8E-43	L9649	1849	6.0	11	P3867	1986	48.0	133
miR171i2	192	2E-26	L8895	1930	24.7	31	P5314	1784	11.3	23
miR319a	188	2E-70	нет соответствия				P20012	828	42.9	53
miR319d	192	1E-53	нет соответствия				P20793	797	20.8	36
miR390a	116	5E-24	нет соответствия				P37982	364	26.7	111
miR390b	135	3E-21	нет соответствия				P38121	362	18.9	49
miR393a	113	9E-28	L11031	1718	80.8	5	P10713	1292	102.9	1042
miR396b1	149	5E-32	L19994	1055	16.8	50	P29987	513	22.8	61
miR396b2	150	2E-18	L21853	939	14.7	66	нет соответствия			

АС, среднее покрытие; LC, локальное покрытие. Серым цветом отмечены отобранные в результате фильтрации контиги, несущие последовательности, в высокой степени сходные с пре-миРНК *C. melo* (e-значение <1E-15) и имеющие высокое значение LC (LC>30); их аналоги в транскриптах флоэмы или листа (не отмечены серым) показаны для сравнения; No match (нет совпадений) означает, что данная последовательность не обнаруживается во флоэме или транскрипте листа. Последовательности с индексами 1 и 2 в названиях миРНК соответствуют разным геномным локусам *C. maxima*.

В результате всех этапов фильтрации были отобраны 11 контигов с хорошо представленными последовательностями пре-миРНК для транскрипта флоэмы и 11 таких контигов - для транскрипта листа. Эти два набора имели два общих контига (Таблица 1), что позволяет предположить, что транскриптом флоэмы содержит специфический набор пре-миРНК. Следует также заметить, что среди 11 пре-миРНК,

обнаруженных во флоэме в результате анализа транскриптома, присутствуют пре-миРНК390а и пре-миРНК390б.

В последние десятилетия обсуждалось, могут ли (и в какой степени) препараты экссудата флоэмы, которые, как предполагается, представляют собой содержащее СЭ, быть загрязненными макромолекулами из других клеток и тканей из-за применения деструктивных методов, используемых для получения флоэмного экссудата (Atkins et al., 2011; Schulz, 2017). Идентификация различных наборов наиболее представленных при-миРНК в транскриптомах флоэмы и листа показала, что присутствие при-миРНК в экссудате флоэмы едва ли является результатом контаминации при-миРНК из листьев. Этот вывод был дополнительно подтвержден анализом относительного количества мРНК в транскриптомах флоэмы и листа. Например, количество чтений, соответствующих мРНК малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы, предположительно неспособной к транспорту по флоэме, оказалось равным 2031410 и 18233 для транскриптома листа и флоэмы, соответственно, тогда как количество чтений, соответствующих мРНК ТСТР (XM_023119399), способной к транспорту (Thieme et al., 2015; Toscano-Morales et al., 2014), не показала столь резких различий между транскриптомами листа и флоэмы (56579 и 201834 чтений). Следовательно, наличие определенной РНК в транскриптоме флоэмы не коррелировало с ее уровнем в листе.

Следует отметить, что количество при-миРНК во флоэме было значительно ниже, чем мРНК ТСТР. Для двух наиболее представленных при-миРНК флоэмы, при-миРНК166d и при-миРНК393а (Таблица 1), количество чтений, нормализованные на 100 нуклеотидов, составили 213,4 и 214,9, соответственно, тогда как для мРНК ТСТР это значение было примерно в 100 раз выше (22729,1). Можно предположить, что наблюдаемое относительно низкое количество последовательностей при-миРНК объясняется регуляторной, а не структурной функцией миРНК.

Таким образом, данные анализа флоэмного транскриптома показывают, что СЭ флоэмы содержат специфический набор предшественников миРНК.

Детекция предшественников миРНК во флоэмном экссудате *C. maxima* и анализ их способности к системному транспорту

Чтобы экспериментально проверить данные анализа транскриптомов, была проведена детекция при-миРНК в препаратах РНК из флоэмного экссудата. В качестве контроля РНК выделяли из образцов листьев *C. maxima*, взятых из участков листовых пластинок, не включавших основные жилки. В этих экспериментах были проанализированы три при-миРНК со сходной представленностью, а именно при-миРНК319а, которая присутствует, согласно анализу транскриптома, во флоэме, но не в листьях, при-миРНК167b, обнаруженная в листьях, но не во флоэме и при-миРНК396b1 идентифицированная как в транскриптомах листа, так и во флоэме (Таблица 1). Обратная транскрипция и ПЦР со специфическими праймерами показала, что для при-миРНК319а и при-миРНК96b1 продукты ожидаемого размера могут быть обнаружены во флоэме, тогда как при-миРНК167b и при-миРНК396b1 - в РНК листа (Рис. 7А), подтверждая, таким образом, данные анализа транскриптома. Следует отметить, что дифференциальное обнаружение при-миРНК319а и при-миРНК167b подтвердило, что образцы не были перекрестно загрязнены, и что специфическое накопление некоторых при-миРНК, таких как при-миРНК319а, во флоэме не было результатом их высокого содержания в тканях листа. Таким образом, исходя из транскриптомных данных и экспериментального обнаружения при-миРНК, можно сделать вывод о том, что некоторые при-миРНК *C. maxima* избирательно накапливаются во флоэме.

Чтобы определить, могут ли при-миРНК транспортироваться на дальние расстояния по флоэме, был использован метод межвидовых прививок. Была сделана прививка привоя *C. melo* на подвой *C. maxima*. Через

двадцать дней после прививки препараты флоэмного экссудата получали отдельно для привоя и подвоя привитых растений, а также из контрольных непривитых растений *C. melo*. РНК из этих образцов была проанализирована обратной транскрипцией и ПЦР с праймерами, специфичными для при-миРНК319а *C. maxima*, которая детектировалась флоэмном экссудате *C. maxima* (Рис. 7А). В качестве положительного контроля при анализе транспорта РНК из подвоя в привой использовалась способная к транспорту мРНК ТСТР *C. maxima*, которая также была обнаружена флоэмном экссудате *C. maxima* (Рис. 7В). Для детекции миРНК319а *C. maxima*, использовали пару праймеров, которые соответствовали последовательности *C. maxima* и не могли давать продукт амплификации на миРНК319а *C. melo*. Аналогичным образом, праймеры для детекции ТСТР были специфичны по отношению к соответствующей последовательности *C. maxima*, но не *C. melo*. С использованием праймеров, специфичных для ТСТР *C. maxima*, продукты ПЦР ожидаемого размера были получены для РНК флоэмного экссудата подвоя и привоя, но не для контрольных непривитых растений *C. melo* (Рис. 7С). Секвенирование продуктов ПЦР, полученных для подвоя и привоя, показало, что их последовательности соответствовали мРНК ТСТР *C. maxima*. Эти данные говорят о том, что в анализируемая мРНК ТСТР транспортировалась из подвоя *C. maxima* в привой *C. melo*, как ранее было обнаружено для мРНК ТСТР в экспериментах по прививкам с участием других видов растений (Thieme et al., 2015; Toscano-Morales et al., 2014). Когда амплификацию проводили с праймерами, специфичными для при-миРНК319а *C. maxima*, ПЦР продукты ожидаемого размера (276 п.н.) были обнаружены для образцов РНК как подвоя *C. maxima*, так и привоя *C. melo*, но не в образцах РНК *C. melo* (Рис. 7С).

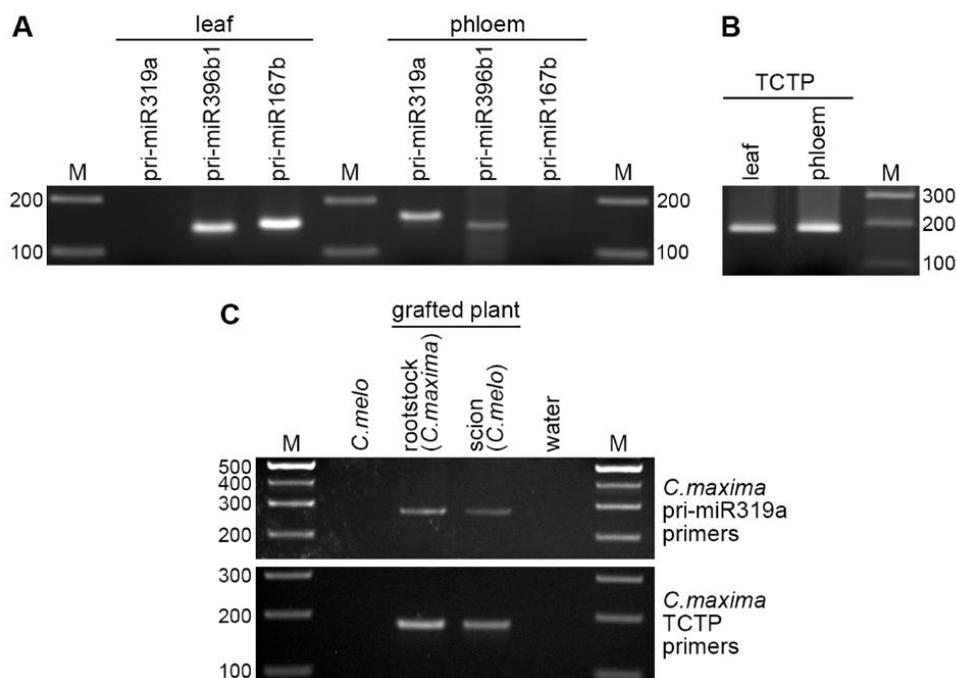


Рисунок 7. Обнаружение при-миРНК во флоэме.

Обнаружение при-миРНК (А) и мРНК ТСТР (В) в препаратах РНК из экссудата флоэмы и образцов листьев. Обратную транскрипцию проводили с олиго-dТ в качестве праймера; Последовательности при-миРНК и мРНК ТСТР были амплифицированы с парами специфических праймеров. (С) Обнаружение транспорта при-миРНК 319а через место соединения привоя и подвоя. Обратная транскрипция была проведена с oligo-dТ в качестве праймера. ТСТР и при-миРНК319а амплифицировали со специфическими праймерами, предназначенными для отжига с соответствующими последовательностями *C. maxima*, но не *C. melo*. Размеры при-миРНК319а-специфических продуктов в А и С составляют 162 п.н. и 276 п.н. соответственно, так как эти продукты были получены с разными парами специфических праймеров. Вода - контрольный образец без РНК. М - маркер размера ДНК; длины отдельных фрагментов ДНК указаны в н.п.

Анализ последовательности подтвердил, что оба продукта амплификации соответствуют при-миРНК319а *C. maxima*, а не *C. melo*. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что при-миРНК319а может транспортироваться из подвоя в привой через флоэму. Следует подчеркнуть, что наличие специфической для подвоя при-миРНК в экссудате флоэмы привоя не могло быть результатом загрязнения препарата экссудата привоя РНК из окружающих тканей и может быть только результатом переноса на дальние расстояния молекул при-миРНК, содержащихся во флоэме подвоя. Таким образом, наблюдаемый перенос при-миРНК319а от подвоя к привою подтверждает, что обнаружение этой конкретной при-миРНК в препаратах экссудата флоэмы биоинформатическим путем и ПЦР-

анализом действительно отражает ее присутствие в ситовидных элементах флоэмы, что свидетельствует о достоверности и других данных, полученных этими методами.

Можно предложить две модели попадания при-миРНК в СЭ флоэмы. Во-первых, поскольку предельная пропускная способность плазмодесм, связывающих СЭ и КС, значительно выше по сравнению с плазмодесмами других типов клеток (Lee, Frank, 2018; Oparka, Santa Cruz, 2000), и в силу этого предполагается неспецифический выход белков из КС в СЭ (Paultre et al., 2016), РНК, синтезированные в КС, также могут попадать в СЭ и, следовательно, вход в элементы флоэмы определенных при-миРНК может быть результатом их экспрессии в КС. Эта модель предполагает, что загрузка при-миРНК в СЭ является неспецифическим процессом, независимым от структуры при-миРНК. Во-вторых, в соответствии с современными взглядами на системный транспорт РНК, при-миРНК может быть направлена по пути транслокации по флоэме с помощью своих структурных элементов, служащих специфическими сигналами транспорта по флоэме. Такие сигналы могут способствовать транслокации РНК через все типы плазмодесм, и поэтому КС-специфическая экспрессия может не быть необходимой для загрузки при-миРНК во флоэму. Для изучения этих двух возможностей необходимы дальнейшие эксперименты. В частности, при исследовании транспорта при-миРНК319а важно понять, связаны ли способность при-миРНК319а к транспорту и ее присутствие во образцах флоэмного экссудата, но не листьев, с КС-специфической экспрессией при-миРНК319а, и важны ли структурные элементы при-миРНК319а для ее транспорта. В любом случае, загрузка при-миРНК во флоэму является альтернативой процессингу при-миРНК и, предположительно, может зависеть от способности при-миРНК избегать процессинга и выходить из ядра в непроцессированном виде. Можно предположить, что существуют специфические РНК-связывающие белки, которые могут при взаимодействии с определенными сигналами в при-миРНК, чтобы (i) исключить их из пула молекул, которые

подвергаются процессингу, и (ii) направить их ядерный экспорт и дальнейшее движение по пути транспорта по флоэме.

Функциональное значение транспорта при-миРНК в настоящее время неясно. Чтобы служить передающей сигнал молекулой, при-миРНК должна быть преобразована в зрелую миРНК после доставки в клетки-мишени, что, в свою очередь, требует импорта при-миРНК в ядро, где в клетках растений процессинг пре-миРНК приводит к образованию зрелой миРНК (Bologna et al., 2018). Ядерный импорт РНК не является широко распространенным; однако задокументировано несколько примеров такого процесса. Например, малые ядерные РНК, ключевые компоненты сплайсосом, транспортируются в цитоплазму, образуя комплекс с рядом белков, которые затем импортируются обратно в ядро (Becker et al., 2019). Ядерно-цитоплазматический транспорт тРНК, как известно, является двунаправленным: в дополнение к обычному потоку тРНК из ядра в цитоплазму, цитоплазматическая тРНК импортируется обратно в ядро (Chatterjee et al., 2018). Мы предполагаем, что ядерный импорт при-миРНК может использовать один из путей, используемых другими клеточными РНК. С другой стороны, нельзя исключить, что системная передача сигналов в растениях с использованием при-миРНК может быть не связана с продукцией зрелой миРНК и ее функциями.

Потенциальной функцией при-миРНК, способных к транспорту, может быть способность регулировать процессы развития в дистальных органах с помощью регуляторных пептидов кодируемых этими при-миРНК.

В работе (Lauressergues et al., 2015) показано, что при-миРНК растений содержат короткие последовательности с открытыми рамками считывания, которые кодируют регуляторные пептиды. На матрице при-миРНК171b *Medicago truncatula* и при-миРНК165a *A. thaliana* синтезируются пептиды, miPEP171b и miPEP165a, которые усиливают накопление соответствующих им зрелых миРНК, что приводит к подавлению активности генов-мишеней, участвующих в развитии корней.

Подобный эффект пептидов, кодируемых при-миРНК, показан на модели при-миРНК858а *A. thaliana* кодирующей небольшой пептид - miPER858а, который регулирует экспрессию миРНК858а на уровне транскрипции и тем самым влияет на уровень экспрессии генов-мишеней, участвующих в пути синтеза фенилпропаноидов, что приводит к изменению уровня флавоноидов. (Sharma et al., 2020).

Заключение

Экспериментальные данные, представленные в данной работе, демонстрируют способность структурированных элементов РНК вирусных ТПС и пре-миРНК направлять системный транспорт РНК по сосудистой системе растений. Полученные данные указывают на ключевую роль элементов вторичной/третичной структуры в направлении молекул РНК по пути транспорта по флоэме, подтверждая данные, полученные при исследовании роли элементов структуры РНК вириоида в системном транспорте (Takeda et al., 2018). В настоящий момент не идентифицированы общие элементы структуры, способные направлять дальний транспорт РНК, и их выявление является одной из задач будущей экспериментальной работы. Кроме того, необходимы дальнейшие исследования для идентификации белков, взаимодействующих со структурными элементами РНК, направляющими их транспорт по флоэме.

Ранее было показано, что зрелые миРНК способны транспортироваться по флоэме в ответ на изменения условий окружающей среды, выполняя регуляторные функции (Kehr, Kragler, 2018). В данной работе, используя анализ данных транскриптома, нам впервые удалось показать, что флоэма *S.maxima* содержит ряд предшественников миРНК, и подтвердить эти данные анализом образцов флоэмного экссудата. В экспериментах по межвидовым прививкам прямо показан системный транспорт предшественников миРНК. Таким образом, представленные в настоящей работе данные позволяют предполагать возможность участия предшественников определенных миРНК в передаче системных сигналов по растению и открывают новую область исследований функций миРНК в растениях.

Выводы

1. На основе модифицированного генома X-вируса картофеля получена экспериментальная система, позволяющая тестировать способность структурных элементов различных РНК направлять системный транспорт РНК по флоэме.

2. С использованием полученной системы показано, что тРНК-подобные структуры, имеющиеся в 3'-нетранслируемых областях РНК-геномов ряда вирусов растений, содержат сигналы, которые могут обеспечивать системный транспорт вирусных РНК по флоэме.

3. Показано, что последовательность пре-миРНК390 является достаточной для обеспечения системного транспорта гетерологичной РНК.

4. С использованием биоинформатического анализа показано, что транскриптом флоэмного экссудата тыквы (*Cucurbita maxima*) содержит последовательности предшественников миРНК, набор которых является специфичным для флоэмы; эти данные подтверждены анализом образцов флоэмного экссудата.

5. Методом межвидовых прививок показано, что происходит системный транспорт при-миРНК319а *C. maxima* из подвоя в привой, что позволяет выдвинуть гипотезу о возможной роли предшественников миРНК в передаче сигналов по флоэме у растений.

Список литературы

1. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
2. Aoki K., Suzui N., Fujimaki S., Dohmae N., Yonekura-Sakakibara K., Fujiwara T., Hayashi H., Yamaya T., Sakakibara H. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins // *Plant Cell.* 2005. V. 17. № 6. P. 1801–1814.
3. Atabekova A.K., Pankratenko A. V., Makarova S.S., Lazareva E.A., Owens R.A., Solovyev A.G., Morozov S.Y. Phylogenetic and functional analyses of a plant protein related to human B-cell receptor-associated proteins // *Biochimie.* 2017. V. 132. P. 28–37.
4. Atkins C.A., Smith P.M.C., Rodriguez-Medina C. Macromolecules in phloem exudates-a review // *Protoplasma.* 2011. T. 248. № 1. C. 165–172.
5. Banerjee A.K., Chatterjee M., Yu Y., Suh S.G., Miller W.A., Hannapel D.J. Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway // *Plant Cell.* 2006. V. 18. № 12. P. 3443–3457.
6. Banerjee A.K., Lin T., Hannapel D.J. Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. № 4. P. 1831–1843.
7. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. V. 19. № 5. P. 455–477.
8. Barends S., Rudinger-Thirion J., Florentz C., Giegé R., Pleij C.W.A., Kraal B. tRNA-like structure regulates translation of Brome mosaic virus RNA // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 8. P. 4003–4010.
9. Becker D., Hirsch A.G., Bender L., Lingner T., Salinas G., Krebber H. Nuclear Pre-snRNA Export Is an Essential Quality Assurance Mechanism for Functional Spliceosomes // *Cell Rep.* 2019. V. 27. № 11. P. 3199- 3214.e3.

10. Bielewicz D., Kalak M., Kalyna M., Windels D., Barta A., Vazquez F., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A. Introns of plant pri-miRNAs enhance miRNA biogenesis // *EMBO Rep.* 2013. V. 14. № 7. P. 622–628.
11. Bol J.F. Replication of alfamo- and ilarviruses: role of the coat protein // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. V. 43. P. 39–62.
12. Bologna N.G., Iselin R., Abriata L.A., Sarazin A., Pumplin N., Jay F., Grentzinger T., Dal Peraro M., Voinnet O. Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway // *Mol. Cell.* 2018. V. 69. № 4. P. 709- 719.e5.
13. Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs // *Science (80-.).* 2008. V. 320. № 5880. P. 1185–1190.
14. Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Schaller H., Khafif M., Schott G., Bendahmane A., Voinnet O. Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. V. 109. № 5. P. 1778–1783.
15. Buhtz A., Pieritz J., Springer F., Kehr J. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility // *BMC Plant Biol.* 2010. V. 10.
16. Buhtz A., Springer F., Chappell L., Baulcombe D.C., Kehr J. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of Brassica napus // *Plant J.* 2008. V. 53. № 5. P. 739–749.
17. Calderwood A., Kopriva S., Morris R.J. Transcript Abundance Explains mRNA Mobility Data in Arabidopsis thaliana // *Plant Cell.* 2016. V. 28. № 3. P. 610–615.
18. Carbonell A., Fahlgren N., Garcia-Ruiz H., Gilbert K.B., Montgomery T.A., Nguyen T., Cuperus J.T., Carrington J.C. Functional analysis of three Arabidopsis argonautes using slicer-defective mutants // *Plant Cell.* 2012. V. 24. № 9. P. 3613–3629.
19. Carlsbecker A., Lee J.Y., Roberts C.J., Dettmer J., Lehesranta S., Zhou J., Lindgren O., Moreno-Risueno M.A., Vatén A., Thitamadee S., Campilho A.,

- Sebastian J., Bowman J.L., Helariutta Y., Benfey P.N. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate // *Nature*. 2010. V. 465. № 7296. P. 316–321.
20. Carrington J.C., Kasschau K.D., Mahajan S.K., Schaad M.C. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants // *Plant Cell*. 1996. T. 8. № 10. C. 1669–1681.
21. Carter C.W. Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 715–748.
22. Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs // *Cell*. 2009. T. 136. № 4. C. 642–655.
23. Cerveau N., Jackson D.J. Combining independent de novo assemblies optimizes the coding transcriptome for nonconventional model eukaryotic organisms // *BMC Bioinformatics*. 2016. V. 17. № 1.
24. Chatterjee K., Nostramo R.T., Wan Y., Hopper A.K. tRNA dynamics between the nucleus, cytoplasm and mitochondrial surface: Location, location, location // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 2018. T. 1861. № 4. C. 373–386.
25. Chen S.-C., Olsthoorn R.C.L. In vitro and in vivo studies of the RNA conformational switch in Alfalfa mosaic virus // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 3. P. 1423–1429.
26. Chitwood D.H., Nogueira F.T.S., Howell M.D., Montgomery T.A., Carrington J.C., Timmermans M.C.P. Pattern formation via small RNA mobility // *Genes Dev.* 2009. V. 23. № 5. P. 549–554.
27. Cho S.K., Sharma P., Butler N.M., Kang I.H., Shah S., Rao A.G., Hannapel D.J. Polypyrimidine tract-binding proteins of potato mediate tuberization through an interaction with StBEL5 RNA // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. № 21. P. 6835–6847.
28. Chojnowski G., Waleń T., Bujnicki J.M. RNA Bricks--a database of RNA 3D motifs and their interactions // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № Database issue.
29. Christensen N., Tilsner J., Bell K., Hammann P., Parton R., Lacomme C., Oparka K. The 5' cap of tobacco mosaic virus (TMV) is required for virion attachment to the

- actin/endoplasmic reticulum network during early infection // *Traffic*. 2009. V. 10. № 5. P. 536–551.
30. Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* // *Science* (80-.). 2007. V. 316. № 5827. P. 1030–1033.
31. Cruz S.S., Chapman S., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A.M., Oparka K.J. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93. № 13. P. 6286–6290.
32. Deiman B.A.L.M., Koenen A.K., Verlaan P.W.G., Pleij C.W.A. Minimal template requirements for initiation of minus-strand synthesis in vitro by the RNA-dependent RNA polymerase of turnip yellow mosaic virus // *J. Virol.* 1998. V. 72. № 5. P. 3965–3972.
33. Devers E.A., Branscheid A., May P., Krajinski F. Stars and symbiosis: MicroRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. № 4. P. 1990–2010.
34. Devers E.A., Brosnan C.A., Sarazin A., Albertini D., Amsler A.C., Brioude F., Jullien P.E., Lim P., Schott G., Voinnet O. Movement and differential consumption of short interfering RNA duplexes underlie mobile RNA interference // *Nat. Plants.* 2020. V. 6. № 7. P. 789–799.
35. Dong Z., Han M.H., Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. № 29. P. 9970–9975.
36. Dreher T.W. Viral tRNAs and tRNA-like structures // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2010. T. 1. № 3. C. 402–414.
37. Dreher T.W., Bujarski J.J., Hall T.C. Mutant viral RNAs synthesized in vitro show altered aminoacylation and replicase template activities // *Nature.* 1984. V. 311. № 5982. P. 171–175.

38. Dreher T.W., Hall T.C. Mutational analysis of the tRNA mimicry of brome mosaic virus RNA. Sequence and structural requirements for aminoacylation and 3'-adenylation // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 201. № 1. P. 41–55.
39. Dreher T.W., Rao A.L.N., Hall T.C. Replication in vivo of mutant brome mosaic virus RNAs defective in aminoacylation // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 206. № 3. P. 425–438.
40. Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C., Voinnet O. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells // *Science* (80-.). 2010. V. 328. № 5980. P. 912–916.
41. Eamens A.L., Smith N.A., Curtin S.J., Wang M.B., Waterhouse P.M. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes // *RNA*. 2009. V. 15. № 12. P. 2219–2235.
42. Fang Y., Spector D.L. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 9. P. 818–823.
43. Fedorkin O.N., Solovyev A.G., Yelina N.E., Zamyatnin J., Zinovkin R.A., Mäkinen K., Schiemann J., Morozov S.Y. Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. № 2. P. 449–458.
44. Fujioka Y., Utsumi M., Ohba Y., Watanabe Y. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. № 9. P. 1243–1253.
45. Gallie D.R., Kobayashi M. The role of the 3'-untranslated region of non-polyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency // *Gene*. 1994. V. 142. № 2. P. 159–165.
46. German M.A., Pillay M., Jeong D.H., Hetawal A., Luo S., Janardhanan P., Kannan V., Rymarquis L.A., Nobuta K., German R., Paoli E. De, Lu C., Schroth G., Meyers B.C., Green P.J. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 8. P. 941–946.

47. Giege R., Briand J. - P, Mengual R., Ebel J. P, Hirth L. Valylation of the two RNA components of turnip-yellow mosaic virus and specificity of the tRNA aminoacylation reaction // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 84. № 1. P. 251–256.
48. Giegé R., Puglisi J.D., Florentz C. tRNA structure and aminoacylation efficiency // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1993. V. 45. № C. P. 129–206.
49. Gómez G., Pallás V. A Long-Distance Translocatable Phloem Protein from Cucumber Forms a Ribonucleoprotein Complex In Vivo with Hop Stunt Viroid RNA // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 18. P. 10104–10110.
50. Goodwin J.B., Dreher T.W. Transfer RNA mimicry in a new group of positive-strand RNA plant viruses, the furoviruses: differential aminoacylation between the RNA components of one genome // *Virology.* 1998. V. 246. № 1. P. 170–178.
51. Gopinath K., Kao C.C. Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 4. P. 1179–1191.
52. Griffiths-Jones S., Saini H.K., Dongen S. Van, Enright A.J. miRBase: Tools for microRNA genomics // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № SUPPL. 1.
53. Gu S., Jin L., Huang Y., Zhang F., Kay M.A. Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. № 16. P. 1536–1542.
54. Ham B.K., Brandom J.L., Xoconostle-Cázares B., Ringgold V., Lough T.J., Lucas W.J. A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex // *Plant Cell.* 2009. V. 21. № 1. P. 197–215.
55. Ham B.K., Lucas W.J. Phloem-Mobile RNAs as Systemic Signaling Agents // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. T. 68. C. 173–195.
56. Hannapel D.J., Banerjee A.K. Multiple Mobile mRNA Signals Regulate Tuber Development in Potato. // *Plants (Basel, Switzerland).* 2017. V. 6. № 1. P. 294–388.
57. Haywood V., Kragler F., Lucas W.J. Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling // *Plant Cell.* 2002. V. 14. № SUPPL. P. S303–S325.
58. Heinlein M. Plant virus replication and movement // *Virology.* 2015. T. 479–480. C. 657–671.

59. Huen A.K., Rodriguez-Medina C., Ho A.Y.Y., Atkins C.A., Smith P.M.C. Long-distance movement of phosphate starvation-responsive microRNAs in Arabidopsis // *Plant Biol.* 2017. V. 19. № 4. P. 643–649.
60. Iki T., Yoshikawa M., Meshi T., Ishikawa M. Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 2. P. 267–278.
61. Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M.C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Meshi T., Ishikawa M. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90 // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 2. P. 282–291.
62. Imlau A., Truernit E., Sauer N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues // *Plant Cell.* 1999. V. 11. № 3. P. 309–322.
63. Iwakawa H., Tomari Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants // *Mol. Cell.* 2013. V. 52. № 4. P. 591–601.
64. Kanrar S., Bhattacharya M., Arthur B., Courtier J., Smith H.M.S. Regulatory networks that function to specify flower meristems require the function of homeobox genes PENNYWISE and POUND-FOOLISH in Arabidopsis // *Plant J.* 2008. V. 54. № 5. P. 924–937.
65. Kehr J., Kragler F. Long distance RNA movement // *New Phytol.* 2018. T. 218. № 1. C. 29–40.
66. Kim G., LeBlanc M.L., Wafula E.K., DePamphilis C.W., Westwood J.H. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts // *Science (80-.).* 2014. V. 345. № 6198. P. 808–811.
67. Kim M., Canio W., Kessler S., Sinha N. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato // *Science (80-.).* 2001. V. 293. № 5528. P. 287–289.
68. Kim Y.J., Zheng B., Yu Y., Won S.Y., Mo B., Chen X. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 5. P. 814–822.

69. Knoblauch M., Knoblauch J., Mullendore D.L., Savage J.A., Babst B.A., Beecher S.D., Dodgen A.C., Jensen K.H., Holbrook N.M. Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants // *Elife*. 2016. V. 5. № JUN2016.
70. Knoblauch M., Peters W.S., Bell K., Ross-Elliott T.J., Oparka K.J. Sieve-element differentiation and phloem sap contamination // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. T. 43. C. 43–49.
71. Koenig R., Barends S., Gultyaev A.P., Lesemann D.E., Vetten H.J., Loss S., Pleij C.W.A. Nemesia ring necrosis virus: a new tymovirus with a genomic RNA having a histidylatable tobamovirus-like 3' end // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. № Pt 6. P. 1827–1833.
72. Kozomara A., Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № D1.
73. Kwak P.B., Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 2. P. 145–151.
74. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
75. Laubinger S., Sachsenberg T., Zeller G., Busch W., Lohmann J.U., Ratsch G., Weigel D. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. № 25. P. 8795–8800.
76. Laressergues D., Couzigou J.M., San Clemente H., Martinez Y., Dunand C., Bécard G., Combier J.P. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides // *Nature*. 2015. V. 520. № 7545. P. 90–93.
77. Lazareva E.A., Lezhov A.A., Komarova T. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G. A novel block of plant virus movement genes // *Mol. Plant Pathol.* 2017. V. 18. № 5. P. 611–624.
78. Leathers V., Tanguay R., Kobayashi M., Gallie D.R. A phylogenetically conserved sequence within viral 3' untranslated RNA pseudoknots regulates translation // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. № 9. P. 5331–5347.

79. Lee J.Y., Frank M. Plasmodesmata in phloem: different gateways for different cargoes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. T. 43. C. 119–124.
80. Leontis N.B., Lescoute A., Westhof E. The building blocks and motifs of RNA architecture // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. № 3. P. 279–287.
81. Li C., Gu M., Shi N., Zhang H., Yang X., Osman T., Liu Y., Wang H., Vatish M., Jackson S., Hong Y. Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction // *Sci. Rep.* 2011a. V. 1.
82. Li C., Zhang K., Zeng X., Jackson S., Zhou Y., Hong Y. A cis Element within Flowering Locus T mRNA Determines Its Mobility and Facilitates Trafficking of Heterologous Viral RNA // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 8. P. 3540–3548.
83. Li P., §1 ‡, Ham B.-K., Lucas W.J. CmRBP50 Protein Phosphorylation Is Essential for Assembly of a Stable Phloem-mobile High-affinity Ribonucleoprotein Complex * □ S // 2011b.
84. Li S., Liu L., Zhuang X., Yu Y., Liu X., Cui X., Ji L., Pan Z., Cao X., Mo B., Zhang F., Raikhel N., Jiang L., Chen X. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in arabidopsis // *Cell.* 2013. V. 153. № 3. P. 562–574.
85. Lin M.K., Lee Y.J., Lough T.J., Phimmey B.S., Lucas W.J. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function // *Mol. Cell. Proteomics.* 2009. V. 8. № 2. P. 343–356.
86. Lin T., Sharma P., Gonzalez D.H., Viola I.L., Hannapel D.J. The impact of the long-distance transport of a BEL1-like messenger RNA on development // *Plant Physiol.* 2013. V. 161. № 2. P. 760–772.
87. Liu H., Liang C., Kollipara R.K., Matsui M., Ke X., Jeong B.C., Wang Z., Yoo K.S., Yadav G.P., Kinch L.N., Grishin N. V., Nam Y., Corey D.R., Kittler R., Liu Q. HP1BP3, a Chromatin Retention Factor for Co-transcriptional MicroRNA Processing // *Mol. Cell.* 2016. V. 63. № 3. P. 420–432.
88. Liu L., Li C., Teo Z.W.N., Zhang B., Yu H. The MCTP-SNARE complex regulates florigen transport in arabidopsis // *Plant Cell.* 2019. V. 31. № 10. P. 2475–

2490.

89. Liu N., Zhou K.I., Parisien M., Dai Q., Diatchenko L., Pan T. N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. № 10. P. 6051–6063.

90. Lough T.J., Lucas W.J. Integrative Plant Biology: Role of Phloem Long-Distance Macromolecular Trafficking // 2006.

91. Lu K.J., Huang N.C., Liu Y.S., Lu C.A., Yu T.S. Long-distance movement of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation // *RNA Biol.* 2012. V. 9. № 5. P. 653–662.

92. Lucas W.J., Groover A., Lichtenberger R., Furuta K., Yadav S.R., Helariutta Y., He X.Q., Fukuda H., Kang J., Brady S.M., Patrick J.W., Sperry J., Yoshida A., López-Millán A.F., Grusak M.A., Kachroo P. The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions // *J. Integr. Plant Biol.* 2013. T. 55. № 4. C. 294–388.

93. Machida S., Yuan Y.A. Crystal structure of arabidopsis thaliana dawdle forkhead-associated domain reveals a conserved phospho-threonine recognition cleft for dicer-like 1 binding // *Mol. Plant.* 2013. V. 6. № 4. P. 1290–1300.

94. Mahajan A., Bhogale S., Kang I.H., Hannapel D.J., Banerjee A.K. The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile // *Plant Mol. Biol.* 2012. V. 79. № 6. P. 595–608.

95. Manavella P.A., Hagmann J., Ott F., Laubinger S., Franz M., MacEk B., Weigel D. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1 // *Cell.* 2012. V. 151. № 4. P. 859–870.

96. Mans R.M.W., Pleij C.W.A., Bosch L. tRNA-like structures. Structure, function and evolutionary significance // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 201. № 2. P. 303–324.

97. Matsuda D., Dreher T.W. The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer // *Virology.* 2004. V. 321. № 1. P. 36–46.

98. Matsuda D., Yoshinari S., Dreher T.W. eEF1A binding to aminoacylated viral RNA represses minus strand synthesis by TYMV RNA-dependent RNA polymerase // *Virology.* 2004. V. 321. № 1. P. 47–56.

99. Mee Y.P., Wu G., Gonzalez-Sulser A., Vaucheret H., Poethig R.S. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. V. 102. № 10. P. 3691–3696.
100. Morozov S.Y., Fedorkin O.N., Jüttner G., Schiemann J., Baulcombe D.C., Atabekov J.G. Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes // J. Gen. Virol. 1997. V. 78. № 8. P. 2077–2082.
101. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement // J. Gen. Virol. 2003. V. 84. № Pt 6. P. 1351–1366.
102. Narjala A., Nair A., Tirumalai V., Vivek Hari Sundar G., Shivaprasad P. V. A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis // Nucleic Acids Res. 2020. V. 48. № 6. P. 3103–3118.
103. Natarajan B., Kondhare K.R., Hannapel D.J., Banerjee A.K. Mobile RNAs and proteins: Prospects in storage organ development of tuber and root crops // Plant Sci. 2019. T. 284. C. 73–81.
104. Notaguchi M. Identification of phloem-mobile mRNA // J. Plant Res. 2015. V. 128. № 1. P. 27–35.
105. Notaguchi M., Wolf S., Lucas W.J. Phloem-Mobile Aux/IAA Transcripts Target to the Root Tip and Modify Root Architecture // J. Integr. Plant Biol. 2012. V. 54. № 10. P. 760–772.
106. Olsthoorn R.C.L., Mertens S., Brederode F.T., Bol J.F. A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication // EMBO J. 1999. V. 18. № 17. P. 4856–4864.
107. Oparka K.J., Santa Cruz S. The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules // Annu. Rev. Plant Biol. 2000. V. 51. P. 323–347.
108. Oparka K.J., Turgeon R. Sieve elements and companion cells - Traffic control centers of the phloem // Plant Cell. 1999. V. 11. № 4. P. 739–750.
109. Ostendorp A., Pahlow S., Krübel L., Hanhart P., Garbe M.Y., Deke J.,

Giavalisco P., Kehr J. Functional analysis of Brassica napus phloem protein and ribonucleoprotein complexes // *New Phytol.* 2017. V. 214. № 3. P. 1188–1197.

110. Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M., Vaucheret H. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 15. P. 4738–4745.

111. Palukaitis P. Potato spindle tuber viroid: Investigation of the long-distance, intra-plant transport route // *Virology.* 1987. V. 158. № 1. P. 239–241.

112. Pant B.D., Buhtz A., Kehr J., Scheible W.R. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis // *Plant J.* 2008. V. 53. № 5. P. 731–738.

113. Parizotto E.A., Dunoyer P., Rahm N., Himber C., Voinnet O. In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 18. P. 2237–2242.

114. Paultre D.S.G., Gustin M.P., Molnar A., Oparka K.J. Lost in transit: Long-distance trafficking and phloem unloading of protein signals in arabidopsis homografts // *Plant Cell.* 2016. V. 28. № 9. P. 2016–2025.

115. Pinck M., Yot P., Chapeville F., Duranton H.M. Enzymatic binding of valine to the 3' end of TYMV-RNA // *Nature.* 1970. V. 226. № 5249. P. 954–956.

116. Qi Y., Péliissier T., Itaya A., Hunt E., Wassenegger M., Ding B. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary // *Plant Cell.* 2004. V. 16. № 7. P. 1741–1752.

117. Ragni L., Belles-Boix E., Günl M., Pautot V. Interaction of KNAT6 and KNAT2 with Brevipedicellus and Pennywise in Arabidopsis inflorescences // *Plant Cell.* 2008. V. 20. № 4. P. 888–900.

118. Ramachandran V., Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis // *Science (80-.).* 2008. V. 321. № 5895. P. 1490–1492.

119. Rao A.L., Dreher T.W., Marsh L.E., Hall T.C. Telomeric function of the tRNA-like structure of brome mosaic virus RNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. V. 86. № 14. P. 5335–5339.
120. Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants // *Science* (80-.). 1997. V. 276. № 5318. P. 1558–1560.
121. Ren G., Chen X., Yu B. Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in arabidopsis // *Curr. Biol.* 2012a. V. 22. № 8. P. 695–700.
122. Ren G., Xie M., Dou Y., Zhang S., Zhang C., Yu B. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012b. V. 109. № 31. P. 12817–12821.
123. Rogers K., Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs // *Plant Cell.* 2013. T. 25. № 7. C. 2383–2399.
124. Rojas A.M.L., Drusin S.I., Chorostecki U., Mateos J.L., Moro B., Bologna N.G., Bresso E.G., Schapire A., Rasia R.M., Moreno D.M., Palatnik J.F. Identification of key sequence features required for microRNA biogenesis in plants // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1.
125. Rosas-Diaz T., Zhang D., Fan P., Wang L., Ding X., Jiang Y., Jimenez-Gongora T., Medina-Puche L., Zhao X., Feng Z., Zhang G., Liu X., Bejarano E.R., Tan L., Zhang H., Zhu J.K., Xing W., Faulkner C., Nagawa S., Lozano-Duran R. A virus-targeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. V. 115. № 6. P. 1388–1393.
126. Ross-Elliott T.J., Jensen K.H., Haaning K.S., Wager B.M., Knoblauch J., Howell A.H., Mullendore D.L., Monteith A.G., Paultre D., Yan D., Otero S., Bourdon M., Sager R., Lee J.Y., Helariutta Y., Knoblauch M., Oparka K.J. Phloem unloading in arabidopsis roots is convective and regulated by the phloempole pericycle // *Elife.* 2017. V. 6.
127. Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Kragler F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. T. 7. № 6. C. 641–650.

128. Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J. Long distance delivery of CmNACP mRNA. , 1999.
129. Saplaoura E., Kragler F. Mobile Transcripts and Intercellular Communication in Plants // *Enzymes. : Academic Press*, 2016. C. 1–29.
130. Schulz A. Long-distance trafficking: Lost in transit or stopped at the gate? // *Plant Cell*. 2017. T. 29. № 3. C. 426–430.
131. Schwab R., Speth C., Laubinger S., Voinnet O. Enhanced microRNA accumulation through stemloop-adjacent introns // *EMBO Rep*. 2013. V. 14. № 7. P. 615–621.
132. Sharma A., Badola P.K., Bhatia C., Sharma D., Trivedi P.K. Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in Arabidopsis // *Nat. Plants*. 2020. V. 6. № 10. P. 1262–1274.
133. Sharma P., Lin T., Hannapel D.J. Targets of the StBEL5 transcription factor include the FT Ortholog StSP6A1[OPEN] // *Plant Physiol*. 2016. V. 170. № 1. P. 310–324.
134. Sherlock M.E., Hartwick E.W., Macfadden A., Kieft J.S. Structural diversity and phylogenetic distribution of valyl tRNA-like structures in viruses // *RNA*. 2021. V. 27. № 1. P. 27–39.
135. Shivprasad S., Pogue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K., Dawson W.O. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors // *Virology*. 1999. V. 255. № 2. P. 312–323.
136. Singh R.N., Dreher T.W. Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase: initiation of minus strand synthesis in vitro // *Virology*. 1997. V. 233. № 2. P. 430–439.
137. Solovyev A.G., Minina E.A., Makarova S.S., Erokhina T.N., Makarov V. V., Kaplan I.B., Kopertekh L., Schiemann J., Richert-Pöggeler K.R., Morozov S.Y. Subcellular localization and self-interaction of plant-specific Nt-4/1 protein // *Biochimie*. 2013. V. 95. № 7. P. 1360–1370.
138. Sonenberg N., Hinnebusch A.G. Regulation of translation initiation in

- eukaryotes: mechanisms and biological targets // *Cell*. 2009. V. 136. № 4. P. 731–745.
139. Sperry J.S. Evolution of water transport and xylem structure // *Int. J. Plant Sci.* 2003. T. 164. № SUPPL. 3.
140. Speth C., Willing E.M., Rausch S., Schneeberger K., Laubinger S. RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in Arabidopsis // *Plant J.* 2013. V. 76. № 3. P. 433–445.
141. Takada S., Goto K. Terminal Flower2, an Arabidopsis Homolog of Heterochromatin Protein1, Counteracts the Activation of Flowering Locus T by Constans in the Vascular Tissues of Leaves to Regulate Flowering Time // *Plant Cell*. 2003. V. 15. № 12. P. 2856–2865.
142. Takeda R., Petrov A.I., Leontis N.B., Ding B. A three-dimensional RNA motif in Potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell*. 2011. V. 23. № 1. P. 258–272.
143. Takeda R., Zirbel C.L., Leontis N.B., Wang Y., Ding B. Allelic RNA Motifs in Regulating Systemic Trafficking of Potato Spindle Tuber Viroid // *Viruses*. 2018. V. 10. № 4.
144. Thieme C.J., Rojas-Triana M., Stecyk E., Schudoma C., Zhang W., Yang L., Minãmbres M., Walther D., Schulze W.X., Paz-Ares J., Scheible W.R., Kragler F. Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues // *Nat. Plants*. 2015. V. 1. № 4.
145. Thorvaldsdóttir H., Robinson J.T., Mesirov J.P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration // *Brief. Bioinform.* 2013. V. 14. № 2. P. 178–192.
146. Tiedemann R. Graft Union Development and Symplastic Phloem Contact in the Heterograft *Cucumis sativus* on *Cucurbita ficifolia* // *J. Plant Physiol.* 1989. V. 134. № 4. P. 427–440.
147. Tilsner J., Linnik O., Louveaux M., Roberts I.M., Chapman S.N., Oparka K.J. Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata // *J. Cell Biol.* 2013. V. 201. № 7. P. 981–995.

148. Tolstyko E.A., Lezzhov A.A., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Phloem transport of structured RNAs: A widening repertoire of trafficking signals and protein factors // *Plant Sci.* 2020a. T. 299. C. 110602.
149. Tolstyko E.A., Lezzhov A.A., Pankratenko A. V., Serebryakova M. V., Solovyev A.G., Morozov S.Y. Detection and in vitro studies of *Cucurbita maxima* phloem serpin-1 RNA-binding properties // *Biochimie.* 2020b. V. 170. P. 118–127.
150. Toscano-Morales R., Xoconostle-Cázares B., Martínez-Navarro A.C., Ruiz-Medrano R. Long distance movement of an *Arabidopsis* Translationally Controlled Tumor Protein (AtTCTP2) mRNA and protein in tobacco // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. № DEC.
151. Tsikou D., Yan Z., Holt D.B., Abel N.B., Reid D.E., Madsen L.H., Bhasin H., Sexauer M., Stougaard J., Markmann K. Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA // *Science (80-.)*. 2018. V. 362. № 6411. P. 233–236.
152. Vazquez F., Gascioli V., Crété P., Vaucheret H. The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. № 4. P. 346–351.
153. Verchot-Lubicz J., Torrance L., Solovyev A.G., Morozov S.Y., Jackson A.O., Gilmer D. Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2010. T. 23. № 10. C. 1231–1247.
154. Voinnet O., Baulcombe D.C. Systemic signalling in gene silencing [7] // *Nature.* 1997. T. 389. № 6651. C. 553.
155. Wang F., Perry S.E. Identification of direct targets of FUSCA3, a key regulator of *Arabidopsis* seed development // *Plant Physiol.* 2013. V. 161. № 3. P. 1251–1264.
156. Wang L., Song X., Gu L., Li X., Cao S., Chu C., Cui X., Chen X., Cao X. NOT2 Proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2013. V. 25. № 2. P. 715–727.

157. Wang W., Ye R., Xin Y., Fang X., Li C., Shi H., Zhou X., Qi Y. An importin β protein negatively regulates microRNA activity in Arabidopsis // *Plant Cell*. 2011. V. 23. № 10. P. 3565–3576.
158. Wilusz J.E., Freier S.M., Spector D.L. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA // *Cell*. 2008. V. 135. № 5. P. 919–932.
159. Wu J., Leontis N.B., Zirbel C.L., Bisaro D.M., Ding B. A three-dimensional RNA motif mediates directional trafficking of Potato spindle tuber viroid from epidermal to palisade mesophyll cells in *Nicotiana benthamiana* // *PLoS Pathog*. 2019. V. 15. № 10.
160. Wu J., Zhou C., Li J., Li C., Tao X., Leontis N.B., Zirbel C.L., Bisaro D.M., Ding B. Functional analysis reveals G/U pairs critical for replication and trafficking of an infectious non-coding viroid RNA // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. № 6. P. 3134–3155.
161. Wu X., Shi Y., Li J., Xu L., Fang Y., Li X., Qi Y. A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in Arabidopsis // *Cell Res*. 2013. V. 23. № 5. P. 645–657.
162. Xie Z., Allen E., Fahlgren N., Calamar A., Givan S.A., Carrington J.C. Expression of Arabidopsis MIRNA genes // *Plant Physiol*. 2005. V. 138. № 4. P. 2145–2154.
163. Xoconostle-Cázares B., Xiang Y., Ruiz-Medrano R., Wang H.L., Monzer J., Yoo B.C., McFarland K.C., Franceschi V.R., Lucas W.J. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem // *Science (80-.)*. 1999. V. 283. № 5398. P. 94–98.
164. Xu J., Chua N.H. Processing bodies and plant development // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2011. T. 14. № 1. C. 88–93.
165. Yamaji Y., Kobayashi T., Hamada K., Sakurai K., Yoshii A., Suzuki M., Namba S., Hibi T. In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A // *Virology*. 2006. V. 347. № 1. P. 100–108.

166. Yang L., Perrera V., Saplaoura E., Apelt F., Bahin M., Kramdi A., Olas J., Mueller-Roeber B., Sokolowska E., Zhang W., Li R., Pitzalis N., Heinlein M., Zhang S., Genovesio A., Colot V., Kragler F. m 5 C Methylation Guides Systemic Transport of Messenger RNA over Graft Junctions in Plants // *Curr. Biol.* 2019. V. 29. № 15. P. 2465- 2476.e5.
167. Yoo B.C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y.M., Lough T.J., Lucas W.J. A systematic small RNA signaling system in plants // *Plant Cell.* 2004. V. 16. № 8. P. 1979–2000.
168. Yot P., Pinck M., Haenni A.L., Duranton H.M., Chapeville F. Valine-specific tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1970. V. 67. № 3. P. 1345–1352.
169. Yu B., Bi L., Zheng B., Ji L., Chevalier D., Agarwal M., Ramachandran V., Li W., Lagrange T., Walker J.C., Chen X. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. № 29. P. 10073–10078.
170. Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R.W., Steward R., Chen X. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis // *Science (80-.).* 2005. V. 307. № 5711. P. 932–935.
171. Yumul R.E., Kim Y.J., Liu X., Wang R., Ding J., Xiao L., Chen X. POWERDRESS and Diversified Expression of the MIR172 Gene Family Bolster the Floral Stem Cell Network // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 1.
172. Zeenko V. V., Ryabova L.A., Spirin A.S., Rothnie H.M., Hess D., Browning K.S., Hohn T. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with the upstream pseudoknot domain in the 3' untranslated region of tobacco mosaic virus RNA // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 11. P. 5678–5691.
173. Zeng Y., Cullen B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5 // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 16. P. 4776–4785.
174. Zhai J., Zhao Y., Simon S.A., Huang S., Petsch K., Arikiti S., Pillay M., Ji L., Xie M., Cao X., Yu B., Timmermans M., Yang B., Chen X., Meyers B.C. Plant microRNAs display differential 3' truncation and tailing modifications that are

ARGONAUTE1 dependent and conserved across species // *Plant Cell*. 2013. V. 25. № 7. P. 2417–2428.

175. Zhan X., Wang B., Li H., Liu R., Kalia R.K., Zhu J.K., Chinnusamy V. Arabidopsis proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. V. 109. № 44. P. 18198–18203.

176. Zhang H., Yu P., Zhao J., Jiang H., Wang H., Zhu Y., Botella M.A., Šamaj J., Li C., Lin J. Expression of tomato prosystemin gene in Arabidopsis reveals systemic translocation of its mRNA and confers necrotrophic fungal resistance // *New Phytol.* 2018. V. 217. № 2. P. 799–812.

177. Zhang S., Sun L., Kragler F. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation1[W][OA] // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. № 1. P. 378–387.

178. Zhang W., Thieme C.J., Kollwig G., Apelt F., Yang L., Winter N., Andresen N., Walther D., Kragler F. tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants // *Plant Cell*. 2016. V. 28. № 6. P. 1237–1249.

179. Zhao Y., Yu Y., Zhai J., Ramachandran V., Dinh T.T., Meyers B.C., Mo B., Chen X. The arabidopsis nucleotidyl transferase HESO1 uridylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. № 8. P. 689–694.

180. Zhong X., Tao X., Stombaugh J., Leontis N., Ding B. Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 16. P. 3836–3846.