

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Чергинцев Денис Александрович

**Дополнительные белки, кодируемые генными модулями, родственными
тройному блоку транспортных генов вирусов растений**

1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Соловьев Андрей Геннадьевич

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	4
Введение	7
Обзор литературы	12
1. Организм растения как единое симпластическое пространство	12
2. Транспорт вируса по растению	13
2.1. Транспортные белки вирусов растений	14
2.1. Транспорт вирусов с тройным блоком транспортных генов (TGB)	15
3. Происхождение и эволюция TGB	23
4. РНК-сайленсинг в растениях	26
4.1. Общий механизм РНК-сайленсинга в растениях	26
4.2. Амплификация РНК-сайленсинга	34
4.3. Транспорт сигнала сайленсинга	35
4.4. Некоторые эндогенные механизмы контроля РНК-сайленсинга	36
4.5. РНК-сайленсинг как ответ растения на вирусную инфекцию	37
5. Вирусные супрессоры РНК-сайленсинга	40
5.1. Примеры различных ВСР и механизмы их работы	40
5.2. Подавление РНК-сайленсинга TGB-содержащими вирусами	46
5.3. Супрессоры РНК-сайленсинга аллексивирусов	48
6. Особенности транспортного модуля аллексивирусов	52
7. Родственный TGB транспортный модуль ТСМВ и дополнительный белок vDRB	55
Материалы и методы	58
Результаты	78

1. Исследование механизма экспрессии гена p42 и функций белка p42	78
1.1. Экспрессия гена p42 ShVX.....	78
1.2. Возможные механизмы экспрессии p42 у других аллексивирусов.....	81
1.3. РНК-связывающие свойства p42	84
1.4. Внутриклеточная локализация белка p42	85
1.5. Анализ способности белка p42 супрессировать РНК-сайленсинг.....	87
1.6. Белок p42 супрессирует нонсенс-опосредованный распад РНК.....	91
2. Исследование белка vDRB	94
2.1. РНК-связывающие свойства vDRB	94
2.2. Внутриклеточная локализация vDRB	97
2.3. Супрессия РНК-сайленсинга белком vDRB в невирусных экспериментальных системах	99
2.4. Супрессия РНК-сайленсинга белком vDRB в эксперименте с TCV	101
2.5. Влияние vDRB на инфекцию PVX	103
Обсуждение.....	107
Заключение	117
Список литературы	119

Список сокращений

Названия вирусов

ASPV – apple stem pitting virus, вирус ямчатости древесины яблони

BSMV – barley stripe mosaic virus, вирус штриховатой мозаики ячменя

CaMV – cauliflower mosaic virus, вирус мозаики цветной капусты

CMV – cucumber mosaic virus, вирус мозаики огурца

HGSV – Hibiscus green spot virus, вирус зеленой пятнистости гибискуса

PlAMV – Plantago asiatica mosaic virus, вирус мозаики подорожника азиатского

PMTV – potato mop-top virus, вирус курчавости верхушки картофеля

PSLV – Pothos latent virus, латентный вирус потоса

PVM – potato virus M, M-вирус картофеля

PVX – potato virus X, X-вирус картофеля

ShVX – shallot virus X, X-вирус лука-шалота

TBSV – tomato bushy stunt virus, вирус кустистой карликовости томатов

TCV – turnip crinkle virus, вирус морщинистости турнепса

TMV – tobacco mosaic virus, вирус табачной мозаики

TRV – tobacco rattle virus, вирус погремковости табака

TVX – tulip virus X, X-вирус тюльпана

TuMV – turnip mosaic virus, вирус мозаики турнепса

TYMV – turnip yellow mosaic virus, вирус желтой мозаики турнепса

WClMV – white clover mosaic potexvirus, потексвирус мозаики белого клевера

Другие сокращения

АГ – аппарат Гольджи

ВРК – вирусный репликативный комплекс

ВСР – вирусный супрессор РНК-сайленсинга

дпн – дни после инфильтрации

дцРНК – двухцепочечная РНК

ОРТ – открытая рамка трансляции (англ. ORF)

оцРНК – одноцепочечная РНК

ПД – плазмодесма

ППС – предельная пропускная способность

ПТСГ – посттранскрипционный сайленсинг генов

ПЦР – полимеразная цепная реакция; кПЦР – количественная ПЦР

РНП – рибонуклеопротеид, РНП комплекс – рибонуклеопротеидный комплекс

сгРНК – субгеномная РНК

ТБ – транспортный белок

ТЗО – темно-зеленые островки (англ. DGIs – dark green islands)

30К – белок 30К суперсемейства транспортных белков, а также конкретно 30-КДа ТБ TMV

AGO – ARGONAUTE

БМВ – binary movement block, двойной транспортный блок

СР – coat protein, белок оболочки

СРР – cysteine-rich protein, цистеин-богатый белок

ДСЛ – Dicer-like, Dicer-подобная РНКаза III

ДГБ – double gene block, двойной блок генов

ДРБ – dsRNA-binding protein, дцРНК-связывающий белок; вДРБ – viral dsRNA-binding protein, дцРНК-связывающий белок вируса

ГФР – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

HEN1 – HUA Enhancer 1

HYL1 – HYPONASTIC-LEAVES1

ИРС – internal ribosome entry site, участок внутренней посадки рибосомы

мРНК – микроРНК, продукт процессинга транскриптов МИР генов

mRFP – monomeric red fluorescent protein, мономерный красный флуоресцентный белок

NMD – nonsense-mediated decay, нонсенс-опосредованный распад

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase, РНК-зависимая РНК полимераза

RISC – RNA-induced silencing complex

SGS3 – SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3

siRNA – малая интерферирующая РНК (siRNA)

TCMB – tetra-cistron movement block, четырехцистронный транспортный блок

TGB – triple gene block, тройной блок генов

VLRA – Virus-Like RNA Assemblies, вирус-подобны транскриптомные контиги

Введение

Вирусы растений являются важными для изучения инфекционными агентами, наносящими значительный ущерб сельскому хозяйству и растениеводству (Tatineni, Hein, 2023). Большая часть вирусов растений относится к домену *Riboviria*, царству *Orthornavirae*, репликативный цикл которых осуществляется без образования ДНК-интермедиата (Koonin et al., 2020). Также, геном большинства вирусов растений представлен (+)РНК – одноцепочечной РНК положительной полярности, на матрице которой происходит синтез вирусных белков при попадании вируса в клетку (Koonin et al., 2021).

РНК-вирусы растений обладают геномами сравнительно небольших размеров, и их способность кодировать белки, необходимые для успешного заражения растения, сильно ограничена. Для представителей *Orthornavirae* только ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) является консервативным (Dolja et al., 2020; Wolf et al., 2018). Вирулентность вирусов растений зависит от ряда факторов, таких как эффективность репликации, способность подавлять системы противовирусной защиты и распространяться по клеткам и тканям растения. Для осуществления этих функций геном вируса кодирует белки, имеющие функции супрессоров РНК-сайленсинга (BCP) и транспортных белков (ТБ), а также содержит гены белков оболочки и некоторых дополнительных белков (Garciá, Pallás, 2015). Следует отметить, что функции многих белков фитовирусов остаются неизвестными, поскольку их свойства не могут быть предсказаны в силу отсутствия сходства с какими-либо клеточными или вирусными белками, а экспериментальное изучение их свойств не проводилось (Li et al., 2024a; Solovyev, Morozov, 2017).

Геномы ряда (+)РНК-вирусов растений содержат тройной блок генов (triple gene block, TGB) – консервативный генный модуль, кодирующий белки TGB1, TGB2 и TGB3, необходимые для транспорта вируса (Morozov, Solovyev, 2003). Для TGB1 некоторых вирусов также показана функция BCP (Senshu et al., 2009).

Открытые рамки трансляции трех белков TGB частично перекрываются и транслируются по механизму «leaky scanning» с одной субгеномной РНК (Fujimoto et al., 2022). Известно, что белки TGB2 и TGB3 способны модифицировать эндомембранный систему клетки, и, совместно с белком TGB1, взаимодействующим с вирусной геномной РНК, направляют геном вируса в каналы плазмодесм, обеспечивая таким образом его межклеточный транспорт (Tilsner et al., 2013; Verchot-Lubicz et al., 2010). Считается, что TGB эволюционировал как единый генный модуль (Solovyev, Morozov, 2017). Одним из направлений эволюции TGB могло быть приобретение дополнительных генов, кодирующих белки, функции которых связаны с функциями белков TGB (Morozov, Solovyev, 2022).

Для вирусов рода *Allexivirus* (сем. *Alphasflexiviridae*), в том числе для типового представителя рода, X-вируса лука-шалота (shallot virus X, ShVX), характерно наличие гена, кодирующего белок p42 и расположенного с 5'-дистальной стороны от TGB (Kanyuka et al., 1992). Белки, имеющие сходство с p42, не обнаружены ни у других вирусов, ни среди клеточных белков. Существуют неподтвержденные наблюдения, указывающие на связь p42 с вирионами ShVX или с формированием вирионов (Vishnichenko et al., 2002), однако в целом функции белка p42 ShVX остаются неизвестными.

Другой схожий с TGB модуль генов, названный тетрацистронным транспортным блоком (tetra-cistron movement block, TCMB), был найден в транскриптомных контигах бриевого мха *Dicranum scoparium* и цветкового растения *Colobanthus quitensis*. Эти контиги соответствовали геномному сегменту РНК2 новых вирусов с двухкомпонентными РНК-геномами, которые были отнесены к группе, родственной семейству *Benyviridae* (Morozov, Solovyev, 2022). Отличительной чертой TCMB является ген, частично перекрывающийся с 5'-концевым районом гена TGB1 и кодирующий vDRB – маленький белок, который содержит предсказываемый трансмембранный домен и участок, имеющий сходство с дЦРНК-связывающим доменом, найденным у клеточных белков, таких,

как DRB4 и HYL1, которые способны связывать днРНК и участвуют в РНК-сайленсинге и противовирусной защите (Eamens et al., 2012b; Morozov, Solovyev, 2022; Rahman et al., 2021).

До настоящего времени белки DRB и p42 не были охарактеризованы экспериментально, также не была исследована экспрессия p42, кодируемого ShVX и другими аллексивирусами.

Цели и задачи исследования

Целью работы являлось изучение свойств белков, кодируемых дополнительными генами TGB-содержащих геномных модулей вирусов растений, а именно неохарактеризованного белка vDRB вируса *D. scoparium* и консервативного для вирусов рода *Allexivirus* белка p42.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить способность vDRB и p42 ShVX связывать различные типы нуклеиновых кислот в условиях *in vitro*.
- 2) Исследовать внутриклеточную локализацию vDRB и p42 ShVX при временной экспрессии в листьях *N. benthamiana*.
- 3) Оценить способность vDRB и p42 ShVX супрессировать сайленсинг в различных экспериментальных системах.
- 4) Установить механизм экспрессии гена p42 ShVX.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования были белки геномных модулей, родственных TGB: белок p42 X-вируса шалота (ShVX) и кодирующая его область генома вируса, а также белок vDRB вируса мха *Dicranum scoparium*. Предметом исследования было выявление функций p42 и vDRB в различных экспериментальных системах.

Научная новизна исследования

Научная новизна заключается в установлении свойств ранее экспериментально не изученных белков, кодируемых дополнительными генами геномных модулей, родственных тройному генному блоку транспортных белков

вирусов растений. Были впервые показаны активности белков p42 ShVX и vDRB в качестве вирусных супрессоров РНК-сайленсинга в ряде экспериментальных систем.

Теоретическая и практическая значимость работы

Значимость работы заключается в обнаружении способности супрессировать РНК-сайленсинг у неродственных белков, гены которых являются дополнительными к генам TGB. Полученные данные позволяют расширить представление об эволюции транспортных систем вирусов растений и тесной связи вирусного транспорта и подавления противовирусной защиты растения. Поскольку TGB широко представлен у вирусов растений, имеющих экономически важное значение, дальнейшее изучение деталей молекулярных механизмов активностей белков, которые были охарактеризованы в данной работе, в будущем может внести вклад в развитие безвирусного растениеводства.

Личный вклад соискателя

Д.А. Чергинцев принимал непосредственное участие в изучении литературных данных, планировании и проведении исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов, а также в обсуждении и написании текстов статей и подготовке материалов к ним. Участие соавторов в отдельных этапах исследования надлежащим образом отражено в публикациях.

Методология и методы диссертационного исследования

В исследовании применялись современные методы генной инженерии и молекулярной биологии, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Все работы выполнены с использованием современного оборудования.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Белок p42 ShVX способен синтезироваться на функционально тетрацистронной РНК по механизму «leaky scanning»; с точки зрения трансляции, TGB и ген p42 составляют единый геномный модуль.
- 2) Белок p42 ко-локализуется с микротрубочками.
- 3) Белок p42 ShVX способен связывать *in vitro* оцРНК, но не дцРНК.

- 4) Белок p42 ShVX способен супрессировать сайленсинг, вызванный оцРНК, и подавлять NMD, а также проявлять активность ВСР в контексте инфекции ТСВ.
- 5) Белок vDRB способен связывать оцРНК и дцРНК, проявляя в случае дцРНК большую эффективность связывания.
- 6) vDRB выступает в качестве супрессора сайленсинга в контексте вирусной инфекции.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты были получены с использованием современного научного оборудования и общепризнанных актуальных методик. Достоверность полученных результатов обусловлена необходимым количеством проведенных экспериментальных исследований, воспроизводимостью данных в повторных экспериментах и статистической обработкой результатов. По теме диссертационной работы были опубликованы три статьи в рецензируемых международных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 150 печатных страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Список литературы. Рукопись содержит 1 таблицу и 16 рисунков. Список литературы включает 369 источника.

Обзор литературы

1. Организм растения как единое симпластическое пространство

Практически весь организм растения представляет единое симпластическое пространство, в котором клетки соединены плазмодесмами (ПД) – каналами, проходящими сквозь клеточные стенки контактирующих клеток и формирующими соединение их цитоплазм, плазматических мембран и элементов эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (Tee, Faulkner, 2024). Около ПД кортикальная сеть ЭПР, ответвляясь в сторону клеточной стенки, формирует десмотрубочку – сильно суженную трубочку ЭПР, проходящую из одной клетки в другую. Узкий просвет десмотрубочки не позволяет макромолекулам перемещаться между клетками по люмену ЭПР, и их транспорт происходит по цитоплазматической части канала, между мембраной десмотрубочки и плазматической мембраной («цитоплазматическому рукаву») (Nicolas et al., 2017a). Предполагается, что молекулы с малым Стоксовым радиусом перемещаются по цитоплазматическому рукаву путем диффузии, тогда как в случае более крупных молекул, таких как нуклеиновые кислоты, перемещение происходит благодаря активному транспорту (Citovsky, Zambryski, 1991; Nicolas et al., 2017b). По ПД в растениях осуществляется как ближний, так и дальний (системный) транспорт соединений. Системный транспорт осуществляется по флоэме, проводящей ткани растения, перемещение по элементам которой происходит через ситовидные каналы, формирующиеся в местах контактов клеток флоэмы путем модификации ПД (Lewis et al., 2022). К соединениям, транспортируемым межклеточно и системно по растению, относятся не только продукты основного метаболизма и фотоассимиляты, но также и многочисленные сигнальные соединения, в том числе гормоны, полипептиды и РНК (Citovsky, Zambryski, 2000; Kondhare et al., 2021; Lucas, Lee, 2004; Shen et al., 2023).

2. Транспорт вируса по растению

Транспорт вируса по растению происходит в основном по симпласту, и, хотя известны примеры системного транспорта вирусов по ксилеме (Sun et al., 2022), считается, что клеточная стенка является непроницаемым барьером для вируса и преодолеть ее вирус может только при нарушении целостности клеточной стенки или во время дифференцировки клеток (Escalante et al., 2024; Navarro et al., 2019; Sun et al., 2022; Whitfield et al., 2015).

В перемещении вируса по растению можно выделить два основных этапа, требующих разных вирусных и клеточных факторов, и различающихся по механизмам. Первый этап представляет собой локальное распространение вируса и заключается в направленном перемещении вируса внутри клетки к ПД, с последующим проникновением вируса через ПД в соседние клетки (Navarro et al., 2019). Для второго этапа, системного транспорта, вирус должен обладать способностью проникнуть в проводящие ткани, загрузиться во флоэмные элементы, транспортироваться по ним и затем снова выгрузиться в основные ткани (Folimonova, Tilsner, 2018). Способность вируса к перемещению по растению определяется возможностью транспортной формы вируса, в качестве которой может выступать вирион, геномная РНК или рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс, проникать через ПД. Линейные размеры вириона (например, 18x300 нм для tobacco mosaic virus, TMV) и размер свободной, неупакованной в капсид РНК вируса могут в разы превосходить доступное для перемещения пространство ПД между мембраной десмотрубочки и плазматической мембраной, оцениваемое в 2-4 нм (Hong, Ju, 2017; Kumar, Dasgupta, 2021; Lucas, 2006). Однако, в присутствии вирусного транспортного белка РНК TMV формирует РНП, имеющий диаметр 1.5-3.5 нм и способный, таким образом, проникать через ПД (Kiselyova et al., 2001; Kumar, Dasgupta, 2021; Lucas, 2006).

2.1. Транспортные белки вирусов растений

Основной функцией ТБ является перемещение вирусного генома через каналы ПД; для реализации этой функции ТБ обладают рядом общих свойств, включающих: I) способность располагаться в ПД и перемещаться через них; II) способность увеличивать предельную пропускную способность (ППС) до размеров, необходимых для перемещения транспортных форм вируса; III) способность связывать РНК; IV) способность взаимодействовать с цитоскелетом и/или сетью ЭПР для транспорта вирусных комплексов к ПД и через каналы ПД (Navarro et al., 2019). Однако, несмотря на общие функции, механизмы функционирования ТБ сильно различаются, как отличается и транспортная форма вирусного генома. Поскольку гены и белки, исследуемые в рамках этой работы, принадлежат к группе вирусов, геном которых представлен (+)РНК, ниже обсуждаются преимущественно вирусы этой группы.

Можно выделить несколько стратегий функционирования ТБ. Первая заключается в увеличении ППС без разрушения структуры самой ПД, и в данном случае вирус перемещается в соседние клетки в форме РНП, включающего геномную РНК вируса, ТБ, а также иногда белок оболочки (СР, от англ. «coat protein») и некоторые другие белки (Navarro et al., 2019). Этот способ широко распространен среди различных вирусов (Heinlein, 2015). Второй вариант подразумевает модификацию ПД под воздействием ТБ, молекулы которого олигомеризуются и образуют белковую трубку, замещающую внутреннюю структуру канала ПД. Такой вариант позволяет транспортироваться собранным вирионам и в данном случае СР является также необходимым (Kumar, Dasgupta, 2021). Примеры стратегии этого типа распространены среди представителей семейств *Comoviridae*, *Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Sequiviridae* и некоторых других, ТБ которых относятся к 30K суперсемейству (Melcher, 2000; Ritzenthaler, Hofmann, 2007; Xie et al., 2016). Еще одна стратегия известна для представителей рода *Potyvirus* (сем. *Potyviridae*), например, turnip mosaic virus (TuMV), у которого белки, составляющие транспортную систему, образуют особые структуры,

выстилающие канал ПД и осуществляющие транспорт вируса в форме вириона или РНП, однако десмотрубочка при этом сохраняется (Dai et al., 2020; Heinlein, 2015).

Для вирусов растений характерна тесная связь репликации и транспорта. При репликации РНК-вирусы образуют ассоциированные с мембранами вирусные репликативные комплексы (ВРК), которые потом могут формировать репликативные фабрики или вироплазмы (Heinlein, 2015). ВРК являются сложно организованными структурами, которые, помимо геномной РНК вируса и вирусной репликазы, включают различные мембранные элементы цитоскелета, а также клеточные и вирусные белки, в том числе ТБ, которые способны связывать РНК, взаимодействовать с цитоскелетом, рекрутировать и модифицировать мембранные (Heinlein, 2015; Solovyev et al., 2022). ВРК формируются во множестве участков в клетке и могут быть подвижными, причем их внутриклеточное перемещение связано с распространением вируса (Boyko et al., 2007; Heinlein, 2015). Также ВРК могут быть ассоциированы с ПД и тем самым способствовать загрузке вирусного генома в каналы ПД; согласно некоторым данным, сами ВРК могут перемещаться через ПД (Grangeon et al., 2013; Kawakami et al., 2004; Tilsner et al., 2013).

Существует несколько достаточно изученных транспортных систем вирусов растений: суперсемейство 30К-белков, тройной блок генов (triple gene block, TGB) и родственный ему бинарный транспортный блок (binary movement block, BMB), двойной блок генов (double gene block, DGB) и транспортная система представителей *Potyviridae* (Kumar, Dasgupta, 2021; Navarro, Pallás, 2017).

2.1. Транспорт вирусов с тройным блоком транспортных генов (TGB)

TGB является хорошо изученным примером транспортного модуля с функциями ТБ, разделенными между тремя белками, TGB1, TGB2 и TGB3. Открытые рамки трансляции (OPT) белков TGB частично перекрываются. TGB достаточно консервативен среди представителей нескольких семейств (+)РНК вирусов, а именно *Virgaviridae* (порядок *Martellivirales*), *Alphaflexiviridae*,

Betaflexiviridae (порядок *Tymovirales*) и *Benyviridae* (порядок *Hepelivirales*) (Рис. 1) (Morozov, Solovyev, 2003; Solovyev, Morozov, 2022).

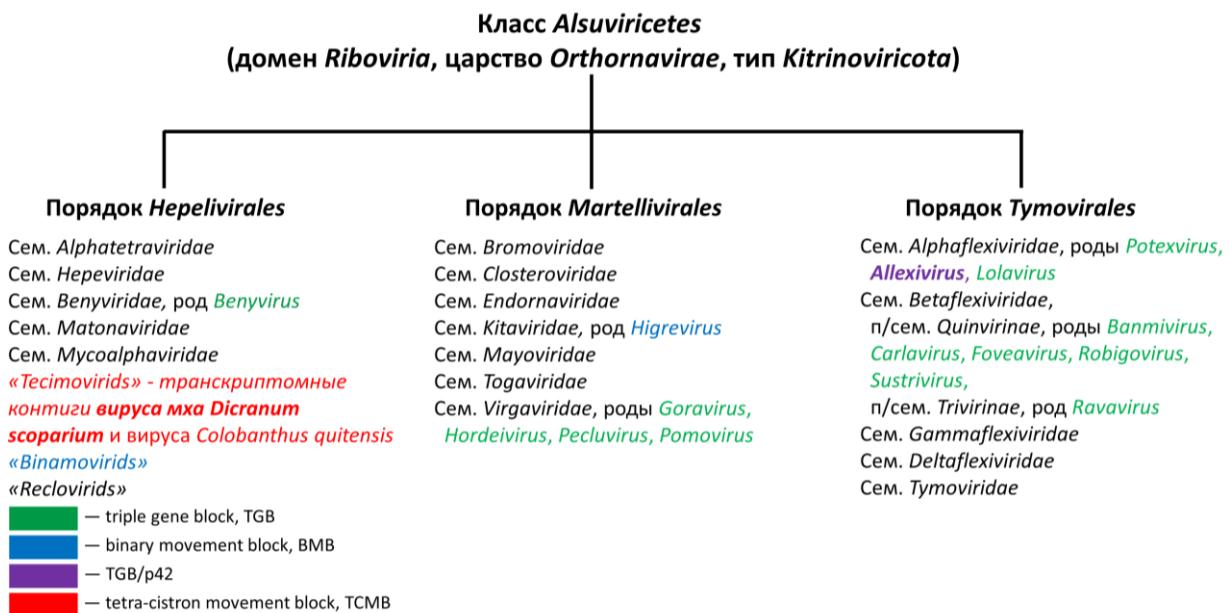


Рисунок 1. Разнообразие вирусов, содержащих TGB и родственные транспортные модули. Для семейств, у представителей которых показаны или предсказаны родственные TGB модули, выписаны соответствующие роды. Цветовая маркировка, как указано, соответствует типу транспортного модуля. Схема не отображает реального эволюционного положения порядков. В кавычках указаны недавно выделенные группы неясного таксономического положения (Solovyev, Morozov, 2022).

Согласно сравнениям последовательностей и по функциональным исследованиям выделяют два типа TGB, а именно potex-подобные TGB, которые характерны для вирусов с нитевидными вирионами семейств *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae*, и hordei-подобные TGB, которые характерны для вирусов с веретеновидными вирионами из семейства *Virgaviridae* и рода *Benyvirus*, названные так по соответствующим родам *Potexvirus* и *Hordeivirus* (Morozov, Solovyev, 2003; Morozov, Solovyev, 2015; Solovyev et al., 2022).

Белок TGB1 является самым большим и многофункциональным белком TGB, содержит НТФазный/хеликазный домен, принадлежащий группе «дополнительных» вирусных хеликаз суперсемейства I (SF1), происхождение которых, как предполагают, связано с дупликацией хеликазного домена вирусной репликазы (Koonin et al., 1993; Morozov, Solovyev, 2012; Morozov, Solovyev, 2015). TGB1 hordei-подобных TGB, помимо расположенного в С-концевом районе белка НТФазного/хеликазного домена, имеют выраженные N-концевой и срединный

домены, которые отсутствуют у potex-подобных TGB (Verchot-Lubicz et al., 2010). В клетках белки TGB1 имеют преимущественно диффузную цитоплазматическую локализацию и образуют дискретные белковые структуры, локализованные в том числе рядом с плазматической мембраной, в ПД, а также в ядре (Lawrence, Jackson, 2001; Lim et al., 2009; Samuels et al., 2007; Verchot-Lubicz et al., 2010), и в некоторых случаях могут перемещаться между ядром и цитоплазмой (Li et al., 2018). Для ряда вирусов было экспериментально установлено, что белки TGB1 обладают НТФазной и хеликазной активностями (Donald et al., 1997; Kalinina et al., 2002; Morozov, Solovyev, 2003), и эти ферментативные активности TGB1 необходимы для внутриклеточной локализации TGB1 в ПД (Zamyatnin et al., 2004). Помимо этого, НТФазный/хеликазный домен белка необходим для взаимодействия его с РНК, белками TGB2 и TGB3 и, как следствие, для функционирования TGB1 в межклеточном транспорте (Donald et al., 1997; Jiang et al., 2020; Lim et al., 2009; Verchot-Lubicz et al., 2010; Zamyatnin et al., 2004). Неспецифическая РНК-связывающая активность TGB1 обусловлена С-концевым доменом, а также срединным и N-концевым доменами у TGB1 hordei-подобных TGB (Makarov et al., 2009), и является важной для взаимодействия с геномной РНК вируса и формирования репликативных комплексов (Bleykasten et al., 1996; Cowan et al., 2002; Donald et al., 1997; Kalinina et al., 2001).

Как было показано для PVX, типового представителя потексвирусов, межклеточный транспорт potex-подобных вирусов происходит в форме вирионов, образованных СР, с несколькими молекулами TGB1, присоединенными к концу нитевидного вириона, содержащему 5'-конец геномной РНК (Park et al., 2014). Взаимодействие TGB1 с вирионами PVX происходит через СР; это взаимодействие вызывает изменение структуры вириона, что позволяет ему транспортироваться через ПД (Solovyev, Makarov, 2016) и делает возможной трансляцию вирусной РНК в составе вириона, которая приводит к ко-трансляционной разборке вириона в условиях *in vitro* (Atabekov et al., 2000; Karpova et al., 2006). Было установлено, что TGB1 PVX способен взаимодействовать с белками eEF1A и eEF1B β (Hwang et al.,

2015), клеточными компонентами системы эукариотической трансляции, которые при этом способны взаимодействовать с цитоскелетом (Pittman et al., 2009) и таким образом могут способствовать осуществлению белком TGB1 функций транспорта.

В отличие от потексвирусов, для вирусов с hordei-подобным TGB СР не является необходимым для транспорта; транспортной формой генома у этих вирусов является РНП-комплекс РНК-генома с TGB1 (Jackson et al., 2009; Morozov, Solovyev, 2020). Для TGB1 представителей семейства *Virgaviridae*, а именно potato mott-top virus (PMTV) и barley stripe mosaic virus (BSMV, типовой вирус с hordei-подобным TGB), была показана необходимость характерного для данного типа TGB N-концевого домена для успешного системного транспорта (Solovyev et al., 1999; Wright et al., 2010). Также для TGB1 BSMV была обнаружена способность локализоваться в нуклеоплазме и в ядрышке, где он взаимодействует с ядрышковым белком фибрилларином 2 (Fib2), а также транспортироваться из ядра и в ядро, причем данная локализация, как и взаимодействие с Fib2, являются важными для выполнения белком TGB1 функции межклеточного транспорта (Li et al., 2018).

Важно отметить, что для транспорта вирусов с TGB обоих типов, помимо функциональных TGB1, также важны активности TGB2 и TGB3 и взаимодействие TGB1 с ними (Morozov, Solovyev, 2020). TGB2 и TGB3 являются небольшими белками с гидрофобными сегментами и локализуются в мембранах ЭПР и происходящих из ЭПР мембранных структурах (Verchot-Lubicz et al., 2010; Verchot, 2022). Белки TGB2 довольно консервативны среди разных вирусов, в отличие от белков TGB3, которые существенно различаются у potex- и hordei-подобных TGB (Morozov, Solovyev, 2020). Белки TGB2 имеют U-образную топологию в мембранах с N- и С-концами, обращенными в цитоплазму, и центральной гидрофильной петлей, находящейся в лumenе ЭПР (Hsu et al., 2008; Zamyatnin et al., 2006). Для TGB2 PMTV, имеющего hordei-подобный TGB, а также для TGB2 bamboo mosaic virus (BaMV) с potex-подобным TGB показана способность неспецифически связывать оцРНК (Cowan et al., 2002; Hsu et al., 2009). Предполагается, что белки

TGB3 разных типов TGB не являются родственными; TGB3 потех-подобных TGB меньше по размеру и содержат один N-концевой трансмембранный домен и С-концевой цитоплазматический домен, TGB3 hordei-подобного типа имеют два консервативных трансмембранных сегмента, образующими U-образную топологию в мембране с N- и С- концами в цитоплазме и консервативной центральной петлей в люмене ЭПР (Morozov, Solovyev, 2003; Verchot-Lubicz et al., 2010).

Белки TGB2 и TGB3 способны взаимодействовать друг с другом, и это взаимодействие необходимо для осуществления ими функции транспорта вируса (Jackson et al., 2009; Li et al., 2024b; Lim et al., 2008; Samuels et al., 2007). Локализация белков TGB2 и TGB3 в эндомембранах клетки различается (Solovyev et al., 2022). TGB2 локализуется в ЭПР и везикулах ЭПР, формирующихся под воздействием TGB2 (Ju et al., 2005), в то время как TGB3, помимо локализации в производных от ЭПР мембранах, также способен образовывать ассоциированные с ПД тельца, в которые он, согласно некоторым данным, захватывает TGB2 благодаря взаимодействию с ним (Krishnamurthy et al., 2003; Lee et al., 2010; Samuels et al., 2007; Solovyev et al., 2022; Verchot-Lubicz et al., 2010). Перемещение TGB3 происходит вдоль ЭПР путем латеральной диффузии и не задействует связанный с аппаратом Гольджи везикулярный транспорт (Schepetilnikov et al., 2005; Schepetilnikov et al., 2008). TGB2 способен модифицировать мембранны, а именно изменять их кривизну, вызывая констрикции трубочек ЭПР (Lazareva et al., 2021a). Белки TGB2/TGB3 взаимодействуют с TGB1 и необходимы для локализации TGB1 в мембранных тельцах около ПД (Lim et al., 2009; Verchot, 2022).

Соотношение количеств белков TGB2 и TGB3 является важным для транспорта, при его изменении могут происходить нарушения в перемещении вируса к ПД и в межклеточном транспорте (Verchot-Lubicz et al., 2010). Было показано, что нормальная TGB3-зависимая локализация TGB1 и TGB2 BSMV вблизи клеточной стенки и около ПД наблюдается при соотношении TGB2 к TGB3,

равном 10:1, что соответствует природному соотношению этих белков для BSMV (Lim et al., 2009). При вирусной инфекции белки TGB1-3 экспрессируются в нативном соотношении 100:10:1 (Jackson et al., 2009).

Данные о способности белков TGB увеличивать ППС являются противоречивыми (Solovyev et al., 2022). Так, в случае ротекс-подобных TGB, для TGB1 PVX и white clover mosaic potexvirus (WCIMV) в ряде исследований показана способность увеличивать ППС (Angell et al., 1996; Howard et al., 2004; Lough et al., 1998), тогда как в другой работе было обнаружено, что основную роль в увеличении ППС играет TGB2, но не TGB1 и TGB3 (Tamai, Meshi, 2001). Для TGB2 PMTV показана способность взаимодействовать с клеточными белками TIP1-3 (TGB12K-interacting proteins), которые, в свою очередь, могут взаимодействовать с β -1,3-глюканазой и вызывать деградацию каллозы около ПД, что приводит к увеличению ППС (Fridborg et al., 2003; Solovyev et al., 2022).

Многие вирусы растений при заражении клеток вызывают образование в них довольно крупных структур, которые исторически получили название X-телец (Smith, 1930). Образование X-телец хорошо изучено для PVX; показано, что эти структуры представляют собой ВРК (Linnik et al., 2013; Tilsner et al., 2012). Для образования X-телец необходим белок TGB1, роль которого заключается в рекрутировании актинового цитоскелета и эндомембранный системы клетки (в основном мембран ЭПР), а также белков TGB2 и TGB3, которые тоже локализуются в X-тельцах, при этом похожие образования формируются белками TGB в клетке и в отсутствие других вирусных белков и генома вируса (Tilsner et al., 2012). Другие исследования показывают, что рекрутирование TGB2 в X-тельца происходит без участия TGB1 и TGB3, но зависит от репликации PVX (Wu et al., 2019). Ядро X-тельца формируется агрегатами TGB1, вокруг которых находятся сильно измененные, «перекрученные» в кольцеобразные структуры мембранны ЭПР, содержащие TGB2 и TGB3. Образование кольцеобразных структур из ретикулярных мембран ЭПР происходит благодаря активности TGB2 (Linnik et al., 2013), и от TGB2 зависит локализация TGB3 (Wu et al., 2019). Также в X-тельцах

находится РНК вируса, причем во внутренней его части в виде свободной РНК, а по периферии Х-тельца – в составе вирионов (Linnik et al., 2013; Tilsner et al., 2012). Другие данные указывают на локализацию на периферии Х-телец и свободной, и заключенной в капсид РНК вируса (Wu et al., 2019). В Х-тельцах зараженных клеток были обнаружены скопления репликазы вируса и образуемые ею двухцепочечные РНК-продукты репликации, при этом показано, что сама репликаза PVX взаимодействует с TGB2, скопления которого окружают область локализации репликазы (Wu et al., 2019). Репликаза PVX клеточном лизате формирует способные к репликации высокомолекулярные комплексы (Yoshida et al., 2019), а на модели потексвируса *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) было обнаружено, что направленное перемещение образованных репликазой комплексов к местам дальнейшей репликации в ЭПР зависит от собственных активностей белка и может происходить в отсутствие других белков вируса (Komatsu et al., 2021). Эти работы подтверждают важную роль репликазы PVX в инициации формирования ВРК, которые затем могут быть преобразованы в Х-тельца, в образовании которых ключевую роль отводят белку TGB2 (Solovyev et al., 2022). Таким образом, репликация PVX происходит в довольно сложных организованных ВРК, которые можно рассматривать в качестве обособленных компартментов, в которых реплицированная геномная РНК, а также образующиеся при репликации дуплексы РНК могут быть изолированы от клеточных систем узнавания и защиты. Помимо этого, создание подобного репликативного компанентта может способствовать 1) концентрации в ВРК факторов, необходимых для воспроизведения вируса, 2) уменьшению вреда, наносимого клетке вирусной инфекцией (Sanfaçon, 2006), 3) препятствованию преждевременного взаимодействия расположенного в ядре Х-тельца TGB1 с вирионами PVX, что привело бы к дестабилизации структуры вириона (Linnik et al., 2013; Rodionova et al., 2003).

Современная модель транспорта TGB-содержащих вирусов лучше всего разработана для вирусов с потекс-подобными TGB на примере PVX и предполагает

сопряжение процессов транспорта с репликацией вируса, модификацией клеточных мембран и формированием ВРК (Solovyev et al., 2022). Считается, что сначала собираются ВРК, состоящие из репликазы и TGB2, который придает этим комплексам способность перемещаться внутри клеток, затем, благодаря взаимодействиям TGB2 с TGB1 и TGB3, а также TGB1 с TGB3 происходит образование X-тельца, которое затем приобретает способность направлено транспортироваться к ПД при участии актинового цитоскелета (Solovyev et al., 2022). В ассоциированном с ПД ВРК продолжается репликация вируса, при этом новые образованные вирионы или вирусные РНП способны сразу же перемещаться через ПД в соседние клетки (Solovyev et al., 2022; Tilsner et al., 2013). Предполагается, что благодаря такому сопряжению репликации и перемещения через ПД может достигаться значительная эффективность транспорта вируса (Solovyev et al., 2022; Wu, Cheng, 2020).

Описанный выше механизм транспорта был подтвержден и уточнен в недавней работе, посвященной исследованию apple stem pitting virus (ASPV), геном которого содержит ротекс-подобный TGB (Li et al., 2024b). Было показано, что TGB2 ASPV играет ключевую роль в образовании X-телец и взаимодействует с TGB1, TGB3 и СР, привлекая их в первичный репликативный компартмент в перинуклеарной области. Также было обнаружено, что TGB1, TGB2 и СР колокализуются в ПД и способствуют увеличению ППС ПД, делая это самостоятельно при индивидуальной временной экспрессии в отсутствие других белков. При этом TGB1 и СР могли самостоятельно перемещаться через ПД, а TGB2 мог проникать в соседние клетки при ко-экспрессии с TGB1. Было также показано, что TGB3 ASPV без участия TGB2 формирует везикулы из мембран ЭПР и, путем взаимодействия с TGB2, захватывает в них РНП из перинуклеарных ВРК, содержащие СР, TGB1, TGB2 и геномную РНК. Затем образованные TGB3 мобильные везикулы направляются в кортикальную цитоплазму по актиновому цитоскелету, причем для функции направления к ПД белку важен сигнал сортировки у TGB3, консервативный для ротекс-подобных TGB. Доставив ВРК к ПД, TGB3, не

способный покидать клетку, направляется в эндосомы, а компоненты ВРК в виде РНП (или собранного вириона) проходят в соседнюю клетку (Li et al., 2024b). Суммируя вышесказанное, можно заключить, что, хотя на настоящий момент общая картина функционирования транспортного модуля TGB прояснилась, однако многие детали работы конкретных белков, а также потенциально взаимодействующих с ними клеточных факторов, только предстоит выяснить.

3. Происхождение и эволюция TGB

Эволюционно родственный TGB бинарный транспортный блок (BMB) был обнаружен у *Hibiscus green spot virus* (HGSV) (род *Higrevirus*, семейство *Kitaviridae* (Melzer et al., 2011). Транспортный модуль HGSV находится во второй геномной РНК вириуса, в которой расположены четыре OPT: OPT1, кодирующая 50-кДа белок с неизвестной функцией; OPT2, кодирующая белок с НТФазным/хеликазным доменом суперсемейства SF1, имеющий сходство с белком TGB1 вириусов рода *Benyvirus*; OPT3 и OPT4, кодирующие небольшие белки с гидрофобными участками, причем белок OPT3 имеет отдаленное сходство с белком TGB2 (Morozov, Solovyev, 2012; Morozov, Solovyev, 2015). Функции белковых продуктов OPT2, OPT3 и OPT4 были исследованы в экспериментах по комплементации транспорта репортерной конструкции PVX-POL-GFP, способной самостоятельно реплицироваться, но не транспортироваться из клетки в клетку; эта способность восстанавливается при ко-экспрессии PVX-POL-GFP с гетерологичными ТБ (Lazareva et al., 2017b; Lazareva et al., 2022). Было обнаружено, что для транспорта репортерной гетерологичной конструкции необходимы и достаточны два белка, кодируемые OPT2 и OPT3, которые были названы BMB1 и BMB2, соответственно. Белковый продукт OPT4, не являющийся необходимым для вирусного транспорта в этой экспериментальной системе, может являться важным в условиях инфекции HGSV в природных хозяевах, растениях рода *Hibiscus* (Lazareva et al., 2017b).

Белок BMB2 локализуется в образованных из ЭПР мембранных тельцах, которые расположены на периферии клетки у ПД (Lazareva et al., 2017b). Транспорт

новосинтезированных молекул BMB2 в эти структуры требует наличия функционального актинового цитоскелета и, происходит по мембранам сети ЭПР, не используя СОРП-зависимый секреторный путь (Lazareva et al., 2017a; Lazareva et al., 2021b). В мембране белок BMB2 имеет W-образную топологию с C- и N-концами, а также центральной гидрофильной петлей, расположенными в цитоплазме (Lazareva et al., 2021a). Подобной топологией обладают ретикулоны – клеточные белки, функцией которых является образование трубочек ЭПР, поддержание формы, кривизны и общей морфологии сети ЭПР (Hawes et al., 2015; Hu et al., 2008; Kriechbaumer, Brandizzi, 2020; Sparkes et al., 2010). Предполагается, что W-образная топология позволяет BMB2 изменять структуру ЭПР, увеличивая кривизну липидного бислоя и вызывая в результате констрикцию трубочек ЭПР (Lazareva et al., 2021a). Воздействие BMB2 на ЭПР приводит к образованию телец из плотно переплетенных и измененных мембран ЭПР, имеющих сходство с X-тельцами (Atabekova et al., 2023a; Lazareva et al., 2021a).

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные и данные анализа транскриптомов позволяют сделать некоторые выводы относительно вероятной эволюции TGB. Например, в результате обработки транскриптомных данных *Litchi chinensis* и *Lathyrus sativus* были получены вирус-подобные контиги (virus-like RNA assemblies, VLRA) Lc-VLRA и Ls-VLRA, соответственно, которые содержат последовательности транспортных модулей, сходные с BMB HGSV, хотя в остальном их геномная организация сходна скорее с организацией геномов представителей семейств *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae*; и при этом у Lc-VLRA и Ls-VLRA также отсутствует OPT для TGB3 (Morozov, Solovyev, 2003; Morozov, Solovyev, 2015). Было показано, что два заражающих маниок вируса из рода *Potexvirus*, Cassava virus X (CsVX) и Cassava new alphaflexivirus (CsNAV), имея общую организацию транспортного блока, типичного для potex-подобных вирусов, не содержат TGB3, но при этом CsVX был способен заражать неприродного хозяина *N. benthamiana*, а CsNAV – нет (Lozano et al., 2017; Morozov, Solovyev, 2020). Также Ap-VLRA из транскриптома *Andrographis paniculata* содержит OPT

для TGB1 и TGB2, за которыми сразу следует OPT для белка капсида, и при этом отсутствует OPT для TGB3 (Solovyev, Morozov, 2017). Эти данные указывают на справедливость гипотезы о вспомогательной роли белков TGB3, которые характеризуются наибольшим разнообразием по сравнению с другими белками TGB, и позволяют предложить следующий сценарий эволюции TGB (Solovyev, Morozov, 2017).

Первым этапом становления TGB могло быть приобретение геномом предкового вируса белка TGB1 с хеликазным/НТФазным доменом, возникшим вследствие дупликации домена репликативной РНК-хеликазы и дальнейшей его специализацией с приобретением новых функций – изначально функции супрессора сайленсинга, а затем транспортной функции (Morozov, Solovyev, 2012). В дальнейшем эволюция могла идти по пути возникновения у предшественника белков TGB1 способности связываться с мембранами, или же приобретения вирусным геномом генов дополнительных белков, взаимодействующих с мембранами, и белков, которые могли бы одновременно взаимодействовать и с TGB1 и/или с РНП вируса. Так, предполагают, что вторым этапом эволюции стало приобретение белка TGB2, который мог возникнуть, путем горизонтального переноса генов или благодаря сдвигу в рамке С-концевого участка расположенного перед ним гена, предка TGB1, который кодировал в этом участке последовательность гидрофобного домена (Morozov, Solovyev, 2015). Приобретение TGB3, как полагают, является более поздним событием, которое могло произойти путем возникновения *de novo* дополнительной OPT, значительно перекрывающейся с TGB2. Вышеупомянутые данные, а также различия в строении белков TGB3 позволяют сделать вывод о том, что ген TGB3 был приобретен разными группами TGB-содержащих вирусов независимо после их эволюционного расхождения от общего предка и, возможно, в связи с приспособлением к разным растениям-хозяевам (Morozov, Solovyev, 2003; Morozov, Solovyev, 2015). Важной чертой возникших в результате эволюции вариантов TGB является перекрывание их OPT, благодаря чему достигается скоординированная экспрессия

функционирующих вместе генов и оптимальное соотношение их белковых продуктов (Morozov, Solovyev, 2015; Verchot-Lubicz et al., 2010).

4. РНК-сайленсинг в растениях

РНК-сайленсинг – один из фундаментальных эукариотических механизмов регуляции экспрессии генов, поддержания целостности и функционирования генома, запуска и координации программ развития и ответа на различные воздействия, а также защиты эукариот от вирусов (Baulcombe, 2002; Ghildiyal, Zamore, 2009; Voinnet, 2005). Именно при изучении вирусных инфекций на растениях (Lindbo et al., 1993; Vlugt van der et al., 1992), а также ответов растения на экспрессирующиеся трансгены (Kumagai et al., 1995; Napoli et al., 1990), были получены первые косвенные данные о процессе РНК-сайленсинга, которые, в совокупности с данными об ингибировании экспрессии антисмысловыми транскриптами (Fire et al., 1991; Izant, Weintraub, 1984), в значительной степени предопределили открытие двухцепочечной РНК (дцРНК) в качестве основного действующего участника РНК-сайленсинга в работе на *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Роль малых РНК в противодействии вирусной инфекции была также впервые показана на растениях (Hamilton, Baulcombe, 1999).

4.1. Общий механизм РНК-сайленсинга в растениях

Малые РНК имеют длину 20-30 нуклеотидов. Общий путь биогенеза малых РНК в растениях можно кратко представить следующим образом (Ghildiyal, Zamore, 2009). На первом этапе длинный двухцепочечный фрагмент РНК процессируется, как правило, с помощью рибонуклеазы DCL (Dicer/Dicer-like RNase-III). В результате активности DCL, в зависимости от типа дцРНК и типа DCL, образуются двухцепочечные продукты длиной 21-24 нуклеотида и имеющие следующие общие черты: двухнуклеотидные выступы на обоих 3'-концах дуплекса; каждая цепь несет фосфатные группы на 5'-концах, а также 2'- и 3'-гидроксильные группы (2'ОН и 3'ОН) на 3'-конце; 2'ОН 3'-концевого остатка рибозы метилируются с помощью метилтрансферазы малых РНК HUA Enhancer 1

(HEN1) (Wang et al., 2019; Yang et al., 2006). Затем собирается многокомпонентный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), в котором дуплекс малых РНК (РНК/РНК*) связывается одним из белков-аргонавтов (ARGONAUTE, AGO), основным белком RISC (Hammond et al., 2000). AGO расплетает дуплекс малых РНК, при этом одна цепь остается в комплексе с AGO, а вторая, которую называют пассажирской (РНК*), деградирует (Baulcombe, 2004). Связанный с малой РНК белок AGO по принципу комплементарности распознает РНК-мишени и связывает их, приводя либо (1) к разрушению последних благодаря эндонуклеазной активности AGO; либо (2) к остановке трансляции, проходящей на матрице РНК-мишени; либо (3) к метилированию ДНК и гистонов транскрибируемого локуса, в случае узнавания образуемого полимеразой polV транскрипта; либо же (4) к инициации образования вторичных малых РНК путем привлечения RdRp (Baumberger, Baulcombe, 2005; Voinnet, 2009).

Малые РНК разделяют на две группы – микроРНК (англ. miRNA) и малые интерферирующие РНК (англ. siRNA).

В отличие от животных, биогенез miRNA у растений происходит полностью в ядре, начиная от транскрипции соответствующего локуса и заканчивая загрузкой дуплекса в AGO1 и удалением miRNA*, и из ядра выходит уже комплекс AGO1, связавший направляющую miRNA (Bologna et al., 2018). Гены miRNA транскрибируются РНК полимеразой II с образованием транскриптов, полиаденинированных на 3'-конце и несущих 5'-кэн. Такие транскрипты называются pri-miRNA и они содержат несовершенную шпилечную структуру. Данная структура затем процессируется (Wang et al., 2019). У растений нет гомологов РНКазы III Drosha, белка, который процессирует pri-miRNA в pre-miRNA у животных. У растений весь процессинг предшественников miRNA осуществляет DCL1 в ядерных D-тельцах (dicing bodies) (Fang, Spector, 2007; Laubinger et al., 2008). В D-тельцах DCL1, в комплексе с дцРНК-связывающим белком HYPONASTIC-LEAVES1 (HYL1) и белком с доменом типа «цинковые пальцы» SERRATE (SE), осуществляет две последовательные эндонуклеазные

реакции, приводящие к образованию дуплекса miRNA (Tang et al., 2022; Xie et al., 2020). Дуплекс затем метилируется HEN1, который также расположен в D-тельцах и взаимодействует сAGO1 и HYL1 (Baranausk et al., 2015; Huang et al., 2009; Pontes et al., 2013; Xie et al., 2004).

Неметилированные дуплексы miRNA и siRNA разрушаются. Например, незащищенные с помощью 2'-О-метилирования дуплексы могут подвергаться нематричному 3'-полиуридилированию нуклеотидилтрансферазой HEN1 SUPPRESSOR1 (HESO1) и ее функциональным паралогом UTP:RNA URIDYLIC TRANSFERASE 1 (URT1), что приводит к последующей деградации малых днкРНК (Ren et al., 2012; Tu et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2012). Для HESO1 и URT1 также была показана способность узнавать и полиуридилировать дуплексы, находящиеся в комплексе сAGO (Tu et al., 2015). Другой способ заключается в узнавании неметилированных miRNA и их разрушении экзорибонуклеазами. Например, было показано, что в разрушении неметилированных miRNA играет роль экзорибонуклеаза Atrimmer 2 (ATRM2), которая способна физически взаимодействовать с комплексомAGO1, и, как предполагается, на этапе сбора RISC, предшествующем расплетению дуплекса miRNA, может узнавать неметилированные малые РНК, приводя к их деградации (Wang et al., 2018b). Таким образом, нарушение биогенеза дуплексов малых РНК может разными способами влиять на сборку RISC и функционирование дальнейших этапов сайленсинга.

Биогенез siRNA может происходить и в ядре, и в цитоплазме с помощью DCL4, DCL2 и DCL3 которые процессируют длинные днкРНК с высокой степенью комплементарности, давая совершенные дуплексы siRNA длиной 21, 22 или 24 нуклеотида. 21-нт дуплексы siRNA образуются в цитоплазме при помощи DCL4, за биогенез 24-нт дуплексов siRNA в ядре отвечает DCL3, а DCL2 способен образовывать 22-нт продукты в любом из этих компартментов (Vaucheret, Voinnet, 2024). За метилирование предшественников siRNA в цитоплазме также отвечает белок HEN1 (Fang, Spector, 2007; Yang et al., 2006).

DCL3 функционирует в транскрипционном сайленсинге генов и работает с продуктами активности RDR2, которые данная полимераза синтезирует, используя в качестве матричной цепи продукт транскрипции PolIV (Matzke, Mosher, 2014). Получаемые 24-нт дуплексы метилируются HEN1 и загружаются в AGO4, направляя его к комплементарным транскриптам, синтезированным полимеразой PolV, что в дальнейшем приводит к привлечению к транскрибуируемому PolV участку систем метилирования ДНК. Таким образом происходит РНК-зависимое метилирование ДНК, необходимое для супрессии мобильных элементов и контроля активности генов (Matzke, Mosher, 2014). Многие участники данного процесса (например, DCL3, RDR2, AGO4) ко-локализуются в ядре в тельцах Кахаля (Li et al., 2006; Pontes et al., 2006). У однодольных за продукцию 24-нт siRNA отвечает также DCL5, родственный DCL3, и отличающийся от него предпочтениями к субстрату (Chen et al., 2022; Teng et al., 2020). DCL3 также может отвечать за противовирусный ответ растения в случае заражения ДНК-вирусами (Aregger et al., 2012).

DCL4 функционирует в посттранскрипционном сайленсинге генов (ПТСГ) и является важным участником процессов, связанных с биогенезом трансдействующих siRNA (ta-siRNA) (Xie et al., 2005). Субстратами для DCL4 служат длинные дцРНК (более 100 нуклеотидов), продукты полимераз RDR1 и RDR6, а также другие встречающиеся в цитоплазме двухцепочечные РНК с высокой степенью комплементарности, которые DCL4 расщепляет с образованием 21-нт siRNA (Bologna, Voinnet, 2014; Kakiyama et al., 2019). DCL4 играет важную роль в противовирусном ответе, расщепляя вирусные репликативные интермедиаты, представляющие собой дцРНК (Leonetti et al., 2023), и способствует вирус-индуцированному сайленсингу в клетке (Qin et al., 2017; Qu et al., 2008). Интересно, что DCL1 способен супрессировать противовирусную активность DCL4 путем подавления его экспрессии (Qu et al., 2008).

Образуемые DCL2 22-нт дуплексы siRNA обычно рассматриваются как одни из основных участников противовирусного ответа в клетке (Lopez-Gomollon,

Baulcombe, 2022). Для DCL2 показана роль в распространении защитного ответа на вирус в соседние клетки, DCL2 способствует межклеточной передаче вирус-индуцированного сайленсинга, в то время как DCL4, наоборот, ингибирует ее (Qin et al., 2017). Способность DCL2 образовывать 22-нт дуплексы siRNA важна для стимуляции транзитивности ПТСГ, процесса, который приводит к образованию и накоплению большого количества вторичных siRNA (Mlotshwa et al., 2008). Этот процесс конкурирует с DCL4-зависимым расщеплением дцРНК на 21-нт дуплексы siRNA (Qin et al., 2017). На этой конкуренции за субстрат, вероятно, основана и регуляция работы DCL4 и DCL2 (Рис. 2) – пока в цитоплазме функционирует DCL4 и его количества достаточно, чтобы процессировать подходящие ему в качестве субстрата дцРНК, образуются 21-нт siRNA, а когда количество DCL4 уменьшается, что может происходить при ингибировании DCL4 или в случае мутации *dcl4*, DCL2 процессирует дцРНК, образуя 22-нт дуплексы siRNA, что в дальнейшем может инициировать процесс транзитивности и накопления вторичных siRNA (Wu et al., 2017; Zhang et al., 2015).

Геном арабидопсиса кодирует десять генов AGO, которые делятся на три филогенетические группы: (1) AGO1, AGO5 и AGO10; (2) AGO2, AGO3 и AGO7; (3) AGO4, AGO6, AGO8 и AGO9 (Bologna, Voinnet, 2014; Mallory, Vaucheret, 2012). Специфичность белков AGO к дуплексам siRNA определяется длиной последних, а также нуклеотидом на 5'-конце. Так, AGO1 и AGO2 предпочитают siRNA длиной 21-нт и имеющие 5'U или 5'A, соответственно, а AGO5 взаимодействует с 21/24-нт siRNA с 5'C. AGO4 и похожие на него AGO6 и AGO9 предпочитают 24-нт siRNA с 5'A (Vaucheret, Voinnet, 2024). При этом нуклеотидные остатки в позициях 2, 6, 9 и 13 в siRNA также могут быть важны (Thieme et al., 2012). AGO7 и AGO10 являются очень специфическими и ассоциированы практически только с биогенезом и функционированием miR390 и miR165/166, соответственно (Bologna, Voinnet, 2014).

В то время как для AGO5 и AGO10 характерна определенная тканеспецифичность экспрессии и конкретные функции в онтогенезе, AGO1,

связывая 21-нт и 22-нт РНК-продукты активности DCL4 и DCL2, играет ключевую роль в ПТСГ, в том числе опосредованном miRNA, а также в антивирусном сайленсинге (Bologna, Voinnet, 2014; Pumplin, Voinnet, 2013; Zhao et al., 2023). Часть AGO1 локализуются рядом с мембранами ЭПР благодаря взаимодействию с интегральным белком ЭПР ALTERED MERISTEM PROGRAM1 (AMP1) (Li et al., 2013). Локализация и функционирование AGO1 около ЭПР наблюдается преимущественно в сайтах, осуществляющих опосредованную miRNA супрессию трансляции и деградацию мРНК, а также биогенез поэтапно образующихся вторичных siRNA (phasiRNA) (Blagojevic et al., 2024; Fei et al., 2013; Li et al., 2016).

Как было показано для AGO1, который изучен лучше всего, сборка RISC и загрузка дуплексов siRNA или miRNA является АТФ-зависимым процессом и требует активности белков HSP70/HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN, HSP), шаперонов, участвующих в фолдинге и конформационных изменениях разных белков (Iki et al., 2010; Tang et al., 2022). При этом исключение антисмысловой цепи siRNA из связанного дуплекса требует эндонуклеазной активности AGO, но для высвобождения miRNA* достаточно простого расплетения несовершенного дуплекса (Iki et al., 2010). В сборке RISC в ядре также участвует Constitutive Alterations in the Small RNAs Pathways9 (CARP9), который взаимодействует с HYL1, зрелыми дуплексами miRNA и с AGO1, способствуя загрузке в него дуплексов miRNA (Tomassi et al., 2020). Также роль регуляции загрузки AGO1 была показана для двух белков из семейства импортинов β , однако влияние этих белков является противоположным. Так, ENHANCED miRNA ACTIVITY1 (EMA1) препятствует накоплению miRNA, вероятно нарушая систему их образования на уровне загрузки в AGO1 (Wang et al., 2011a), а TRANSPORTIN1 (TRN1) взаимодействует с AGO1, способствуя загрузке в него дуплексов miRNA и, вероятно, выступая в качестве белка-платформы для образования комплексов биогенеза miRNA (Cui et al., 2016).

Функции AGO2 во многом перекрываются с AGO1 (Bologna, Voinnet, 2014). AGO2 локализуется преимущественно в цитоплазме, но в некоторых случаях

может располагаться и в ядре (Oliver, Martinez, 2022). Основная рольAGO2, видимо, проявляется при противовирусной защите клетки (Alvarado, Scholthof, 2012; Brosseau et al., 2020; Harvey et al., 2011).AGO3, как иAGO4,AGO6 иAGO9, функционируют в основном в транскрипционном сайленсинге генов, связывая 24-нт siRNA и обеспечивая эпигенетическую регуляцию экспрессии генов путем метилирования ДНК и гистонов (Duan et al., 2015; Zhang et al., 2016b; Zilberman et al., 2003).

Ранее считали, что зрелые дуплексы miRNA у растений выходят из ядра с помощью белка HASTY (HST) (Bologna, Voinnet, 2014). Позднее, однако, обнаружили, что способность HASTY перемещаться между ядром и цитоплазмой никак не связана с биогенезом miRNA, а HASTY выступает в качестве белка-платформы для процессинга pre-miRNA, связывая DCL1 с компонентом медиаторного комплекса MED37 и, таким образом, с позволяя привлекать DCL1 к транскрибуемому локусу гена miRNA (Cambiagno et al., 2021). Также интересно, что получены данные об участии HASTY в межклеточном и системном транспорте дуплексов miRNA (Brioudes et al., 2021). Выход miRNA из ядра в основном происходит благодаря способности AGO1 растений самостоятельно циркулировать между ядром и цитоплазмой за счет наличия у белка соответствующих сигналов ядерной локализации и экспорта из ядра (Bologna et al., 2018). Однако же не исключается и возможность AGO1 связывать и процессировать дуплексы малых РНК и в цитоплазме.

Интересным примером регуляции РНК-сайленсинга служит отрицательная обратная связь между DCL1 и двумя РНК-продуктами его активности, miR162 и miR838, мишениями которых является мРНК DCL1 (Рис. 2). При этом miR162 напрямую приводит к расщеплению мРНК DCL1 (Xie et al., 2003), а miR838 образуется из шпилечной структуры интрана 14 транскрипта гена DCL1 и нарушает его сплайсинг (Rajagopalan et al., 2006). Также существует регуляция на уровне AGO. Например, AGO1 отвечает за образование miR403, которая супрессирует AGO2, связывая его мРНК в 3'-нетранслируемой области (Allen et al.,

2005). Вероятно, этим можно объяснить важную роль AGO2 в противовирусном ответе, когда AGO1 подавляется. Похожим образом регулируется количество AGO1 с помощью miR168, которая, связываясь с AGO1, приводит к деградации его собственных матричных РНК (Mallory, Vaucheret, 2012). В случае miR168 показано также и образование вторичных siRNA, специфических для мРНК AGO1, что указывает на важность данного способа регуляции (Mallory, Vaucheret, 2009).

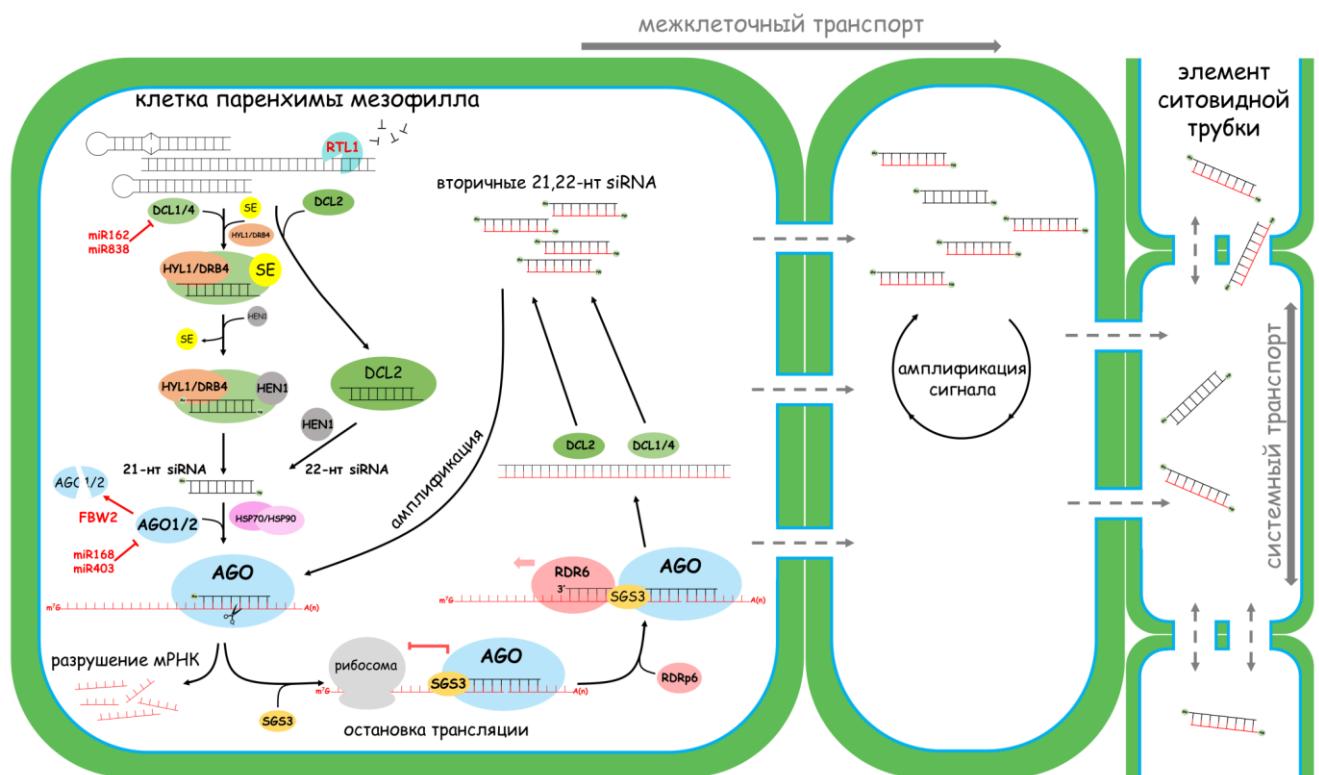


Рисунок 2. РНК-сайленсинг в растениях, опосредованный 21- и 22-нуклеотидными siRNA. В левой части рисунка показан процесс образования первичных siRNA из дцРНК (клеточные дцРНК, РНК вируса). siRNA образуют с белками AGO комплексы RISC, активность которых приводит к разрушению комплементарных РНК-мишений, либо к остановке трансляции. Также может происходить образование вторичных siRNA и амплификация сигнала сайленсинга. Образование вторичных siRNA зависит в основном от 22-нт РНК-продуктов активности DCL2 и требует привлечения SGS3 и RdRp (например, RDR6) к РНК-мишени, узнанной комплексом белка AGO с соответствующей siRNA. Образованная RdRp дцРНК процессируется затем белками DCL до вторичных 21,22-нт РНК. Дальше сигнал сайленсинга усиливается благодаря образованию новых вторичных siRNA (амплификация). siRNA способны перемещаться через каналы плазмодесм в соседние клетки (межклеточный транспорт сигнала сайленсинга) и распространяться по сосудистой ткани через ситовидные каналы флоэмных элементов (системный транспорт сигнала сайленсинга). Красные стрелки показывают внутриклеточные механизмы контроля процесса сайленсинга, см. пояснения в тексте. Рисунок сделан путем адаптации изображения из Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022.

4.2. Амплификация РНК-сайленсинга

Как отмечалось выше, вторичные siRNA в цитоплазме являются продуктами расщепления длинных дцРНК, возникающих в результате активности РНК-зависимых РНК-полимераз (RDR1 и RDR6), в основном RDR6 (Huang et al., 2016; Willmann et al., 2011) (Рис. 2). RDR2 функционирует в ядре в процессе транскрипционного сайленсинга (Bologna, Voinnet, 2014; Lu et al., 2006; Wassenegger, Krczal, 2006). Для образования дцРНК необходимо, чтобы белок RdRp узнал мишень на оцРНК, связался с ней и начал синтезировать комплементарную цепь РНК. Важную роль в привлечении RdRp выполняют белки SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) и SILENCING DEFECTIVE 5 (SDE5) (Yoshikawa et al., 2021). SGS3 узнает и связывает выступающий 3'-концевой нуклеотид малой РНК, которая находится в комплексе сAGO на узнанной и порезанной им РНК-мишени (Iwakawa et al., 2021; Yoshikawa et al., 2021). Образованные DCL2 22-нт малые РНК используются чаще для привлечения SGS3, поскольку они длиннее 21-нт, и дополнительный нуклеотид выступает за пределыAGO в собранном на оцРНК комплексе, являясь доступным для связывания SGS3. Таким образом,AGO1, связывающий большинство малых РНК, не может инициировать процесс образования дцРНК, будучи в комплексе с 21-нт малыми РНК. Однако, 21-нт miRNA (например, miR390), могут тоже использоваться в этом процессе, но в комплексе сAGO7, размеры которого, видимо, также позволяют SGS3 связать 3'-концевой нуклеотид (Iwakawa et al., 2021; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Связывание комплекса из белкаAGO и 22-нт siRNA с РНК-мишенью, помимо ее расщепления, приводит также к остановке трансляции (ribosome stalling), что благоприятно влияет на биогенез вторичных siRNA (Iwakawa et al., 2021). SGS3 обеспечивает привлечениеRdRp на 5'-выступающий фрагмент порезанной РНК для начала синтеза дцРНК, причем инициация для разных RdRp может зависеть или не зависеть от 3'-концевого нуклеотида в качестве праймера (Tang et al., 2003; Voinnet, 2008). Было показано, что инициация образования дцРНК белками RDR2 и RDR6 арабидопсиса может происходить на

матрице РНК как с использованием праймера, так и независимо от его наличия (Devert et al., 2015). Образованную RdRp д^цРНК затем процессирует DCL4, реже DCL2, образуя вторичные siRNA (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). При этом образованные вторичные siRNA распознают мишени уже не в изначальном участке связывания RISC с первичной малой РНК, а перед ним в сторону к 5'-концу мишени, многократно усиливая сайленсинг (de Felippes, Waterhouse, 2020; MacLean et al., 2010). Также, если в участке процессируемой РНК, расположенному после первоначального сайта узнавания, имеются области, комплементарные каким-либо другим РНК в клетке, то в дальнейшем сайленсинг может распространяться и на них (например, в случае транс-действующих siRNA) (Deng et al., 2018). Таким образом работает механизм транзитивности (de Felippes, Waterhouse, 2020).

4.3. Транспорт сигнала сайленсинга

Малые РНК, как это следует из косвенных данных, могут перемещаться между клетками по ПД и транспортироваться системно по флоэму (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022) (Рис. 2). Прямых данных, показывающих механизм транспорта малых РНК, на настоящий момент нет. Как полагают, транспорт малых РНК происходит в свободной форме, однако связывающиеся с ними белки AGO, в основном AGO1 и AGO2, способны вытитровывать из пула транспортируемых малых РНК дуплексы с 5'-У и 5'-А в соответствии со своим сродством к ним. Таким образом, среди транспортируемых межклеточно малых РНК повышенено содержание дуплексов с С/Г на 5'-конце (Devers et al., 2020; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Учитывая, что соотношение типов AGO в клетках разных тканей может отличаться, растения способны контролировать соотношения переносимых по организму малых РНК как локально, так и системно (Voinnet, 2022). Для мобильных малых РНК в растении можно обозначить несколько характеристик: (1) отличия подвижности одних малых РНК от других в зависимости от их собственных свойств; (2) зависимость подвижности от соотношения количеств разных по специфичности AGO в клетках, по которым происходит транспорт; (3) направленность транспорта, то есть транспорт в определенном направлении или в

ограниченной области конкретной ткани; (4) различающаяся дальность действия разных мобильных малых РНК (Brosnan et al., 2019; Voinnet, 2022). Таким образом, малые РНК являются не только супрессорами экспрессии генов, но играют также важные роли в регуляции сигналинга, позиционной информации для клеток и тканей, в сообщении между удаленными частями растения и в контроле программ роста и развития (Skopelitis et al., 2018).

4.4. Некоторые эндогенные механизмы контроля РНК-сайленсинга

В клетке, помимо упомянутых выше, существуют другие собственные механизмы регуляции сайленсинга. Один из них реализуется с участием кальмодулин-подобного белка rgs-CaM (regulator of gene silencing-calmodulin-like protein). Предполагается, что rgs-CaM способен супрессировать сайленсинг путем воздействия на биогенез вторичных siRNA (Anandalakshmi et al., 2000; Li et al., 2014). Еще одним примером могут служить белки, подобные РНКазам-III, например, RNASE THREE-LIKE 1 (RTL1), который активируется в инфицированных растениях и разрушает днкРНК, в том числе днкРНК вирусного происхождения, однако из-за этого разрушаются и днкРНК, которые могли бы стать субстратом для DCL, таким образом белок способен супрессировать образование siRNA (Shamandi et al., 2015). Другой путь связан с деградацией белкаAGO при его связывании с не свойственной малой РНК. На арабидопсисе было показано, что F-box содержащий белок FBW2 способствует селективной деградации AGO1, не связанного с нормальной для AGO1 малой РНК, мутация *fbw2* приводит к усилению сайленсинга, а неспособный к деградации AGO1 начинает связывать не свойственные для него малые РНК и ошибочно разрезать РНК-мишени (Hacquard et al., 2022). Предполагается, что в данном случае AGO или комплекс AGO с «неправильной» малой РНК узнается системами убиквитин-лигаз и отправляется на расщепление по пути автофагии и/или по пути протеасомной деградации (Derrien et al., 2012; Hacquard et al., 2022).

4.5. РНК-сайленсинг как ответ растения на вирусную инфекцию

В контексте ответа растения на вирусную инфекцию есть смысл говорить в первую очередь про siRNA, их биогенез и функционирование, так как основная функция miRNA заключается в контроле программ роста и развития растения, а также ответа на внешние факторы и стрессы.

При репликации РНК-геномов вирусов в клетках образуются дцРНК, которые, хотя и могут потенциально служить мишениями для DCL, как было сказано выше, часто изолированы от системы сайленсинга белками вируса и образованными репликативными компартментами. Для правильного функционирования противовирусного сайленсинга необходимо отличать вирусные РНК от собственных РНК клетки, которые также могут служить мишениями для деградации и образования вторичных siRNA в случае их узнавания для 21- и 22-нг малыми РНК (Chen et al., 2010; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Отчасти клеточные РНК защищены от сайленсинга и деградации различными рибонуклеазами благодаря 5'-кэпу, полиаденилированному 3'-концу, связанным с мРНК многочисленными белками, контролирующими время их функционирования в клетке, – структурами, препятствующими связыванию клеточных мРНК компонентами систем деградации (Liu, Chen, 2016). Однако, подобные защитные структуры могут иметь и РНК вируса. Вероятно, при массовой продукции и накоплении вирусного материала внутри клетки может происходить вытитровывание систем защиты РНК от сайленсинга и новые образующиеся вирусные РНК – одноцепочечные и двухцепочечные продукты репликации и транскрипции РНК вируса – становятся доступными для систем деградации РНК: распознанные дцРНК процессируются DCL1 и DCL2, и запускается масштабный противовирусный ответ, включающий производство вторичных siRNA (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Также можно полагать, что участники процесса сайленсинга способны взаимодействовать с РНК вируса в образованных вирусом специфических компартментах, куда не попадают факторы защиты РНК от

деградации, однако нет прямых данных, подтверждающих эту гипотезу (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022).

Мобильные малые РНК, являющиеся продуктами расщепления вирусной дцРНК (вирусные siRNA), могут распространяться по клеткам вместе с вирусной инфекцией или опережая ее распространение; попадая в клетку и связываясь с белкамиAGO, эти малые РНК могут запускать противовирусную защиту в новозараженных клетках гораздо быстрее или даже обеспечивать устойчивость клеток к заражению в случае опережения распространения вируса (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Преимущественную роль в противовирусном сайленсинге играет DCL2, так как образуемые им 22-нт продукты в комплексе сAGO могут с большей эффективностью привлекать SGS3 и RDR6 к РНК-мишеням и вызывать остановку рибосом и инициировать продукцию вторичных siRNA, которые в дальнейшем будут распространяться межклеточно и системно (Parent et al., 2015; Wang et al., 2018a; Wang et al., 2018c). DCL1 и DCL4, продуктами которых являются 21-нт дуплексы siRNA, также могут функционировать в противовирусном ответе, в том числе в образовании вторичных вирусных siRNA (Blevins et al., 2006; Bouché et al., 2006; Parent et al., 2015). Для разных вирусов и растений-хозяев было показано функционирование разных белковAGO в противовирусном сайленсинге. Так, у арабидопсиса по меньшей мере пять белковAGO (AGO1, AGO2, AGO4, AGO5 и AGO10) играют роль в противовирусном ответе растения, основные защитные функции при этом выполняют AGO1 и AGO2 (Carbonell, Carrington, 2015). AGO2 является необходимым для ответа растения на некоторые вирусные инфекции, например, инфекцию cucumber mosaic virus (CMV, сем. *Bromoviridae*) и turnip crinkle virus (TCV, сем. *Tombusviridae*), которые кодируют вирусные супрессоры РНК-сайленсинга (BCP), специфически ингибирующие AGO1 (Azevedo et al., 2010; Thomas et al., 2003; Zhang et al., 2006). AGO1, таким образом, может представлять первый уровень защиты от вируса и, пока AGO1 в клетках имеется в достаточном количестве, путем отрицательной регуляции через miR403 AGO1 подавляет AGO2. При ингибировании AGO1

белками ВСР негативная регуляцияAGO2 снимается, повышается уровень синтезаAGO2, который представляет собой второй уровень противовирусной защиты(Harvey et al., 2011).

Таким образом, сайленсинг вируса, возникший в инфицированном вирусом органе растения, может распространяться по всему растению, делая его устойчивым к данному вирусу (Melnyk et al., 2011). Однако, степень влияния мобильных вирусных siRNA на защиту растения сильно различается в зависимости от вида растения и заражающего его вируса (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Например, в растениях *N. benthamiana*, инфицированных PVX, мобильные вирусные siRNA способны защитить от вируса апикальную меристему, и этот процесс зависит от активности RDR6 в апикальных тканях (Schwach et al., 2005). Данные по гибридизации *in situ* показали, что вирусные siRNA не препятствуют начальным стадиям инфекции мутантного варианта томбусвируса *Cymbidium ringspot tombusvirus* (CymRSV) с дефектным ВСР (мутация в гене белка p19), а также не влияют на его продвижение по флоэме, однако ингибируют распространение вируса по основным тканям после выгрузки из флоэмы, тем самым не допуская общей инфекции (Havelda et al., 2003). Для арабидопсиса, зараженного oilseed rape mosaic virus (ORMV), показано, что вирусные siRNA не влияли на накопление вирусной РНК, однако блокировали проявление симптомов и экспрессию белков вируса, что говорит о супрессии трансляции путем ПТСГ (Kørner et al., 2018; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022).

Классическим экспериментом, демонстрирующим сайленсинг и его распространение на соседние клетки, служит временная экспрессия GFP в трансгенных растениях *N. benthamiana* линии 16с, конститутивно экспрессирующей локализованный в ЭПР GFP. Если в листе растения 16с локально экспрессировать трансген GFP (например, методом агробактериальной инфильтрации), вокруг локуса экспрессии привнесенной конструкции будет наблюдаться сайленсинг эндогенно экспрессирующегося GFP. Этот эффект можно наблюдать визуально по исчезновению флуоресценции GFP на расстоянии в 10-15

клеток вокруг локуса (Himber et al., 2003; Voinnet et al., 1998). В дальнейшем в клетках, до которых дошли мобильные siRNA, может начинаться образование вторичных siRNA, таким образом сигнал способен амплифицироваться и распространяться по растению, в том числе и системно (Hamilton et al., 2002). В том случае, если в локусе ко-экспрессируется белок-супрессор сайленсинга, способный вытитровывать siRNA из пула доступных для сайленсинга и ингибировать их транспорт или же супрессировать образование вторичных siRNA, зона исчезновения флуоресценции GFP наблюдаться не будет (Himber et al., 2003; Voinnet et al., 1999).

5. Вирусные супрессоры РНК-сайленсинга

Геномы вирусов растений кодируют белки, называемые вирусными супрессорами РНК-сайленсинга, которые подавляют сайленсинг на различных уровнях и таким образом способствуют преодолению вирусом защитных систем растения. Мишениями ВСР являются ключевые компоненты сайленсинга, такие как белки DCL,AGO, HEN1, RdRp и другие, также ВСР могут связывать siRNA, выводя их из клеточного пула и делая недоступными для систем сайленсинга, препятствовать распространению сигнала сайленсинга, или же могут переключать систему защиты растения, используя эндогенные системы регуляции (Csorba et al., 2015; Gaffar, Koch, 2019; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Различных типов ВСР достаточно много, некоторые из них уникальны для небольших групп вирусов, а другие характерны для большого количества представителей крупных таксонов. Приведенные далее примеры ВСР будут в основном белками РНК-вирусов, хотя следует отметить, что и для ДНК-вирусов растений известен и хорошо описан ряд ВСР (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022).

5.1. Примеры различных ВСР и механизмы их работы

ВСР могут рекрутировать эндогенную систему супрессии сайленсинга (Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Например, для белков HC-Pro potato virus Y (PVY, сем. *Potyviridae*), AL2 tomato golden mosaic virus (TGMV, сем. *Geminiviridae*)

и β C1 tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV, сем. *Geminiviridae*) (Anandalakshmi et al., 2000; Li et al., 2014; Yong Chung et al., 2014) показана функция влияния на супрессию сайленсинга через взаимодействие с rgs-СaМ. Также ВСР ряда вирусов способны либо активировать, либо супрессировать RTL1, конкурирующий с белками DCL за субстрат, таким образом ВСР способны подстраивать разные системы деградации днкРНК для ослабления защиты клетки (Shamandi et al., 2015).

Одной из мишеней ВСР являются белки AGO. Белок Р0 вирусов рода *Polerovirus* (сем. *Solemoviridae*) содержащий домен F-box, необходимый для взаимодействия с системой убиквитин-Е3-лигазы и ее сборки, способен связывать AGO1 и приводить к его деградации путем автофагии (Bortolamiol et al., 2007; Derrien et al., 2012; Derrien et al., 2018; Pazhouhandeh et al., 2006). Показано, что ATG8-interacting 1 и 2 (ATI1 и ATI2), интегральные белки мембран направляющихся к вакуоли везикул, способны взаимодействовать с AGO1 и таким образом влиять на РНК-сайленсинг (Michaeli et al., 2019). Белок Р0 способен образовывать связанные с ЭПР тельца, куда он направляет часть молекул белка AGO1. Далее эти тельца отправляются в вакуоли, вероятно, для последующей деградации. В этом процессе формирования и отправки к вакуоли AGO1-содержащих телец важную роль играют ATI1/2, взаимодействующие с AGO1, а также с ATG8a (AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN 8a), одним из основных белков, организующих мембранны автофагосом и взаимодействующих с рецепторами мишеней автофагии (Bu et al., 2020; Michaeli et al., 2019). Следует также заметить, что взаимодействие между перечисленными клеточными белками наблюдается и в отсутствие вирусного белка Р0, что, видимо, играет роль в регуляции эндогенных процессов (Derrien et al., 2012).

В другой недавней работе было показано, что белок НС-Pro потивирусов супрессирует сайленсинг, воздействуя на AGO1 (Pan et al., 2025). НС-Pro TuMV физически взаимодействует с HEN1, ингибирует его метилтрансферазную активность, а также связывается с ключевым участником автофагии ATG8a и

рекрутирует оба белка в образованные HC-Pro тельца (Н-тельца) (Bu et al., 2020; Pan et al., 2025). Также HC-Pro опосредованно взаимодействует сAGO1, привлекая его в Н-тельца, вероятно, через посредство белка RPL18B (RIBOSOMAL PROTEIN L18B (Ivanov et al., 2016)), и вызывая его деградацию по пути автофагии, таким образом нарушая образование метилированных дуплексов малых РНК, формирование RISC и РНК-сайленсинг (Pan et al., 2025). Для другого ВСР TuMV, VPg, показана способность взаимодействовать с SGS3 и вызывать его деградацию путем автофагии и протеасомного расщепления (Cheng, Wang, 2017), а также супрессировать зависимую от NONEXPRESSOR OF PR1 (NPR1) направленную автофагию HC-Pro (Hafrén et al., 2018). По всей видимости, процесс деградацииAGO путем автофагии более эффективен до сборки RISC (Csorba et al., 2010), что может косвенно подтверждаться данными о связи деградацииAGO с нарушением сборки RISC вследствие нарушения биогенеза дуплексов малых РНК. Процесс контроляAGO1 с помощью автофагии был показан также для собственных факторов клетки (Earley et al., 2010). Примечательно, что и внутри незараженных клетокAGO1 ко-локализуется и взаимодействует с ATG8a (Derrien et al., 2012). Таким образом, ВСР могут использовать клеточные системы контроля РНК-сайленсинга, связанные с автофагией, для супрессии сайленсинга вирусных РНК.

HC-Pro является чрезвычайно многофункциональным белком потивирусов, помимо описанных выше функций данного белка, в других системах был показан еще ряд активностей HC-Pro в качестве ВСР, например: (1) способность связывать вирусные siRNA и выводить их из пула доступных для сайленсинга, (2) способность ингибировать продукцию S-аденозил-L-метионина (источника метильных групп для HEN1) путем ингибирования ферментов метионинового цикла, (3) способность ингибировать RDR6 на уровне мРНК (Ivanov et al., 2016; Sahana et al., 2014; Valli et al., 2018; Zhang et al., 2008).

Механизмом работы ВСР может быть изъятие вирусных siRNA из цитоплазмы (функция siRNA-тубки) (Incarbone et al., 2017). Белок p15 peanut clump virus (PCV, сем. *Virgaviridae*) способен связыватьAGO1 и препятствовать загрузке

в него siRNA, помимо этого p15 связывает 21- и 22-нт siRNA, супрессируя таким образом сайленсинг как на клеточном уровне, так и на системном, не давая вторичным siRNA распространиться. Интересен механизм нейтрализации siRNA, осуществляемый белком p15. Было показано, что внутри клетки p15 направляется в пероксисомы и способен закачивать в них siRNA из цитоплазмы, что приводит к истощению пула siRNA, участвующих в сайленсинге (Incarbone et al., 2017).

Для ряда других ВСР также показана способность связывать малые днРНК определенной длины: для γ B BSMV, для p21 beet yellows virus (BYV, сем. *Closteroviridae*), HC-Pro tobacco etch virus (TEV, сем. *Potyviridae*) (Mérai et al., 2006). Белок p14 из Pothos latent virus (PoLV, сем. *Tombusviridae*) является мощным ВСР, не обладает избирательностью к размеру siRNA-мишени и способен связывать разные по длине днРНК (Mérai et al., 2005).

Для известного и широко используемого ВСР p19 tomato bushy stunt virus (TBSV, сем. *Tombusviridae*) также показана способность связывать дуплексы малых РНК. p19 предпочтительнее связывает и выводит из активного пула малые РНК размером 21 нт, но не 22-нт siRNA (Qu, Morris, 2007; Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). Также p19 TBSV способен взаимодействовать с рецептор-подобными киназами BAM1 и BAM2 (BARELY ANY MERISTEM), которые экспрессируются в клетках центрального цилиндра, расположены в ПД и участвуют в межклеточном транспорте малых РНК (Fan et al., 2021; Garnelo Gómez et al., 2021; Rosas-Díaz et al., 2018; Shimizu et al., 2015). Предполагают, что взаимодействие с p19 может приводить к ингибированию активности BAM1/2 в межклеточном транспорте малых РНК. Способности p19 взаимодействовать с BAM и связывать 21-нт siRNA не связаны друг с другом; мутантный вариант p19, не обладающий днРНК-связывающей активностью, по-прежнему способен супрессировать межклеточное распространение сайленсинга. Таким образом, p19 подавляет распространение 21-нт малых РНК как путем связывания их в клетках, так и путем ингибирования активности белков BAM1/2 (Garnelo Gómez et al., 2021). Для белка C4, ВСР tomato yellow leaf curl virus (TYLCV; сем. *Geminiviridae*), также была показана

способность взаимодействовать с ВАМ1 и ВАМ2, приводящая к нарушению межклеточного транспорта сайленсинга (Rosas-Diaz et al., 2018).

Белок оболочки p38 является супрессором сайленсинга у вирусов рода *Carmovirus* (сем. *Tombusviridae*), в частности, для TCV впервые была показана необходимость p38 и для транспорта вируса и подавления защиты растения (Hacker et al., 1992; Thomas et al., 2003). p38 способен связывать и ингибироватьAGO1 и AGO2 (Azevedo et al., 2010; Jin, Zhu, 2010; Zhang et al., 2012b), положительно регулировать DCL1, супрессируя таким образом DCL3 и DCL4 (Azevedo et al., 2010), стимулировать образование miR168, нацеленной на транскрипты AGO1 (Várallyay, Havelda, 2013), ингибировать защитные пути сигналинга салициловой кислоты (Donze et al., 2014), связывать дцРНК (Mérai et al., 2006) и блокировать продукцию первичных siRNA путем взаимодействия с этилен-индуцируемым ДНК-связывающим фактором RAV2/EDF2 (Csorba et al., 2015; Endres et al., 2010). Последняя функция показана также и для HC-Pro, который, как предполагают, через посредство RAV2/EDF2 способен положительно регулировать экспрессию эндогенных супрессоров сайленсинга (Endres et al., 2010).

Белок 2b CMV также является многофункциональным ВСР, который необходим для межклеточного и системного транспорта вируса (Csorba et al., 2015; Nemes et al., 2014). Белок 2b CMV и родственных вирусов способен связывать дуплексы siRNA, а также длинные дцРНК (Duan et al., 2012; González et al., 2012; Goto et al., 2007). Показана активность 2b белков противAGO, приводящая к нарушению сборки и работы RISC, ингибиции рибонуклеазной активностиAGO1 (Duan et al., 2012; Zhang et al., 2006). Также показано, что 2b способен негативно влиять на количество AGO1 путем воздействия на miR162, но эти данные несколько противоречивые (Várallyay, Havelda, 2013; Zhang et al., 2006). Белок 2b, нарушая работу RDR1 и RDR6, снижает количество вторичных вирусных siRNA (Diaz-Pendon et al., 2007; Wang et al., 2011b). Также 2b нарушает сингналинг через салициловую кислоту и жасмонаты, нарушая системы защиты растений

против разных групп патогенов (Lewsey et al., 2010), и влияет на успешность переноса вируса между растениями с помощью тлей (Ziebell et al., 2011).

У ряда вирусов белок, проявляющий активность как супрессор сайленсинга, может выполнять и другие функции в жизненном цикле вируса, а именно участвовать в транспорте вируса, репликации, сборке вирусных частиц (Atabekova et al., 2023b).

Транспортный белок p69 turnip yellow mosaic virus (TYMV, семейство *Tymoviridae*) необходим для распространения вируса по растению, также p69 способен ингибировать образование днкРНК и амплификацию сайленсинга. Было показано, что p69 не влияет на образование эндогенных siRNA, продуцируемых DCL2, но супрессирует образование вторичных вирусных siRNA и трансдействующих siRNA путем воздействия на RDR6, при этом p69 ко-локализуется с RDR6 в тельцах, где происходит образование siRNA. Другим интересным механизмом дополнительной супрессии сайленсинга у TYMV является индукция клеточной рибонуклеазы RTL1, которая разрушает днкРНК, конкурируя с DCL (Sehki et al., 2023).

На основании косвенных данных для транспортного белка 29K tobacco rattle virus (TRV, семейство *Virgaviridae*) тоже предполагается активность BCP (Deng et al., 2013). Охарактеризованным BCP у TRV является белок 16K. При развитии инфекции TRV 16K необходим для проникновения в меристематические ткани (Martín-Hernández, Baulcombe, 2008). Механизм ингибирования сайленсинга белком 16K не до конца понятен. 16K неспособен связывать siRNA или ингибировать активность уже существующих siRNA, однако препятствует образованию комплексов RISC, что согласуется с данными о способности 16K взаимодействовать с AGO4 (Fernández-Calvino et al., 2016). Как и для p69 TYMV, для 16K TRV показан механизм супрессии сайленсинга путем активации работы RTL1, что приводит к снижению уровня накопления вирусных siRNA (Sehki et al., 2023). Также было показано, что 16K локализуется в цитоплазме и ядре (Ghazala et al., 2008). Однако остается невыясненным, связана ли ядерная локализация 16K с

его функцией BCP, но показано, что в ядре 16K активирует одну из форм антивирусного ответа: 16K взаимодействует с резидентным для телец Кахаля белком коилином и индуцирует его ре-локализацию в ядрышко, что вызывает активацию опосредованного салициловой кислотой защитного ответа и подавление системной инфекции TRV (Shaw et al., 2019). Таким образом, в механизме активности BCP TRV еще многое остается неизученным (Atabekova et al., 2023b).

У TMV функция супрессии сайленсинга показана для белка P126, синтезируемого на матрице OPT белка репликазы P183 при терминации рибосом на слабом стоп-кодоне внутри OPT (Zaitlin, 1999). P126 способен супрессировать индукцию сайленсинга *de novo*, но не способен препятствовать накоплению siRNA или супрессировать уже начавшийся сайленсинг (Ding et al., 2007; Kubota et al., 2003; Lee et al., 2021). Существуют исследования, показывающие способность P126 связывать дуплексы siRNA и miRNA и препятствовать таким образом их встраиванию в RISC (Csorba et al., 2007; Kurihara et al., 2007). Также для P126 обнаружена способность ингибировать 3'-О-метилирование малых РНК (Csorba et al., 2007). Интересно, что три района P126 (метилтрансферазный и хеликазный домены, а также часть вариабельного фрагмента между ними) способны проявлять активность BCP, что указывает на предполагаемое наличие нескольких механизмов супрессии сайленсинга белком P126 (Wang et al., 2012).

5.2. Подавление РНК-сайленсинга TGB-содержащими вирусами

Белок TGB1 (белок p25) является BCP у PVX и других представителей *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae* (Atabekova et al., 2023b). Было показано, что способности белков TGB1 разных ротек-вирусов супрессировать сайленсинг в растениях *N. benthamiana* сильно различаются (Senhu et al., 2009). При временной экспрессии белки TGB1 вирусов PVX, PIAMV, WClMV, tulip virus X (TVX) и Asparagus virus 3 (AV3) способны супрессировать сайленсинг ко-экспрессированного трансгена, самый сильный уровень супрессии при этом наблюдается в случае TGB1 PIAMV, самый слабый – с TGB1 AV3. Также сами

вирусы PVX, P1AMV, WClMV и AV3 различаются по способности супрессировать исходно установившийся сайленсинг (Senshu et al., 2009). Эти данные могут свидетельствовать об использовании родственными ВСР различных механизмов супрессии сайленсинга или об адаптации TGB1 разных вирусов к их хозяевам (Senshu et al., 2009). TGB1 PVX способен взаимодействовать с белкамиAGO (AGO1, AGO2, AGO3 и AGO4) и направлять их на протеасомную деградацию (Chiu et al., 2010). Косвенные доказательства получены в экспериментах, в которых в результате обработки ингибитором протеасом MG132 растения становились менее подвержены инфекции разных потексвирусов, а количество AGO1 в зараженных тканях восстанавливалось до уровня свободных от вируса тканей (Chiu et al., 2010). Можно предположить, что механизм работы TGB1 PVX похож на механизм функционирования HC-Pro или P0 в том смысле, что он использует клеточные системы контроля процесса сайленсинга для его подавления (Derrien et al., 2012; Hacquard et al., 2022; Pan et al., 2025).

TGB1 P1AMV способен образовывать гомоолигомеры, взаимодействует с RDR6 и SGS3, образуя с этими белками агрегаты в цитоплазме, и ингибирует образование и межклеточное распространение мобильных вирусных siRNA (Okano et al., 2014). При этом TGB1 P1AMV является более сильным ВСР, чем TGB1 PVX, что можно объяснить наличием у TGB1 P1AMV двух активностей: подавление образования вторичных siRNA и ингибирование транспорта сигнала сайленсинга (Atabekova et al., 2023b; Komatsu, Hammond, 2022). Помимо этого, TGB1 PVX способствует межклеточному транспорту вируса путем увеличения ППС ПД; эта функция белка не связана с функцией ВСР, из чего следует, что за эти две функции отвечают разные домены белка TGB1 (Bayne et al., 2005). Также, как и у PVX, TGB1 potato virus M (PVM, род *Carlavirus*, сем. *Betaflexiviridae*) обладает активностью ВСР, однако, в отличие от TGB1 PVX, этот белок у PVM супрессирует только распространение сигнала сайленсинга, но не сайленсинг внутри зараженной клетки (Senshu et al., 2011). Способность TGB1 PVM супрессировать распространение сайленсинга функционально роднит его с TGB1 P1AMV. Помимо TGB1, геном

PVM кодирует еще один ВСР, цистеин-богатый белок CRP (англ. cysteine-rich protein), который способен эффективно супрессировать как сайленсинг внутри клетки, так и его системное распространение, причем более эффективно, чем TGB1 PVM, что было показано на протопластах и путем инокуляции вирусом растений с дальнейшим анализом накопления потомства вируса в инокулированных и системных листьях (Senshu et al., 2011).

5.3. Супрессоры РНК-сайленсинга аллексивирусов

Среди родов семейства *Alphaflexiviridae* три рода вирусов растений, *Allexivirus*, *Lolavirus* и *Mandarivirus*, имеют геномную (+)РНК, содержащую семь ОРТ, в то время как у рода *Potexvirus* их пять. Седьмая ОРТ кодирует цистеин-богатый белок CRP, обладающий способностью связывать нуклеиновые кислоты. CRP также присутствует у всех представителей родственного семейства *Betaflexiviridae* (Lezzhov et al., 2015; Yoshida et al., 2018). Выше уже отмечалось наличие активности супрессировать локальный и системный сайленсинг у представителей семейства *Betaflexiviridae*, например, PMV, похожая активность обнаружена у CRP grapevine virus A (GVA), который также обладает способностью связывать малые РНК (Senshu et al., 2011; Zhou et al., 2006). CRP Chrysanthemum virus B (CVB, род *Carlavirus* сем. *Betaflexiviridae*) является одновременно фактором транскрипции, активирующим экспрессию положительного регулятора пролиферации клеток, что приводит к гиперплазии тканей, а также проявляет активность ВСР, причем эти две функции белка не зависят друг от друга (Lukhovitskaya et al., 2013; Lukhovitskaya et al., 2014). Однако, у других вирусов, например, potato mop-top virus (PMTV, род *Pomovirus* сем. *Virgaviridae*), CRP не проявляет свойств ВСР, но способствует развитию симптомов у зараженных растений (Lukhovitskaya et al., 2005). Недавно было показано, что CRP PMTV олигомеризуется в мембранах клеток, образуя каналы, проницаемые для протонов и ионов калия (Liu et al., 2025), однако роль данной активности CRP PMTV в развитии вирусной инфекции не была изучена.

Род *Allexivirus* представлен 14 видами вирусов. Семь из них, garlic virus A, B, C, D, E, X и shallot virus X, заражают растения лука и объединяются в подрод *Acarallexivirus*. Другими представителями рода *Allexivirus* являются *Arachis pintoi* virus, *Senna severe yellow mosaic virus*, *alfalfa virus S*, *Vanilla latent virus*, *blackberry virus E*, *Rehmannia allexivirus* и *garlic mite-borne filamentous virus* (Úbeda et al., 2025; Yoshida et al., 2018). Гены CP-CRP и фланкирующие последовательности различаются у разных представителей *Acarallexivirus*. Филогенетический анализ последовательностей, содержащих OPT CP и CRP разных изолятов аллексивирусов подрода *Acarallexivirus* выявил, что их можно разделить на две группы (Yoshida et al., 2018). У представителей группы I была обнаружена консервативная пентануклеотидная последовательность UAAUG или UGAUG, в которой перекрываются стоп-кодон OPT CP и старт-кодон OPT CRP. Такая же последовательность есть и у ShVX. У представителей группы II нет подобных консервативных последовательностей, а гены CP и CRP отстоят друг от друга, поскольку между ними имеются вариабельные вставки. Интересно, что у аллексивирусов обеих групп перед терминаторным кодоном OPT CP расположена последовательность, комплементарная 18S рРНК, а у представителей группы II вариабельная вставка между OPT CP и CRP также частично комплементарна 18S рРНК, но другому ее участку. Вероятно, наличие таких последовательностей может указывать на механизм трансляции этих OPT, который на настоящий момент неизвестен (Yoshida et al., 2018). Можно предполагать, что для трансляции CRP используется особый механизм терминации-реинициации, при котором транслируемая РНК вируса взаимодействует с 18S РНК малой субъединицы рибосомы и заставляет ее реиницировать трансляцию. Последовательность перед OPT гена CRP, которая способна взаимодействовать с 18S РНК, получила название TURBS (termination upstream ribosome-binding site) (Yoshida et al., 2018). Такой механизм терминации-реинициации с использованием TURBS известен у ряда вирусов животных (Luttermann, Meyers, 2007; Powell et al., 2008) и грибов (Guo et al., 2009). Также можно полагать, что такой способ трансляции OPT CP и CRP аллексивирусов I группы и ShVX, вероятно, указывает на механизм контроля

соотношения количеств синтезируемых белков, что важно для развития инфекции (Yoshida et al., 2018).

Биологические свойства CRP аллексивирусов исследовали при их экспрессии в гетерологичной системе. Гены CRP GarV-A из группы I и GarV-B из группы II клонировали в составе полногеномной копии PVX; полученными конструкциями инокулировали растения *N. benthamiana* (Yoshida et al., 2018). Было обнаружено, что в обоих случаях CRP вызывает усиление вирусной инфекции, приводит к локальным некрозам на 14 день после инокуляции и затем к летальным некрозам в системных листьях на 21 день, а также способствует увеличенному накоплению РНК вируса в ткани растения. Таким образом, можно предположить, что CRP аллексивирусов у *N. benthamiana* распознается как фактор авирулентности (Luderer, Joosten, 2001), узнаваемый системой противовирусной защиты, которая в свою очередь приводит к реакции сверхчувствительности, сопровождающейся некрозами (Yoshida et al., 2018). Данное исследование весьма интересно в свете того, что во всех природных хозяевах, растениях рода *Allium*, аллексивирусы не вызывают симптомов, в том числе некротических (Yoshida et al., 2018). Сходные данные об активации реакции сверхчувствительности в ответ на CRP, экспрессированный в составе PVX в *N. tabacum* и *N. benthamiana*, были получены для 12-кДа CRP *Chrysanthemum virus B* (Lukhovitskaya et al., 2009). Механизмы, лежащие в основе столь разного ответа растений родов *Allium* и *Nicotiana* на CRP, пока остаются неизвестными.

Дальнейшие исследования показали, что СР и CRP являются ВСР, которые подавляют активность друг друга в цитоплазме (Kim et al., 2023). Для того, чтобы избежать подавление активности СР белком CRP, представители двух групп аллексивирусов используют разные стратегии: цистеин-богатый белок вирусов из группы II (GarV-B) локализуется в ядре и цитоплазме, но при этом ко-локализуется с ATG8a и деградирует в цитоплазме путем автофагии; а CRP I группы (GarV-D) имеет другую локализацию, расположен в ядре и ядрышке. CRP I группы не проявляют активности ВСР, но приобретают ее, если с их последовательностью

слил сигнал ядерного экспорта. Результаты ко-иммунопреципитации показали, что, вероятно, между CP и CRP существуют слабые взаимодействия. Авторы показали, что у аллексивирусов II группы как CP, так и CRP, проявляют активность ВСР, приводя к усилению симптомов инфекции PVX и к накоплению РНК вируса при экспрессии CRP или CP в составе PVX. CP и CRP I группы приводили к усилению симптомов, но при этом CRP не вызывал увеличения количества РНК вируса по сравнению с контролем (вирус PVX без вставки CRP). Следует отметить, что во всех случаях инфекция вируса, несущего ген CRP, приводила к существенно более выраженным симптомам в сравнении с контрольным вирусом, что указывает на распознавание растением CRP как фактора абиорутентности. Предполагают, что у аллексивирусов основным ВСР является CP, в то время как CRP, более вероятно, супрессирует эту активность, при этом для контроля ингибиторной активности CRP в отношении CP, белки CRP II группы в цитоплазме деградируют путем автофагии. Активность ВСР у CRP зависит от способности перемещаться между ядром и цитоплазмой, и CRP, не способные выходить из ядра, не супрессируют сайленсинг. Функция супрессии сайленсинга была показана также для CRP GarV-X, представителя II группы (Zhang et al., 2018).

Следует отметить, что при экспрессии в листьях конструкции CP-CRP, в которой гены расположены совместно, белок CRP не был обнаружен путем вестрен-блот анализа, что указывает на неэффективную трансляцию ОРТ гена CRP на данной матрице. В недавней работе было показано, что экспрессия CRP происходит с субгеномной РНК (сгРНК), промотор которой расположен в 3'-концевой области гена CP (Kim et al., 2023). Также обнаружено, что у аллексивирусов II группы в гене CRP есть внутренний сайт посадки рибосомы (IRES, Internal Ribosome Entry Site), вторичная структура, которая напрямую привлекает компоненты системы инициации трансляции в ОРТ независимо от 5'-кэпа (Martinez-Salas et al., 2018), а вариабельная вставка между генами CP и CRP конкурирует с IRES за взаимодействие с рибосомами. Таким образом, на основании этих данных предполагается механизм инициации трансляции ОРТ гена CRP,

отличающийся от простой терминации-реинициации, при этом последовательность TURBS может быть нужна для контроля инициации с IRES (Kim et al., 2023).

Таким образом, для вирусов, родственных ShVX, функции ВСР уже были показаны как минимум для двух белков, СР и СРР (Kim et al., 2023).

Следует заметить, что ShVX по отсутствию вставки между генами СР и СРР относится к I группе аллексивирусов подрода *Acarallexivirus*, однако по последовательности СРР филогенетически находится между I и II группами (Kim et al., 2023).

6. Особенности транспортного модуля аллексивирусов

Помимо хорошо изученных генов, которые кодируют белки с известными функциями, геномы многих вирусов растений содержат ОРТ, кодирующие белки, функции которых еще не определены экспериментально и не могут быть предсказаны на основании их последовательности, поскольку они не имеют сходства с известными вирусными или клеточными белками. Один из таких белков, названный p42, кодируется геномом ShVX (Kanyuka et al., 1992).

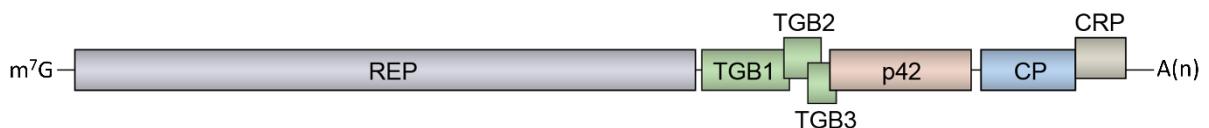


Рисунок 3. Схема строения генома ShVX. Прямоугольниками показаны ОРТ соответствующих белков.

Как и другие вирусы подрода *Acarallexivirus*, ShVX является латентным вирусом и не вызывает видимых симптомов у инфицированных растений (Vishnichenko et al., 1993). В естественных условиях в инфицированных растениях ShVX и другие аллексивирусы часто обнаруживаются в совместных инфекциях с другими вирусами, в основном из родов *Potyvirus* и *Carlavirus* (Katis et al., 2012; Vishnichenko et al., 1993), что позволяет предположить, что ShVX может быть частью вирусных ассоциаций. Геном ShVX представляет собой (+)оцРНК длиной 8832 пн, не считая 3'-терминальной поли(А) последовательности, и кодирует семь белков (Kanyuka et al., 1992). Репликативный модуль генома ShVX представлен 5'-

проксимальным геном, который кодирует белок массой 196 кДа. Согласно анализу последовательности, этот белок включает четыре домена: метилтрансферазный, AlkB (Alkylation B), хеликазный и домен РНК-зависимой РНК-полимеразы (Úbeda et al., 2025). Следом за геном репликазы в геноме ShVX расположен транспортный модуль TGB (Kanyuka et al., 1992; Morozov, Solovyev, 2003). 3'-проксимальная область генома ShVX включает структурный модуль вируса, представленный OPT CP, который необходим для формирования гибких нитевидных вирионов ShVX, и OPT CRP (Kanyuka et al., 1992). Для CP и CRP ShVX не были показаны функции BCP, но, по аналогии с соответствующими белками ряда других аллексивирусов, таких как GarV-X, GarV-D и GarV-B (Kim et al., 2023), можно предполагать, что эти белки также способны супрессировать сайленсинг.

Дополнительная OPT, расположенная в геноме ShVX между TGB и OPT CP/CRP, кодирует белок p42, который является уникальным для рода *Allexivirus* (Kanyuka et al., 1992). Белки, которые имели бы сходство с p42, не встречаются ни у других вирусов, ни среди клеточных белков. Хотя существуют некоторые наблюдения, указывающие на связь p42 с вирионами ShVX, а также с формированием вирионов (Vishnichenko et al., 2002), эти данные не были подтверждены. Таким образом, функция p42 остается неизвестной.

Геномы вирусов с (+)РНК обычно содержат несколько генов, однако у эукариот на таких матрицах может транслироваться только ген, ближайший к 5'-концу. У альфа-подобных вирусов (Goldbach et al., 1991) для экспрессии других 5'-дистальных генов обычно требуются субгеномные РНК (сгРНК). Эти сгРНК имеют общий 3'-конец с геномной РНК, а их 5'-концы различаются и расположены перед стартовыми кодонами отдельных генов (Sztuba-Solińska et al., 2011). Хотя сгРНК могут содержать OPT нескольких генов, функционально они являются моноцистронными, поскольку транслируется только их 5'-проксимальная OPT. Однако, существуют и исключения из этого правила, когда матрицы, содержащие несколько OPT, могут быть организованы таким образом, что трансляция возможна

и для 5'-дистальных генов. Хорошо изученным примером подобной матрицы является TGB (Morozov, Solovyev, 2003).

Одним из механизмов трансляции OPT 5'-дистальных генов полицистронной мРНК является инициация трансляции рибосомами на внутренних инициаторных последовательностях РНК благодаря наличию IRES (Martinez-Salas et al., 2018). Другим распространенным механизмом трансляции удаленных от 5'-конца OPT в полицистронных РНК является механизм «leaky scanning», при котором инициирующая 40S субъединица рибосомы вместе с факторами инициации и метиониновой инициаторной тРНК пропускает инициаторный кодон 5'-проксимальной OPT, который находится в «слабом», согласно Козак, контексте, и продолжает сканировать матрицу, пока не достигнет следующего инициаторного кодона, на котором происходит инициация трансляции в случае, если он находится в оптимальном или суб-оптимальном контексте (Dueñas et al., 2025; Kozak, 1983; Kozak, 1989; Ryabova et al., 2006). В случае «leaky scanning» инициация трансляции рибосомами на стартах различных OPT полицистронной матрицы является вероятностным процессом и зависит от контекстов, в которых находятся их инициаторные кодоны, а также от длины 5'-концевой нетранслируемой области (5'-НТО) перед первой OPT (Fujimoto et al., 2022). Соотношение количеств белковых продуктов, получаемых на такой матрице, также будет зависеть от степени соответствия контекста инициаторных кодонов оптимальному контексту (Geng et al., 2021).

Первые исследования PVX показали, что три белка TGB синтезируются на двух сгРНК, одна из которых служит матрицей для трансляции OPT гена TGB1, а другая – матрицей для трансляции TGB2 и TGB3, причем трансляция TGB3 инициируется по механизму «leaky scanning» (Morozov et al., 1991; Verchot et al., 1998). Более позднее исследование вирусов родов *Potexvirus*, *Carlavirus* и *Lolavirus* ясно показало, что три белка TGB синтезируются на одной сгРНК, и что TGB2 и TGB3 экспрессируются по механизму «leaky scanning» (Fujimoto et al., 2022). Также эффективной трансляции OPT TGB2 и TGB3 на такой функционально

трицистронной сгРНК способствует сильно укороченная 5'-НТО перед ОРТ TGB1 (Fujimoto et al., 2022). У большинства аллексивирусов в ОРТ TGB3 отсутствует инициаторный кодон AUG (Kanyuka et al., 1992; Lezzhov et al., 2015). С помощью мутационного анализа было показано, что трансляция ОРТ TGB3 ShVX инициируется на неканоническом инициаторном кодоне ACG по механизму «leaky scanning» (Lezzhov et al., 2015). Экспрессия других 5'-дистальных генов в геноме ShVX, в том числе гена белка p42, пока оставалась не изученной (Chergintsev et al., 2025).

7. Родственный TGB транспортный модуль ТСМВ и дополнительный белок vDRB

Вирус-подобные последовательности часто находят в транскриптомах растений, поскольку использованные для секвенирования нового поколения пробы могут быть отобраны из растений, зараженных вирусами (Mifsud et al., 2022). Сходный с TGB модуль генов, названный тетрацистронным транспортным блоком (TCMB, Tetra-Cistron Movement Block), был найден в транскриптомных контигах бриевого мха *Dicranum scoparium* и цветкового растения *Colobanthus quitensis*. Эти контиги соответствовали геномному сегменту РНК2 новых вирусов с двухкомпонентными РНК-геномами (Рис. 4), которые были отнесены к группе, родственной семейству *Benyviridae* (Morozov, Solovyev, 2022). Анализ последовательности показал, что вторая ОРТ ТСМВ кодирует белок с хеликазным доменом, который является является родственным TGB1 и BMB1, два остальных белка, кодируемых третьей и четвертой ОРТ ТСМВ, имеют сходство последовательности с TGB2 и TGB3, соответственно (Morozov, Solovyev, 2022; Solovyev, Morozov, 2017). Интересно, что белок, кодируемый ОРТ4 ТСМВ, также похож на TGB2, из чего можно сделать предположение о том, что расположенные ближе к 3'-концу транспортного блока гены TGB и ТСМВ могли возникнуть путем дупликации гена TGB2/BMB2 предкового модуля генов, подобного BMB (Solovyev, Morozov, 2017). Характерной чертой ТСМВ является наличие дополнительного 5'-концевого гена, последовательность которого перекрываетяется с

последовательностью следующего за ним TGB1-подобного гена у *D. scoparium* и *C. quitensis*. Таким образом, ТСМВ представляет собой ТГБ-подобный модуль генов с дополнительным 5'-концевым геном, который кодирует белок, содержащий дцРНК-связывающий домен семейства DSRM_AtDRB (Рис. 4) (Morozov, Solovyev, 2022). Этому белку было дано название vDRB (viral dsRNA-binding protein). Домен DSRM_AtDRB имеет длину 65-70 аминокислотных остатков и является типичным для дцРНК-связывающих белков арабидопсиса, названных AtDRB1-AtDRB5, которые содержат по два таких домена, способны связывать дцРНК и участвуют в РНК-сайленсинге и противовирусной защите (Eamens et al., 2012b; Rahman et al., 2021).

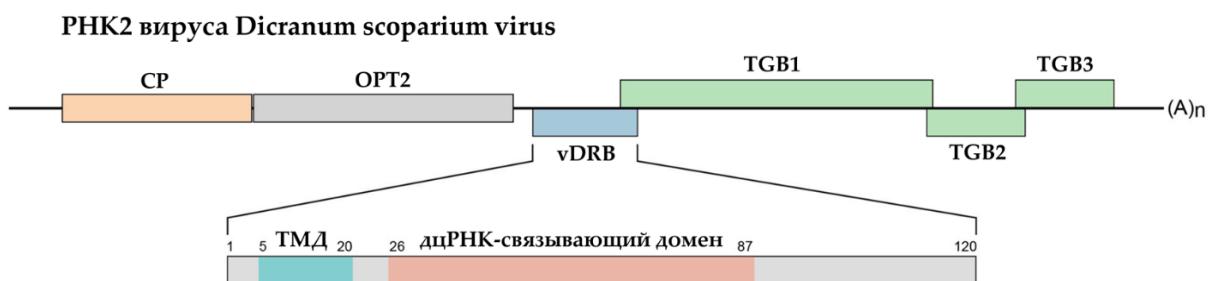


Рисунок 4. Схематичное изображение структуры геномной РНК2 вириуса *D. scoparium* и молекулярной организации белка vDRB. OPT соответствующих белков показаны прямоугольниками. У vDRB цветом отмечены позиции трансмембранных домена (TMD) и дцРНК-связывающего домена, указаны номера позиций аминокислотных остатков для доменов.

«DRB1» – другое название белка HYL1, для которого, как было упомянуто выше, хорошо известны функции в биогенезе miRNA, в процессе которого белок присутствует в D-тельцах, образуя комплексы с предшественниками miRNA, DCL1 и SERRATE (Pouch-Pélissier et al., 2008; Tang et al., 2022). HYL1 участвует в связывании и узнавании шпилечных структур предшественников miRNA и способствует правильному их разрезанию с помощью DCL1 и образованию дуплексов miRNA (Wieczorek et al., 2023). DRB2 является другим известным участником процесса РНК-сайленсинга, играет роль в опосредованном miRNA ингибировании трансляции, в регуляции программ роста и развития растения, участвует в узнавании вирусной инфекции и защите от нее меристематических тканей, важен в развитии индуцированном вирусом системном некрозе тканей, а также, может конкурировать с другими DRB за дцРНК (Eamens et al., 2012a; Fátyol et al., 2020; Reis et al., 2015). При гиперэкспрессии в тканях *N. benthamiana* белок

DRB2 способен нарушать процесс сайленсинга на уровне белков DCL, эта активность DRB2 зависит от дцРНК-связывающего домена белка (Fátyol et al., 2020). В растениях, зараженных PVX, гиперэкспрессия DRB2 приводит к ингибированию образования 21- и 22-нг siRNA, и увеличению накопления РНК вируса; также в зараженных PVX тканях белок DRB2 способен вызывать некрозы (Fátyol et al., 2020). В отличие от DRB2, DRB4 является важным компонентом РНК-сайленсинга, в комплексе с DCL4 белок DRB4 участвует в процессинге дцРНК и образовании различных типов малых РНК, в том числе и вирусных siRNA (Adenot et al., 2006; Eamens et al., 2012a; Reis et al., 2015; Zhang et al., 2016a). Предполагается, что DRB4 может играть первичную роль в узнавании вирусной дцРНК, а в том случае, если сайленсинг не приводит к предотвращению инфекции, то DRB2 участвует в инициации следующего контура защиты, приводящего к реакции гиперчувствительности и некрозу (Fátyol et al., 2020; Rahman et al., 2021). Для DRB3, так же, как и для DRB2 и DRB5, которые имеют диффузную локализацию в незараженной клетке, показано перераспределение в вирусные репликативные компартменты, где они способны ингибировать репликацию вируса и запускать защитные ответы, что может говорить о выполнении белками DRB роли сенсоров вирусной инвазии (Barton et al., 2017).

Кодируемый ТСМВ белок vDRB, в отличие от упомянутых клеточных белков, содержит только один дцРНК-связывающий домен и имеет гидрофобный сегмент в N-концевом районе (Morozov, Solovyev, 2022). Свойства и функции vDRB ранее экспериментально не изучались .

Материалы и методы

Использованные реагенты

Ферменты, использованные в работе: РНКаза А, ДНКаза I, Ribolock (ингибитор РНКаз) и Т4-ДНК-лигаза, обратная транскриптаза RevertAid H Minus Reverse Transcriptase и эндонуклеазы рестрикции производства «Thermo Fisher Scientific» (США), также (для работы с p42 ShVX) использовали обратную транскриптазу M-MuLV «SibEnzyme» (Россия), ДНК-полимеразу Encyclo производства «Evrogen» (Россия). В работе использовались набор для выделения ДНК из геля «Cleanup Standard» производства «Евроген» (Россия), реактив для выделения тотальной РНК из растений «ExtractRNA» «Хеликон» (Россия), набор для выделения и очистки плазмид из культур клеток «Plasmid Miniprep 2.0» производства «Евроген» (Россия). Для постановки кПЦР использовали готовую смесь qPCR Mix M-440 «Синтол» (Россия). Для протокола 5'-RACE использовали набор Ambion FirstChoice RLM-RACE Kit (ThermoFisher Scientific, Уолтем, США). Для проявки Вестерн-блотов использовали систему ECL «GE Healthcare Bio-Sciences» (США). Антибиотики: рифампицин, стрептомицин, спектиномицин, канамицин, ампициллин, тетрациклин производства фирмы «Duchefa Biochemie» (Нидерланды). Для аффинной очистки белков использовали реагент Ni-NTA агарозы (Ni-NTA Agarose for purification of His-tagged proteins by gravity-flow chromatography производства «Qiagen», Германия). Для обнаружения белков использовали конъюгированные с пероксидазой кроичьи анти-GFP антитела «Rockland» (Поттстаун, США) или моноклональные анти-FLAG M2 антитела и кроичьи анти-Mouse IgG (whole molecule) вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, США) и систему ECL GE «Healthcare Bio-Sciences» (США).

Другие реагенты: ацетосирингон «Sigma-Aldrich» (США); 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) «Thermo Fisher Scientific» (Бельгия), ЭДТА «VWR international LLC» (США), ДМСО «MP Biomedicals» (Франция), изопропил-β-D-1-

тиогалактопиранозид (ИПТГ) «CHEM-IMPEX INT'L» (США), ингибитор протеаз (Protease Inhibitor Cocktail) «Sigma-Aldrich» (Израиль), глицин «VWR international LLC» (США), бромид этидия «AppliChem» (Германия), бромфеноловый синий «Sigma-Aldrich» (США), агароза «Lonza» (США), бактоагар «VWR international LLC» (США), дрожжевой экстракт «Хеликон» (Россия), бактотриптон «VWR international LLC» (США), трил «VWR international LLC» (США), H_3BO_3 «Хеликон» (Россия), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ «Хеликон» (Россия), CH_3COOK «Хеликон» (Россия), MgCl_2 «Хеликон» (Россия), HCl «Химмед» (Россия), NaCl «Хеликон» (Россия), изопропанол «Химмед» (Россия), глицерин «AppliChem» (Германия), минеральное масло «ICN Biomedicals» (США); хлороформ «Мосреактив» (Россия); ледяная уксусная кислота «Химмед» (Россия), высокоочищенная вода Milli-Q «Millipore» (Франция), родамин «ААТ Bioquest» (США), акриламид «AppliChem» (Германия), бисакриламид «Amresco» (США), мочевина «Sigma-Aldrich» (Германия), додецилсульфат натрия «AppliChem» (Германия), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) «Servicebio» (Китай), персульфат аммония «Хеликон» (Россия), ацетат аммония «Sigma-Aldrich» (США), фенол «Acros Organics» (США), 2-меркаптоэтанол «Ferak Berlin» (Германия), сухое молоко (Blotting Grade) «Carl Roth» (Германия), полисорбат (Tween 20) «Хеликон» (Россия), PEG 8000 «Sigma-Aldrich» (США), гуанидингидрохлорид «AppliChem» (Германия).

Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*

Все бактериальные культуры, использованные в работе для получения рекомбинантных конструкций, растили на твердой или жидкой бактериальной среде LB (Lysogeny broth). Состав среды LB: 5 г/л NaCl , 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л бакто-триптона, 1,5% агара (для жидкой среды – без этого компонента). Для накопления белка клетки растили на жидкой среде 2YT (5 г/л NaCl , 10 г/л дрожжевого экстракта, 16 г/л бакто-триптона). Стерилизацию среды осуществляли автоклавированием.

В исследовании были взяты штаммы *E. coli* XL1-BLUE (штамм,

используемый для бело-голубой селекции) и BL-21(DE3) (экспрессионный штамм, используемый для накопления белка). Для получения компетентных (пригодных для трансформации) клеток 50 мкл компетентных клеток предыдущего приготовления растили в 5 мл среды LB в течение ночи на орбитальном термостатируемом шейкере («New Brunswick Scientific», США) при +37°C. Для клеток штамма XL1-BLUE в среду добавляли 20 мкг/мл тетрациклина, штамм BL-21, не имеющий собственной устойчивости, растили в стерильной среде без антибиотиков. Через 16 часов культивирования 5 мл культуры переливали в 300 мл среды с тетрациклином или без него для BL-21 и растили при +37°C на орбитальном шейкере до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,4-0,6$. Затем колбу с культурой ставили на инкубацию в лед на орбитальный шейкер на 1,5 часа. После культуру осаждали в течение 15 мин при 3500 об/мин на +4°C, супернатант сливали в ламинаре, держа клетки все время во льду. Осадок ресуспензировали в 2,5 мл охлажденного фильтрованного через бактериальный фильтр TSS буфера (1,34 г PEG 8000, 0,72 мл ДМСО, 0,72 мл 1M $MgCl_2$, дистиллированная вода до 10 мл). Затем ресуспензированные клетки инкубировали 30 мин во льду, после чего были разаликованы по 100 мкл в предварительно охлажденные центрифужные микропробирки на 2 мл и заморожены в жидком азоте. Компетентные клетки хранились в низкотемпературном холодильнике («New Brunswick Scientific», США) при -72°C.

Трансформация клеток *Escherichia coli*

Пробирку с компетентными клетками из низкотемпературного холодильника переносили в лед на 10 минут. Плазмиду добавляли из расчета 0,5 мкл на 100 мкл клеток, после добавления снова ставили в лед на 10 минут, далее выдерживали 110 секунд в термостатируемой водяной бане при 42°C и 10-15 минут во льду. После этого добавляли стерильно в ламинаре 400 мкл жидкой LB и инкубировали 40 минут-час при 37°C в термостате, затем стерильно в ламинаре размазывали содержимое пробирки по чашке Петри с твердой средой LB и необходимыми антибиотиками. Раствор канамицина (50 мг в 1 мл воды) добавляли до конечной

концентрации в среде 50 мкг/мл. Здесь и везде далее использовали деионизированную дистиллированную воду Milli-Q «Merck Millipore» (США). Культуры росли в термостате при 37°C 16 часов, далее чашки убирали в холодильник на +4°C.

Выделение и очистка плазмида ацетатом аммония

Перед выделением плазмида из трансформированных *E. coli*, культуры инкубировали в жидкой среде LB с соответствующими антибиотиками в пробирках на 15 мл (объем среды 2 мл) в термостатируемом орбитальном шейкере при 37°C в течение 16 часов. Из центрифужных пробирок культуры переливали в 2 мл пробирки и центрифугировали 3 минуты при 8000 об/мин (настольная центрифуга 5424 «Eppendorf», Германия), супернатант сливали и добавляли к осадку 250 мкл воды (первый лизирующий раствор), перемешивали на вортексе, добавили 250 мкл II лизирующего раствора (0,2 М NaOH, 1% SDS), осторожно перемешивали и выдерживали во льду 3-4 минуты, затем добавляли 250 мкл III лизирующего раствора (3М раствор ацетата калия) и оставляли во льду на 15 минут. После инкубации во льду лизат клеток центрифугировали (10 минут, 15000 об/мин) и переносили супернатант в 1,5 мл пробирки, доводили до 1.5 мл 96% этанолом, центрифугировали (10 минут, 15000 об/мин), сливали супернатант и добавляли 500 мкл 70% этанола, центрифугировали (10 минут, 15000 об/мин), сливали супернатант, отбирали весь спирт и сушили в термостате при 37°C. Полученный воздушно-сухой осадок плазмида и белков далее чистили ацетатом аммония. Осадок растворяли в 50 мкл воды и добавляли 50 мкл 7,5М AcNH₃, помещали в жидкий азот на 5 мин. Далее центрифугировали (10 минут, 15000 об/мин) и отбирали полученный супернатант в пробирку на 1,5 мл. До 1,5 мл объем доводили 96% этанолом, центрифугировали (10 минут, 15000 об/мин), вновь сливали супернатант, добавляли 500 мкл 70% этанола, центрифугировали (10 минут, 15000 об/мин), сливали супернатант, отбирали весь спирт и сушили в термостате 25 минут при 37°C. Полученный прозрачный очищенный от белков осадок ДНК плазмида растворяли в 30 мкл воды.

Выделение и очистка плазмиды из бактериальных клеток

Для инокуляции растений плазмидой, несущей полногеномную копию вируса, необходимо использовать очищенный от бактериальных эндотоксинов препарат ДНК. Для получения препарата требуемой степени очистки был использован набор для выделения и очистки плазмид из культур клеток «Plasmid Miniprep 2.0» производства «Евроген» (Россия). Перед выделением культуры клеток, несущие конструкции PVX дикого типа или PVX-vDRB растили в 400 мл среды LB с ампилицином в термостатируемом орбитальном шейкере при 37°C до достижения финальной оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6-0,8. Далее культуру осаждали в 50 мл центрифужных пробирках центрифугированием при 4500 об/мин при 4°C. Дальнейшие процедуры выделения и очистки проводили, следуя протоколу производителя.

Амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР в работе использовали для различных задач: проверка наличия вставки в клонах, амплификация нужной матрицы, внесение необходимых последовательностей в амплифицированные фрагменты с помощью специально подобранных праймеров, перекрывающаяся ПЦР (Overlap-PCR) для соединения нужных фрагментов. ПЦР проводили в 0,5 мл пробирках. Для реакции брали 0,5 мкл матрицы ДНК (50-100 нг), 5 мкл 10x Encyclo буфера производства «Евроген» (или 10X Taq Turbo буфера для проверочной ПЦР), 1 мкл смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ, каждый в концентрации 10 mM, «Thermo Fisher Scientific»), по 2 мкл праймеров (правый и левый, в концентрации по 10 мкМ), 0,5 мкл 50X Encyclo полимеразы производства «Евроген», Россия. Объем доводили до 50 мкл водой и сверху насылали 50 мкл минерального масла. Для ПЦР использовали четырехканальный ДНК-амплификатор «Терцик» производства фирмы «ДНК-Технология», Россия. Режим ПЦР: предварительная денатурация (1-3 мин, 94°C) – 1 цикл; денатурация матрицы (94°C, 30 сек), отжиг праймеров (60°C, 40 сек), элонгация (72°C,

продолжительность от 15 сек, в зависимости от длины фрагмента, из расчета 1 тысяча пар оснований/минуту), всего 30-31 цикл; финальная достройка цепи – 72°C, 3-5 минут, далее охлаждение до 10°C. Продукты ПЦР хранили при -20°C. Продукт ПЦР проверяли на наличие фрагментов нужной длины электрофорезом в агарозном геле.

Очистка продукта ПЦР фенолом и хлороформом

40 мкл проверенного продукта ПЦР, не захватывая масло, отбирали в пробирку, добавляли 260 мл дейонизированной воды, 150 мкл фенола и 150 мкл хлороформа, центрифугировали (10 минут, 10000 об/мин), осторожно отбирали верхний слой жидкости, не захватывая интерфазный объем, загрязненный белками. Добавляли 5 мкл III лизирующего раствора, и доводили до 1,5 мл 96% этанолом. После центрифугирования (10 минут, 15000 об/мин) сливали супернатант и добавляли 500 мкл 70% этанола, центрифугировали (10 минут, 10000 об/мин), сливали надосадочную жидкость, отбирали весь спирт и сушили термостате 25 минут при 37°C. Полученный прозрачный очищенный от белков осадок ДНК ПЦР-продукта растворяли в 20 мкл дейонизированной воды.

Электрофорез в агарозном геле

Необходимый объем аликовты водного раствора ДНК смешивали с 3 мкл красителя в буфере для нанесения – DNA Gel Loading Dye (6X) производства «Thermo Fisher Scientific», (США) (10 mM Трис-HCl (рН 7.6) 0.03% бромфеноловый синий, 0.03% ксилен цианол FF, 60% глицерол, 60 mM ЭДТА), после чего проводили электрофорез в агарозном геле в приборе для горизонтального электрофореза. Для электрофореза использовали гель, содержащий 1% раствор агарозы в 0,5M ТВЕ-буфере (Трис-борат-ЭДТА), агарозу растворяли нагреванием в СВЧ-печи, добавляли интеркалирующий краситель (бромистый этидий, 7 мкл/70 мл раствора агарозы). Электрофорез проводили при напряжении 165 mV, в качестве маркеров использовали GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific»).

Выделение и очистка ДНК из агарозного геля

В работе применяли два способа очистки ДНК из агарозного геля. Для высокомолекулярных продуктов и продуктов с большим количеством материи (например, ПЦР-продукты) был использован набор для выделения ДНК из геля «Cleanup Standard» производства «Евроген» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для выделения и очистки препаратов ДНК с небольшим исходным количеством использовали метод выделения на стекле с помощью готового набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit производства «Thermo Fisher Scientific» согласно прилагаемой производителем инструкции. Очищенные образцы ДНК хранили про -20°C.

Реакция рестрикции

Реакцию проводили в 1,5 мл пробирках, суммарный объем компонентов – 40 мкл: требуемый объем очищенной ДНК (разный для различных задач); комбинация необходимых эндонуклеаз рестрикции, каждой по 0,5 мкл в начале реакции и по 0,5 мкл через 1,5 часа; 4 мкл соответствующего ферментам буфера; доводили водой до 40 мкл. После добавления компонентов смесь перемешивали и ставили на 1,5 часа в термостат на 37°C, и еще на 1,5 часа после добавления новой порции ферментов.

Используемые буфера для реакции рестрикции производства «Thermo Fisher Scientific», США: Tango buffer (Y) (1X состав буфера: 33 mM три-ацетат (рН 7.9 при 37°C), 10 mM ацетат магния, 66 mM ацетат калия, 0.1 мг/мл BSA), red buffer (R) (10 mM Tris-HCl (рН 8.5 при 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 мг/мл BSA).

Лигирование

Объем реакции составлял 30 мкл, для реакции использовали компоненты (лигаза, буфер, рибоАТФ) производства «Thermo Fisher Scientific» (США). В лигазную смесь добавляли 0,5 мкл лигазы бактериофага T4 (T4 DNA Ligase), 3 мкл лигазного буфера (10X T4 DNA Ligase buffer), 1,5 мкл рибоАТФ (10 мМ),

необходимое количество ДНК вектора и вставок, доводили водой до 30 мкл. Соотношения количеств ДНК старались делать приблизительно равными 3:1 (вектор:вставка). Длительность реакции – 1 час при комнатной температуре. Для трансформации *E. coli* брали половину лигазной смеси (15 мкл).

Получение рекомбинантных конструкций

Рекомбинантные конструкции для временной экспрессии mRFP, ER-mRFP и ST-mRFP в растениях (Lazareva et al., 2017b), слитых с mRFP C-концевого актин-связывающего домена талина мыши (Kost et al., 1998; Lazareva et al., 2017a) и микротрубочки-связывающего домена белка MAP4 мыши (Shemyakina et al., 2011), а также PVX-GFP (Cruz et al., 1996), PVX201 (Boevink et al., 1996), TCV-GFP (Powers et al., 2008b; Powers et al., 2008a) и pBSCII-SK(+)-GFP (Makarova et al., 2014) были созданы и описаны в литературе ранее. Конструкция DCP5-mRFP была любезно предоставлена к.б.н. Н. И. Луховицкой (Кембриджский университет). Олигонуклеотиды, использованные для получения других рекомбинантных конструкций, перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе.

Олигонуклеотиды для работы с p42 ShVX	
Олигонуклеотиды для 5'RACE	
R-TGB1-in	CGTCAAGAATTCTGGTCTCGTGA
R-TGB1-out	GAATGGGTACCTACAAGGACAT
R-TGB2-in	CGGAATTCTAGTGAGAAGTATTGCCAGGGT
R-TGB2-out	AGGTTGAGAACAGCGTACGCAA
R-p42-in	GCGAATTGGTTGAGTAGAGCGTTGAAGT
R-p42-out	TTGACGCAATTGGGTTGGGCT
R-CP-in	ACGGAATTGACTCCACGTCACTAGTGAT
R-CP-out	CTCTTAGCTTGTAAAGCGTCCA
R-CRP-in	GTCAGAATTGAGCGACTCGTAAAGCGTT
R-CRP-out	CCCTGATGGATGACACTCAAACA
TGB-p42-FLAG	
p1-Xh-P	GGCTCGAGAAATGAAGACTGACCTCCTACT
p42-Xba-M	GCTCTAGAACATCTGTCATCGTCATCCTGTAAATCACACAGACCTCGCCCCCTAA
ShVX-p1-ovl-M	CTAAGTGCTCGTGTGGTAGCGAT
ShVX-p1-ovl-P	ATCGCTACCACACGAGCACTTAG
TGB2[OPT] и TGB2[CAG]	
Left	TATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCT
ShVX-ovl-M	GTAACCTCAATGTTGTGTCGGT
ShVX-ovl-P- p2CAG	ACCGACACAAACATTGGAGTTACCACCAAGAGCTTGC
ShVX-ovl-P- p2opt	ACCGACACAAACATTGGAGTTACACCATTGGCTTGC
ShVX-p2-Spe-M	GCGACTAGTGAGAAGTATTGCTAGCGTGAGCG
TGB3[AUG] и TGB3[CAG]	
Right	CCTTATCTGGGAACCTACTCACACATT

Таблица 1 (продолжение).

ShVX-BglIII-M	AAGCCTACAAGATCTCGCTCAAATT
ShVX-BglIII-P	AGCGAGATCTGTAGGCTTCTAC
ShVX-p3CAG-ovl-M	GAAATGGCTTGGTGTGATGATCCCTGTTAGG
ShVX-p3AUG-ovl-M	GAAATGGCTTGGTGTGATGATCCATTAGG
ShVX-p3-ovl-P	GATCATCACCAACAAGCCATT
p42 и p42-GFP	
p42-P-XhoNhe	CGCTCGAGCTAGCCATGGTGATTGTACAACACCTTCC
p42-intEco-M	CGGAATTGGGAGTCTACGCCG
p42-intEco-P	CCGAATTCCGATGGACATAACAGGTAGGCCAGCAAGCAC
p42-M-SalXba	GCTCTAGAGTCGACTAACACAGACCTCGCCCC
p42-M-Bam	GCGGATCCAGAACACAGACCTCGCCCC
UPF1[R863C]	
UPF1-Xho-P	CGCTCGAGACCATGGATTCTCAACAGAGCGATCT
UPF1-Xba-M	CGTCTAGACTTCTCACCCCTCAGCCATTGT
UPF1-ovl-P	ATATTGTCCTGTCTGCAGTAATGAGCATCA
UPF1-ovl-M	TGATGCTCATTACTGCAGACACAGGACAATAT
GFP-LUTR	
GUS2-P120	GCGACCGGTTACAAGAAAGCCGGGC
GUSi-M	GCTCTAGACCACCTGTTGATCCGCATC
Left	TATCCTTCGCAAGACCTTCCTCT
C3-Mlu-M	CGCACCGGTTATTTGTAGAGCTCATCCATGCC
кПЦР	
F-Box-F	GGCACTCACAAACGTCTATTTC;
F-Box-R	ACCTGGGAGGCATCCTGCTTAT
GFP-C3-PP1-R	GCGTCTTGTAGTCCCCGTCA
GFP-C3-PP1-F	TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT
Олигонуклеотиды для экспрессии белков и экспериментов по изменению подвижности в геле	
p42-pET-M-Xho	CGCTCGAGAGAACACAGACCTCGCCCC
p42-P-XhoNhe	CGCTCGAGCTAGCCATGGTGATTGTACAACCTTCC
ShVX-M-XAN	CCTGCTAGCGCGCGCCTGTACACGTCAAGGAAATA
ShVX-T7-P	CGTAATACGACTCACTATAGAAAATCAACCAAAACATCACACAAACCA
dsC3-P	GAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGAAGGTGATGCTACATA
dsC3-M	GAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAGATTGTGTCGACAG
Олигонуклеотиды для работы с vDRB	
vDRB-pET-P	GCGGATCCGGCGGTAGTGAAGGTAGAGTTGCTAAACT
vDRB-pET-M	CGCTCGAGTTAGGTGTCTCTTTAGATAAGAGTT
vDRB-ovl-P	CTGACAAACAGCCAAGGGTGGGTTGTTGGGTGTCCTCTTACG
vDRB-ovl-M	CACCCTTGGCTGTTGTCAGACCGCTAAATATTGCTACATG
vDRB-201-P1	GGGCTAGCATGAGTAGGTCTCTTTAGATAAGAGTT
vDRB-201-M	CCCGTCGACTTAGGTGTCTCTTTAGATAAGAGTT
PVX-REP-P	CATTGTATGCGACCTTAGTTCTC
PVX-REP-M	CGTGTAAATTGAGATGTCCGAGAA

Кодирующая последовательность гена белка p14 Pothos latent virus была химически синтезирована («Евроген», Москва, Россия) по ранее опубликованным последовательностям (Mérai et al., 2005; Rubino, Russo, 1997) и клонирована в бинарный вектор pLH* (Solovyev et al., 2013) для получения конструкции pLH-p14 для экспрессии в растениях.

Ген vDRB *D. scoparium* был химически синтезирован («Евроген», Москва, Россия) и клонирован в бинарный вектор pLH* для экспрессии в растениях. Для экспрессии в *E. coli* часть последовательности гена, кодирующая vDRB без N-

концевого гидрофобного домена, была амплифицирована с помощью пары праймеров vDRB-pET-P/vDRB-pET-M. Полученный продукт амплификации был порезан с помощью *Bam*H I и *Xho*I и клонирован в pET-33b(+) (Novagen, Merck, Дармштадт, Германия). Для внесения мутаций в vDRB была проведена перекрывающаяся ПЦР (overlap PCR) с праймерами vDRB-ovl-P/vDRB-ovl-M. Для получения DHFR в *E. coli* был использован экспрессионный вектор pQE-40 (Qiagen, Хильден, Германия). С 3'-концом OPT всех белков, предназначенных для накопления в *E. coli* белков, была слита последовательность полигистидинового гексапептида (6xHis), который позволяет выделять белки методом аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (Malhotra, 2009).

Для экспрессии vDRB в составе вектора PVX кодирующая последовательность vDRB была амплифицирована с использованием праймеров vDRB-201-P1/vDRB-201-M. Полученный продукт был порезан с помощью *Nhe*I и *Sal*I и клонирован в PVX-201.

Для получения конструкции TGB-p42-FLAG соответствующий участок генома ShVX амплифицировали методом перекрывающейся ПЦР (overlap PCR) на матрице кДНК, полученной из инфицированных ShVX растений *Allium cepa* var. *aggregatum* с использованием специфических праймеров. Первый продукт ПЦР был получен с использованием праймеров p1-Xh-P/ShVX-p1-ovl-M. Второй продукт был получен с праймерами ShVX-p1-ovl-P/p42-Xba-M. Искомый продукт перекрывающейся ПЦР амплифицировали с праймерами p1-Xh-P/p42-Xba-M, затем клонировали в бинарный вектор pLH* по сайтам *Xho*I-*Xba*I.

Для получения конструкций TGB2[OPT] и TGB2[CAG] соответствующие последовательности были амплифицированы методом перекрывающей ПЦР с специфическими парами праймеров на матрице конструкции TGB-p42-FLAG. Первый ПЦР-продукт был получен с праймерами Left/ShVX-ovl-M. Второй фрагмент амплифицировали с парами праймеров ShVX-ovl-P-p2CAG/ShVX-p2-Spe-M или ShVX-ovl-P-p2opt/ShVX-p2-Spe-M, соответственно. Искомый продукт перекрывающейся ПЦР получали с праймерами Left/ShVX-p2-Spe-M и клонировали в конструкцию TGB-p42-FLAG по сайтам *Xho*I-*Spe*I, замещая при

этом последовательность дикого типа.

Похожим образом были получены конструкции с внесенными заменами в инициаторную последовательность TGB3. Первый фрагмент TGB3[AUG] и TGB3[CAG] был получен методом ПЦР с праймерами Left/ShVX-BglII-M на матрице TGB-p42-FLAG и порезан по сайтам *XhoI*-*BglII*. Второй фрагмент амплифицировали методом перекрывающей ПЦР на той же матрице с использованием пар праймеров ShVX-BglII-P/ShVX-p3AUG-ovl-M или ShVX-BglII-P/ShVX-p3CAG-ovl-M для первой части перекрывающей ПЦР и пары праймеров ShVX-p3-ovl-P/Right — для второй. Конечный продукт перекрывающей ПЦР амплифицировали с праймерами ShVX-BglII-P/Right и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BglII*-*XbaI*. Обработанные эндонуклеазами ПЦР-продукты первого фрагмента и продукты перекрывающейся ПЦР были клонированы в pLH* по сайтам *XhoI*-*XbaI*.

Конструкцию гена p42 в pLH* (pLH-p42) получали путем амплификации двух частей кодирующей последовательности p42 с использованием пар праймеров p42-P-XhoNhe/p42-intEco-M и p42-intEco-P/p42-M-SalXba на матрице кДНК ShVX с последующей обработкой эндонуклеазами рестрикции *XhoI*-*EcoRI* и *EcoRI*-*XbaI*, соответственно. Полученные продукты были клонированы в бинарный вектор pLH* по сайтам *XhoI*-*XbaI*.

Для получения конструкции p42-GFP кодирующую последовательность p42 амплифицировали на матрице pLH-p42 с праймерами p42-P-XhoNhe и p42-M-Bam, затем клонировали по сайтам *XhoI*-*BamHI* в одной рамке с GFP в конструкцию pLH-BMB1-GFP (Lazareva et al., 2017b), из которой последовательность BMB1 была удалена с помощью рестрикции.

Для накопления белка p42 в *E. coli* кодирующую последовательность p42 амплифицировали с праймерами p42-pET-M-Xho и p42-P-XhoNhe на матрице ранее полученной конструкции pLH-p42. Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор pET-33b(+) по сайтам *XhoI*-*NcoI*.

Для получения конструкции UPF1[R863C] ген UPF1 амплифицировали на кДНК *Arabidopsis thaliana* с использованием пар праймеров UPF1-Xho-P/UPF1-ovl-

М и UPF1-ovl-P/UPF1-Xba-M. Продукты реакций амплифицировали с праймерами UPF1-Xho-P/UPF1-Xba-M с помощью перекрывающейся ПЦР, продукт которой затем разрезали эндонуклеазами рестрикции *XhoI-XbaI* и клонировали в бинарный вектор pLH*.

Конструкция GFP-LUTR была получена путем лигирования двух продуктов ПЦР в бинарном векторе pLH*. На первом этапе соответствующие продукты ПЦР амплифицировали с праймерами Left/C3-Mlu-M на матрице pLH*-GFP (Yelina et al., 2005) и матрице pLH*-GUS (Solovyev et al., 2013) с праймерами GUS2-P120/GUSi-M. На втором этапе продукты ПЦР были обработаны эндонуклеазами рестрикции *NcoI-MluI* и *MluI-XbaI*, соответственно, и клонировали в бинарный вектор pLH*, по сайтам *NcoI-XbaI*. Все конструкции были проверены с помощью секвенирования (ЕвроГен, Москва, Россия).

Выделение и очистка белков

Для накопления белков клетки *E. coli* (штамм BL21) были трансформированы экспрессионными векторами, затем были отобраны клоны с наибольшим уровнем экспрессии целевого продукта. Для индуцирования накопления белка хранящиеся в низкотемпературном холодильнике клетки растили в 25 мл среды 2YT 16 часов на термостатируемом орбитальном шейкере при +37°C с добавлением канамицина. Затем весь объем культуры переливали в колбу с 575 мл среды 2YT с канамицином и инкубировали еще в при +37°C при постоянном перемешивании до финальной оптической плотности при 600 нм (OD_{600}) = 0.8. Накопление белка индуцировали добавлением 1М изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1-2 мМ. После добавления ИПТГ культуру инкубировали при помешивании при +37°C в течение 2-4 часов. Далее культуру разливали по 50 мл центрифужным пробиркам и осаждали центрифугированием при 4500 g в течение 10 мин при +4°C (настольная центрифуга 5810 R «Eppendorf», Германия).

Выделение белков проводили в соответствии с протоколом «The QIAexpressionist» фирмы «Qiagen» для хроматографии белков, содержащих 6xHis, с некоторыми изменениями. В день выделения белка осадок доставали из

морозилки и размораживали при комнатной температуре в течение недлительного времени, далее ресуспензировали в 10 мл буфера А (6М гуанидингидрохлорид, 10мМ трис, 100мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=8,0), добавляли ингибитор протеаз и ставили инкубироваться в течение часа на орбитальный шейкер при комнатной температуре. Во время инкубации готовили колонки для аффинной хроматографии. На фильтр чистой колонки осторожно наносили 300 мкл Ni-NTA агарозы (Ni-NTA Agarose for purification of His-tagged proteins by gravity-flow chromatography производства «Qiagen», Германия), сливали жидкость, не допуская пересыхания гранул, трижды промывали дистиллированной водой (10 мл) для избавления от азода натрия и трижды промывали 1 мл буфера А для уравновешивания колонки. Затем с остатком буфера А колонку закрывали до окончания времени инкубации белка.

После часа инкубации белок разливали по 2 мл микроцентрифужным пробиркам и осаждали в течение 10 минут при 15 000 об/мин, супернатант переносили в колонку. После прохождения жидкой части супернатанта через колонку, поочередно ее промывали 10 мл буфера А, затем 10 мл буфера В (8М мочевина, 10 mM трис, 0,1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=8,0) и 10 мл буфера С (8М мочевина, 10 mM трис, 0,1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=6,3). Далее колонку промывали 1 мл буфера Е (8М мочевина, 10 mM трис, 0,1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=4,5), собирая вымытое из колонки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку (первая фракция). Затем в колонку добавляли еще один мл буфера Е и инкубировали при периодическом перемешивании в течение 5 мин, после чего собирали вторую фракцию. Также были собраны третья, четвертая и пятая фракции белка, вымытого из колонки. Фракции очищенного белка хранились в холодильнике при +4°C.

Перед диализом проводили анализ фракций на предмет содержания белка нужного размера путем электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), электрофорез проводили в соответствии с методом Лэммли (Laemmli, 1970). Из каждой фракции отбирали 10 мкл и инкубировали вместе с 5 мкл 4x sample buffer (100mM Трис-HCl (pH=6.8), 100мМ β -меркаптоэтанола, 10% глицерина, 4% додецилсульфата натрия (SDS), 0,1% бромфенолового синего) в течение 5 мин при

95°C. SDS-PAGE проводили в трис-глициновом электродном буфере (0,025M Трис-HCl, 0,192M глицин, 0,1% SDS, pH=8,3). Нижний разделяющий гель содержал 10% акриламида, 0,15% метиленбисакриламида, 0,4M Трис-HCl pH=8,8 и 0,1% SDS. Для полимеризации геля в соответствии со стандартным протоколом использовали персульфат аммония (PSA) и тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Нижний гель оставляли на 40 мин для полимеризации, предварительно насытив сверху 1 мл изопропилового спирта. Верхний концентрирующий гель содержал 4% акриламида, 0,08% метиленбисакриламида, 0,0125M Трис-HCl pH=6,8 и 0,1% SDS. Все растворы хранили при +4°C. Электрофорез проводили в приборе для электрофореза производства «Hoeffer Scientific» при напряжении 135 В и силе тока не выше 40mA. В качестве маркера был использован PageRuler™ Prestained Protein Ladder «Thermo Fisher Scientific» (США).

Диализ белков

После выделения белка наиболее обогащенную белками фракцию (во всех случаях это была вторая фракция) диализовали. Для диализа использовали диализные мешки (SERVAPOR dialysis tubing, MWCO 12000-14000), которые предварительно кипятили в течение 25 минут в дистиллированной воде. Затем мешок зажимали специальными зажимами, поместив внутрь фракцию белка, и промывали в стакане с дистиллированной водой (или буфером) в течение 30 минут в холодильнике на +4°C. Затем дистиллированную воду или буфер сливал и помещали мешок в деионизированную дистиллированную воду milli-Q (при необходимости используя буфер с соответствующим pH) еще на 30 минут на +4°C на магнитную мешалку. Далее воду еще три раза меняли, после последней смены оставляли диализ в холодильнике на ночь.

Условия диализа белков были подобраны экспериментально, исходя из положения изоэлектрической точки белков, посчитанной с помощью веб-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Все белки были диализованы простив воды Milli-Q. После диализа белки переносили в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и центрифугировали при 15000 об/мин при +4°C для удаления

денатурированного белка, супернатант переносили в новую пробирку, которую хранили во льду или при +4°C. Концентрации диализованных белков были измерены с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, США) при 280 нм, для получения истинных концентраций белков использовали закон Бугера-Ламберта-Бэра. Молекулярную массу белка и коэффициент экстинкции определяли с помощью веб-сервиса ProtParam.

Анализ РНК-связывающих свойств белков методом изменения подвижности в агарозном геле

РНК, использованная в экспериментах по изменению подвижности в агарозном геле, была получена путем транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 «Thermo Fisher Scientific» (США). Субстратную GFP-специфическую оцРНК получали путем транскрипции с матрицы pBSCII-SK(+-GFP, которая была предварительно линеаризована с помощью эндонуклеазы рестрикции *SacI*. Для получения субстратной ShVX-специфической оцРНК на РНК, выделенной из зараженных ShVX растений, была поставлена обратная транскрипция с использованием праймера ShVX-M-XAN. Выделение РНК проводили с использованием реагента ExtractRNA «Евроген» (Россия), следуя инструкции производителя, обратную транскрипцию ставили с использованием обратной транскриптазы RevertAid «Thermo Fisher Scientific» (США). Полученную кДНК затем использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами ShVX-M-XAN и ShVX-T7-P, продукт данной ПЦР транскрибировали для образования субстратной оцРНК ShVX. Субстратную дцРНК синтезировали путем транскрипции продукта ПЦР, полученного на матрице pBSCII-SK(+-GFP, с парой праймеров dsC3-P и dsC3-M, содержащих T7-промотор (см. таблица 1). Субстратную дцДНК получали с помощью ПЦР с использованием универсальных для pBSCII-SK(+) праймеров Uni и Rev на матрице pBSCII-SK(+-GFP.

В экспериментах по оценке изменения подвижности в агарозном геле нуклеиновые кислоты были инкубированы с различным количеством белка в связывающем буфере (для vDRB: 10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 100 мМ NaCl, 5 мМ

ZnCl₂; для p42 ShVX: 10 мМ Трис-HCl pH 7.8, 50 мМ KCl, 0.1 мМ ЭДТА, 5% глицерин) в течение 30 мин на льду. Образцы анализировали в 1,5% (для vDRB) или 1,8% (для p42 ShVX) неденатурирующем агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Электрофорез проводили в течение 20 минут при напряжении 145 В. Далее гель доставали из плашки для электрофореза и фотографировали с помощью системы гель-документирования («ChemiDoc XRS+ Gel Imaging System» производства «Bio-Rad»).

Растительный материал

Растения *N. benthamiana* выращивали в стандартных условиях в оранжерее или в ростовых камерах (циклы свет/темнота – 16 ч/8 ч, дневная/ночная температура – 24/20 °C, влажность 50%). Для агроинфилtrации использовали 5-6-недельные растения. 3-недельные растения использовались для механической инокуляции.

Трансформация агробактерий

Клетки *Agrobacterium tumefaciens* (штамм C58C1, устойчивость к рифампицину) трансформировали бинарными векторами методом замораживания-оттаивания. Клетки *A. tumefaciens* из свежей культуры, росшей не более 10 дней, пересаживали в центрифужную пробирку объемом 50 мл в 5 мл жидкой среды LB с рифампицином (100 мкг/мл), выращивали в течение 16 часов 28°C на орбитальном шейкере (Excella E1 Platform Shaker, «New Brunswick Scientific», США) при 175 об/мин. Спустя 16 часов 500 мкл культуры переливали в 2 мл пробирку и добавляли 3-4 мкг плазмида. Далее пробирки помещали на 10 минут в лед и затем на 2 мин в жидкий азот. Тепловую обработку проводили при 37°C в течение 15 минут в термостате. Далее стерильно в ламинаре добавляли 800 мкл жидкой среды LB и помещали на орбитальный шейкер на 2-3 часа, после чего клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 1000 rcf) и отбирали 950 мкл супернатанта. Осадок клеток ресуспензировали в оставшемся объеме среды и переносили на чашку с твердой средой LB и соответствующими антибиотиками, в

зависимости от устойчивости используемого вектора: рифампицин (100 мкг/мл среды), спектиномицин (50 мкг/мл среды), стрептомицин (20 мкг/мл среды), канамицин (50 мкг/мл).

Трансформированные бактерии хранились при -72°C в низкотемпературном холодильнике в замороженном виде в 25% глицерине.

Агроинфилтрация и инокуляция растений

Перед агроинфилтрацией бактериальные культуры выращивали, как описано ранее (Li, 2016; Solovyev et al., 2013). Агробактерии выращивали в среде LB при 28 °C в течение 16 часов с соответствующими антибиотиками. Затем клетки собирали центрифугированием, ресуспензировали в буфере для инфильтрации (10 мМ MES (2-(N-морфолино] этансульфоновая кислота, pH 5,5), 10 мМ MgCl₂ и 150 мкМ ацетосирингона) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 ч. Ацетосирингон – фенольный аттрактант, мобилизующий агробактерию для инфицирования растения (Ashby et al., 1988) Для инфильтрации суспензию клеток *A. tumefaciens* разводили до конечной OD₆₀₀ = 0,3, следуя известным по литературным данным рекомендациям об оптимальной оптической плотности инфильтрируемой суспензии (Bechtold et al., 1993; Wroblewski et al., 2005). Для анализа межклеточного транспорта PVX-GFP агробактериальную культуру, несущую конструкцию PVX-GFP, инфильтрировали при OD₆₀₀ = 0,00003. Аналогично, для анализа на основе TCV культуру агробактерий, несущую TCV-GFP, разводили до OD₆₀₀ = 0,00024. Агроинфилтрацию абаксиальной поверхности листьев растений *N. benthamiana* проводили с помощью шприца без иглы объемом 2 мл. Для анализа инфекции PVX и PVX-vDRB листья растений *N. benthamiana* посыпали диатомитом (целит 545, «L.P.C. Chemicals & Dyes Ltd», Лондон, Великобритания) и механически инокулировали плазмидной ДНК; для инокуляции каждого листа использовали 7 мкг ДНК (раствор 1 мкг/мкл в деионизированной воде).

Вестерн-блот

Образцы листьев растений *N. benthamiana* измельчали в порошок в жидком азоте, затем добавляли буфер, содержащий три части Трис-HCl (pH 7.8) и одну часть четырехкратного буфера (Laemmli sample buffer, 100 mM Трис-HCl (pH 6.8), 100 mM β-меркаптоэтанола, 10% глицерина, 4% SDS, 0,1% бромфенолового синего). Образцы инкубировали при 95 °C в течение 5 минут, центрифугировали для удаления остатков тканей растений и наносили на 12 % полиакриламидный гель для SDS-PAGE. После электрофореза белки переносили на мембрану Hybond-P «GE Healthcare Bio-Sciences» (Нискауна, США). Для обнаружения белков использовали конъюгированные с пероксидазой кроличьи анти-GFP антитела «Rockland» (Поттстаун, США) или моноклональные анти-FLAG M2 антитела и кроичьи анти-Mouse IgG (whole molecule) вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), а также систему субстратов для усиленной хемилюминесценции ECL «GE Healthcare Bio-Sciences» (Нискауна, США).

Обратная транскрипция и количественный ПЦР-анализ

Из анализируемых частей растения отбирали листовые диски, замораживали в жидком азоте и измельчали в порошок. Тотальную РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA «Evrogen» (Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы избежать загрязнения геномной ДНК растений, образцы обрабатывали ДНКзой I (ThermoFisher Scientific). После обработки ДНКзой I пробы тотальной РНК были очищены фенол-хлороформным методом (см. «Очистка продукта ПЦР фенолом и хлороформом»). После очистки 1 мкг каждого образца РНК транскрибировали в кДНК с праймером oligo(dT) с помощью обратной транскриптазы RevertAid «ThermoFisher Scientific». Затем 1 мкл разбавленного в 3 раза продукта обратной транскрипции использовали для кПЦР со смесью qPCR Mix M-440 «Синтол» (Россия). Для кПЦР использовали специфические праймеры на кодирующую последовательность репликазы вируса

PVX (PVX-REP-P и PVX-REP-M), на кДНК GFP (GFP-C3-PP1-R и GFP-C3-PP1-F) и праймеров для кДНК референсного транскрипта F-box (F-box-F и F-box-R) (см. таблица 1). Реакции проводили в системе CFX Connect Real-Time PCR System «Bio-Rad» Геркулес, США). Значение порогового цикла Ct для РНК PVX и GFP нормировали на мРНК референсного гена.

5'-RACE

Тотальная РНК, использованная для 5'-RACE была выделена из зараженных ShVX растений *Allium sera* var. *aggregatum* с помощью реагента ExtractRNA «Evrogen» (Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Процедура 5'-RACE была проведена с использованием набора Ambion FirstChoice RLM-RACE Kit (ThermoFisher Scientific, Уолтем, США) в соответствии с протоколом производителя. Время элонгации цикла ПЦР было равно 30 секундам. Использованные специфические для генома ShVX олигонуклеотиды приведены в таблице 1.

Микроскопия и наблюдение транспорта вируса, визуализация флуоресценции

Анализ внутриклеточной локализации белков проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon C2plus (Токио, Япония), оснащенного объективом с водной иммерсией с увеличением $\times 60$ (1,2 NA). Длины волн возбуждения флуоресценции составляли 488 нм для GFP и 548 нм для mRFP и гексилового эфира родамина B. Флуоресценцию регистрировали в интервале 495-545 нм для GFP и 580-640 нм для mRFP. Образцы агроинфильтрированных листьев анализировали с помощью конфокальной микроскопии на 3 дпи. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Nikon NIS Elements (версия 5.21.00). Очаги инфекции TCV-GFP рассматривали на 5 дпи с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M (Zeiss, Oberkochen, Германия) под объективом с увеличением $\times 20$. Флуоресценцию GFP возбуждали длинноволновым ультрафиолетовым светом (365

нм) с помощью лампы Black-Ray B-100AP (UVP, Кембридж, Великобритания) – во время работ с vDRB; и с помощью лампы UV-365ES UV-A/White Light LED NTD Inspection Lamp (Spectro-UV, Фармингдейл, Нью-Йорк, США) – во время работ с p42.

Анализ последовательностей

Собранные поэледовательности вирусных геномов были взяты из базы данных NCBI (доступ получен 17 июня 2025 г.). Детекцию ОРТ и трансляцию предполагаемых белок-кодирующих последовательностей проводили с помощью программ «ORF Finder» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) и «ExPASy» (<https://web.expasy.org/translate/>), соответственно. Доступ к этим инструментам был получен 17 июня 2025 года.

Результаты

1. Исследование механизма экспрессии гена p42 и функций белка p42

1.1. Экспрессия гена p42 ShVX

Экспрессия 5'-дистальных генов генома ShVX (Рис. 1А), может происходить с сгРНК, служащих матрицами для трансляции, как это было показано для других представителей *Alphaflexiviridae* (Fujimoto et al., 2022). Для поиска сгРНК ShVX была использована методика амплификации 5'-концов кДНК 5'-RACE. Тотальная РНК для постановки 5'-RACE была выделена из зараженных ShVX растений *Allium cepa* var. *aggregatum*. В исследовании использовали набор из пяти пар праймеров, комплементарных участкам кДНК генома ShVX, расположенным на расстоянии около 300 нукл. к 3'-концу от старт-кодонов генов TGB1, TGB2, p42, CR и CRP (Рис. 5А). Ген TGB3 в анализ не был включен, поскольку ранее уже было показано, что трансляция OPT TGB3 происходит по механизму “leaky scanning” на матрице, содержащей гены TGB2 и TGB3 (Lezzhov et al., 2015). В результате 5'-RACE были выявлены продукты амплификации только для генов TGB1 и CR (Рис. 5Б). Для картирования 5'-концевых нуклеотидов субгеномных РНК для TGB1 и CR продукты амплификации были клонированы, по пять независимых клонов были секвенированы для каждого гена. Было обнаружено, что 5'-концевые нуклеотиды субгеномных РНК для TGB1 и CR соответствуют остаткам гуанозина в позициях 5319 и 7605 генома ShVX, соответственно (Рис. 5В).

Поскольку при постановке 5'RACE не было обнаружено продукта амплификации с праймерами, специфическими для p42, можно было предположить, что экспрессия p42 не требует наличия отдельной сгРНК. В таком случае трансляция p42 может происходить с помощью механизма «leaky scanning» с более длинной сгРНК, такой как сгРНК TGB1. При анализе последовательности участка генома ShVX, включающего TGB и p42, было выявлено, что: (1) ген p42 перекрываетя с геном TGB3; (2) инициаторный кодон TGB2 является слабым, так как находится в неоптимальном контексте, согласно Козак (Kozak, 1983; Kozak,

1989); (3) инициаторный кодон AUG OPT TGB2 является единственным триплетом AUG в области от начала OPT TGB1 до инициаторного кодона OPT p42; и (4) инициаторный кодон AUG OPT p42 находится в контексте, оптимальном для инициации трансляции (Рис. 6А). Эти наблюдения согласуются с гипотезой о том, что трансляция p42 происходит на матрице сгРНК TGB1 с помощью механизма «leaky scanning». В этом процессе сканирующая субъединица рибосомы, пропустившая инициаторный кодон TGB1, может также пропустить неоптимальный AUG TGB2 и неэффективный инициаторный кодон CUG TGB3; это позволяет рибосоме достичь следующего триплета AUG, который является инициаторным кодоном p42 (Рис. 6А).

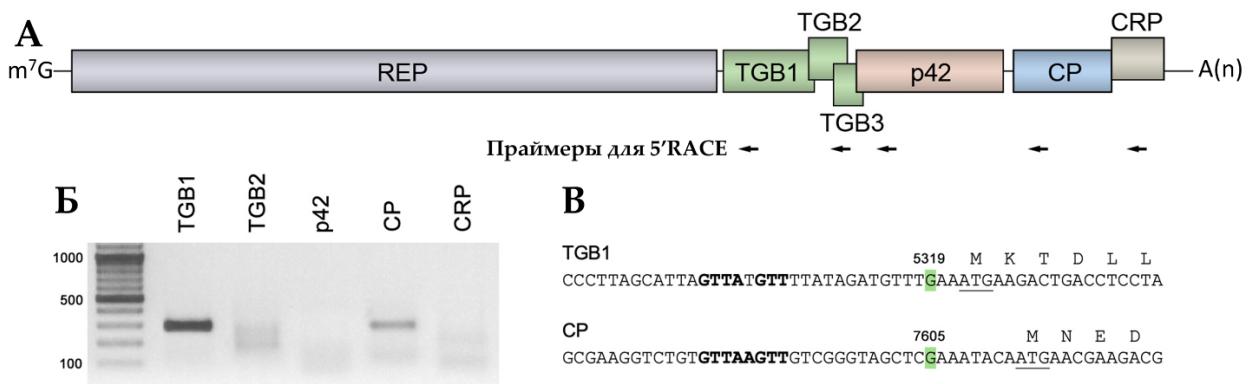


Рисунок 5. Анализ сгРНК ShVX с помощью 5'-RACE. (А) Схематическое изображение генома ShVX с позициями праймеров, использованных для 5'-RACE, показанными стрелками. (Б) Изображение агарозного геля с нанесенными продуктами 5'-RACE. Слева указаны маркеры длины ДНК (в парах оснований). Ожидаемый размер каждого продукта амплификации во всех случаях составляет около 300 пар оснований. (В) Картированые 5'-концы сгРНК TGB1 и CP. 5'-концевые нуклеотиды сгРНК показаны зеленым цветом, сверху указаны позиции этих нуклеотидов в геномной РНК. Показано начало кодирующих последовательностей TGB1 и CP, подчеркнуты инициаторные кодоны. Жирным шрифтом выделена последовательность GTTAAGTT, которая является консервативным элементом промоторов сгРНК вирусов семейства *Alflexiviridae*.

Чтобы проверить эту гипотезу, участок генома ShVX, включающий TGB и ген p42, был клонирован в бинарный вектор под контролем 35S-промотора. В ходе клонирования в одной рамке с OPT p42 была слита короткая последовательность, кодирующая эпитоп FLAG (Hopp et al., 1988). Полученная конструкция, имитирующая сгРНК TGB1 и названная TGB-p42-FLAG (Рис. 6А), была использована для трансформации клеток *Agrobacterium tumefaciens*. Полученный бактериальный клон использовали для агроинфильтрации листьев растений *Nicotiana benthamiana*. Анализ листьев методом Вестерн-блот с использованием

FLAG-специфических антител, проведенный через 3 дня после инфильтрации (дпи), выявил основную полосу размером около 43 кДа, соответствующего ожидаемому для p42-FLAG, и полосу размером около 85 кДа, которая, вероятно, представляет собой димер p42 (Рис. 6Б). Дополнительная слабая полоса продукта размером 33 кДа, обнаруженная в инфильтрированных листьях, но не в контроле, могла быть продуктом частичного протеолиза p42 (Рис. 6Б). Таким образом, представленные данные показывают, что p42 может транслироваться на матрице тетрацистронной мРНК.

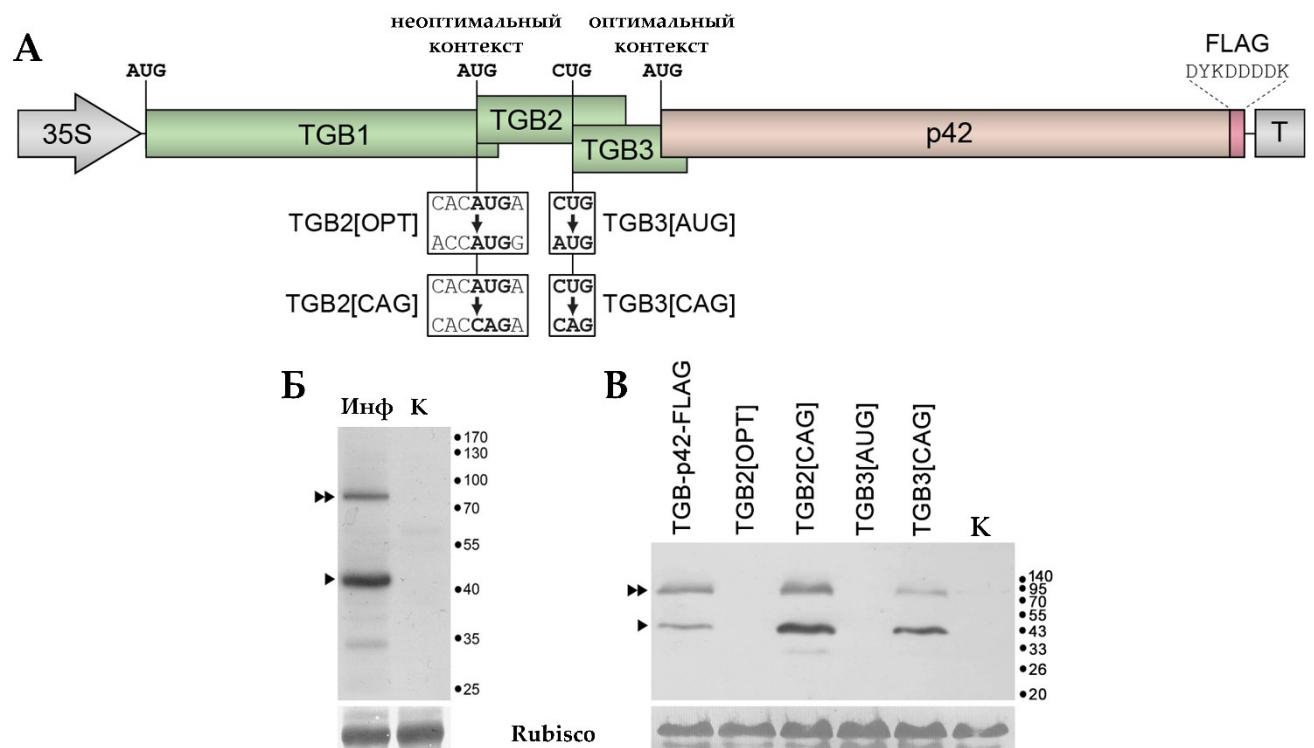


Рисунок 6. Анализ механизма экспрессии p42. Схематическое изображение конструкции TGB-p42-FLAG. Гены показаны прямоугольниками. Показаны положения 35S промотора и 35S терминатора (T). Под схемой показаны мутации, внесенные в TGB-p42-FLAG, и указаны названия соответствующих мутантов. (Б) Детекция p42 в листьях *N. benthamiana*, экспрессирующих TGB-p42-FLAG, методом Вестерн-блота с антителами к FLAG. Инф – агроинфильтрированный лист. (В) Влияние внесенных мутаций на трансляцию p42. Конструкции, использованные для агроинфильтрации, указаны над дорожками. На (А, Б) К – контроль, инокулированный буфером лист. Позиции p42 и его предполагаемого димера обозначены одинарным и двойным треугольником, соответственно. Справа показано положение маркеров молекулярной массы (кДа).

Чтобы определить, происходит ли трансляция p42 на матрице тетрацистронной мРНК с помощью механизма «leaky scanning», была получена серия мутантов TGB-p42-FLAG, включающая следующие мутантные конструкции: TGB2[OPT], в которой контекст AUG TGB2 был приведен к оптимальному

согласно Козак (Kozak, 1983; Kozak, 1989); TGB2[CAG], в которой AUG TGB2 был заменен на CAG, о котором никогда не сообщалось как об альтернативном инициаторном кодоне; TGB3[AUG], в которой альтернативный инициаторный кодон CUG TGB3 был заменен на AUG; и TGB3[CAG], в которой инициаторный кодон TGB3 был заменен неинициаторным кодоном CAG (Рис. 6Б). Культурами агробактерий, несущих мутантные конструкции и конструкцию дикого типа (wt) TGB-p42-FLAG в качестве контрольной, инфильтрировали листья *N. benthamiana*. Вестерн-блот анализ инфильтрированных листьев с FLAG-специфическими антителами показал, что мутации, внесенные для получения TGB2[OPT] и TGB3[AUG], ведущие к увеличению эффективности инициации трансляции TGB2 и TGB3, соответственно, блокировали синтез p42 (Рис. 6Б). С другой стороны, блокирование трансляции TGB2 и TGB3 в мутантах TGB2[CAG] и TGB3[CAG] приводило к повышению уровня p42, причем мутирование инициаторного кодона TGB2 имело более выраженный эффект (Рис. 6Б). Полученные данные показывают, что трансляция p42 на мРНК, имитирующей сгРНК TGB1, зависит от инициации трансляции двух предыдущих OPT, что исключает инициацию трансляции на внутреннем сайте посадки рибосомы в качестве механизма трансляции p42. Кроме того, трансляция p42 возможна только при подавлении инициации трансляции двух предыдущих OPT и блокируется при эффективной инициации трансляции хотя бы одной из этих OPT. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что трансляция p42 осуществляется на матрице тетрацистронной РНК TGB-p42-FLAG по механизму «leaky scanning». Исходя из этого, можно выдвинуть предположение, что сгРНК TGB1 является матрицей для трансляции p42 и при инфекции ShVX.

1.2. Возможные механизмы экспрессии p42 у других аллексивирусов

Для экспрессии p42 ShVX с помощью механизма «leaky scanning» с сгРНК TGB1 требуется слабый контекст инициаторного кодона TGB2, неэффективная инициация трансляции TGB3 и отсутствие других инициаторных кодонов в области TGB. Чтобы определить, является ли этот механизм экспрессии общим для

представителей рода *Allexivirus*, был проведен анализ универсальности этих особенностей в геномах известных в настоящее время аллексивирусов. Первоначальный анализ показал, что инициаторные кодоны, ранее предсказанные для ОРТ генов TGB1 четырех аллексивирусов, располагались перед 5'-терминальными остатками сгРНК TGB1, предсказанными путем выравнивания их последовательностей с последовательностью ShVX (Рис. 7А). Когда в качестве истинных инициаторных кодонов были взяты кодоны, расположенные после предсказанных 5'-терминальных остатков сгРНК TGB1 (Рис. 7А), оказалось, что семь других аллексивирусов, помимо ShVX, имеют перечисленные выше особенности геномной области TGB/p42 (Рис. 7Б), которые обеспечивают экспрессию p42 по механизму «leaky scanning».

Интересно, что у трех из этих вирусов инициаторным кодоном ОРТ гена TGB3 является AUG. Однако у двух из них инициаторные последовательности имеют остатки С в положениях -3 и +1, что делает эти контексты неоптимальными (Рис. 7Б) и позволяет предполагать, что эффективность инициации трансляции на этих кодонах очень низка и, вероятно, сравнима с эффективностью инициаторного кодона CUG ОРТ TGB3 ShVX. У третьего вириса, *Vanilla latent virus* (VLV), инициаторная последовательность TGB3 находится в неоптимальном контексте GGCAUGU (Рис. 7Б), что делает трансляцию расположенной после нее ОРТ p42 весьма неэффективной. Четыре из проанализированных вирусов имеют внутренние триплеты AUG в генах TGB1, TGB2 или обоих генах TGB1 и TGB3 (Рис. 7Б). У *blackberry virus E* (BVE) только референсный геном вириса, который был использован в анализе, имеет внутренний AUG в гене TGB1, в то время как остальные 19 вариантов BVE, доступные в GenBank, имеют не-AUG триплеты в этой позиции. Это наблюдение показывает, что BVE имеет расположение инициаторных кодонов в области TGB/p42, подобное геному ShVX. Из 16 доступных вариантов вирусов вида *garlic virus C* (GarV-C) только четыре, включая референсный геном, имеют внутренние AUG в гене TGB1. Аналогично, только 16 из 70 доступных вариантов вирусов *garlic virus D* (GarV-D) имеют внутренние

триплеты AUG в гене TGB1, причем все они содержат пиrimидины в положениях -3 и +1, что делает их довольно неэффективными инициаторами. Таким образом, большинство геномов BVE, GarV-C и GarV-D отвечают требованиям трансляции p42 по механизму «leaky scanning». Геном garlic virus X (GarV-X) является заметным исключением среди аллексивирусов. Из 45 вариантов GarV-X, доступных в GenBank, только шесть не имеют внутренних триплетов AUG в генах TGB1 и TGB3. Остальные имеют до двух внутренних AUG в TGB1 и до трех в TGB3, что позволяет предположить, что механизм трансляции p42 у GarV-X может отличаться от такового у ShVX. В целом, на основании анализа последовательностей можно сделать вывод о том, что подавляющее большинство секвенированных аллексивирусов имеют общий механизм экспрессии p42, включающий трансляцию функционально тетрацистронной РНК по механизму «leaky scanning».

A

ShVX	ACUAUUUAACUAACCCCUUAGCAUUA	GUUAUGUUUUUAUAGGUGUUUGAA AUG
BVE	UGAUUUGCCACCGGGCCGUUGAGUAG	CUUAUGUUUUUGCCUAAACUGAAG AUG
GarV-A	UCAUUUGCUGACAACCUCUUGUAGCUA	GUUAUGUUCUAGAUAUGCUCGAA AUG
GarV-B	CAACUUUAAAGCAUCCAUUAGGUUUAGUUAUGUUUCCUAA	U GUUUU GAA AUG
GarV-C	AUUAUAUAGAAUCCCAUGUAAAAGGUUAGGUU	U UCCUGCAUGAU GAA AUG

Б

	TGB1	TGB2	TGB3	p42
ShVX	AUG ..[no AUG].. CAC AUGA ..[no AUG].. AAU CUGC ..[no AUG].. AGC AUGG			
GarV-E	AUG ..[no AUG].. UUG AUGA ..[no AUG].. ACG CUGG ..[no AUG].. GCC AUGG			
ApV	AUG ..[no AUG].. UUU AUGA ..[no AUG].. CCC CUGC ..[no AUG].. GCC AUGA			
SSYMV	AUG ..[no AUG].. UCU AUGA ..[no AUG].. CAU AUGC ..[no AUG].. CAA AUGC			
AVS	AUG ..[no AUG].. UUU AUGA ..[no AUG].. CCU AUGC ..[no AUG].. GCC AUGC			
VLV	AUG ..[no AUG].. UCG AUGA ..[no AUG].. GGC AUGU ..[no AUG].. GUCA UGG			
GarV-A	AUG ..[no AUG].. CGG AUGA ..[no AUG].. UAG CUGG ..[no AUG].. GCC AUGG			
GarV-B	AUG ..[no AUG].. CUA AUGA ..[no AUG].. ACA CUGG ..[no AUG].. CAC AUGA			
BVE	AUG ..[no AUG].. UCC AUGA ..[1 AUG].. AAAC CUGG ..[no AUG].. GCA AUGG			
GarV-C	AUG ..[1 AUG].. UUU AUGA ..[no AUG].. AAG CUGG ..[no AUG].. CGC AUGA			
GarV-D	AUG ..[1 AUG].. UAG AUGA ..[no AUG].. AAU CUGG ..[no AUG].. GAC AUGG			
GarV-X	AUG ..[2 AUG].. UUU AUGA ..[no AUG].. ACAC CUGG ..[2 AUG].. CCC AUGA			
ReAV	AUG ..[no AUG].. GGG AUGA ..[no AUG].. CCC AUGA ..-----			

Рисунок 7. Анализ последовательностей геномных областей TGB/p42 представителей рода *Allexivirus*. (А) Предсказание инициаторных кодонов в генах TGB1. Выравнивание последовательностей BVE, GarV-A, GarV-B и GarV-C с участком последовательности ShVX, предшествующим инициаторному кодону TGB1. Зеленым цветом показан 5'-терминальный остаток сгРНК TGB1, который был картирован для ShVX и предсказан для других вирусов. Консервативная часть промотора сгРНК показана синим. Инициаторные кодоны TGB1 выделены жирным шрифтом. Подчеркнуты триплеты, которые ранее были аннотированы как инициаторные кодоны соответствующих генов. (Б) Контексты инициаторных кодонов и наличие внутренних триплетов AUG в области TGB/p42 геномов аллексивирусов. Показаны контексты инициаторных кодонов TGB2, TGB3 и p42. В квадратных скобках указано количество триплетов AUG между инициаторными кодонами TGB1, TGB2, TGB3 и p42. Прочерки указывают на

отсутствие гена p42 в геноме ReAV. В анализ были включены следующие вирусы: ShVX, shallot virus X (идентификационный номер NC_003795.1); GarV-E, garlic virus E (NC_004012.1); ApV, arachis pintoi virus (NC_032104.1); SSYMV, Senna severe yellow mosaic virus (NC_076419.1); AVS, alfalfa virus S (NC_034622.1); VLV, Vanilla latent virus (NC_035204.1); GarV-A, garlic virus A (NC_003375.1); GarV-B, garlic virus B (NC_025789.1); BVE, blackberry virus E (NC_015706.1); GarV-C, garlic virus C (NC_003376.1); GarV-D, garlic virus D (NC_022961.1); GarV-X, garlic virus X (NC_001800.1); ReAV, Rehmannia allexivirus (PP097219.1).

1.3. РНК-связывающие свойства p42

Биохимические свойства ShVX p42 не были изучены. Чтобы проанализировать способность p42 связывать РНК, рекомбинантный p42 был экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Для этого кодирующую последовательность p42 клонировали в плазмидный вектор для экспрессии белка. Затем белок p42, слитый с гексагистидиновой последовательностью (6xHis), был аффинно очищен из лизированных бактериальных клеток и ренатурирован с помощью диализа. Способность p42 связывать РНК была проанализирована в экспериментах по исследованию изменения подвижности в агарозном геле, в которых определенное количество рекомбинантного p42 инкубировали с возрастающим количеством РНК; образцы после инкубации анализировали в агарозном геле.

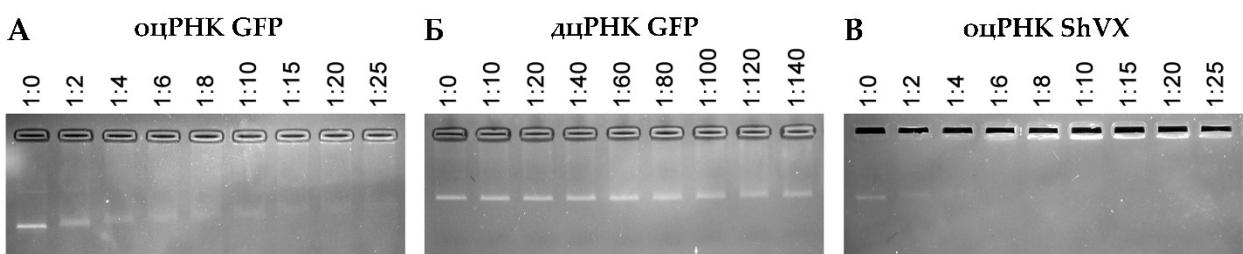


Рисунок 8. Анализ способности белка p42 связывать РНК в экспериментах по исследованию изменения подвижности в агарозном геле. Показано связывание p42 с GFP-специфической оцРНК (А), GFP-специфической дцРНК (Б), ShVX-специфической оцРНК (В). Пробы РНК были инкубированы с возрастающими количествами p42 и нанесены на агарозный гель, содержащий бромистый этидий. Молярные соотношения РНК:белок показаны над каждой дорожкой геля.

Инкубация p42 с оцРНК, представляющей собой фрагмент кодирующей последовательности GFP, привела к образованию РНК-белковых комплексов с пониженной подвижностью в геле по сравнению с несвязанной РНК (Рис. 8А). Впервые эти комплексы появлялись при молярном соотношении РНК:белок, равном 1:2. По мере увеличения этого соотношения подвижность комплексов

снижалась. Кроме того, при соотношении РНК:белок, равном 1:10 и выше, наблюдались комплексы, которые были неспособны войти в гель (Рис. 8А). После инкубации p42 с GFP-специфической д_ЦРНК не было выявлено связывания РНК даже при соотношении РНК:белок, равном 1:140 (самое высокое соотношение из использованных; Рис. 8Б). Эти данные показывают, что p42 связывается с о_ЦРНК и что это связывание не может быть обусловлено исключительно электростатическими взаимодействиями с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами.

Далее была проанализирована способность p42 связывать одноцепочечный транскрипт РНК, соответствующий 682 5'-концевым остаткам геномной РНК ShVX. Как и в экспериментах с GFP-специфической о_ЦРНК, наблюдались как комплексы с пониженной подвижностью в геле, так и комплексы, неспособные войти в гель (Рис. 8В). Характер связывания GFP- и ShVX-специфических транскриптов был в целом сходным. Комплексы, образованные p42, обнаруживались при молярном соотношении РНК:белок, равном 1:2, для обоих вариантов РНК (Рис. 8А, 8В). Однако комплексы, не входящие в гель, наблюдались при несколько меньшем молярном соотношении РНК:белок в случае транскрипта ShVX (Рис. 8А, 8В). Можно предположить, что наблюдаемые различия в связывании GFP- и ShVX-специфических транскриптов носят количественный характер. Таким образом, эти эксперименты не выявляют заметной специфичности белка p42 по отношению к используемому фрагменту генома ShVX. На основании имеющихся данных следует заключить, что p42 связывается с о_ЦРНК, но не с д_ЦРНК.

1.4. Внутриклеточная локализация белка p42

Для анализа внутриклеточной локализации p42 ShVX была получена конструкция p42-GFP, которая кодирует рекомбинантный белок p42, С-конец которого слит с GFP. Экспрессию p42-GFP проводили в листьях растений *N. benthamiana* с помощью агроинфилtrации, внутриклеточную локализацию

рекомбинантного белка исследовали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. На 3 дпи белок локализовался диффузно в цитоплазме, в небольших цитоплазматических тельцах, а также в виде нитевидных структур в цитоплазме. Эти три типа локализации были представлены в разной степени в каждой конкретной клетке (Рис. 9А, 9Б). В части клеток p42-GFP обнаруживался только в многочисленных тельцах в цитоплазме (Рис. 9В).

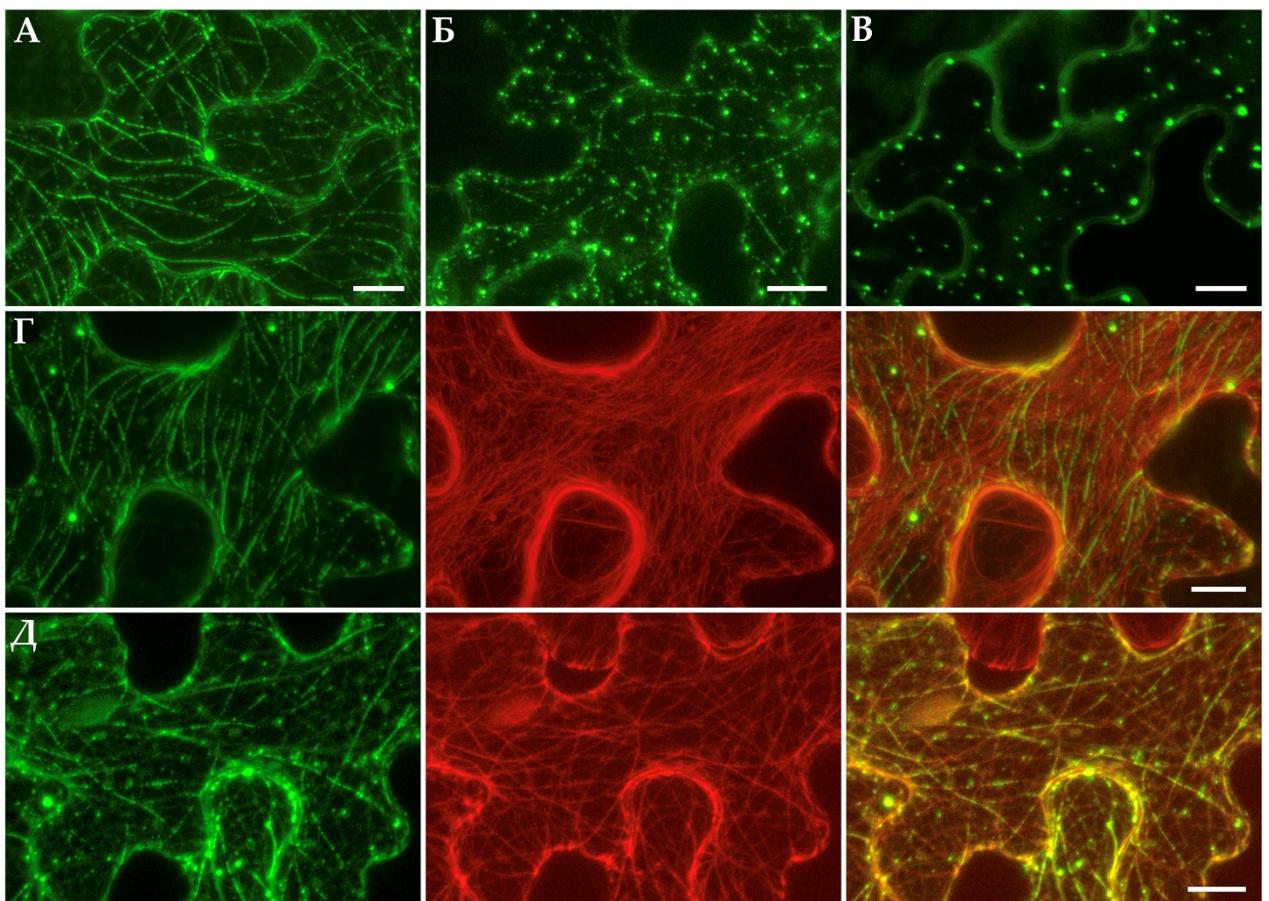


Рисунок 9. Внутриклеточная локализация белка p42. (А-В) Варианты локализации p42-GFP в разных клетках. (Г) Ко-экспрессия p42-GFP с актин-связывающим доменом белка талина мыши, слитым с мRFP. (Д) Ко-экспрессия p42-GFP со слитым с мRFP доменом белка MAP4 мыши, связывающим микротрубочки. Левые изображения (Г) и (Д) сделаны в зеленом канале, центральные – в красном, правые изображения получены путем наложения изображений в зеленом и красном каналах. Фотографии сделаны на 3 дпи. Все фотографии были получены путем реконструкции из Z-серии оптических срезов. Размер шкалы – 10 мкм.

Так как нитевидные структуры, наблюдаемые для p42-GFP, напоминали элементы цитоскелета, листья *N. benthamiana* агроинфилtrировали для ко-экспрессии p42-GFP с маркерами актиновых филаментов или микротрубочек. Когда p42-GFP ко-экспрессировали со слитым с мRFP актин-связывающим доменом мышиного талина, который, связывает актиновые микрофиламенты в

растительных клетках (Kost et al., 1998; Lazareva et al., 2017a), ко-локализации сигналов GFP и mRFP не наблюдалось (Рис. 9Г). При ко-экспрессии p42-GFP со слитым с mRFP микротрубочки-связывающим доменом мышиного белка MAP4 (microtubule-associated protein 4) (Shemyakina et al., 2011), нитевидные структуры, содержащие p42-GFP, отчетливо ко-локализовались с микротрубочками (Рис. 9Д). Следует отметить, что небольшие тельца, содержащие p42-GFP, также были расположены вдоль микротрубочек. Кроме того, p42 часто располагался вдоль микротрубочек неравномерно, образуя прерывистые структуры, напоминающие пунктирные линии (Рис. 9Д). Таким образом, исследования внутриклеточной локализации показывают, что ShVX p42 может связываться с микротрубочками в растительных клетках.

1.5. Анализ способности белка p42 супрессировать РНК-сайленсинг

Анализ способности p42 супрессировать сайленсинг проводился с использованием нескольких экспериментальных подходов.

Первый подход заключался в использовании ранее описанной экспериментальной системы для идентификации ВСР, основанной на временной ко-экспрессии GFP и dsGF (Yelina et al., 2005). Конструкция dsGF кодирует транскрипт, содержащий инвертированный повтор, образующий длинную шпилечную структуру днкРНК, который соответствует двум третям последовательности GFP и индуцирует сайленсинг GFP (Yelina et al., 2005). В этом эксперименте листья *N. benthamiana* были инфильтрированы для (1) экспрессии GFP, (2) совместной экспрессии GFP с конструкцией dsGF, (3) ко-экспрессии GFP, dsGF и p42 ShVX, а также (4) ко-экспрессии GFP, dsGF и белка p19 вируса кустистой карликовости томатов, который является хорошо известным супрессором сайленсинга (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003) и был использован в качестве положительного контроля. Результаты анализировали на 4 дни при возбуждении флуоресценции GFP облучением УФ-светом. Инфильтрированные для экспрессии GFP (без dsGF, p19 и p42) участки листьев демонстрировали

умеренный уровень флуоресценции GFP, тогда как ко-экспрессия GFP с dsGF, как и ожидалось, приводила к отсутствию флуоресценции GFP в инфильтрированных участках (Рис. 10А). При совместной экспрессии GFP с dsGF и p19 наблюдался высокий уровень флуоресценции GFP вследствие подавления сайленсинга, вызванного dsGF, как описано ранее (Yelina et al., 2005), тогда как ко-экспрессия p42 с GFP и dsGF приводила к отсутствию флуоресценции GFP (Рис. 10А). Эти наблюдения показывают, что p42 не способен супрессировать сайленсинг, индуцированный дцРНК.

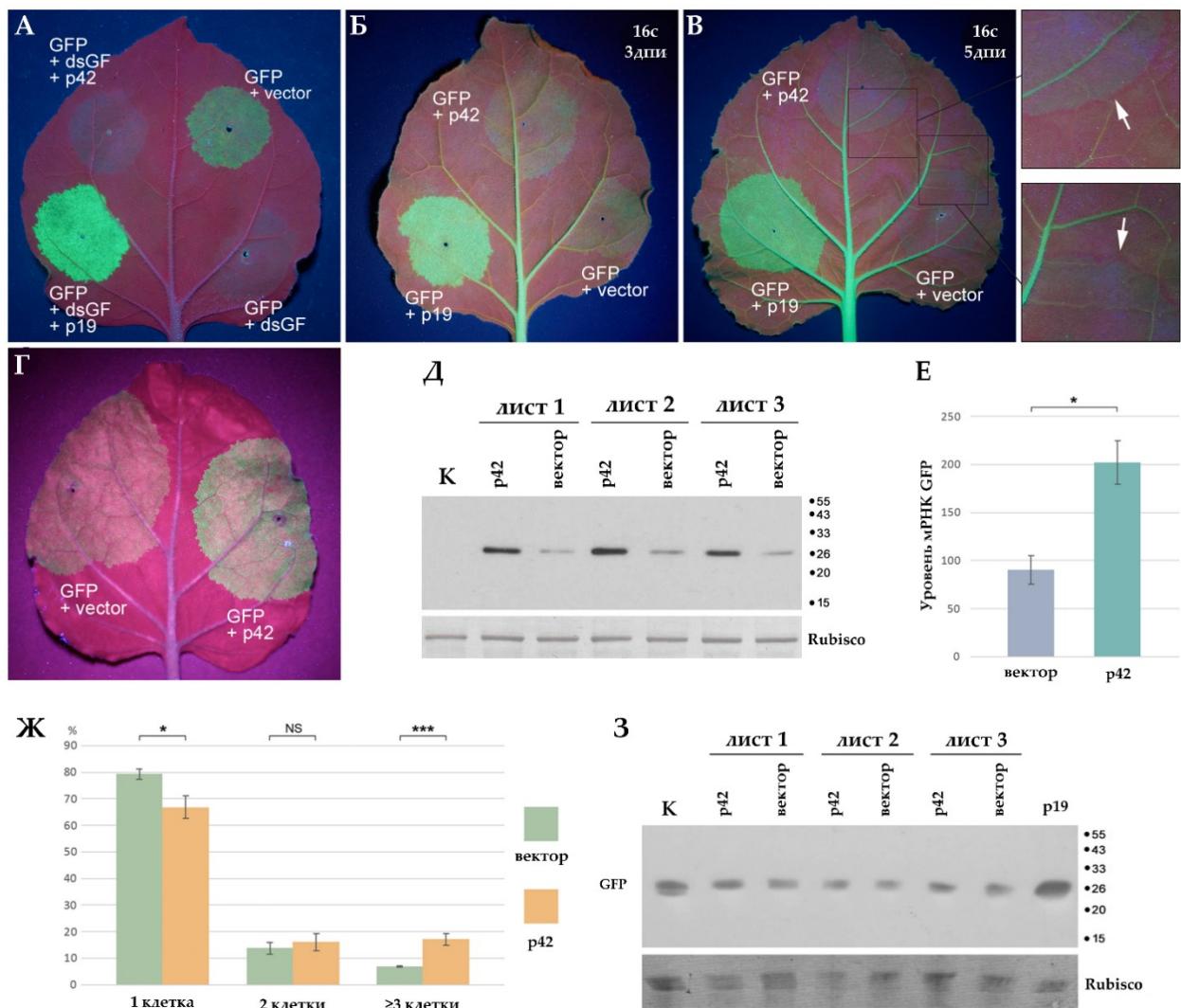


Рисунок 10. Анализ способности p42 супрессировать РНК-сайленсинг в растениях *N. benthamiana*. (А) Анализ способности p42 супрессировать сайленсинг, индуцированный дцРНК. (Б и В) Анализ способности p42 подавлять оцРНК-индуцированный сайленсинг в трансгенных растениях, экспрессирующих GFP (линия 16с). Изображения листьев получали на 3 дпи (Б) и 5 дпи (В). Стрелки на увеличенных участках листьев указывают на красную кайму, окружающую инфильтрированные участки. (Г-Е) Анализ способности p42 подавлять индуцированный оцРНК сайленсинг в нетрансгенных растениях *N. benthamiana*. (Г) Фотография агроинфилtrированного листа.

(продолжение) (Д) Вестерн-блот-анализ накопления GFP в участках листьев, агроинфильтрированных для ко-экспрессии GFP с p42 или с пустым вектором. К – контроль, инокулированный буфером лист. Положение маркеров молекулярных масс показано справа. (Е) Уровни накопления мРНК GFP в листьях, агроинфильтрированных для ко-экспрессии GFP с p42 или пустым вектором. Образцы инфильтрированной ткани листа были отобраны на 3 дни. Показаны средние уровни экспрессии, определенные методом кПЦР; планки погрешностей указывают на стандартную ошибку. Для расчета каждого приведенного значения использовали четыре биологические повторности. Звездочка указывает на статистически значимые различия (*, $p < 0,05$) согласно парному двухвыборочному двухстороннему t-тесту Стьюдента. (Ж) Анализ способности p42 супрессировать РНК-сайленсинг контексте инфекции TCV-GFP. На графике представлен процент флуоресцентных локусов, состоящих из одной, двух, трех и более клеток, наблюдаемых при совместной экспрессии TCV-GFP с p42 или пустым вектором. Количество посчитанных локусов составляло 513 для p42 и 486 для контроля (пустой вектор). Звездочками отмечены статистически значимые (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) различия согласно парному двухвыборочному двухстороннему t-тесту Стьюдента. NS - несущественные различия. Столбики ошибок указывают на стандартную ошибку (SE). (З) Вестерн-блот-анализ накопления GFP в листьях трансгенных растений *N. benthamiana* линии 16с, которые были агроинфильтрированы для ко-экспрессии GFP либо с p42, либо с пустым вектором в качестве контроля. К – контроль (не инфильтрированная ткань листа). p19 – ткань листа, агроинфильтрированная для ко-экспрессии p19 с GFP. Справа указаны положения маркеров молекулярных масс.

Далее была проанализирована способность p42 супрессировать сайленсинг, индуцированный оцРНК. В этом эксперименте были использованы трансгенные растения *N. benthamiana* линии 16с, конститутивно экспрессирующие GFP (Ruiz et al., 1998). Листья растений 16с были агроинфильтрированы для ко-экспрессии GFP с p42, p19, или пустым вектором. На 3 дни GFP, ко-экспрессированный с пустым вектором (отрицательный контроль), давал слабый сигнал GFP в инфильтрированных областях. При этом ко-экспрессия GFP с p19 приводила к яркой флуоресценции GFP (Рис. 10Б), демонстрируя что активность p19 в качестве ВСР приводит к супрессии сайленсинга временно экспрессированного GFP (положительный контроль). По сравнению с ко-экспрессией GFP с пустым вектором, ко-экспрессия GFP с p42 не привела к значительному увеличению уровня флуоресценции GFP (Рис. 10Б) и накоплению белка GFP (Рис. 103). В условиях постановки данного эксперимента, как было описано ранее, можно наблюдать транспорт сигналов сайленсинга по образованию узкой красной каймы шириной 10-15 клеток вокруг областей инфильтрации. Данная красная кайма образуется вследствие сайленсинга эндогенного трансгена GFP в клетках участков листа, которые не были инфильтрированы, но куда распространился сигнал сайленсинга

из инфильтрированной области (Himber et al., 2003). Было обнаружено, что на 5 дни появилась красная кайма вокруг инфильтрированных участков в случае ко-экспрессии GFP с пустым вектором и с p42, но не в случае ко-экспрессии GFP и p19 (Рис. 10В). В случае p19 такая граница отсутствует, поскольку, как показано ранее, p19 ингибирует межклеточный транспорт сигналов сайленсинга (Himber et al., 2003). В совокупности эти данные показывают, что p42 не оказывает очевидного влияния на РНК-сайленсинг, инициированный оцРНК в трансгенных растениях, а также не влияет на распространение сайленсинга от клетки к клетке.

Способность p42 подавлять сайленсинг, индуцированный оцРНК, была дополнительно проанализирована с помощью другого, ранее описанного экспериментального подхода для идентификации белков функции ВСР (Senshu et al., 2011). Листья растений *N. benthamiana* дикого типа агроинфильтрировали для ко-экспрессии GFP с p42 или пустым вектором, использованным в качестве контроля. При возбуждении флуоресценции в листе под ультрафиолетовым светом на 3 дни было обнаружено, что участки, экспрессирующие p42, имели более яркую флуоресценцию GFP, чем контрольные участки, экспрессирующие GFP с пустым вектором (Рис. 10Г). Вестерн-блот анализ с использованием GFP-специфических антител подтвердил более высокий уровень накопления GFP при ко-экспрессии с p42 (Рис. 10Д). Анализ данных количественной ПЦР (кПЦР) с обратной транскрипцией показал, что уровень мРНК GFP был в 2,2 раза выше по сравнению с контролем (Рис. 10Е). Эти данные демонстрируют, что наблюдаемое усиление экспрессии GFP, вызванное белком p42, обусловлено повышенным уровнем мРНК GFP, что позволяет предположить, что p42 может выполнять функцию супрессора РНК-сайленсинга, индуцированного оцРНК.

Далее функцию ВСР белка p42 анализировали в контексте инфекции вируса морщинистости турнепса (turnip crinkle virus, TCV) (Powers et al., 2008b; Powers et al., 2008a). В данном эксперименте использовали TCV с модифицированным геномом, несущим ген GFP вместо гена белка оболочки TCV, выполняющего также функцию вирусного ВСР. Известно, что при экспрессии в отсутствие ВСР,

конструкция TCV-GFP локализуется в единичных исходно инфицированных клетках, однако способность TCV-GFP перемещаться между клетками восстанавливается при ко-экспрессии TCV-GFP с гомологичным или гетерологичным BCP, что приводит к образованию локусов инфекции, состоящих из нескольких клеток (Powers et al., 2008b; Powers et al., 2008a). В качестве контроля в данном эксперименте одну половину листа растения *N. benthamiana* инфильтрировали культурой агробактерий, несущей TCV-GFP, которая была сильно разбавлена для достижения экспрессии TCV-GFP в отдельных клетках, расположенных друг от друга на значительных расстояниях. Другую половину листа инфильтрировали сильно разведенной культурой агробактерий, несущей TCV-GFP, в смеси с культурой, несущей ген p42 ShVX, которая была разведена до стандартных значений оптической плотности ($OD_{600} = 0.3$), чтобы добиться экспрессии p42 во всех клетках инфильтрированной части листа. Флуоресцентная микроскопия инфильтрированных листьев на 5 дпи выявила статистически значимое ($p < 0,001$ согласно t-тесту Стьюдента) увеличение в 2,5 раза процента инфекционных локусов, состоящих из трех и более клеток, в образцах с p42 по сравнению с образцами с пустым вектором (Рис. 10Ж). Однако процент многоклеточных локусов, наблюдаемый для p42, был все же низким (17,1%) по сравнению со значением 76,6%, ранее полученным в аналогичном эксперименте для p19, который является сильным BCP (Lazareva et al., 2015). Таким образом, эксперименты по супрессии сайленсинга белком p42 позволяют предположить, что p42 можно рассматривать в качестве слабого BCP, активного в контексте вирусной инфекции или в условиях активации сайленсинга с помощью оцРНК.

1.6. Белок p42 супрессирует нонсенс-опосредованный распад РНК

Как и другие альфа-подобные вирусы, ShVX использует сгРНК для экспрессии 5'-дистальных генов. Следовательно, геномная РНК ShVX и сгРНК TGB1 имеют длинные 3'-нетранслируемые области (3'-НТО) и поэтому могут стать мишенью для нонсенс-опосредованного распада (nonsense-mediated decay, NMD), который является механизмом контроля качества клеточной РНК. При NMD

подвергаются разрушению аберрантные РНК, в том числе РНК с длинными 3'-НТО, такие как неправильно сплайсированные мРНК с внутренними терминирующими кодонами (Garcia et al., 2014; Kervestin, Jacobson, 2012). Поэтому был проведен анализ способности p42 подавлять противовирусную стратегию растений, основанную на механизме NMD. Для этих экспериментов использовали репортерную конструкцию GFP-LUTR (Long UTR), которая содержит фрагмент гена GUS длиной 555 нт, помещенный между кодирующей последовательностью GFP и терминатором транскрипции в векторе, используемом для экспрессии GFP (Рис. 11А). Таким образом, мРНК, транскрибируемая с этой конструкции в растениях, имеет длинную 3'-НТО. Было показано, что такие длинные 3'-НТО выступают в качестве цис-элементов, активирующих NMD в растительных клетках (Kertész et al., 2006). Чтобы проверить, подвергается ли РНК GFP-LUTR деградации по механизму NMD, листья растений *N. benthamiana* были агроинфильтрированы для экспрессии либо GFP-LUTR, либо GFP, который использовался в качестве контроля. В этом и последующих экспериментах для анализа эффекта NMD в условиях подавления РНК-сайленсинга используемые конструкции экспрессировали совместно с p14, мощным BCP PSLV (Pothos latent virus) (Kertész et al., 2006).

На 4 дни было обнаружено, что флуоресценция GFP-LUTR была значительно снижена по сравнению с GFP (Рис. 11Б). Чтобы проверить способность p42 подавлять NMD, растения *N. benthamiana* агроинфильтрировали для ко-экспрессии GFP-LUTR с p42, пустым вектором (отрицательный контроль) или UPF1[R863C] (положительный контроль). Последняя конструкция содержала кодирующую последовательность белка UPF1 (RNA helicase Up-Frameshift 1) арабидопсиса, основного эфектора NMD (Kervestin, Jacobson, 2012), несущую точечную замену аргининового остатка на цистeinовый в положении 863. Известно, что этот мутант UPF1 является доминантно-негативным при временной экспрессии и способен подавлять NMD в растительных клетках (Garcia et al., 2014; Kertész et al., 2006). На 4 дни при ко-экспрессии GFP-LUTR с UPF1[R863C] уровень флуоресценции GFP

был заметно увеличен по сравнению с ко-экспрессией GFP-LUTR с пустым вектором (Рис. 11В), подтверждая тем самым, что мРНК GFP-LUTR подвергается NMD. Ко-экспрессия p42 с GFP-LUTR также приводила к увеличению уровня флуоресценции по сравнению с отрицательным контролем (Рис. 11В). Анализ методом кПЦР показал, что уровень мРНК GFP-LUTR был увеличен в 1,86 раза в присутствии p42 (Рис. 11Г) по сравнению с отрицательным контролем, представленным пустым вектором. Эти данные позволяют заключить, что p42 способен подавлять NMD.

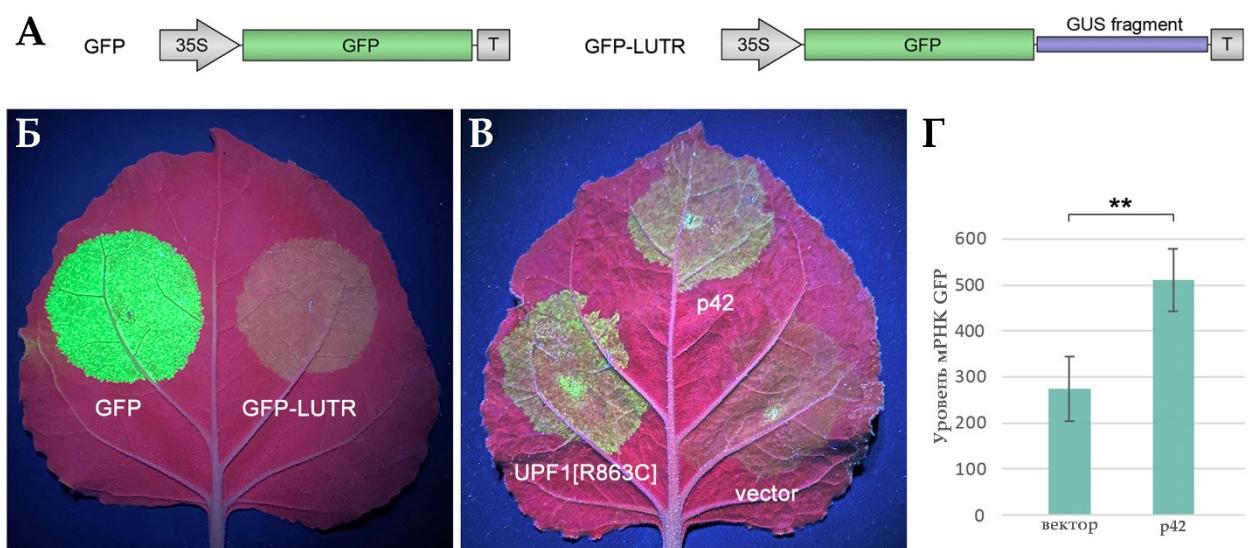


Рисунок 11. Подавление NMD белком p42 ShVX. (А) Схематическое изображение использованных репортерных конструкций. 35S – промотор 35S CaMV. Т –терминатор транскрипции. (Б) мРНК GFP-LUTR подвергается NMD. Изображение листа, который был инфильтрирован одинаково разведенными культурами агробактерий для экспрессии GFP и GFP-LUTR. (В) Анализ способности p42 подавлять NMD. Лист агроинфильтрировали для совместной экспрессии GFP-LUTR с p42, UPF1[R863C] или с пустым вектором, как указано в подписи на изображении. Фотография сделана на 4 дпи. (Г) Уровни накопления мРНК GFP-LUTR в листьях, агроинфильтрированных для ко-экспрессии GFP-LUTR с пустым вектором и p42. Образцы были отобраны на 4 дпи. Показаны средние уровни экспрессии, определенные методом кПЦР; планки погрешностей указывают на стандартную ошибку. Для расчета каждого показанного значения использовали три биологические повторности. Звездочка указывает на статистически значимые различия (**, $p < 0,01$) согласно парному двухвыборочному двухстороннему t-тесту Стьюдента.

2. Исследование белка vDRB

2.1. РНК-связывающие свойства vDRB

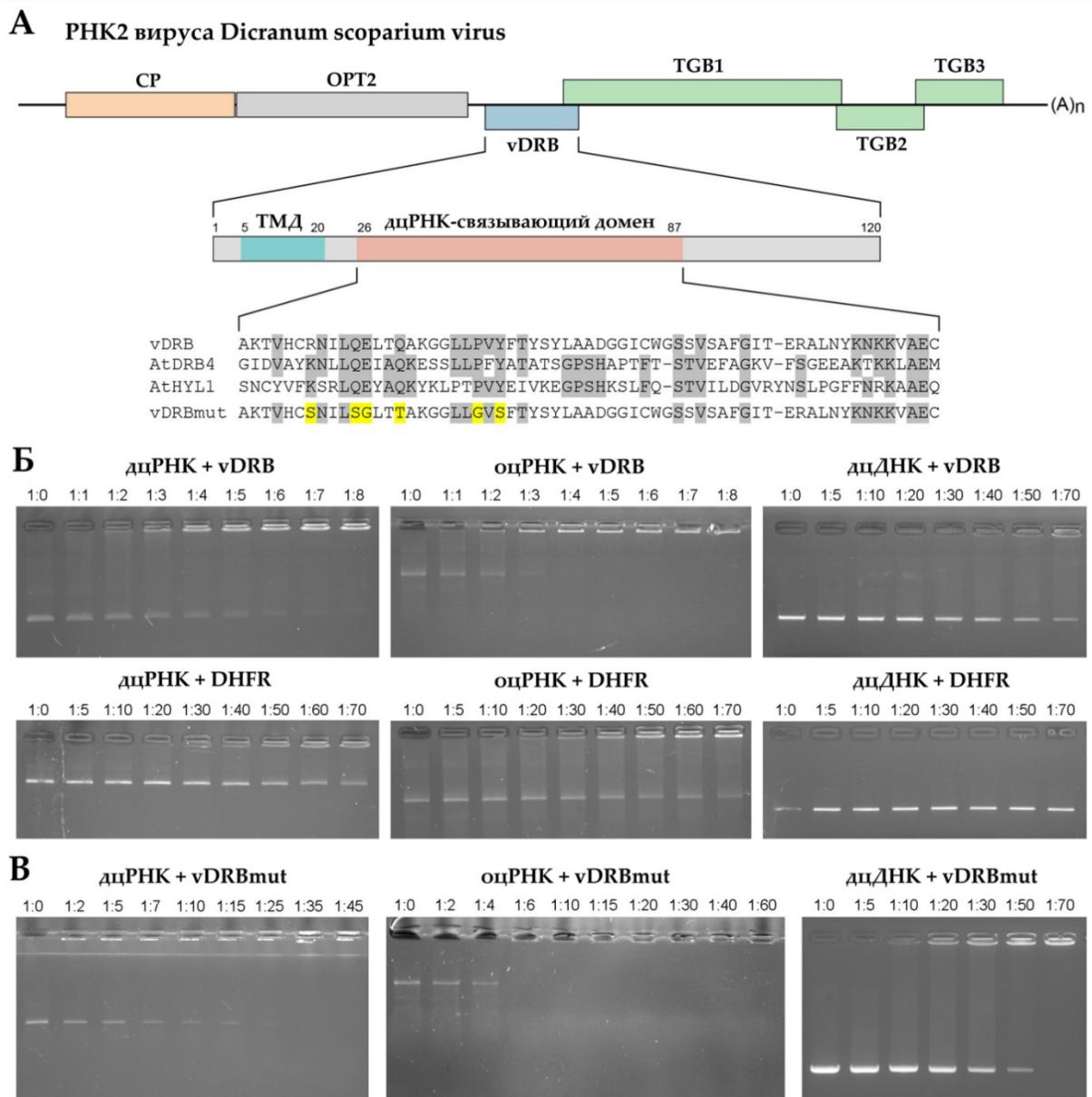


Рисунок 12. Анализ способности белка vDRB связывать нуклеиновые кислоты в экспериментах по оценке изменения подвижности в геле. (А) Схематическое изображение структуры геномной РНК2 вириуса *D. scoparium* и молекулярной организации vDRB. OPT показаны прямоугольниками. У vDRB цветом отмечены позиции трансмембранных домена (TMD) и дцРНК-связывающего домена. Под схемой приведено выравнивание последовательности дцРНК-связывающего домена vDRB с соответствующими доменами AtDRB4 и AtHYL1. Серым цветом выделены консервативные аминокислотные остатки. Желтым цветом показаны замены, внесенные в vDRBmut. (Б) Связывание vDRB с оцРНК, дцРНК и дцДНК. Во всех случаях нуклеиновые кислоты, как подписано сверху над фотографиями гелей, были инкубированы с возрастающими концентрациями либо vDRB, либо DHFR (в качестве отрицательного контроля) и нанесены на агарозный гель. (В) Связывание vDRBmut с оцРНК, дцРНК и дцДНК. Молярное соотношение нуклеиновых кислот к белку указано над дорожками гелей.

Основываясь на анализе последовательности третьей открытой рамки трансляции (OPT3) РНК2 вириуса *D. scoparium*, было предположено, что ее белковый продукт способен связывать днкРНК, однако данная способность vDRB до сих пор не была исследована (Morozov, Solovyev, 2022). Для проверки гипотезы о способности vDRB связывать днкРНК был использован продукт OPT3, экспрессированный в клетках *E. coli*. Для более эффективной экспрессии белка в бактериях был получен вариант гена OPT3 vDRB, из которого был удален участок, кодирующий N-концевой гидрофобный трансмембранный домен (Рис. 10), который был далее клонирован в экспрессионный вектор pET-33b(+) в одной рамке с последовательностью 6xHis. Накопленный в клетках *E. coli* рекомбинантный vDRB был очищен с помощью аффинной хроматографии и ренатурирован с помощью диализа. Способность полученного vDRB связывать нуклеиновые кислоты была проанализирована методом оценки изменения подвижности в агарозном геле. В качестве субстратов для связывания с vDRB были использованы оцРНК, дцРНК и дцДНК гена GFP.

Инкубация vDRB с дцРНК приводила к образованию РНК-содержащих комплексов, неспособных входить в гель. Такие комплексы появлялись, начиная с соотношения белок:РНК, равного 2:1, и при соотношении 8:1 большая часть внесенной дцРНК наблюдалась в комплексах, остававшихся в лунках для нанесения (Рис. 12Б). В качестве контроля был использован белок дигидрофолатредуктаза мыши (DHFR), который не обладает РНК-связывающей активностью. Этот белок был также экспрессирован в клетках *E. coli*, очищен и ренатурирован с помощью диализа. В случае контроля комплексы дцРНК с DHFR, которые были не способны войти в гель, наблюдались начиная с соотношения белок:РНК, равного 30:1, что можно объяснить возможным наличием минорных количеств бактериальных клеточных белков, которые могут неспецифично сорыгделяться с целевым продуктом. Однако значительное количество не связанный дцРНК оставалось и при соотношении 70:1 (Рис. 12Б). Полученные данные показывают, что vDRB способен эффективно связывать дцРНК, и подтверждают,

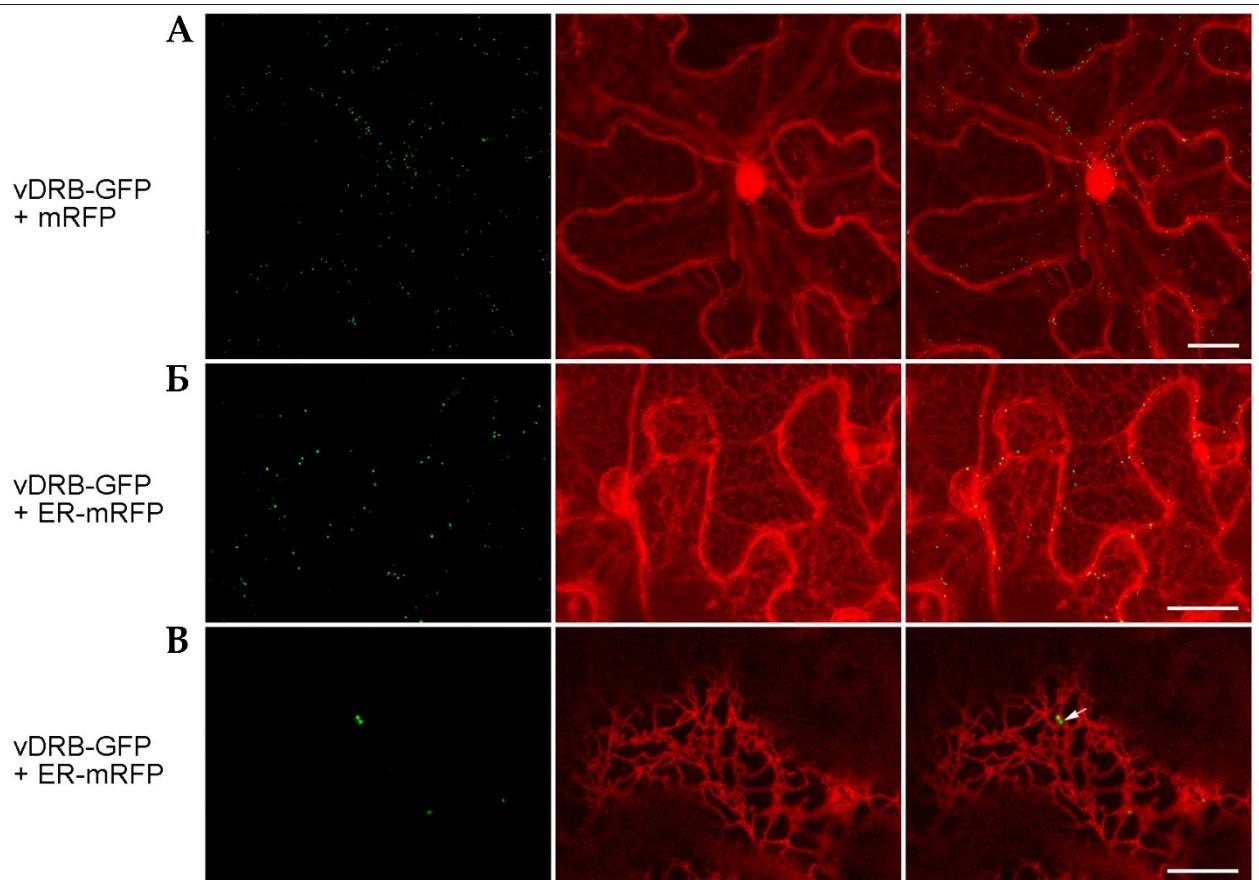
что наблюдаемое связывание не является следствием присутствия в препарате vDRB со-выделяемых белков. При инкубации vDRB с оцРНК комплексы, не входящие в гель, начинали образовываться уже при соотношении белка к РНК, равном 1:1, а при соотношении 5:1 вся внесенная оцРНК обнаруживалась в составе таких комплексов (Рис. 12Б). Как и в случае с дцРНК, контрольный эксперимент с DHFR показал гораздо меньшую способность белка связывать оцРНК по сравнению с vDRB (Рис. 12Б). Таким образом, помимо способности связывать дцРНК, vDRB также связывает и оцРНК, причем данная активность vDRB сравнима с дцРНК-связывающей активностью или даже превосходит ее. Также было показано, что vDRB способен формировать комплексы с ДНК, неспособные входить в гель, при больших соотношениях белок:ДНК, таких как 40:1 и выше (Рис. 12Б), что может отражать наличие слабой аффинности vDRB к ДНК или способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами за счет электростатических взаимодействий.

Далее была проанализирована роль дцРНК-связывающего домена vDRB в связывании дцРНК и оцРНК. Путем сайт-направленного мутагенеза были внесены замены консервативных аминокислотных остатков в дцРНК-связывающем домене vDRB (Рис. 12А). Мутированный белок, названный vDRBmut, был экспрессирован в бактериях, очищен, ренатурирован с помощью диализа и использован в эксперименте по оценке изменения подвижности в агарозном геле. В этих экспериментах vDRBmut связывал дцРНК слабее, чем vDRB. Инкубированная с vDRBmut дцРНК полностью находилась в составе неподвижных комплексов при соотношении белок:РНК, равном 35:1 (Рис. 12В), в то время как в случае с vDRB такой же эффект можно было наблюдать при соотношениях 8:1. Однако внесенные мутации не оказали значимого эффекта на способность vDRBmut связывать оцРНК. Добавленная оцРНК полностью переходила в состав комплексов, неспособных входить в гель, при соотношении белок:РНК, равном 6:1, в случае vDRBmut и 5:1 – в случае vDRB (Рис. 12Б,В). Эти данные показывают, что специфичным для дцРНК-связывающего домена vDRBmut является связывание с

дЦРНК, но не с оЦРНК. Интересно, что vDRBmut также проявил повышенную способность связывать дЦДНК по сравнению с vDRB (Рис. 12Б, В), что может указывать на то, что внесенные мутации привели к изменению конформации белка, увеличив его неспецифическую аффинность к ДНК.

2.2. Внутриклеточная локализация vDRB

Для изучения внутриклеточной локализации vDRB кодирующая последовательность OPT3 была слита с последовательностью гена GFP, и полученная конструкция vDRB-GFP была клонирована в бинарном векторе под контролем 35S-промотора CaMV. Для инфильтрации листьев *N. benthamiana* использовали культуру агробактерии, несущую экспрессионную кассету с геном vDRB-GFP. Внутриклеточную локализацию рекомбинантного белка vDRB-GFP изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии абаксиального эпидермиса агроинфильтрированных листьев на 3 дпи. Данные микроскопии позволили установить, что внутри клеток vDRB-GFP расположен в виде многочисленных мелких телец, разбросанных по цитоплазме (Рис. 13А).



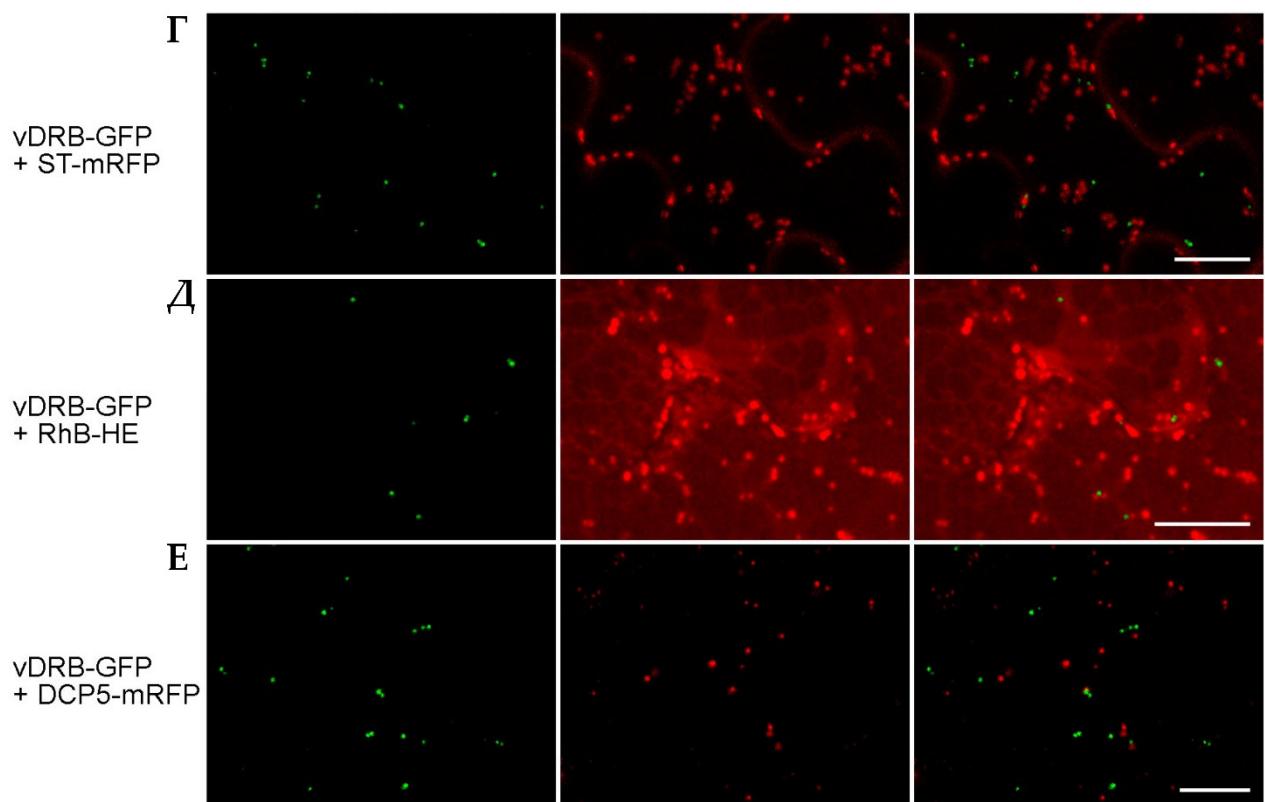


Рисунок 13. Внутриклеточная локализация vDRB-GFP. vDRB-GFP был ко-экспрессирован с mRFP для визуализации ядра и формы клетки (А) или с маркерами внутриклеточных структур (Б-Г, Е), которые указаны слева от фотографий. На фотографиях (Δ) листья, экспрессирующие vDRB-GFP, были окрашены липофильным красителем гексиловым эфиром родамина В. Расположенные слева фотографии (А-Е) сняты в канале для GFP, по центру – для mRFP, правые фотографии представляют наложение изображений, снятых в каналах для GFP и mRFP. Все изображения, кроме (В), были получены путем реконструкции из Z-серии оптических срезов. Изображение (В) представляет один оптический срез. Шкала размеров равна 20 мкм (А, Б) и 10 мкм (В-Е).

Чтобы выяснить, как соотносятся наблюдаемые структуры, содержащие vDRB-GFP, с эндоцембранными клетки, vDRB-GFP был ко-экспрессирован с маркерами внутриклеточных структур. Для визуализации сети ЭПР был использован маркер ER-mRFP, который представляет собой белок mRFP, слитый с сигнальной последовательностью локализации в лumenе ЭПР. Для визуализации аппаратов Гольджи (АГ) был взят маркер ST-mRFP, в котором последовательность mRFP слита с сигнальным пептидом сиалилтрансферазы (ST) крысы, направляющим в АГ. Данные конфокальной микроскопии абаксиального эпидермиса листьев *N. benthamiana* показали, что тельца, содержащие vDRB-GFP, локализуются вдоль трубочек кортикальной сети ЭПР (Рис. 13Б). Однако, никаких дискретных телец, соответствующих тельцам vDRB-GFP, не было обнаружено при съемке в канале для mRFP (Рис. 13В), так же как некоторые тельца vDRB-GFP не

содержали сигнала ER-mRFP, несмотря на локализацию вблизи от мембран ЭПР (Рис. 13В). Эти наблюдения указывают на то, что образуемые vDRB структуры не являются частью ЭПР и не происходят напрямую от нее. Ко-экспрессия vDRB-GFP с ST-mRFP показала, что содержащие vDRB тельца не соответствуют АГ и не ко-локализуются с ними (Рис. 13Г). Таким образом, эксперименты по ко-экспрессии vDRB-GFP с ER-mRFP и ST-mRFP показали, что vDRB-содержащие тельца не связаны с секреторным путем из ЭПР в АГ.

Для того чтобы выяснить, являются ли образованные vDRB тельца частью других эндомембранных структур клетки, листья, экспрессирующие vDRB-GFP, были обработаны гексиловым эфиром родамина В, который способен проникать внутрь клетки и, являясь липофильным красителем, окрашивает мембранные клеток (Ryabov et al., 1998). Полученные данные конфокальной микроскопии показали, что краситель располагался в многочисленных мембранных структурах внутри цитоплазмы, но ни одна из этих структур не ко-локализовалась с тельцами vDRB-GFP (Рис. 13Д).

Затем vDRB-GFP был ко-экспрессирован в листьях *N. benthamiana* с DCP5-mRFP (DECAPPING5), который является маркером белковых процессирующих тельц (Р-тельца или Р-bodies), участвующих в подавлении трансляции мРНК и в разрушении мРНК (Xu, Chua, 2009). В данном случае сигналы GFP и mRFP также не перекрывались (Рис. 13Е), что указывает на отсутствие связи между образованными vDRB структурами и Р-тельцами.

2.3. Супрессия РНК-сайленсинга белком vDRB в невирусных экспериментальных системах

Поскольку vDRB связывает дцРНК *in vitro*, была изучена способность белка функционировать в качестве ВСР и нарушать зависимости от дцРНК путем РНК-сайленсинга. Для этих исследований была использована культура агробактерий, несущая конструкцию, в которой кодирующая последовательность vDRB была клонирована в бинарном векторе под контролем 35S-промотора.

Сначала потенциальная способность vDRB функционировать в качестве ВСР была оценена методом сравнительного анализа агроинфильтрированных участков листа для временной ко-экспрессии GFP и dsGF, в котором РНК-сайленсинг был индуцирован присутствием дцРНК (Yelina et al., 2005). Особенности методики постановки эксперимента были описаны выше для p42 ShVX. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрированы для экспрессии GFP, dsGF и vDRB, в качестве положительного контроля был использован ВСР p19 TBSV (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). Агроинфильтрированные листья были исследованы под УФ светом на 4 дпи с абаксиальной стороны. Участки листа, инфильтрированные только GFP, проявляли слабый уровень флуоресценции, при совместной экспрессии GFP с dsGF сигнала флуоресценции не было по причине сайленсинга GFP (Рис. 14А). В участке, в котором GFP и dsGF были ко-экспрессированы с p19, был сильный сигнал флуоресценции, указывающий на супрессию сайленсинга GFP. Однако, при экспрессии GFP и dsGF с vDRB сигнала флуоресценции GFP не было, и область листа не светилась сильнее, чем при ко-экспрессии GFP только с dsGF (Рис. 14А). Можно заключить, что vDRB неспособен супрессировать индуцированный дцРНК РНК-сайленсинг в этих экспериментальных условиях.

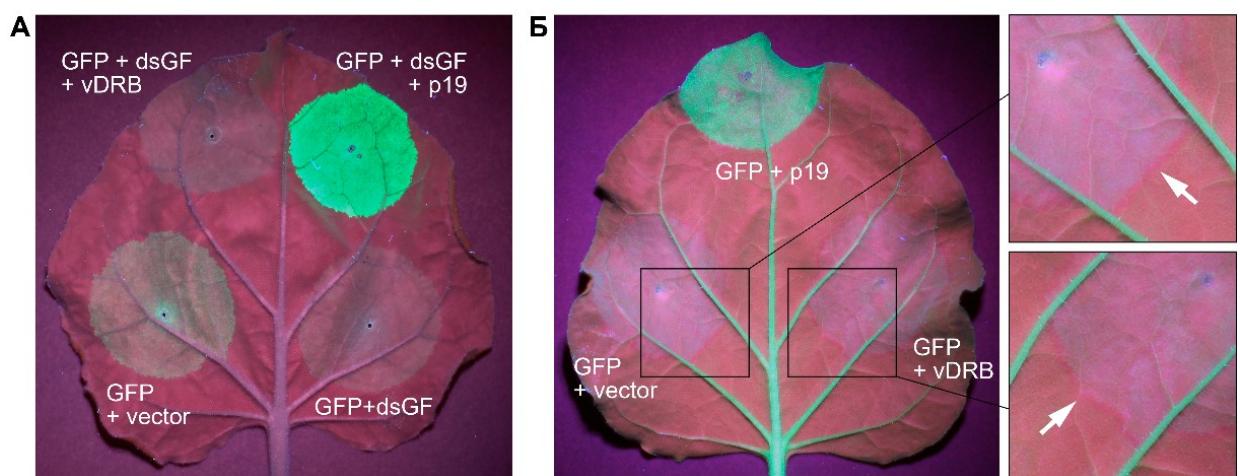


Рисунок 14. Анализ способности vDRB супрессировать РНК-сайленсинг. (А) Анализ способности vDRB супрессировать сайленсинг, индуцированный дцРНК. Листья *N. benthamiana* были инфильтрированы культурами агробактерий для экспрессии в соответствующих участках листа конструкций, указанных на подписях на фотографии. (Б) Анализ способности vDRB супрессировать сайленсинг, индуцированный оцРНК, и влиять на межклеточный транспорт сигналов сайленсинга в растениях *N. benthamiana* линии 16с, конститутивно экспрессирующих GFP. Стрелки на фотографии увеличенной части листа указывают на красные окаймления вокруг областей инфильтрации, указывающей на транспорт сигнала сайленсинга. Фотографии были сделаны под УФ светом на 4 дпи (А) и на 5 дпи (Б).

Далее была проанализирована способность vDRB подавлять сайленсинг, индуцированный оцРНК, и влиять на локальный межклеточный транспорт сигналов сайленсинга. В этих экспериментах использовали трансгенные растения *N. benthamiana* линии 16с, методика постановки эксперимента была аналогична указанной выше для p42 ShVX. На 3 дпи при временной ко-экспрессии GFP с p19 флуоресценция GFP была яркой, что является следствием проявления белком p19 активности ВСР. В области совместной временной экспрессии GFP с vDRB сигнал флуоресценции GFP был слабым и не имел заметных отличий от флуоресценции GFP, ко-экспрессированного с пустым вектором (Рис. 14Б), что указывает на отсутствие у vDRB активности ВСР в отношении сайленсинга, индуцированного оцРНК. Как ожидалось, красная кайма на листьях растений линии 16с образовалась вокруг областей агроинфилtrации для совместной экспрессии GFP с пустым вектором (отрицательный контроль), но в случае ко-экспрессии GFP с p19 красной каймы не было обнаружено вокруг областей инфильтрации (Рис. 14Б), так как p19 способен супрессировать межклеточный транспорт сигнала сайленсинга (Himber et al., 2003). При совместной экспрессии GFP с vDRB в листьях растений 16с можно было отчетливо наблюдать красную кайму, окружающую области инфильтрации, похожую на кайму вокруг области временной экспрессии GFP (Рис. 14Б). Таким образом, vDRB не способен влиять на локальный транспорт сигнала сайленсинга в листьях *N. benthamiana*.

2.4. Супрессия РНК-сайленсинга белком vDRB в эксперименте с TCV

Для оценки способности vDRB являться ВСР в контексте вирусной инфекции была использована экспериментальная система, основанная на репортерной конструкции TCV-GFP, детали методики были описаны выше для ShVX p42. Листья, инфильтрованные для ко-экспрессии TCV-GFP либо с vDRB, либо с пустым вектором, исследовали с абаксиальной стороны на 5 дпи с помощью флуоресцентного микроскопа, был проведен подсчет количества клеток в каждом зараженном TCV-GFP локусе на обеих половинах листа.

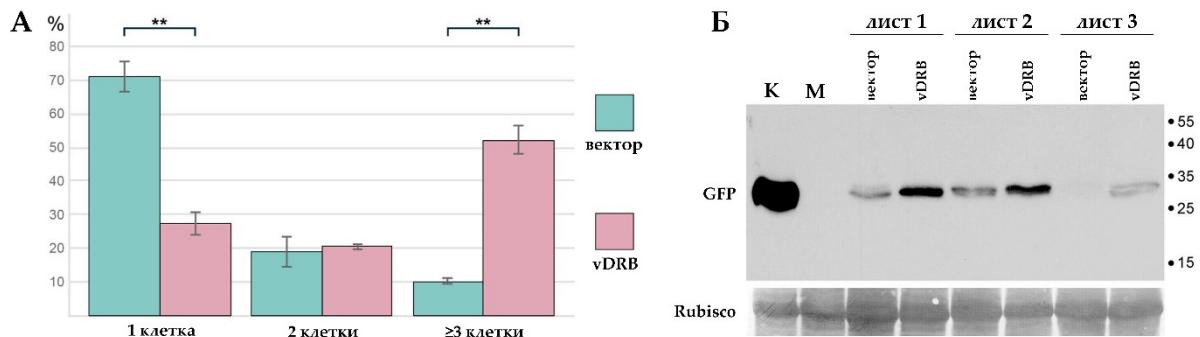


Рисунок 15. vDRB способен супрессировать РНК-сайленсинг в контексте инфекции TCV. (А) Процент флуоресцирующих локусов, состоящих из одной, двух или трех и более клеток, наблюдавшихся при совместной экспрессии TCV-GFP либо с vDRB, либо пустым вектором. Число локусов, посчитанных на листьях трех растений, было 183 для ко-инфилтрации с пустым вектором и 241 с vDRB. Звездочками отмечена статистическая значимость различий в соответствие с парным двухсторонним t-критерием Стьюдента (** - $p < 0.01$). Планки погрешности отображают стандартную ошибку среднего. (Б) Результаты Вестерн-блота проб, отобранных с трех разных листьев *N. benthamiana*, одна половина которых была агроинфильтрирована TCV-GFP с пустым вектором, а вторая – TCV-GFP с vDRB. Пробы были отобраны на 5 дпи. Использованы антитела к GFP. Справа показаны положения маркеров молекулярного веса. Обозначение «М» (mock) означает пробу, полученную из не инфильтрированной части листа. К – контроль, проба отобрана из листа растений линии 16с, конститутивно экспрессирующих GFP. Снизу фотографии результатов Вестерн-блота показана мембрана, окрашенная Амидо черным (Amido Black) для демонстрации количества помещенного в лунки препарата тотального белка.

В области листа, агроинфильтрированной TCV-GFP и вектором, локусы, состоящие из одной клетки, составляли в среднем 70.8%, в то время как в области совместной агроинфильтрации TCV-GFP с vDRB таких локусов было 27,3%, что показывает статистически значимое отличие (Рис. 15А). Напротив, процентное количество локусов, состоящих из 3 и более клеток, в случае присутствия vDRB было значительно выше (52,2%) по сравнению с контролем (10,2%). Стоит также отметить, что локусы, состоящие из 10 и более клеток, редко наблюдались в области совместной инфильтрации TCV-GFP с vDRB, но ни разу не были замечены в контрольной области, где конструкция TCV-GFP была экспрессирована без vDRB. Эти данные показывают, что vDRB способствует транспорту TCV-GFP из клетки в клетку и значительно увеличивает размер инфицированных локусов. Чтобы подтвердить полученные данные, были отобраны пробы из агроинфильтрированных участков листьев, которые затем были проанализированы с методом Вестерн-блота с использованием антител к GFP. В случае ко-экспрессии TCV-GFP с vDRB количество GFP было значительно больше по сравнению с

частью листа, экспрессирующей только TCV-GFP (Рис. 15Б). Таким образом, полученные данные демонстрируют, что vDRB проявляет активность ВСР в контексте инфекции TCV.

2.5. Влияние vDRB на инфекцию PVX

Из литературных данных известно, что ВСР способны существенно усиливать симптомы инфекции PVX (Scholthof et al., 1995; Voinnet et al., 1999). В связи с этим далее было решено проверить, способен ли vDRB вызывать похожие эффекты. Для этого кодирующая последовательность vDRB была клонирована в составе вектора PVX-201, несущего полногеномную инфекционную копию PVX, модифицированную для экспрессии встроенных чужеродных генов в инфицированных клетках. Листья молодых растений *N. benthamiana* были инокулированы либо полученной конструкцией PVX-vDRB с встроенным геном vDRB, либо вектором, содержащим PVX без вставки чужеродного гена, использовавшимся в качестве контроля. Типичные симптомы инфекции PVX, такие как мозаика и нарушение морфологии верхних листьев растений, впервые появились на 7 дпи, и все инокулированные PVX растения имели отчетливо заметные симптомы на 8 дпи. На растениях, инокулированных PVX-vDRB, наблюдалась задержка в проявлении и развитии симптомов. Первые симптомы были заметны на некоторых растениях на 8 дпи, а на всех растениях развились на 10 дпи. Симптомы инфекции, развившиеся на растениях, инокулированных PVX и PVX-vDRB, на 10 дпи и на более поздних временных точках различались значительно. Симптомы, вызванные PVX-vDRB, были менее выраженными и менее сильными, чем те, которые были вызваны PVX. В частности, верхние листья инфицированных PVX-vDRB растений были в меньшей степени деформированы, и на них было меньше «темно-зеленых островков» ткани (ТЗО, англ. DGI, «dark green islands»), которые были также меньше по размеру, чем у инфицированных PVX растений (Рис. 16А-Г). ТЗО – участки зеленой ткани листа, которые визуально контрастируют с окружающими хлоротичными тканями, типичными для зараженных вирусом растений. ТЗО являются участками ткани, которые практи-

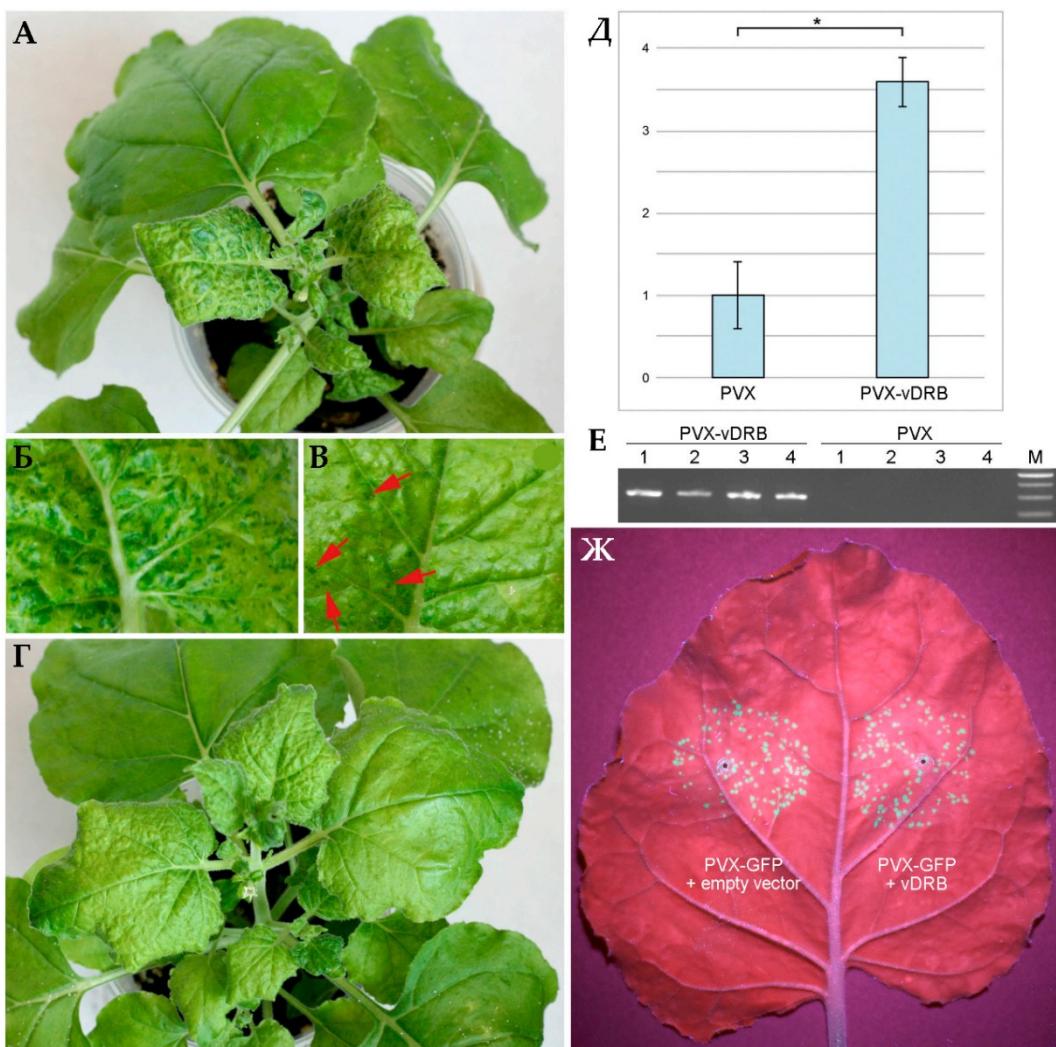


Рисунок 16. Влияние vDRB на инфекцию PVX. Симптомы вирусной инфекции на растениях, инокулированных PVX (А, Б) и PVX-vDRB (В, Г). Верхние системно инфицированные листья были сфотографированы на 14 дпи. Фотографии увеличенных частей листа показывают разницу в количестве и размерах ТЗО, вызванных инфекцией PVX (Б) или PVX-vDRB (В, красные стрелки). (Д) Накопление вируса в верхних листьях растений, инфицированных PVX или PVX-vDRB. Количество геномной РНК вируса были определены методом кПЦР. Представленные данные являются средними значениями для трех биологических повторностей. Звездочка обозначает статистическую значимость различий в соответствие с парным двухсторонним t-критерием Стьюдента (*- $p < 0.05$). Планки погрешности отображают стандартную ошибку среднего. (Е) Детекция с помощью обратной транскрипции последовательности vDRB в верхних листьях растений, инокулированных PVX-vDRB, на 14 дпи. ПЦР была проведена с использованием праймеров на последовательность vDRB. Номера соответствуют индивидуальным растениям, инокулированным либо PVX-vDRB, либо PVX. М – маркер длины ДНК. (Ж) Анализ способности vDRB влиять на межклеточный транспорт PVX. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрированы конструкцией PVX-GFP для ко-экспрессии с пустым вектором или vDRB, как подписано на фотографии. Лист фотографировали на 4 дпи под УФ светом.

чески не содержат вируса и являются результатом противовирусного РНК-сайленсинга, приводящего к возникновению устойчивости к вирусу в этих локальных участках (Chen et al., 2015; Moore et al., 2007). Таким образом,

экспрессия vDRB в контексте инфекции PVX вызывала ингибирование развития РНК-сайленсинга, что приводило к уменьшению образования ТЗО в инфицированных вирусом тканях. Эти данные согласуются с обнаруженной у vDRB функцией ВСР в экспериментальной системе с вирусом TCV. С верхних листьев зараженных растений на 14 дпи были отобраны пробы ткани. Данные анализа проб, проведенного с помощью кПЦР с обратной транскрипцией, показали статистически значимую разницу в накоплении вируса в растениях, инокулированных PVX и PVX-vDRB. Уровень РНК вируса в случае PVX-vDRB был в 3.6 раз выше, чем для PVX (Рис. 16Д). Также с помощью ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что последовательность гена vDRB сохранилась в потомстве вируса PVX-vDRB и спустя 14 дпи (Рис. 16Е), из чего можно заключить, что наблюдаемые на инфицированных PVX-vDRB растениях эффекты являются результатом экспрессии vDRB.

Так как повышенное накопление вируса в тканях может являться результатом усиления транспорта вируса по растению, была изучена способность vDRB влиять на межклеточный транспорт PVX. Для данного эксперимента использовали инфекционную конструкцию PVX, экспрессирующую в зараженных клетках GFP (PVX-GFP). Данную конструкцию экспрессировали в растении методом агробактериальной инфильтрации. Несущая PVX-GFP культура агробактерии была сильно разбавлена для достижения экспрессии PVX-GFP в отдельных клетках, значительно удаленных друг от друга. Данной культурой инфильтрировали листья *N. benthamiana* совместно с культурами агробактерий в стандартном разведении ($OD_{600} = 0,3$), несущими либо vDRB, либо пустой вектор. На 4 дпи никаких визуально заметных отличий в размерах локусов PVX-GFP в присутствии или в отсутствие vDRB обнаружить не удалось (Рис. 16Ж), что указывает, что наблюдаемое воздействие vDRB на накопление PVX не является причиной более активного межклеточного транспорта. Подводя итог, можно заключить, что данные о влиянии vDRB на инфекцию PVX в *N. benthamiana* согласуются с выводом о том, что накопление вируса в инфицированных PVX растениях значительно подавлено

ответом растения в форме противовирусного РНК-сайленсинга, при этом vDRB, экспрессированный в контексте инфекции PVX, способен супрессировать противовирусный сайленсинг и, таким образом, увеличивать накопление вируса и влиять на фенотипическое проявление симптомов.

Обсуждение

До настоящего времени механизм экспрессии и функции белка p42 ShVX, не имеющего сходства последовательности с известными вирусными или клеточными белками, оставались неизученными. Анализ экспрессии гена ShVX, представленный в данной работе, показывает, что p42-специфическая сгРНК не обнаруживается в инфицированных растениях шалота. В экспериментах по временной экспрессии клонированной геномной области TGB/p42 в растениях *N. benthamiana* было установлено, что p42 может транслироваться по механизму «leaky scanning» на матрице тетрацистронной РНК, содержащей ОРТ TGB1, TGB2, TGB3 и p42. Так как ген СР, расположенный сразу после гена p42, экспрессируется с собственной сгРНК, использованная в работе модельная тетрацистронная РНК соответствует нативной сгРНК TGB1 по своей кодирующей способности. Таким образом, можно заключить, что сгРНК TGB1 служит матрицей для трансляции ОРТ гена p42 при естественной инфекции ShVX. Этот вывод хорошо согласуется с экспериментальными данными 5'-RACE, которые позволили установить, что 5'-НТО сгРНК TGB1 составляет всего три нуклеотидных остатка. Известно, что такие чрезвычайно короткие 5'-НТО в сгРНК TGB1 других вирусов ингибируют эффективную инициацию трансляции TGB1, способствуют трансляции ОРТ TGB2 и TGB3 по механизму «leaky scanning», и, таким образом, являются необходимыми для их эффективной экспрессии (Fujimoto et al., 2022). Мутагенез геномной области TGB/p42 показал, что для экспрессии ShVX p42 по механизму «leaky scanning» требуется, чтобы инициаторный кодон TGB2 находился в неоптимальном контексте, а трансляция TGB3 инициировалась с низкой эффективностью на альтернативном инициаторном кодоне (CUG). Кроме того, во всей области TGB ShVX отсутствуют AUG-триплеты, за исключением инициаторных кодонов TGB1 и TGB2, что позволяет сканирующим субъединицам рибосомы, которые пропускают инициаторные последовательности TGB2 и TGB3, достичь инициаторного кодона p42. Эти особенности присутствуют у всех других известных аллексивирусов, за одним исключением, что позволяет предположить,

что механизм экспрессии p42, описанный в данной работе для ShVX, является консервативным для представителей рода *Allexivivirus*.

Экспрессия p42 и TGB с одной сгРНК указывает на то, что эти четыре гена представляют собой единый геномный модуль. Это предположение согласуется с ранее опубликованным наблюдением, согласно которому накопление мутаций в геноме ShVX в вегетативно размножаемых в течение двадцати лет растениях шалота было заметно ниже в области TGB/p42, чем в других частях генома вируса (Arkhipov et al., 2013), что позволяет предположить, что область TGB/p42 эволюционировала как отдельная геномная единица. Гипотетически p42 может быть функционально связан с белками TGB, играя вспомогательную роль в межклеточном транспорте вируса, направляемом белками TGB. В контексте этого предположения представляет определенный интерес обнаруженная колокализация p42 с микротрубочками, которая позволяет провести параллель с известной по литературным данным временной ассоциацией 30К ТБ TMV с микротрубочками на ранних стадиях инфекции (Niehl et al., 2013). Можно предположить, что p42 выполняет функцию, связанную с транспортом; однако в настоящее время нет экспериментальных данных, подтверждающих эту гипотезу, и возможное участие p42 в транспорте вируса может являться предметом дальнейших исследований.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что функции p42 связаны с метаболизмом РНК в клетках растений. В поставленных экспериментах временно экспрессированный p42 подавляет РНК-сайленсинг, индуцированный оцРНК, но не дцРНК. Этот вывод хорошо согласуется с результатами экспериментов *in vitro*, в которых p42 эффективно связывал оцРНК, но не связывал дцРНК. В сайленсинге оцРНК, таких, например, как транскрипты трансгенов, важную роль играет РНК-зависимая РНК-полимераза RDR6, синтезирующая комплементарную цепь на матрице оцРНК (Ding, Voinnet, 2007; Vaucheret, 2006). Считается, что большинство белок-кодирующих мРНК в растительных клетках защищены от системы РНК-сайленсинга 5'-кэп-связывающими и полиг(A)-

связывающими белками, которые препятствуют доступу к ним RDR6 и других факторов, участвующих в биогенезе siRNA (Liu, Chen, 2016; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Согласно одной из гипотез, мРНК трансгенов могут разрушаться системой РНК-сайленсинга, когда уровень транскрипта превышает способность имеющихся кэп- и поли(A)-связывающих белков защищать мРНК от механизма биогенеза siRNA (Liu, Chen, 2016; Lopez-Gomollon, Baulcombe, 2022). Возможно, что наблюдаемое ингибирование белком p42 сайленсинга, индуцированного оцРНК, может быть обусловлено связыванием p42 с оцРНК, что препятствует доступу RDR6 и/или других факторов сайленсинга к временно экспрессируемой трансгенной РНК. Эта модель согласуется с высокой эффективностью связывания оцРНК белком p42. Действительно, при молярном соотношении РНК:белок = 1:2, то есть при соотношении одна молекула оцРНК на один димер p42, все молекулы РНК оказывались связанными белком p42. Несспособность p42 связывать дцРНК и ингибировать сайленсинг, индуцированный дцРНК, позволяет предположить, что p42 может защищать оцРНК от RDR6, но не от siRNA, образованных из дцРНК. Остается невыясненным, почему p42 при временной ко-экспрессии с GFP способен повышать уровень экспрессии GFP в растениях *N. benthamiana* дикого типа, но не в конститутивно экспрессирующих GFP трансгенных растениях. Можно предположить, что экспрессия трансгена GFP в этих растениях частично подавляется РНК-сайленсингом и что p42 не может защитить временно экспрессируемую мРНК GFP от сайленсинга, вызываемого уже существующими в трансгенных растениях GFP-специфическими siRNA.

В некоторых случаях ВСР, помимо своей основной функции, могут подавлять другие типы защиты растений, направленные на деградацию вирусной РНК. Например, было показано, что HC-Pro и VPg, два ВСР TuMV, ингибируют процесс экзонуклеазного распада РНК, с помощью которого РНК может разрушаться в случае ингибирования РНК-сайленсинга (Li, Wang, 2018). В данной работе было показано, что p42 ShVX, в дополнение к своей функции ВСР, может подавлять NMD, являющийся механизмом контроля качества клеточной РНК,

который направляет на деградацию aberrантные РНК, в частности, мРНК с необычно длинными 3'-НТО (Kervestin, Jacobson, 2012) и полицистронные РНК альфа-подобных вирусов растений (Garcia et al., 2014). Аналогичным образом было показано, что СР TCV подавляет как РНК-сайленсинг (Qu et al., 2003), так и NMD (Wu et al., 2025). Другими примерами белков вирусов растений, подавляющими NMD, может служить белок TAV (transactivator protein) CaMV, который нарушает механизм отщепления 5'-кэп-структуры, действуя через скаффолд-белок VARICOSE (Lukhovitskaya, Ryabova, 2019), и белок p26 PEMV (pea enation mosaic virus 2), который участвует в системном транспорте вирусной РНК через флоэму и подавляет NMD, используя неизвестный механизм (May et al., 2020). Необходимы дальнейшие эксперименты для выявления механизма функционирования p42 при подавлении NMD, но уже сейчас можно высказать гипотезу о том, что важную роль в нем может играть способность p42 эффективно связывать оцРНК.

Многие ТБ вирусов растений также обладают функцией ВСР (Atabekova et al., 2023b). Одним из таких ТБ является белок TGB1, для которого роль ВСР и транспортная функция переноса вируса из клетки в клетку были тщательно изучены у вирусов семейств *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae*. В работе Bayne et al., 2005 было показано, что транспортная функция некоторых точечных мутантов белка TGB1 PVX, неспособных осуществлять межклеточное перемещение, могла восстанавливаться при ко-экспрессии гетерологичного ВСР p19 TBSV, из чего можно сделать вывод, что подавление РНК-сайленсинга необходимо для выполнения белком TGB1 транспортных функций. В другой работе было показано, что точечная мутация в белке TGB1 *Alternanthera mosaic virus* (AltMV) значительно подавляет функцию ВСР, в то время как транспортная функция остается незатронутой (Lim et al., 2010), из чего следует, что функции подавления сайленсинга и транспорта могут быть несвязанными. Таким образом, TGB1 выполняет две функции, необходимые для перемещения вируса из клетки в клетку, – функцию ВСР и транспортную функцию как таковую. В настоящее время неизвестно, может ли TGB1 ShVX функционировать в качестве ВСР, подавляя

распространение сигнала сайленсинга, ингибируя активность RDR6, SGS3 или направляя белкиAGO на деградацию, как это было показано для TGB1 других вирусов (Chiu et al., 2010; Okano et al., 2014; Senshu et al., 2011). Можно предположить, что p42 ShVX, являясь дополнительным компонентом TGB-содержащего генного модуля, обеспечивает функцию подавления сайленсинга, которая может быть необходима для эффективного переноса вируса из клетки в клетку, опосредованного белками TGB. Функция супрессии сайленсинга у белка p42 может заменять такую функцию TGB1 ShVX, известную для других вирусов. В качестве альтернативы, p42 может действовать и как дополнительный BCP вместе с функциональным супрессором TGB1. Подобная стратегия двойного подавления сайленсинга была описана для PVM, в котором TGB1 и CRP являются двумя BCP, но с разными функциями. У PVM TGB1 подавляет только распространение сигналов сайленсинга, а CRP действует как BCP и на уровне репликации вируса, и на уровне распространения сигналов сайленсинга (Senshu et al., 2011).

Таким образом, представленные данные демонстрируют, что район генома ShVX, включающий гены TGB и p42, с точки зрения экспрессии вирусных белков представляет собой единый геномный модуль и показывают, что p42 может как подавлять РНК-сайленсинг, так и ингибировать NMD. Для определения точных функций p42 при вирусной инфекции необходимы дальнейшие исследования.

Отличительной чертой TCMB является его ген, расположенный со стороны 5'-конца и кодирующий vDRB, небольшой белок, который содержит домен, имеющий сходство поледовательности с дцРНК-связывающим доменом клеточных белков, связывающих дцРНК, таких, как DRB4 и HYL1 (Morozov, Solovyev, 2022). В экспериментах по изучению изменения подвижности в агарозном геле, проведенных в данной работе, удалось обнаружить, что vDRB эффективно связывает как дцРНК, так и оцРНК, но не дцДНК, которая только частично связывается vDRB при высоких соотношениях белка к РНК. Так же, как для vDRB, для HYL1 была показана способность взаимодействовать с оцРНК, в то

время как AtD RB4 такой активности не проявлял (Pouch-Pélissier et al., 2008). Некоторый свет на способность vDRB связывать оцРНК проливают результаты экспериментов, проведенных с мутированной версией vDRB, vDRBmut, в которой были произведены замены ключевых аминокислотных остатков дцРНК-связывающего домена. Мутации, внесенные в vDRB, снижали дцРНК-связывающую активность белка примерно в пять раз, не влияя при этом на способность связывать оцРНК. Эти результаты дают основание полагать, что ключевые аминокислотные остатки дцРНК-связывающего домена не участвуют в связывании оцРНК, которое, вероятно, происходит независимо от связывания дцРНК. Активность vDRB в связывании оцРНК теоретически может объясняться неспецифическими электростатическими взаимодействиями отрицательно заряженной РНК с положительно заряженными аминокислотными остатками белка. Такое взаимодействие также может объяснить сниженное по сравнению с белком дикого типа, но все равно заметное взаимодействие vDRBmut с дцРНК, и слабое взаимодействие vDRB с дцДНК. Интересно, что vDRBmut, вероятно, из-за измененной конформации мутантного белка, демонстрировал повышенную способность к связыванию с дцДНК, что подтверждает гипотезу о том, что неспецифическое связывание vDRB с нуклеиновыми кислотами не зависит от способности взаимодействовать с дцРНК.

Исследования с использованием TCV показали, что белок vDRB подавляет РНК-сайленсинг. Активность vDRB в качестве ВСР согласуется с его влиянием на инфекцию PVX. Экспрессия vDRB в инфицированных PVX клетках приводит к заметному сокращению как числа, так и размера ТЗО – областей инфицированных листьев, где накопление вируса снижается за счет локально активированного РНК-сайленсинга (Chen et al., 2015; Moore et al., 2007). Инфекция PVX-vDRB вызывала менее выраженные симптомы по сравнению с симптомами PVX, в то время как экспрессия других ВСР в инфицированных PVX клетках, согласно литературным данным, приводила к более выраженным симптомам PVX и системным некрозам у зараженных растений (Scholthof et al., 1995; Voinnet et al., 1999). Этот эффект был

связан с индуцированным BCP увеличением уровня белка TGB1 PVX, который, когда его количество достигает определенного порога, запускает гиперчувствительный ответ (Aguilar et al., 2015). Следует также отметить, что, как правило, экспрессия BCP не приводит к увеличению количества РНК PVX (Luna et al., 2012; Pfeffer et al., 2002; Voinnet et al., 1999; Zhang et al., 2012a), в то время как в данном исследовании vDRB приводил к увеличению накопления РНК PVX в 3.6 раз. При этом на настоящий момент остается не выясненным, почему не вызывает системных некрозов индуцированное vDRB увеличение накопления РНК вируса, которое, потенциально должно приводить и к увеличению количества TGB1. Можно высказать предположение о том, что vDRB, дополнительно к своей функции в качестве BCP, способен также воздействовать на другие противовирусные ответы растения, что проявляется в смягчении симптомов у растений, инокулированных PVX-vDRB по сравнению с симптомами зараженных PVX растений. Таким образом, влияние vDRB на инфекцию PVX отличается от влияния других BCP по крайней мере в двух аспектах: (1) vDRB приводит к более мягким симптомам и (2) vDRB вызывает усиление накопления вируса. Эти наблюдения указывают на то, что специфический для vDRB механизм подавления сайленсинга может отличаться от механизма других BCP, которые были исследованы на предмет их влияния на инфекцию PVX.

Будучи днРНК-связывающим белком, vDRB может подавлять противовирусный РНК-сайленсинг, взаимодействуя либо с промежуточным продуктом репликации (днРНК вируса), как показано для белков p14 PLV и p38 TCV, либо со специфической для вируса двухцепочечной siRNA, как это было показано для p19 TBSV (Burgayán, Havelda, 2011). Другим вариантом предполагаемой активности vDRB может быть конкуренция с каким-либо белком с днРНК-связывающим доменом, который является участником системы РНК-сайленсинга и/или компонентом клеточной системы детекции вирусной инфекции, например, с DRB2 или DRB4 (Fátyol et al., 2020; Incarbone et al., 2021; Rahman et al., 2021). Такого рода конкуренция может приводить к ингибированию

противовирусной защиты клетки. Кроме того, поскольку дцРНК может активировать паттерн-зависимый путь иммунитета (PTI, pattern-triggered immunity pathway), который приводит к усилению отложений каллозы в ПД и ингибированию межклеточного распространения вируса (Huang et al., 2023), ингибирование этого типа иммунитета может быть вероятным механизмом функционирования vDRB и его влияния на инфекцию. Однако, этот механизм представляется маловероятным в силу того, что vDRB был неспособен влиять на межклеточный транспорт PVX. Следует отметить, что активность vDRB в качестве ВСР показана только в присутствии вирусной инфекции, TCV или PVX, но не в экспериментальных условиях, где способность vDRB супрессировать сайленсинг изучалась вне контекста вирусной инфекции. Похожим образом функционирует 29К ТБ TRV, который выполняет функции ВСР только при наличии репликации РНК вируса (Deng et al., 2013), но механизм такой активности остается неизученным. Можно предложить гипотезу о том, что ТБ TRV и vDRB используют не общие для многих ВСР способы супрессии сайленсинга, а способны подавлять компоненты системы РНК-сайленсинга, которые нацелены на узнавание реплицирующегося в клетке вируса.

В отличие от клеточных DRB, vDRB содержит N-концевой гидрофобный фрагмент (Morozov, Solovyev, 2022). Этот фрагмент может функционировать либо как сигнальный пептид, который в процессе трансляции направляет белок в люмен ЭПР и затем отщепляется для получения зрелого белка, либо может работать как мембранный якорь, который позволяет белку в процессе трансляции закрепиться за мембранные ЭПР. В любом случае наличие гидрофобного фрагмента предполагает локализацию vDRB в мембранных структурах. Неожиданно vDRB-GFP был обнаружен в небольших цитоплазматических тельцах, которые не содержат маркеров ЭПР и аппарата Гольджи и, более того, не окрашиваются липофильным красителем, специфическим в том числе и для мембран. Вероятно, благодаря расщепляемому N-концевому сигнальному пептиду vDRB может транслоцироваться в просвет ЭПР, а затем, в зрелой форме, перемещаться обратно

в цитоплазму, при этом избегая деградации комплексом 26S-протеасомы. Похожий путь транслокации, приводящий к цитоплазматической локализации, был показан для белка OPT2 вируса гепатита E (Surjit et al., 2007) и предшественника корового белка вируса гепатита B (Duriez et al., 2008). Безусловно, данное предположение нуждается в экспериментальной проверке и дальнейшие исследования требуются для выяснения природы цитоплазматических телец, образованных vDRB.

До настоящего времени у кодируемых вирусами белков не было обнаружено днРНК-связывающих доменов семейства DSRM_AtDRB, который был найден в vDRB, однако известно, что другие типы днРНК-связывающих доменов кодируются геномами некоторых РНК-вирусов. Например, sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV, род *Crinivirus*, сем. *Closteroviridae*) кодирует белок, содержащий днРНК-связывающий домен, подобный РНКазе III типа (Kreuze et al., 2002), который не способен функционировать самостоятельно как BCP, но неизвестным до сих пор способом усиливает супрессорную активность белка p22 SPCSV, который является BCP (Kreuze et al., 2005). Другим примером является белок B2 вируса flock house virus (FHV, сем. *Nodaviridae*, вирус насекомых), который содержит днРНК-связывающий домен семейства cl12995 (Chao et al., 2005) и обладает активностью BCP. B2 связывает днРНК разных размеров и, как предполагают, благодаря этому защищает двухцепочечные промежуточные продукты репликации вируса от узнавания и разрезания белками DCL и таким образом ингибитирует действие машинерии РНК-сайленсинга (Chao et al., 2005; Li et al., 2002). vDRB не способен супрессировать сайленсинг таким же образом, как это делает B2, поскольку vDRB не проявляет активности BCP в экспериментах по исследованию супрессорных свойств белка вне контекста вирусной инфекции.

В совокупности данные, представленные в этой части работы, свидетельствуют о том, что vDRB является структурно и функционально уникальным среди кодируемых вирусами белков. В частности, будучи днРНК-связывающим белком, vDRB, в отличие от ряда других кодируемых вирусами BCP, не способен подавлять сайленсинг, индуцированный днРНК в безвирусной

экспериментальной системе, и проявляет свойства ВСР только в контексте вирусной инфекции. Таким образом, поскольку vDRB обладает способностью подавлять сайленсинг, и аспекты этой активности являются необычными для других ВСР, необходимы дальнейшие экспериментальные исследования для выяснения деталей молекулярного механизма подавления РНК-сайленсинга белком vDRB.

Заключение

Таким образом, два исследованных блока генов – ТСМВ, идентифицированный в транскриптомах цветкового растения *Colobanthus quitensis* и мха *Dicranum scoparium* (Morozov, Solovyev, 2022), и TGB/p42 ShVX, присутствующий в геномах вирусов рода *Allexivirus*, – являются геномными блоками, состоящими из четырех генов, а именно трех характерных для TGB генов, кодирующих транспортные белки TGB1, TGB2 и TGB3, и дополнительного гена, кодирующего либо vDRB, либо p42, – белки, которые являются РНК-связывающими и проявляют свойства ВСР. При этом белки, кодируемые «дополнительными» генами, имеют ряд существенных отличий, заключающихся в том, что (1) vDRB и p42 несходны по аминокислотной последовательности, (2) vDRB преимущественно связывает днРНК, тогда как p42 – оцРНК, (3) белки имеют различающуюся внутриклеточную локализацию и (4) ген vDRB расположен перед TGB, перекрывааясь с 5'-концевой частью TGB1 (Morozov, Solovyev, 2022), в то время как ген p42 перекрываетя с 3'-концевой частью последовательности TGB3. Таким образом, ТСМВ и блок генов TGB/p42 ShVX представляют собой два примера «расширенных» вариантов TGB, которые, как можно заключить на основании несходства белков vDRB и p42, возникли в эволюции вирусов растений независимо. Тем не менее, в обоих случаях эти дополнительные гены обеспечивают тройному блоку генов функцию ВСР. Наличие дополнительных ВСР-кодирующих генов в двух модулях транспортных генов, связанных с TGB, подчеркивает необходимость супрессии сайленсинга для межклеточного транспорта вирусов, который направляется белками TGB. Помимо этого, наличие таких «расширений» у TGB неродственных вирусов может являться следствием эволюционной адаптации TGB-содержащих вирусов к различным растениям-хозяевам, в которых белки, кодируемые дополнительными генами, могут способствовать выполнению части функций белков TGB.

Выводы

1. Для экспрессии гена белка p42 ShVX используется трансляция по механизму «leaky scanning» функционально тетрацистронной РНК, включающей три гена TGB и ген p42.
2. Белок p42 обладает РНК-связывающей способностью и образует комплексы с оцРНК, но не с дцРНК.
3. Белок p42 локализуется в цитоплазме в структурах, ассоциированных с микротрубочками.
4. Белок p42 не супрессирует РНК-сайленсинг, индуцированный дцРНК, и распространение сигнала сайленсинга, но супрессирует сайленсинг, индуцированный оцРНК, и проявляет свойства супрессора сайленсинга в контексте вирусной инфекции, а также супрессирует нонсенс-опосредованный распад РНК.
6. Белок vDRB связывает как оцРНК, так и дцРНК; во взаимодействии с дцРНК участвует дцРНК-связывающий домен белка vDRB.
7. Белок vDRB не супрессирует сайленсинг в тестовых системах, основанных на временной экспрессии генов в растениях, и распространение сигнала сайленсинга, но супрессирует сайленсинг в контексте вирусной инфекции.

Список литературы

1. *Adenot X., Elmayan T., Lauressergues D., Boutet S., Bouché N., Gasciolli V., Vaucheret H.* DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7 // *Current Biology*. 2006. Vol. 16. № 9. P. 927–932.
2. *Aguilar E., Almendral D., Allende L., Pacheco R., Chung B.N., Canto T., Tenllado F.* The P25 Protein of Potato Virus X (PVX) Is the Main Pathogenicity Determinant Responsible for Systemic Necrosis in PVX-Associated Synergisms // *Journal of Virology*. 2015. Vol. 89. № 4. P. 2090–2103.
3. *Allen E., Xie Z., Gustafson A.M., Carrington J.C.* microRNA-Directed Phasing during Trans-Acting siRNA Biogenesis in Plants // *Cell*. 2005. Vol. 121. № 2. P. 207–221.
4. *Alvarado V.Y., Scholthof H.B.* AGO2: A new Argonaute compromising plant virus accumulation // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 2. № 112. P. 18287.
5. *Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L., Vance V.B.* A Calmodulin-Related Protein That Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing in Plants // *Science*. 2000. Vol. 290. № 5489. P. 142–144.
6. *Angell S.M., Davies C., Baulcombe D.C.* Cell-to-Cell Movement of Potato Virus X Is Associated with a Change in the Size-Exclusion Limit of Plasmodesmata in Trichome Cells of *Nicotiana clevelandii* // *Virology*. 1996. Vol. 216. № 1. P. 197–201.
7. *Aregger M., Borah B.K., Seguin J., Rajeswaran R., Gubaeva E.G., Zvereva A.S., Windels D., Vazquez F., Blevins T., Farinelli L., Pooggin M.M.* Primary and Secondary siRNAs in Geminivirus-induced Gene Silencing // *PLOS Pathogens*. 2012. Vol. 8. № 9. P. e1002941.
8. *Arkhipov A. V., Gushchin V.A., Vishnichenko V.K., Solovyev A.G.* Accumulation of changes in the genome of shallot virus X persisting in vegetatively reproduced plants // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2013. Vol. 452. № 1. P. 237–240.
9. *Ashby A.M., Watson M.D., Loake G.J., Shaw C.H.* Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. // *Journal of bacteriology*. 1988. Vol. 170. № 9. P. 4181–4187.
10. *Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Poljakov V.Y.* The Movement Protein-Triggered in Situ Conversion of Potato Virus X Virion RNA from a Nontranslatable into a Translatable Form // *Virology*. 2000. Vol. 271. № 2. P. 259–263.
11. *Atabekova A.K., Golyshev S.A., Lezzhov A.A., Skulachev B.I., Moiseenko A. V., Yastrebova D.M., Andrianova N. V., Solovyev I.D., Savitsky A.P., Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Fine Structure of Plasmodesmata-Associated Membrane Bodies Formed by Viral Movement Protein // *Plants*. 2023a. Vol. 12. № 24. P. 4100.

12. Atabekova A.K., Solovieva A.D., Chergintsev D.A., Solovyev A.G., Morozov S.Y. Role of Plant Virus Movement Proteins in Suppression of Host RNAi Defense // International Journal of Molecular Sciences. 2023b. Vol. 24. № 10. P. 9049.
13. Azevedo J., Garcia D., Pontier D., Ohnesorge S., Yu A., Garcia S., Braun L., Bergdoll M., Hakimi M.A., Lagrange T., Voinnet O. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein // Genes & Development. 2010. Vol. 24. № 9. P. 904–915.
14. Baranausk S., Mickut M., Plotnikova A., Finke A., Ceslovas Venclovas , Klimašauskas S., Klimašauskas K., Vilkaitis G. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins // Nucleic Acids Research. 2015. Vol. 43. № 5. P. 2802–2812.
15. Barton D.A., Roovers E.F., Gouil Q., Fonseca G.C. Da, Reis R.S., Jackson C., Overall R.L., Fusaro A.F., Waterhouse P.M. Live cell imaging reveals the relocation of dsRNA binding proteins upon viral infection // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2017. Vol. 30. № 6. P. 435–443.
16. Baulcombe D. RNA silencing. // Current biology : CB. 2002. Vol. 12. № 3. P. R82–R84.
17. Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature 2004 431:7006. 2004. Vol. 431. № 7006. P. 356–363.
18. Baumberger N., Baulcombe D.C. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. Vol. 102. № 33. P. 11928–11933.
19. Bayne E.H., Rakitina D. V., Morozov S.Y., Baulcombe D.C. Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing // Plant Journal. 2005. Vol. 44. № 3. P. 471–482.
20. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1993. Vol. 316. P. 1194–1199.
21. Blagojevic A., Baldrich P., Schiaffini M., Lechner E., Baumberger N., Hammann P., Elmayan T., Garcia D., Vaucheret H., Meyers B.C., Genschik P. Heat stress promotes *Arabidopsis* AGO1 phase separation and association with stress granule components // iScience. 2024. Vol. 27. № 3. P. 109151.
22. Blevins T., Rajeswaran R., Shivaprasad P. V., Beknazarians D., Si-Ammour A., Park H.S., Vazquez F., Robertson D., Meins F., Hohn T., Pooggin M.M. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing // Nucleic Acids Research. 2006. Vol. 34. № 21. P. 6233–6246.
23. Bleykasten C., Gilmer D., Guille H., Richards K.E., Jonard G. Beet necrotic yellow vein virus 42 kDa triple gene block protein binds nucleic acid in vitro // Journal

of General Virology. 1996. Vol. 77. № 5. P. 889–897.

24. Boevink P., Santa Cruz S., Hawes C., Harris N., Oparka K.J. Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells // The Plant Journal. 1996. Vol. 10. № 5. P. 935–941.
25. 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 // Molecular Cell. 2018. Vol. 69. № 4. P. 709- 719.e5.
26. Bologna N.G., Voinnet O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis* // Annual Review of Plant Biology. 2014. Vol. 65. № Volume 65, 2014. P. 473–503.
27. Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P., Ziegler-Graff V. The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing // Current Biology. 2007. Vol. 17. № 18. P. 1615–1621.
28. Bouché N., Lauressergues D., Gascioli V., Vaucheret H. An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs // EMBO Journal. 2006. Vol. 25. № 14. P. 3347–3356.
29. Boyko V., Hu Q., Seemanpillai M., Ashby J., Heinlein M. Validation of microtubule-associated Tobacco mosaic virus RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking // Plant Journal. 2007. Vol. 51. № 4. P. 589–603.
30. Brioudes F., Jay F., Sarazin A., Grentzinger T., Devers E.A., Voinnet O. HASTY, the *Arabidopsis* EXPORTIN5 ortholog, regulates cell-to-cell and vascular microRNA movement // The EMBO Journal. 2021. Vol. 40. № 15.
31. Brosnan C.A., Sarazin A., Lim P., Bologna N.G., Hirsch-Hoffmann M., Voinnet O. Genome-scale, single-cell-type resolution of micro RNA activities within a whole plant organ // The EMBO Journal. 2019. Vol. 38. № 13.
32. Brosseau C., Bolaji A., Roussin-Léveillé C., Zhao Z., Biga S., Moffett P. Natural variation in the *Arabidopsis* AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X // The New phytologist. 2020. Vol. 226. № 3. P. 866–878.
33. Bu F., Yang M., Guo X., Huang W., Chen L. Multiple Functions of ATG8 Family Proteins in Plant Autophagy // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020. Vol. 8. P. 532931.
34. Burgýán J., Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing // Trends in Plant Science. 2011. Vol. 16. № 5. P. 265–272.
35. Cambiagno D.A., Giudicatti A.J., Arce A.L., Gagliardi D., Li L., Yuan W., Lundberg D.S., Weigel D., Manavella P.A. HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing // Molecular Plant. 2021. Vol. 14. № 3. P. 426–439.

36. *Carbonell A., Carrington J.C.* Antiviral roles of plant ARGONAUTES // *Current Opinion in Plant Biology*. 2015. Vol. 27. P. 111–117.
37. *Chao J.A., June H.L., Chapados B.R., Debler E.W., Schneemann A., Williamson J.R.* Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2 // *Nature Structural & Molecular Biology* 2005 12:11. 2005. Vol. 12. № 11. P. 952–957.
38. *Chen H.M., Chen L.T., Patel K., Li Y.H., Baulcombe D.C., Wu S.H.* 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107. № 34. P. 15269–15274.
39. *Chen L.J., Liu J., Zhao F.F., Li J.Y., Wang S.X., Lin H.H., Xi D.H.* Characterisation of the dark green islands of cucumber mosaic virus infected *Nicotiana tabacum* // *Plant Cell Reports*. 2015. Vol. 34. № 7. P. 1225–1238.
40. *Chen S., Liu W., Naganuma M., Tomari Y., Iwakawa H.-O.* Functional specialization of monocot DCL3 and DCL5 proteins through the evolution of the PAZ domain // *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50. № 8. P. 4669–4684.
41. *Cheng X., Wang A.* The Potyvirus Silencing Suppressor Protein VPg Mediates Degradation of SGS3 via Ubiquitination and Autophagy Pathways // *Journal of Virology*. 2017. Vol. 91. № 1. P. 16.
42. *Chergintsev D.A., Lezzhov A.A., Lazareva E.A., Atabekova A.K., Solovieva A.D., Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Shallot virus X p42 Protein Expressed in Concert with Virus Movement Proteins Is a Suppressor of Two Plant Antiviral Defense Mechanisms // *Plants*. 2025. Vol. 14. P. 2552.
43. *Chiu M.H., Chen I.H., Baulcombe D.C., Tsai C.H.* The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway // *Molecular Plant Pathology*. 2010. Vol. 11. № 5. P. 641–649.
44. *Citovsky V., Zambryski P.* How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections? // *BioEssays*. 1991. Vol. 13. № 8. P. 373–379.
45. *Citovsky V., Zambryski P.* Systemic transport of RNA in plants // *Trends in Plant Science*. 2000. Vol. 5. № 2. P. 52–54.
46. *Cowan G.H., Lioliopoulou F., Ziegler A., Torrance L.* Subcellular localisation, protein interactions, and RNA binding of Potato mop-top virus triple gene block proteins. // *Virology*. 2002. Vol. 298. № 1. P. 106–15.
47. *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. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93. № 13. P. 6286–6290.
48. *Csorba T., Bovi A., Dalmay T., Burgýán J.* The p122 Subunit of Tobacco Mosaic Virus Replicase Is a Potent Silencing Suppressor and Compromises both Small

- Interfering RNA- and MicroRNA-Mediated Pathways // *Journal of Virology*. 2007. Vol. 81. № 21. P. 11768–11780.
49. *Csorba T., Kontra L., Burgýán J.* viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence // *Virology*. 2015. Vol. 479–480. P. 85–103.
50. *Csorba T., Lózsa R., Hutvágner G., Burgýán J.* Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1 // *The Plant Journal*. 2010. Vol. 62. № 3. P. 463–472.
51. *Cui Y., Fang X., Qi Y.* TRANSPORTIN1 Promotes the Association of MicroRNA with ARGONAUTE1 in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2016. Vol. 28. № 10. P. 2576–2585.
52. *Dai Z., He R., Bernards M.A., Wang A.* The cis-expression of the coat protein of turnip mosaic virus is essential for viral intercellular movement in plants // *Molecular Plant Pathology*. 2020. Vol. 21. № 9. P. 1194–1211.
53. *Deng P., Muhammad S., Cao M., Wu L.* Biogenesis and regulatory hierarchy of phased small interfering RNAs in plants // *Plant Biotechnology Journal*. 2018. Vol. 16. № 5. P. 965.
54. *Deng X., Kelloniemi J., Haikonen T., Vuorinen A.L., Elomaa P., Teeri T.H., Valkonen J.P.T.* Modification of Tobacco rattle virus RNA1 to Serve as a VIGS Vector Reveals That the 29K Movement Protein Is an RNA Silencing Suppressor of the Virus // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2013. Vol. 26. № 5. P. 503–514.
55. *Derrien B., Baumberger N., Schepetilnikov M., Viotti C., Cillia J. De, Ziegler-Graff V., Isono E., Schumacher K., Genschik P.* Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109. № 39. P. 15942–15946.
56. *Derrien B., Clavel M., Baumberger N., Iki T., Sarazin A., Hacquard T., Ponce M.R., Ziegler-Graff V., Vaucheret H., Micol J.L., Voinnet O., Genschik P.* A Suppressor Screen for AGO1 Degradation by the Viral F-Box P0 Protein Uncovers a Role for AGO DUF1785 in sRNA Duplex Unwinding // *The Plant Cell*. 2018. Vol. 30. № 6. P. 1353–1374.
57. *Devers E.A., Brosnan C.A., Sarazin A., Albertini D., Amsler A.C., Brioudes F., Jullien P.E., Lim P., Schott G., Voinnet O.* Movement and differential consumption of short interfering RNA duplexes underlie mobile RNA interference // *Nature Plants* 2020 6:7. 2020. Vol. 6. № 7. P. 789–799.
58. *Devert A., Fabre N., Floris M., Canard B., Robaglia C., Crété P.* Primer-Dependent and Primer-Independent Initiation of Double Stranded RNA Synthesis by Purified *Arabidopsis* RNA-Dependent RNA Polymerases RDR2 and RDR6 // *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10. № 3. P. e0120100.
59. *Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.X., Ding S.W.* Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in *Arabidopsis* Is Associated with Drastically

Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs // The Plant Cell. 2007. Vol. 19. № 6. P. 2053–2063.

60. *Ding S.W., Voinnet O.* Antiviral Immunity Directed by Small RNAs // Cell. 2007. Vol. 130. № 3. P. 413–426.

61. *Ding X.S., Liu J., Cheng N.H., Folimonov A., Hou Y.M., Bao Y., Katagi C., Carter S.A., Nelson R.S.* The Tobacco mosaic virus 126-kDa Protein Associated with Virus Replication and Movement Suppresses RNA Silencing // <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.583>. 2007. Vol. 17. № 6. P. 583–592.

62. *Dolja V. V., Krupovic M., Koonin E. V.* Deep Roots and Splendid Boughs of the Global Plant Virome // Annual Review of Phytopathology. 2020. Vol. 58. P. 23–53.

63. *Donald R.G.K., Lawrence D.M., Jackson A.O.* The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton beta(b) protein is a multifunctional RNA binding protein // Journal of Virology. 1997. Vol. 71. № 2. P. 1538–1546.

64. *Donze T., Qu F., Twigg P., Morris T.J.* Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in Arabidopsis by binding to the NAC transcription factor TIP // Virology. 2014. Vol. 449. P. 207–214.

65. *Duan C., Zhang H., Tang K., Zhu X., Qian W., Hou Y., Wang B., Lang Z., Zhao Y., Wang X., Wang P., Zhou J., Liang G., Liu N., Wang C., Zhu J.* Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation // The EMBO Journal. 2015. Vol. 34. № 5. P. 581–592.

66. *Duan C.G., Fang Y.Y., Zhou B.J., Zhao J.H., Hou W.N., Zhu H., Ding S.W., Guo H.S.* Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-Mediated Slicing, Transgene-Induced RNA Silencing, and DNA Methylation by Distinct Domains of the Cucumber mosaic virus 2b Protein // The Plant Cell. 2012. Vol. 24. № 1. P. 259–274.

67. *Dueñas M.A., Craig R.J., Gallaher S.D., Moseley J.L., Merchant S.S.* Leaky ribosomal scanning enables tunable translation of bicistronic ORFs in green algae // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2025. Vol. 122. № 9. P. e2417695122.

68. *Duriez M., Rossigno J.M., Sitterlin D.* The hepatitis B virus precore protein is retrotransported from endoplasmic reticulum (ER) to cytosol through the ER-associated degradation pathway // Journal of Biological Chemistry. 2008. Vol. 283. № 47. P. 32352–32360.

69. *Eamens A.L., Kim K.W., Curtin S.J., Waterhouse P.M.* DRB2 Is Required for MicroRNA Biogenesis in *Arabidopsis thaliana* // PLOS ONE. 2012a. Vol. 7. № 4. P. e35933.

70. *Eamens A.L., Kim K.W., Waterhouse P.M.* DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signaling & Behavior. 2012b. Vol. 7. № 10. P. 1224–1229.

71. *Earley K., Smith M.R., Weber R., Gregory B.D., Poethig R.S.* An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana* // *Silence*. 2010. Vol. 1. № 1. P. 1–10.
72. *Endres M.W., Gregory B.D., Gao Z., Foreman A.W., Mlotshwa S., Ge X., Pruss G.J., Ecker J.R., Bowman L.H., Vance V.* Two Plant Viral Suppressors of Silencing Require the Ethylene-Inducible Host Transcription Factor RAV2 to Block RNA Silencing // *PLoS Pathogens*. 2010. Vol. 6. № 1. P. e1000729.
73. *Escalante C., Sanz-Saez A., Jacobson A., Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Balkcom K.S., Zhao C., Conner K.* Plant virus transmission during seed development and implications to plant defense system // *Frontiers in Plant Science*. 2024. Vol. 15. № May. P. 1–7.
74. *Fan P., Aguilar E., Bradai M., Xue H., Wang H., Rosas-Diaz T., Tang W., Wolf S., Zhang H., Xu L., Lozano-Durán R.* The receptor-like kinases BAM1 and BAM2 are required for root xylem patterning // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2021. Vol. 118. № 12. P. e2022547118.
75. *Fang Y., Spector D.L.* Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants // *Current Biology*. 2007. Vol. 17. № 9. P. 818–823.
76. *Fátyol K., Fekete K.A., Ludman M.* Double-Stranded-RNA-Binding Protein 2 Participates in Antiviral Defense // *Journal of Virology*. 2020. Vol. 94. № 11.
77. *Fei Q., Xia R., Meyers B.C.* Phased, Secondary, Small Interfering RNAs in Posttranscriptional Regulatory Networks // *The Plant Cell*. 2013. Vol. 25. № 7. P. 2400.
78. *de Felippes F.F., Waterhouse P.M.* The Whys and Wherefores of Transitivity in Plants // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. P. 579376.
79. *Fernández-Calvino L., Martínez-Priego L., Szabo E.Z., Guzmán-Benito I., González I., Canto T., Lakatos L., Llave C.* Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds ARGONAUTE 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes // *Journal of General Virology*. 2016. Vol. 97. № 1. P. 246–257.
80. *Fire A., Albertson D., Harrison S.W., Moerman D.G.* Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle // *Development*. 1991. Vol. 113. № 2. P. 503–514.
81. *Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature* 1998 391:6669. 1998. Vol. 391. № 6669. P. 806–811.
82. *Folimonova S.Y., Tilsner J.* Hitchhikers, highway tolls and roadworks: the interactions of plant viruses with the phloem // *Current Opinion in Plant Biology*. 2018. Vol. 43. P. 82–88.
83. *Fridborg I., Grainger J., Page A., Coleman M., Findlay K., Angell S.* TIP, A Novel Host Factor Linking Callose Degradation with the Cell-to-Cell Movement of Potato

- virus X // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2003. Vol. 16. № 2. P. 132–140.
84. Fujimoto Y., Keima T., Hashimoto M., Hagiwara-Komoda Y., Hosoe N., Nishida S., Nijo T., Oshima K., Verchot J., Namba S., Yamaji Y. Short 5' Untranslated Region Enables Optimal Translation of Plant Virus Tricistronic RNA via Leaky Scanning // Journal of Virology. 2022. Vol. 96. № 7.
85. Gaffar F.Y., Koch A. Catch Me If You Can! RNA Silencing-Based Improvement of Antiviral Plant Immunity // Viruses 2019, Vol. 11, Page 673. 2019. Vol. 11. № 7. P. 673.
86. Garcia D., Garcia S., Voinnet O. Nonsense-mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants // Cell Host and Microbe. 2014. Vol. 16. № 3. P. 391–402.
87. Garcíá J.A., Pallás V. Viral factors involved in plant pathogenesis // Current Opinion in Virology. 2015. Vol. 11. P. 21–30.
88. Garnelo Gómez B., Rosas-Díaz T., Shi C., Fan P., Zhang D., Rufián J.S., Lozano-Durán R. The viral silencing suppressor P19 interacts with the receptor-like kinases BAM1 and BAM2 and suppresses the cell-to-cell movement of RNA silencing independently of its ability to bind sRNA // New Phytologist. 2021. Vol. 229. № 4. P. 1840–1843.
89. Geng G., Wang D., Liu Z., Wang Y., Zhu M., Cao X., Yu C., Yuan X. Translation of Plant RNA Viruses // Viruses. 2021. Vol. 13. № 12. P. 2499.
90. Ghazala W., Waltermann A., Pilot R., Winter S., Varrelmann M. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus // Journal of General Virology. 2008. Vol. 89. № 7. P. 1748–1758.
91. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // Nature Reviews Genetics 2009 10:2. 2009. Vol. 10. № 2. P. 94–108.
92. Goldbach R.W., Gall O. le, Wellink J. Alpha-like viruses in plants. // Seminars Virology. 1991. Vol. 2. P. 19–25.
93. González I., Rakitina D., Semashko M., Taliansky M., Praveen S., Palukaitis P., Carr J.P., Kalinina N., Canto T. RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization // RNA. 2012. Vol. 18. № 4. P. 771–782.
94. Goto K., Kobori T., Kosaka Y., Natsuaki T., Masuta C. Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities // Plant and Cell Physiology. 2007. Vol. 48. № 7. P. 1050–1060.
95. Grangeon R., Jiang J., Wan J., Agbeci M., Zheng H., Laliberté J.F. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection // Frontiers in Microbiology. 2013. Vol. 4. № DEC. P. 351.

96. *Guo L.H., Sun L., Chiba S., Araki H., Suzuki N.* Coupled termination/reinitiation for translation of the downstream open reading frame B of the prototypic hypovirus CHV1-EP713 // *Nucleic Acids Research*. 2009. Vol. 37. № 11. P. 3645–3659.
97. *Hacker D.L., Petty I.T.D., Wei N., Morris T.J.* Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement // *Virology*. 1992. Vol. 186. № 1. P. 1–8.
98. *Hacquard T., Clavel M., Baldrich P., Lechner E., Pérez-Salamó I., Schepetilnikov M., Derrien B., Dubois M., Hammann P., Kuhn L., Brun D., Bouteiller N., Baumberger N., Vaucheret H., Meyers B.C., Genschik P.* The *Arabidopsis* F-box protein FBW2 targets AGO1 for degradation to prevent spurious loading of illegitimate small RNA // *Cell Reports*. 2022. Vol. 39. № 2.
99. *Hafrén A., Üstiün S., Hochmuth A., Svenning S., Johansen T., Hofius D.* Turnip Mosaic Virus Counteracts Selective Autophagy of the Viral Silencing Suppressor HCpro // *Plant Physiology*. 2018. Vol. 176. № 1. P. 649–662.
100. *Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // *The EMBO Journal*. 2002. Vol. 21. № 17. P. 4671–4679.
101. *Hamilton A.J., Baulcombe D.C.* A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants // *Science*. 1999. Vol. 286. № 5441. P. 950–952.
102. *Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature* 2000 404:6775. 2000. Vol. 404. № 6775. P. 293–296.
103. *Harvey J.J.W., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstädt S., Carr J.P., Baulcombe D.C.* An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants // *PLOS ONE*. 2011. Vol. 6. № 1. P. e14639.
104. *Havelda Z., Hornyik C., Crescenzi A., Burgýán J.* In Situ Characterization of *Cymbidium* Ringspot Tombusvirus Infection-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana* // *Journal of Virology*. 2003. Vol. 77. № 10. P. 6082–6086.
105. *Hawes C., Kiviniemi P., Kriechbaumer V.* The endoplasmic reticulum: A dynamic and well-connected organelle // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2015. Vol. 57. № 1. P. 50–62.
106. *Heinlein M.* Plant virus replication and movement // *Virology*. 2015. Vol. 479–480. P. 657–671.
107. *Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C., Voinnet O.* Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing // *The EMBO Journal*. 2003. Vol. 22. № 17. P. 4523–4533.
108. *Hong J.S., Ju H.J.* The plant cellular systems for plant virus movement // *Plant*

Pathol. J. 2017. T. 33. № 3. C. 213–228.

109. *Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L., Libby R.T., March C.J., Cerretti D.P., Urdal D.L., Conlon P.J.* A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification // *Nature Biotechnology*. 1988. Vol. 6. № 10. P. 1204–1210.
110. *Howard A.R., Heppler M.L., Ju H.J., Krishnamurthy K., Payton M.E., Verchot-Lubicz J.* Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves // *Virology*. 2004. Vol. 328. № 2. P. 185–197.
111. *Hsu H.T., Chou Y.L., Tseng Y.H., Lin Y.H., Lin T.M., Lin N.S., Hsu Y.H., Chang B.Y.* Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus // *Virology*. 2008. Vol. 379. № 1. P. 1–9.
112. *Hsu H.T., Tseng Y.H., Chou Y.L., Su S.H., Hsu Y.H., Chang B.Y.* Characterization of the RNA-binding properties of the triple-gene-block protein 2 of Bamboo mosaic virus // *Virology journal*. 2009. Vol. 6.
113. *Hu J., Shibata Y., Voss C., Shemesh T., Li Z., Coughlin M., Kozlov M.M., Rapoport T.A., Prinz W.A.* Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules // *Science*. 2008. Vol. 319. № 5867. P. 1247–1250.
114. *Huang C., Sede A.R., Elvira-González L., Yan Y., Rodriguez M.E., Mutterer J., Boutant E., Shan L., Heinlein M.* dsRNA-induced immunity targets plasmodesmata and is suppressed by viral movement proteins // *The Plant Cell*. 2023. Vol. 35. № 10. P. 3845–3869.
115. *Huang J., Yang M., Lu L., Zhang X.* Diverse functions of small RNAs in different plant-pathogen communications // *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. № OCT. P. 221038.
116. *Huang Y., Ji L., Huang Q., Vassylyev D.G., Chen X., Ma J.B.* Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1 // *Nature* 2009 461:7265. 2009. Vol. 461. № 7265. P. 823–827.
117. *Hwang J.N., Lee S., Lee J.H., Kang W.H., Kang J.H., Kang M.Y., Oh C.S., Kang B.C.* Plant Translation Elongation Factor 1B β Facilitates Potato Virus X (PVX) Infection and Interacts with PVX Triple Gene Block Protein 1 // *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10. № 5. P. e0128014.
118. *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 // *Molecular Cell*. 2010. Vol. 39. № 2. P. 282–291.
119. *Incarbone M., Clavel M., Monsion B., Kuhn L., Scheer H., Vantard É., Poignavent V., Dunoyer P., Genschik P., Ritzenthaler C.* Immunocapture of dsRNA-bound proteins provides insight into Tobacco rattle virus replication complexes and reveals *Arabidopsis*

DRB2 to be a wide-spectrum antiviral effector // The Plant Cell. 2021. Vol. 33. № 11. P. 3402–3420.

120. *Incarbone M., Zimmermann A., Hammann P., Erhardt M., Michel F., Dunoyer P.* Neutralization of mobile antiviral small RNA through peroxisomal import // Nature Plants 2017 3:7. 2017. Vol. 3. № 7. P. 1–7.
121. *Ivanov K.I., Eskelin K., Bašić M., De S., Lõhmus A., Varjosalo M., Mäkinen K.* Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro // The Plant Journal. 2016. Vol. 85. № 1. P. 30–45.
122. *Iwakawa H. oki, Lam A.Y.W., Mine A., Fujita T., Kiyokawa K., Yoshikawa M., Takeda A., Iwasaki S., Tomari Y.* Ribosome stalling caused by the Argonaute-microRNA-SGS3 complex regulates the production of secondary siRNAs in plants // Cell Reports. 2021. Vol. 35. № 13. P. 109300.
123. *Izant J.G., Weintraub H.* Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: A molecular approach to genetic analysis // Cell. 1984. Vol. 36. № 4. P. 1007–1015.
124. *Jackson A.O., Lim H.S., Bragg J., Ganesan U., Lee M.Y.* Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis // Annual Review of Phytopathology. 2009. Vol. 47. № 1. P. 385–422.
125. *Jiang Z., Zhang K., Li Z., Li Z., Yang M., Jin X., Cao Q., Wang X., Yue N., Li D., Zhang Y.* The Barley stripe mosaic virus γ b protein promotes viral cell-to-cell movement by enhancing ATPase-mediated assembly of ribonucleoprotein movement complexes // PLOS Pathogens. 2020. Vol. 16. № 7. P. e1008709.
126. *Jin H., Zhu J.K.* A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes // Genes & Development. 2010. Vol. 24. № 9. P. 853–856.
127. *Ju H.J., Samuels T.D., Wang Y.S., Blancaflor E., Payton M., Mitra R., Krishnamurthy K., Nelson R.S., Verchot-Lubicz J.* The Potato Virus X TGBp2 Movement Protein Associates with Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles during Virus Infection // Plant Physiology. 2005. Vol. 138. № 4. P. 1877–1895.
128. *Kakiyama S., Tabara M., Nishibori Y., Moriyama H., Fukuhara T.* Long DCL4-substrate dsRNAs efficiently induce RNA interference in plant cells // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. № 6920. P. 1–10.
129. *Kalinina N.O., Rakitina D. V., Solovyev A.G., Schiemann J., Morozov S.Y.* RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block // Virology. 2002. Vol. 296. № 2. P. 321–329.
130. *Kalinina N.O., Rakitina D.A., Yelina N.E., Zamyatnin A.A., Stroganova T.A., Klinov D. V., Prokhorov V. V., Ustinova S. V., Chernov B.K., Schiemann J., Solovyev A.G., Morozov S.Y.* RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of poa semilatent hordeivirus. // Journal of General Virology. 2001. Vol. 82. № 10. P. 2569–2578.

131. *Kanyuka K. V., Vishnichenko V.K., Levay K.E., Kondrikov D.Y., Ryabov E. V., Zavriev S.K.* Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons // *Journal of General Virology*. 1992. Vol. 73. № 10. P. 2553–2560.
132. *Karpova O. V., Zayakina O. V., Arkhipenko M. V., Sheval E. V., Kiselyova O.I., Poljakov V.Y., Yaminsky I. V., Rodionova N.P., Atabekov J.G., Atabekov J.G.* Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary «coat protein-RNA-movement protein» complexes // *Journal of General Virology*. 2006. Vol. 87. № 9. P. 2731–2740.
133. *Katis N.I., Maliogka V.I., Dovas C.I.* Viruses of the Genus Allium in the Mediterranean Region // *Advances in Virus Research*. 2012. Vol. 84. P. 163–208.
134. *Kawakami S., Watanabe Y., Beachy R.N.* Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. Vol. 101. № 16. P. 6291–6296.
135. *Kertész S., Kerényi Z., Mérai Z., Bartos I., Pálfy T., Barta E., Silhavy D.* Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants // *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34. № 21. P. 6147–6157.
136. *Kervestin S., Jacobson A.* NMD: A multifaceted response to premature translational termination // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012. Vol. 13. № 11. P. 700–712.
137. *Kim H., Kawakubo S., Takahashi H., Masuta C.* Two mutually exclusive evolutionary scenarios for allexiviruses that overcome host RNA silencing and autophagy by regulating viral CRP expression // *PLoS Pathogens*. 2023. Vol. 19. № 6 June. P. 1–30.
138. *Kiselyova O.I., Yaminsky I. V., Karger E.M., Frolova O.Y., Dorokhov Y.L., Atabekov J.G.* Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro // *Journal of General Virology*. 2001. Vol. 82. № 6. P. 1503–1508.
139. *Komatsu K., Hammond J.* *Plantago asiatica* mosaic virus: An emerging plant virus causing necrosis in lilies and a new model RNA virus for molecular research // *Molecular Plant Pathology*. 2022. Vol. 23. № 10. P. 1401–1414.
140. *Komatsu K., Sasaki N., Yoshida T., Suzuki K., Masujima Y., Hashimoto M., Watanabe S., Tochio N., Kigawa T., Yamaji Y., Oshima K., Namba S., Nelson R.S., Arie T.* Identification of a Proline-Kinked Amphipathic α -Helix Downstream from the Methyltransferase Domain of a Potexvirus Replicase and Its Role in Virus Replication and Perinuclear Complex Formation // *Journal of Virology*. 2021. Vol. 95. № 20.
141. *Kondhare K.R., Patil N.S., Banerjee A.K.* A historical overview of long-distance signalling in plants // *Journal of Experimental Botany*. 2021. Vol. 72. № 12. P. 4218–4236.
142. *Koonin E. V., Dolja V. V., Morris T.J.* Evolution and Taxonomy of Positive-Strand

RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1993. Vol. 28. № 5. P. 375–430.

143. *Koonin E. V., Krupovic M., Agol V.I.* The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2021. Vol. 85. № 3. P. e00053-21.
144. *Koonin E. V, Dolja V. V, Krupovic M., Varsani A., Wolf Y.I., Yutin N., Zerbini F.M., Kuhn J.H.* Global Organization and Proposed Megataxonomy of the // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2020. Vol. 84. № 2. P. e00061-19.
145. *Kørner C.J., Pitzalis N., Peña E.J., Erhardt M., Vazquez F., Heinlein M.* Crosstalk between PTGS and TGS pathways in natural antiviral immunity and disease recovery // Nature Plants 2018 4:3. 2018. Vol. 4. № 3. P. 157–164.
146. *Kost B., Spielhofer P., Chua N.H.* A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes // The Plant Journal. 1998. Vol. 16. № 3. P. 393–401.
147. *Kozak M.* Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles // Microbiological Reviews. 1983. Vol. 47. № 1. P. 1–45.
148. *Kozak M.* Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell-free translation systems // Molecular and Cellular Biology. 1989. Vol. 9. № 11. P. 5073.
149. *Kreuze J.F., Savenkov E.I., Cuellar W., Li X., Valkonen J.P.T.* Viral Class 1 RNase III Involved in Suppression of RNA Silencing // Journal of Virology. 2005. Vol. 79. № 11. P. 7227–7238.
150. *Kreuze J.F., Savenkov E.I., Valkonen J.P.T.* Complete Genome Sequence and Analyses of the Subgenomic RNAs of Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus Reveal Several New Features for the Genus Crinivirus // Journal of Virology. 2002. Vol. 76. № 18. P. 9260–9270.
151. *Kriechbaumer V., Brandizzi F.* The plant endoplasmic reticulum: an organized chaos of tubules and sheets with multiple functions // Journal of Microscopy. 2020. Vol. 280. № 2. P. 122–133.
152. *Krishnamurthy K., Heppler M., Mitra R., Blancaflor E., Payton M., Nelson R.S., Verchot-Lubicz J.* The Potato virus X TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement // Virology. 2003. Vol. 309. № 1. P. 135–151.
153. *Kubota K., Tsuda S., Tamai A., Meshi T.* Tomato Mosaic Virus Replication Protein Suppresses Virus-Targeted Posttranscriptional Gene Silencing // Journal of Virology. 2003. Vol. 77. № 20. P. 11016–11026.
154. *Kumagai M.H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L.K.* Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA // 1995. Vol.

92. P. 1679–1683.

155. *Kumar G., Dasgupta I.* Variability, functions and interactions of plant virus movement proteins: What do we know so far? // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. № 4.
156. *Kurihara Y., Inaba N., Kutsuna N., Takeda A., Tagami Y., Watanabe Y.* Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes // *Journal of General Virology*. 2007. Vol. 88. № 8. P. 2347–2352.
157. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. № 5259. P. 680–685.
158. *Laubinger S., Sachsenberg T., Zeller G., Busch W., Lohmann J.U., Rätsch G., Weigel D.* Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. № 25. P. 8795–8800.
159. *Lawrence D.M., Jackson A.O.* Interactions of the TGB1 Protein during Cell-to-Cell Movement of Barley Stripe Mosaic Virus // *Journal of Virology*. 2001. Vol. 75. № 18. P. 8712–8723.
160. *Lazareva E., Lezzhov A., Vassetzky N., Solovyev A., Morozov S.* Acquisition of full-length viral helicase domains by insect retrotransposon-encoded polypeptides // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. № 1447. P. 168994.
161. *Lazareva E.A., Atabekova A.K., Lezzhov A.A., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G.* Virus Genome-Based Reporter for Analyzing Viral Movement Proteins and Plasmodesmata Permeability // *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana Press Inc., 2022. P. 333–349.
162. *Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Chergintsev D.A., Golyshev S.A., Dolja V. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G.* Reticulon-like properties of a plant virus-encoded movement protein // *New Phytologist*. 2021a. Vol. 229. № 2. P. 1052–1066.
163. *Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Dolja V. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G.* Constriction of endoplasmic reticulum tubules by the viral movement protein BMB2 is associated with local BMB2 anchorage at constriction sites // *Plant Signaling & Behavior*. 2021b. Vol. 16. № 3.
164. *Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Golyshev S.A., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G.* Similarities in intracellular transport of plant viral movement proteins BMB2 and TGB3 // *Journal of General Virology*. 2017a. Vol. 98. № 9. P. 2379–2391.
165. *Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Komarova T. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G.* A novel block of plant virus movement genes // *Molecular Plant Pathology*. 2017b. Vol. 18. № 5. P. 611–624.
166. *Lee S.C., Pai H., Huang Y.W., He M.H., Song Y.L., Kuo S.Y., Chang W.C., Hsu Y.H., Lin N.S.* Exploring the multifunctional roles of odontoglossum ringspot virus p126

in facilitating cymbidium mosaic virus cell-to-cell movement during mixed infection // *Viruses*. 2021. Vol. 13. № 8. P. 1552.

167. *Lee S.C., Wu C.H., Wang C.W.* Traffic of a viral movement protein complex to the highly curved tubules of the cortical endoplasmic reticulum // *Traffic*. 2010. Vol. 11. № 7. P. 912–930.

168. *Leonetti P., Consiglio A., Arendt D., Golbik R.P., Rubino L., Gursinsky T., Behrens S.E., Pantaleo V.* Exogenous and endogenous dsRNAs perceived by plant Dicer-like 4 protein in the RNAi-depleted cellular context // *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2023. Vol. 28. № 1. P. 1–20.

169. *Lewis J.D., Knoblauch M., Turgeon R.* The Phloem as an Arena for Plant Pathogens // *Annual Review of Phytopathology*. 2022. Vol. 60. P. 77–96.

170. *Lewsey M.G., Murphy A.M., MacLean D., Dalchau N., Westwood J.H., Macaulay K., Bennett M.H., Moulin M., Hanke D.E., Powell G., Smith A.G., Carr J.P.* Disruption of Two Defensive Signaling Pathways by a Viral RNA Silencing Suppressor // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010. Vol. 23. № 7. P. 835–845.

171. *Lezzhov A.A., Gushchin V.A., Lazareva E.A., Vishnichenko V.K., Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Translation of the shallot virus X TGB3 gene depends on non-AUG initiation and leaky scanning // *Journal of General Virology*. 2015. Vol. 96. № 10. P. 3159–3164.

172. *Li C.F., Pontes O., El-Shami M., Henderson I.R., Bernatavichute Y. V., Chan S.W.L., Lagrange T., Pikaard C.S., Jacobsen S.E.* An ARGONAUTE4-Containing Nuclear Processing Center Colocalized with Cajal Bodies in *Arabidopsis thaliana* // *Cell*. 2006. Vol. 126. № 1. P. 93–106.

173. *Li F., Huang C., Li Z., Zhou X.* Suppression of RNA Silencing by a Plant DNA Virus Satellite Requires a Host Calmodulin-Like Protein to Repress RDR6 Expression // *PLOS Pathogens*. 2014. Vol. 10. № 2. P. e1003921.

174. *Li F., Jia M., Wang A.* Hidden viral proteins: How powerful are they? // *PLOS Pathogens*. 2024a. Vol. 20. № 1. P. e1011905.

175. *Li F., Wang A.* RNA decay is an antiviral defense in plants that is counteracted by viral RNA silencing suppressors // *PLOS Pathogens*. 2018. Vol. 14. № 8. P. e1007228.

176. *Li H., Li W.X., Ding S.W.* Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus // *Science*. 2002. Vol. 296. № 5571. P. 1319–1321.

177. *Li L., Wang G., Zhang Y., Wang W., Zhu Y., Lyu Y., Wang Y., Zhang Y., Hong N.* The functions of triple gene block proteins and coat protein of apple stem pitting virus in viral cell-to-cell movement // *Molecular Plant Pathology*. 2024b. Vol. 25. № 1. P. e13392.

178. *Li S., Le B., Ma X., Li S., You C., Yu Y., Zhang B., Liu L., Gao L., Shi T., Zhao Y., Mo B., Cao X., Chen X.* Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes

in arabidopsis // eLife. 2016. Vol. 5. P. e22750.

179. *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. Vol. 153. № 3. P. 562–574.
180. *Li X.* Infiltration of Nicotiana benthamiana Protocol for Transient Expression via Agrobacterium // Bio-Protocol. 2016. Vol. 1. № 14. P. 1–3.
181. *Li Z., Zhang Y., Jiang Z., Jin X., Zhang K., Wang X., Han C., Yu J., Li D.* Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus // Molecular Plant Pathology. 2018. Vol. 19. № 5. P. 1222–1237.
182. *Lim H.-S., Bragg J.N., Ganesan U., Lawrence D.M., Yu J., Isogai M., Hammond J., Jackson A.O.* Triple gene block protein interactions involved in movement of Barley stripe mosaic virus. // Journal of virology. 2008. Vol. 82. № 10. P. 4991–5006.
183. *Lim H.-S., Bragg J.N., Ganesan U., Ruzin S., Schichnes D., Lee M.Y., Vaira A.M., Ryu K.H., Hammond J., Jackson A.O.* Subcellular Localization of the Barley Stripe Mosaic Virus Triple Gene Block Proteins // Journal of Virology. 2009. Vol. 83. № 18. P. 9432–9448.
184. *Lim H.S., Vaira A.M., Reinsel M.D., Bae H., Bailey B.A., Dornier L.L., Hammond J.* Pathogenicity of Alternanthera mosaic virus is affected by determinants in RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1 // Journal of General Virology. 2010. Vol. 91. № 1. P. 277–287.
185. *Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M., Dougherty W.G.* Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance // The Plant cell. 1993. Vol. 5. № 12. P. 1749–1759.
186. *Linnik O., Liesche J., Tilsner J., Oparka K.J.* Unraveling the structure of viral replication complexes at super-resolution // Frontiers in Plant Science. 2013. Vol. 4. № JAN. P. 40704.
187. *Liu L., Chen X.* RNA Quality Control as a Key to Suppressing RNA Silencing of Endogenous Genes in Plants // Molecular Plant. 2016. Vol. 9. № 6. P. 826–836.
188. *Liu Y., Fan X., Luan Y., Li Y., Zhao Y., Ji W., Li N., Wu X., Cheng X., Bai Y.* The Small Cysteine-Rich Protein of Potato Mop-Top Virus Exhibits Viroporin Activity // Molecular Plant Pathology. 2025. Vol. 26. № 9. P. e70150.
189. *Lopez-Gomollon S., Baulcombe D.C.* Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems // Nature Reviews Molecular Cell Biology 2022 23:10. 2022. Vol. 23. № 10. P. 645–662.
190. *Lough T.J., Shash K., Xoconostle-Ćzares B., Hofstra K.R., Beck D.L., Balmori E.,*

- Forster R.L.S., Lucas W.J.* Molecular Dissection of the Mechanism by Which Potexvirus Triple Gene Block Proteins Mediate Cell-to-Cell Transport of Infectious RNA // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1998. Vol. 11. № 8. P. 801–814.
191. *Lozano I., Leiva A.M., Jimenez J., Fernandez E., Carvajal-Yepes M., Cuervo M., Cuellar W.J.* Resolution of cassava-infecting alphaflexiviruses: Molecular and biological characterization of a novel group of potexviruses lacking the TGB3 gene // Virus Research. 2017. Vol. 241. P. 53–61.
192. *Lu C., Kulkarni K., Souret F.F., MuthuValliappan R., Tej S.S., Poethig R.S., Henderson I.R., Jacobsen S.E., Wang W., Green P.J., Meyers B.C.* MicroRNAs and other small RNAs enriched in the *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant // Genome Research. 2006. Vol. 16. № 10. P. 1276–1288.
193. *Lucas W.J.* Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes // Virology. 2006. T. 344. № 1. C. 169–184.
194. *Lucas W.J., Lee J.Y.* Plasmodesmata as a supracellular control network in plants // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2004. Vol. 5. № 9. P. 712–726.
195. *Luderer R., Joosten M.H.A.J.* Avirulence proteins of plant pathogens: determinants of victory and defeat // Molecular plant pathology. 2001. Vol. 2. № 6. P. 355–364.
196. *Lukhovitskaya N., Ryabova L.A.* Cauliflower mosaic virus transactivator protein (TAV) can suppress nonsense-mediated decay by targeting VARICOSE, a scaffold protein of the decapping complex // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. № 1. P. 1–15.
197. *Lukhovitskaya N.I., Ignatovich I. V., Savenkov E.I., Schiemann J., Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Role of the zinc-finger and basic motifs of chrysanthemum virus B p12 protein in nucleic acid binding, protein localization and induction of a hypersensitive response upon expression from a viral vector // Journal of General Virology. 2009. Vol. 90. № 3. P. 723–733.
198. *Lukhovitskaya N.I., Solovieva A.D., Boddeti S.K., Thaduri S., Solovyev A.G., Savenkov E.I.* An RNA Virus-Encoded Zinc-Finger Protein Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Regulator of Cell Size and Proliferation in Two Tobacco Species // The Plant Cell. 2013. Vol. 25. № 3. P. 960–973.
199. *Lukhovitskaya N.I., Vetukuri R.R., Sama I., Thaduri S., Solovyev A.G., Savenkov E.I.* A viral transcription factor exhibits antiviral RNA silencing suppression activity independent of its nuclear localization // Journal of General Virology. 2014. Vol. 95. № 12. P. 2831–2837.
200. *Lukhovitskaya N.I., Yelina N.E., Zamyatnin A.A., Schepetilnikov M. V., Solovyev A.G., Sandgren M., Morozov S.Y., Valkonen J.P.T., Savenkov E.I.* Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of Potato mop-top virus // Journal of General Virology. 2005. Vol. 86. № 10. P. 2879–2889.
201. *Luna A.P., Morilla G., Voinnet O., Bejarano E.R.* Functional Analysis of Gene-Silencing Suppressors from Tomato Yellow Leaf Curl Disease Viruses // Molecular

Plant-Microbe Interactions. 2012. Vol. 25. № 10. P. 1294–1306.

202. *Luttermann C., Meyers G.* A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA // Journal of Biological Chemistry. 2007. Vol. 282. № 10. P. 7056–7065.
203. *MacLean D., Elina N., Havecker E.R., Heimstaedt S.B., Studholme D.J., Baulcombe D.C.* Evidence for Large Complex Networks of Plant Short Silencing RNAs // PLOS ONE. 2010. Vol. 5. № 3. P. e9901.
204. *Makarov V. V., Rybakova E.N., Efimov A. V., Dobrov E.N., Serebryakova M. V., Solovyev A.G., Yaminsky I. V., Taliansky M.E., Morozov S.Y., Kalinina N.O.* Domain organization of the N-terminal portion of hordeivirus movement protein TGBp1 // Journal of General Virology. 2009. Vol. 90. № 12. P. 3022–3032.
205. *Makarova S.S., Solovyev A.G., Morozov S.Y.* RNA-binding properties of the plant protein Nt-4/1 // Biochemistry (Moscow). 2014. Vol. 79. № 7. P. 717–726.
206. *Malhotra A.* Chapter 16 Tagging for Protein Expression // Methods in Enzymology. : Academic Press Inc., 2009. C. 239–258.
207. *Mallory A., Vaucheret H.* Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins // The Plant Cell. 2012. Vol. 22. № 12. P. 3879–3889.
208. *Mallory A.C., Vaucheret H.* ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways // EMBO Reports. 2009. Vol. 10. № 5. P. 521–526.
209. *Martín-Hernández A.M., Baulcombe D.C.* Tobacco Rattle Virus 16-Kilodalton Protein Encodes a Suppressor of RNA Silencing That Allows Transient Viral Entry in Meristems // Journal of Virology. 2008. Vol. 82. № 8. P. 4064–4071.
210. *Martinez-Salas E., Francisco-Velilla R., Fernandez-Chamorro J., Embarek A.M.* Insights into structural and mechanistic features of viral IRES elements // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 8. № JAN. P. 326269.
211. *Matzke M.A., Mosher R.A.* RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity // Nature Reviews Genetics 2014 15:6. 2014. Vol. 15. № 6. P. 394–408.
212. *May J.P., Johnson P.Z., Ilyas M., Gao F., Simon A.E.* The multifunctional long-distance movement protein of pea enation mosaic virus 2 protects viral and host transcripts from nonsense-mediated decay // mBio. 2020. Vol. 11. № 2.
213. *Melcher U.* The «30K» superfamily of viral movement proteins // Journal of General Virology. 2000. Vol. 81. № 1. P. 257–266.
214. *Melnik C.W., Molnar A., Baulcombe D.C.* Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals // EMBO Journal. 2011. Vol. 30. № 17. P. 3553–3563.
215. *Melzer M.J., Sether D.M., Borth W.B., Hu J.S.* Characterization of a Virus

Infecting Citrus volkameriana with Citrus Leprosis-Like Symptoms // *Phytopathology*. 2011. Vol. 102. № 1. P. 122–127.

216. *Mérai Z., Kerényi Z., Kertész S., Magna M., Lakatos L., Silhavy D.* Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing // *Journal of Virology*. 2006. Vol. 80. № 12. P. 5747–5756.
217. *Mérai Z., Kerényi Z., Molnár A., Barta E., Válóczi A., Bisztray G., Havelda Z., Burgýán J., Silhavy D.* Aureusvirus P14 Is an Efficient RNA Silencing Suppressor That Binds Double-Stranded RNAs without Size Specificity // *Journal of Virology*. 2005. Vol. 79. № 11. P. 7217–7226.
218. *Michaeli S., Clavel M., Lechner E., Viotti C., Wu J., Dubois M., Hacquard T., Derrien B., Izquierdo E., Lecorbeiller M., Bouteiller N., Cilia J. de, Ziegler-Graff V., Vaucheret H., Galili G., Genschik P.* The viral F-box protein P0 induces an ER-derived autophagy degradation pathway for the clearance of membrane-bound AGO1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019. Vol. 116. № 45. P. 22872–22883.
219. *Mifsud J.C.O., Gallagher R. V., Holmes E.C., Geoghegan J.L.* Transcriptome Mining Expands Knowledge of RNA Viruses across the Plant Kingdom // *Journal of Virology*. 2022. Vol. 96. № 24.
220. *Mlotshwa S., Pruss G.J., Peragine A., Endres M.W., Li J., Chen X., Poethig R.S., Bowman L.H., Vance V.* DICER-LIKE2 Plays a Primary Role in Transitive Silencing of Transgenes in *Arabidopsis* // *PLOS ONE*. 2008. Vol. 3. № 3. P. e1755.
221. *Moore C.J., Sutherland P.W., Forster R.L.S., Gardner R.C., MacDiarmid R.M.* Dark Green Islands in Plant Virus Infection are the Result of Posttranscriptional Gene Silencing // <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.8.939>. 2007. Vol. 14. № 8. P. 939–946.
222. *Morozov S.Y., Miroshnichenko N.A., Solovyev A.G., Fedorkin O.N., Zelenina Lukasheva D.A.L.I., Karasev A. V., Dolja V. V., Atabekov J.G.* Expression strategy of the potato virus X triple gene block // *Journal of General Virology*. 1991. Vol. 72. № 8. P. 2039–2042.
223. *Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Triple gene block: Modular design of a multifunctional machine for plant virus movement // *Journal of General Virology*. 2003. Vol. 84. № 6. P. 1351–1366.
224. *Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Did Silencing Suppression Counter-Defensive Strategy Contribute to Origin and Evolution of the Triple Gene Block Coding for Plant Virus Movement Proteins? // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. P. 136.
225. *Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Phylogenetic relationship of some «accessory» helicases of plant positive-stranded RNA viruses: Toward understanding the evolution of triple gene block // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. P. 508.
226. *Morozov S.Y., Solovyev A.G.* Small hydrophobic viral proteins involved in

intercellular movement of diverse plant virus genomes // AIMS Microbiology. 2020. Vol. 6. № 3. P. 305–329.

227. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Bioinformatic Analysis Predicts a Novel Genetic Module Related to Triple Gene and Binary Movement Blocks of Plant Viruses: Tetra-Cistron Movement Block // Biomolecules. 2022. Vol. 12. № 7. P. 861.

228. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans // The Plant cell. 1990. Vol. 2. № 4. P. 279–289.

229. Navarro J.A., Pallás V. An update on the intracellular and intercellular trafficking of carmoviruses // Frontiers in Plant Science. 2017. Vol. 8. № October. P. 1–7.

230. Navarro J.A., Sanchez-Navarro J.A., Pallas V. Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. : Elsevier Inc., 2019. Issue. 1. P. 1–64.

231. Nemes K., Gellért Á., Balázs E., Salánki K. Alanine Scanning of Cucumber Mosaic Virus (CMV) 2B Protein Identifies Different Positions for Cell-To-Cell Movement and Gene Silencing Suppressor Activity // PLOS ONE. 2014. Vol. 9. № 11. P. e112095.

232. Nicolas W.J., Grison M.S., Bayer E.M. Shaping intercellular channels of plasmodesmata: The structure-to-function missing link // Journal of Experimental Botany. 2017a. Vol. 69. № 1. P. 91–103.

233. Nicolas W.J., Grison M.S., Trépout S., Gaston A., Fouché M., Cordelières F.P., Oparka K., Tilsner J., Brocard L., Bayer E.M. Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves // Nature Plants. 2017b. Vol. 3. № June.

234. Niehl A., Peña E.J., Amari K., Heinlein M. Microtubules in viral replication and transport // Plant Journal. 2013. Vol. 75. № 2. P. 290–308.

235. Okano Y., Senshu H., Hashimoto M., Neriya Y., Netsu O., Minato N., Yoshida T., Maejima K., Oshima K., Komatsu K., Yamaji Y., Namba S. In Planta Recognition of a Double-Stranded RNA Synthesis Protein Complex by a Potexviral RNA Silencing Suppressor // The Plant Cell. 2014. Vol. 26. № 5. P. 2168–2183.

236. Oliver C., Martinez G. Accumulation dynamics of ARGONAUTE proteins during meiosis in Arabidopsis // Plant Reproduction. 2022. Vol. 35. № 2. P. 153–160.

237. Pan Z.J., Wei W.L., Tran P.A., Fang R.Y., Pham T.H., Bowman J.L., Chung C.T., Shen B.N., Yang J.T., Chang H.H., Jane W.N., Cheng C.H., Wang C.C., Wu H.Y., Hong S.F., Shang Q.W., Hu S.F., Lin P.C., Wu F.H., Lin C.S., Hung Y.L., Shen T.L., Lin S.S. HC-Pro inhibits HEN1 methyltransferase activity, leading to autophagic degradation of AGO1 // Nature Communications 2025 16:1. 2025. Vol. 16. № 1. P. 1–18.

238. Parent J.S., Bouteiller N., Elmayan T., Vaucheret H. Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing // The Plant Journal. 2015. Vol. 81. № 2. P. 223–232.

239. Park M.R., Jeong R.D., Kim K.H. Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. № MAR. P. 76289.
240. Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P., Ziegler-Graff V. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103. № 6. P. 1994–1999.
241. Pfeffer S., Dunoyer P., Heim F., Richards K.E., Jonard G., Ziegler-Graff V. P0 of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing // *Journal of Virology*. 2002. Vol. 76. № 13. P. 6815–6824.
242. Pittman Y.R., Kandl K., Lewis M., Valente L., Linzy T.G. Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1Ba // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. № 7. P. 4739–4747.
243. Pontes O., Li C.F., Nunes P.C., Haag J., Ream T., Vitins A., Jacobsen S.E., Pikaard C.S. The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center // *Cell*. 2006. Vol. 126. № 1. P. 79–92.
244. Pontes O., Vitins A., Ream T.S., Hong E., Pikaard C.S., Costa-Nunes P. Intersection of Small RNA Pathways in *Arabidopsis thaliana* Sub-Nuclear Domains // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8. № 6. P. e65652.
245. Pouch-Pélissier M.N., Pélissier T., Elmayan T., Vaucheret H., Boko D., Jantsch M.F., Deragon J.M. SINE RNA Induces Severe Developmental Defects in *Arabidopsis thaliana* and Interacts with HYL1 (DRB1), a Key Member of the DCL1 Complex // *PLOS Genetics*. 2008. Vol. 4. № 6. P. e1000096.
246. Powell M.L., Napthine S., Jackson R.J., Brierley I., Brown T.D.K. Characterization of the termination–reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein // *RNA*. 2008. Vol. 14. № 11. P. 2394–2406.
247. Powers J.G., Sit T.L., Heinsohn C., George C.G., Kim K.H., Lommel S.A. The Red clover necrotic mosaic virus RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing // *Virology*. 2008a. Vol. 381. № 2. P. 277–286.
248. Powers J.G., Sit T.L., Qu F., Morris T.J., Kim K.H., Lommel S.A. A versatile assay for the identification of RNA silencing suppressors based on complementation of viral movement // *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 2008b. Vol. 21. № 7. P. 879–890.
249. Pumplin N., Voinnet O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence // *Nature Reviews Microbiology* 2013 11:11. 2013. Vol. 11. № 11. P. 745–760.
250. Qin C., Li B., Fan Y., Zhang X., Yu Z., Ryabov E., Zhao M., Wang H., Shi N.,

Zhang P., Jackson S., Tör M., Cheng Q., Liu Y., Gallusci P., Hong Y. Roles of Dicer-Like Proteins 2 and 4 in Intra- and Intercellular Antiviral Silencing // *Plant Physiology*. 2017. Vol. 174. № 2. P. 1067–1081.

251. *Qu F., Morris T.J.* Efficient Infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus Is Facilitated by the Coat Protein and Maintained by p19 Through Suppression of Gene Silencing // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2007. Vol. 15. № 3. P. 193–202.

252. *Qu F., Ren T., Morris T.J.* The Coat Protein of Turnip Crinkle Virus Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing at an Early Initiation Step // *Journal of Virology*. 2003. Vol. 77. № 1. P. 511–522.

253. *Qu F., Ye X., Morris T.J.* *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. № 38. P. 14732–14737.

254. *Rahman A., Sinha K.V., Sopory S.K., Sanan-Mishra N.* Influence of virus–host interactions on plant response to abiotic stress // *Plant Cell Reports* 2021 40:11. 2021. Vol. 40. № 11. P. 2225–2245.

255. *Rajagopalan R., Vaucheret H., Trejo J., Bartel D.P.* A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana* // *Genes & Development*. 2006. Vol. 20. № 24. P. 3407–3425.

256. *Reis R.S., Hart-Smith G., Eamens A.L., Wilkins M.R., Waterhouse P.M.* Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins // *Nature Plants* 2015 1:3. 2015. Vol. 1. № 3. P. 1–6.

257. *Ren G., Chen X., Yu B.* Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in *arabidopsis* // *Current Biology*. 2012. Vol. 22. № 8. P. 695–700.

258. *Ritzenthaler C., Hofmann C.* Viral Transport in Plants // *Plant Cell Monographs* / ed. E. Waigmann, M. Heinlein. : Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. C. 63–83.

259. *Rodionova N.P., Karpova O. V., Kozlovsky S. V., Zayakina O. V., Arkhipenko M. V., Atabekov J.G.* Linear remodeling of helical virus by movement protein binding // *Journal of Molecular Biology*. 2003. Vol. 333. № 3. P. 565–572.

260. *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 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018. Vol. 115. № 6. P. 1388–1393.

261. *Rubino L., Russo M.* Molecular analysis of the pothos latent virus genome // *Journal of General Virology*. 1997. Vol. 78. № 6. P. 1219–1226.

262. Ruiz T.M., Voinnet O., Baulcombe D.C. Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing // *The Plant Cell*. 1998. Vol. 10. № 6. P. 937–946.
263. Ryabov E. V., Oparka K.J., Santa Cruz S., Robinson D.J., Taliansky M.E. Intracellular Location of Two Groundnut Rosette Umbravirus Proteins Delivered by PVX and TMV Vectors // *Virology*. 1998. Vol. 242. № 2. P. 303–313.
264. Ryabova L.A., Pooggin M.M., Hohn T. Translation reinitiation and leaky scanning in plant viruses // *Virus Research*. 2006. Vol. 119. № 1. P. 52–62.
265. Sahana N., Kaur H., Jain R.K., Palukaitis P., Canto T., Praveen S. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization // *Journal of General Virology*. 2014. Vol. 95. № PART 5. P. 1167–1177.
266. Samuels T.D., Ju H.J., Ye C.M., Motes C.M., Blancaflor E.B., Verchot-Lubicz J. Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB proteins // *Virology*. 2007. Vol. 367. № 2. P. 375–389.
267. Sanfaçon H. Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components // *Canadian Journal of Botany*. 2006. Vol. 83. № 12. P. 1529–1549.
268. Schepetilnikov M. V., Manske U., Solovyev A.G., Zamyatnin A.A., Schiemann J., Morozov S.Y. The hydrophobic segment of Potato virus X TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking // *Journal of General Virology*. 2005. Vol. 86. № 8. P. 2379–2391.
269. Schepetilnikov M. V., Solovyev A.G., Gorshkova E.N., Schiemann J., Prokhnevsky A.I., Dolja V. V., Morozov S.Y. Intracellular Targeting of a Hordeiviral Membrane-Spanning Movement Protein: Sequence Requirements and Involvement of an Unconventional Mechanism // *Journal of Virology*. 2008. Vol. 82. № 3. P. 1284–1293.
270. Scholthof H.B., Scholthof K.B., Jackson A.O. Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. // *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7. № 8. P. 1157–1172.
271. Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D.C. An RNA-Dependent RNA Polymerase Prevents Meristem Invasion by Potato Virus X and Is Required for the Activity But Not the Production of a Systemic Silencing Signal // *Plant Physiology*. 2005. Vol. 138. № 4. P. 1842–1852.
272. Sehki H., Yu A., Elmayan T., Vaucheret H. TYMV and TRV infect *Arabidopsis thaliana* by expressing weak suppressors of RNA silencing and inducing host RNASE THREE LIKE1 // *PLoS Pathogens*. 2023. Vol. 19. № 1. P. e1010482.
273. Senshu H., Ozeki J., Komatsu K., Hashimoto M., Hatada K., Aoyama M., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection // *Journal of General Virology*. 2009. Vol. 90. № 4. P. 1014–1024.

274. *Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S.* A Dual Strategy for the Suppression of Host Antiviral Silencing: Two Distinct Suppressors for Viral Replication and Viral Movement Encoded by Potato Virus M // *Journal of Virology*. 2011. Vol. 85. № 19. P. 10269–10278.
275. *Shamandi N., Zytnicki M., Charbonnel C., Elvira-Matelot E., Bochnakian A., Comella P., Mallory A.C., Lepère G., Sáez-Vásquez J., Vaucheret H.* Plants Encode a General siRNA Suppressor That Is Induced and Suppressed by Viruses // *PLOS Biology*. 2015. Vol. 13. № 12. P. e1002326.
276. *Shaw J., Yu C., Makhotenko A. V., Makarova S.S., Love A.J., Kalinina N.O., MacFarlane S., Chen J., Taliantsky M.E.* Interaction of a plant virus protein with the signature Cajal body protein coilin facilitates salicylic acid-mediated plant defence responses // *New Phytologist*. 2019. Vol. 224. № 1. P. 439–453.
277. *Shemyakina E.A., Solovyev A.G., Leonova O.G., Popenko V.I., Schiemann J., Morozov S.Y.* The Role of Microtubule Association in Plasmodesmal Targeting of Potato mop-top virus Movement Protein TGBp1 // *The Open Virology Journal*. 2011. Vol. 5. № 1. P. 1.
278. *Shen G., Zhang J., Lei Y., Xu Y., Wu J.* Between-Plant Signaling // *Annual Review of Plant Biology*. 2023. Vol. 74. P. 367–386.
279. *Shimizu N., Ishida T., Yamada M., Shigenobu S., Tabata R., Kinoshita A., Yamaguchi K., Hasebe M., Mitsumasu K., Sawa S.* BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide-triggered growth inhibition in *Arabidopsis* root // *New Phytologist*. 2015. Vol. 208. № 4. P. 1104–1113.
280. *Skopelitis D.S., Hill K., Klesen S., Marco C.F., Born P. von, Chitwood D.H., Timmermans M.C.P.* Gating of miRNA movement at defined cell-cell interfaces governs their impact as positional signals // *Nature Communications* 2018 9:1. 2018. Vol. 9. № 1. P. 1–10.
281. *Smith J.H.* Virus Diseases In Plants: I. TRANSLOCATION WITHIN THE PLANT. II. THE AMOEBOID INTRACELLULAR INCLUSIONS. // *Biological Reviews*. 1930. Vol. 5. № 2. P. 159–170.
282. *Solovyev A.G., Atabekova A.K., Lezzhov A.A., Solovieva A.D., Chergintsev D.A., Morozov S.Y.* Distinct Mechanisms of Endomembrane Reorganization Determine Dissimilar Transport Pathways in Plant RNA Viruses // *Plants*. 2022. Vol. 11. № 18.
283. *Solovyev A.G., Makarov V. V.* Helical capsids of plant viruses: Architecture with structural lability // *Journal of General Virology*. 2016. Vol. 97. № 8. P. 1739–1754.
284. *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. Vol.

95. № 7. P. 1360–1370.

285. *Solovyev A.G., Morozov S.Y.* Non-replicative integral membrane proteins encoded by plant alpha-like viruses: Emergence of diverse orphan ORFs and movement protein genes // *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 302561.
286. *Solovyev A.G., Morozov S.Y.* Uncovering Plant Virus Species Forming Novel Provisional Taxonomic Units Related to the Family Benyviridae // *Viruses*. 2022. Vol. 14. № 12. P. 2680.
287. *Solovyev A.G., Savenkov E.I., Grdzelishvili V.Z., Kalinina N.O., Morozov S.Y., Schiemann J., Atabekov J.G.* Movement of hordeivirus hybrids with exchanges in the triple gene block // *Virology*. 1999. Vol. 253. № 2. P. 278–287.
288. *Sparks I., Tolley N., Aller I., Svozil J., Osterrieder A., Botchway S., Mueller C., Frigerio L., Hawes C.* Five *Arabidopsis* Reticulon Isoforms Share Endoplasmic Reticulum Location, Topology, and Membrane-Shaping Properties // *The Plant Cell*. 2010. Vol. 22. № 4. P. 1333–1343.
289. *Sun Y.D., Spellman-Kruse A., Folimonova S.Y.* Blaze a New Trail: Plant Virus Xylem Exploitation // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. № 15. P. 1–15.
290. *Surjit M., Jameel S., Lal S.K.* Cytoplasmic Localization of the ORF2 Protein of Hepatitis E Virus Is Dependent on Its Ability To Undergo Retrotranslocation from the Endoplasmic Reticulum // *Journal of Virology*. 2007. Vol. 81. № 7. P. 3339–3345.
291. *Sztuba-Solińska J., Stollar V., Bujarski J.J.* Subgenomic messenger RNAs: Mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle // *Virology*. 2011. Vol. 412. № 2. P. 245–255.
292. *Tamai A., Meshi T.* Cell-to-Cell Movement of *Potato virus X*: The Role of p12 and p8 Encoded by the Second and Third Open Reading Frames of the Triple Gene Block // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2001. Vol. 14. № 10. P. 1158–1167.
293. *Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P., Zamore P.D.* A biochemical framework for RNA silencing in plants // *Genes & Development*. 2003. Vol. 17. № 1. P. 49–63.
294. *Tang Y., Yan X., Gu C., Yuan X.* Biogenesis, Trafficking, and Function of Small RNAs in Plants // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. 825477.
295. *Tatineni S., Hein G.L.* Plant Viruses of Agricultural Importance: Current and Future Perspectives of Virus Disease Management Strategies // *Phytopathology*. 2023. Vol. 113. № 2. P. 117–141.
296. *Tee E.E., Faulkner C.* Plasmodesmata and intercellular molecular traffic control // *New Phytologist*. 2024. Vol. 243. № 1. P. 32–47.
297. *Teng C., Zhang H., Hammond R., Huang K., Meyers B.C., Walbot V.* Dicer-like 5 deficiency confers temperature-sensitive male sterility in maize // *Nature Communications* 2020 11:1. 2020. Vol. 11. № 1. P. 1–9.

298. *Thieme C.J., Schudoma C., May P., Walther D.* Give it AGO: The search for miRNA-Argonaute sorting signals in *Arabidopsis thaliana* indicates a relevance of sequence positions other than the 5'-position alone // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. № DEC. P. 36516.
299. *Thomas C.L., Leh V., Lederer C., Maule A.J.* Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *nicotiana benthamiana* // *Virology*. 2003. Vol. 306. № 1. P. 33–41.
300. *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 // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 201. № 7. P. 981–995.
301. *Tilsner J., Linnik O., Wright K.M., Bell K., Roberts A.G., Lacomme C., Cruz S.S., Oparka K.J.* The TGB1 Movement Protein of Potato virus X Reorganizes Actin and Endomembranes into the X-Body, a Viral Replication Factory // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. № 3. P. 1359–1370.
302. *Tomassi A.H., Re D.A., Romani F., Cambiagno D.A., Gonzalo L., Moreno J.E., Arce A.L., Manavella P.A.* The Intrinsically Disordered Protein CARP9 Bridges HYL1 to AGO1 in the Nucleus to Promote MicroRNA Activity // *Plant Physiology*. 2020. Vol. 184. № 1. P. 316–329.
303. *Tu B., Liu L., Xu C., Zhai J., Li S., Lopez M.A., Zhao Y., Yu Y., Ramachandran V., Ren G., Yu B., Li S., Meyers B.C., Mo B., Chen X.* Distinct and Cooperative Activities of HESO1 and URT1 Nucleotidyl Transferases in MicroRNA Turnover in *Arabidopsis* // *PLOS Genetics*. 2015. Vol. 11. № 4. P. e1005119.
304. *Úbeda J.R., Aranda M.A., Donaire L.* Alphaflexiviridae in Focus: Genomic Signatures, Conserved Elements and Viral-Driven Cellular Remodeling // *Viruses*. 2025. Vol. 17. № 5. P. 611.
305. *Valli A.A., Gallo A., Rodamilans B., López-Moya J.J., García J.A.* The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have // *Molecular Plant Pathology*. 2018. Vol. 19. № 3. P. 744–763.
306. *Várallyay É., Havelda Z.* Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level // *Molecular Plant Pathology*. 2013. Vol. 14. № 6. P. 567–575.
307. *Vargason J.M., Szittya G., Burgýán J., Tanaka Hall T.M.* Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor // *Cell*. 2003. Vol. 115. № 7. P. 799–811.
308. *Vaucheret H.* Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations // *Genes Dev*. 2006. T. 20. № 7. C. 759–771.
309. *Vaucheret H., Voinnet O.* The plant siRNA landscape // *The Plant Cell*. 2024. Vol. 36. № 2. P. 246–275.

310. *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 // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2010. Vol. 23. № 10. P. 1231–1247.
311. *Verchot J.* Potato virus X: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus // Molecular Plant Pathology. 2022. Vol. 23. № 3. P. 315–320.
312. *Verchot J., Angell S.M., Baulcombe D.C.* In Vivo Translation of the Triple Gene Block of Potato Virus X Requires Two Subgenomic mRNAs // Journal of Virology. 1998. Vol. 72. № 10. P. 8316–8320.
313. *Vishnichenko V.K., Konareva T.N., Zavriev S.K.* A new filamentous virus in shallot // Plant Pathology. 1993. Vol. 42. № 1. P. 121–126.
314. *Vishnichenko V.K., Stel'mashchuk V.Y., Zavriev S.K.* The 42K protein of shallot virus X participates in formation of virus particles // Molecular Biology. 2002. Vol. 36. № 6. P. 879–882.
315. *Vlugt R.A.A. van der, Ruiter R.K., Goldbach R.* Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron // Plant molecular biology. 1992. Vol. 20. № 4. P. 631–639.
316. *Voinnet O.* Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections // Nature Reviews Genetics 2005 6:3. 2005. Vol. 6. № 3. P. 206–220.
317. *Voinnet O.* Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants // Trends in Plant Science. 2008. Vol. 13. № 7. P. 317–328.
318. *Voinnet O.* Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs // Cell. 2009. T. 136. № 4. C. 669–687.
319. *Voinnet O.* Revisiting small RNA movement in plants // Nature Reviews Molecular Cell Biology 2022 23:3. 2022. Vol. 23. № 3. P. 163–164.
320. *Voinnet O., Pinto Y.M., Baulcombe D.C.* Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999. Vol. 96. № 24. P. 14147–14152.
321. *Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D.C.* Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA // Cell. 1998. Vol. 95. № 2. P. 177–187.
322. *Wang J., Mei J., Ren G.* Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation // Front. Plant Sci. 2019. T. 10. C. 360.
323. *Wang L.-Y.Y., Lin S.-S.S., Hung T.-H.H., Li T.-K.K., Lin N.-C.C., Shen T.-L.L.* Multiple Domains of the Tobacco mosaic virus p126 Protein Can Independently Suppress Local and Systemic RNA Silencing // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012. Vol. 25. № 5. P. 648–657.

324. *Wang T., Deng Z., Zhang X., Wang H., Wang Y., Liu X., Liu S., Xu F., Li T., Fu D., Zhu B., Luo Y., Zhu H.* Tomato DCL2b is required for the biosynthesis of 22-nt small RNAs, the resulting secondary siRNAs, and the host defense against ToMV // Horticulture Research. 2018a. Vol. 5. № 1. P. 62.
325. *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 // The Plant Cell. 2011a. Vol. 23. № 10. P. 3565–3576.
326. *Wang X., Wang Y., Dou Y., Chen L., Wang J., Jiang N., Guo C., Yao Q., Wang C., Liu L., Yu B., Zheng B., Chekanova J.A., Ma J., Ren G.* Degradation of unmethylated miRNA/miRNA*’s by a DEDDy-type 3’ to 5’ exoribonuclease Atrimmer 2 in Arabidopsis // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018b. Vol. 115. № 28. P. E6659–E6667.
327. *Wang X., Zhang S., Dou Y., Zhang C., Chen X., Yu B., Ren G.* Synergistic and Independent Actions of Multiple Terminal Nucleotidyl Transferases in the 3’ Tailing of Small RNAs in Arabidopsis // PLOS Genetics. 2015. Vol. 11. № 4. P. e1005091.
328. *Wang X.B., Jovel J., Udomporn P., Wang Y., Wu Q., Li W.X., Gascioli V., Vaucheret H., Ding S.W.* The 21-Nucleotide, but Not 22-Nucleotide, Viral Secondary Small Interfering RNAs Direct Potent Antiviral Defense by Two Cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana* // The Plant Cell. 2011b. Vol. 23. № 4. P. 1625–1638.
329. *Wang Z., Hardcastle T.J., Pastor A.C., Yip W.H., Tang S., Baulcombe D.C.* A novel DCL2-dependent miRNA pathway in tomato affects susceptibility to RNA viruses // Genes & Development. 2018c. Vol. 32. № 17–18. P. 1155–1160.
330. *Wassenegger M., Krczal G.* Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases // Trends in Plant Science. 2006. Vol. 11. № 3. P. 142–151.
331. *Whitfield A.E., Falk B.W., Rotenberg D.* Insect vector-mediated transmission of plant viruses // Virology. 2015. Vol. 479–480. P. 278–289.
332. *Wieczorek P., Jarmołowski A., Szwedkowska-Kulińska Z., Kozak M., Taube M.* Solution structure and behaviour of the *Arabidopsis thaliana* HYL1 protein // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2023. Vol. 1867. № 8. P. 130376.
333. *Willmann M.R., Endres M.W., Cook R.T., Gregory B.D.* The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in *Arabidopsis* // The *Arabidopsis* Book. 2011. Vol. 9. P. e0146.
334. *Wolf Y.I., Kazlauskas D., Iranzo J., Lucía-Sanz A., Kuhn J.H., Krupovic M., Dolja V. V., Koonin E. V.* Origins and evolution of the global RNA virome // mBio. 2018. Vol. 9. № 6.
335. *Wright K.M., Cowan G.H., Lukhovitskaya N.I., Tilsner J., Roberts A.G., Savenkov E.I., Torrance L.* The N-Terminal Domain of PMTV TGB1 Movement Protein Is

Required for Nucleolar Localization, Microtubule Association, and Long-Distance Movement // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010. Vol. 23. № 11. P. 1486–1497.

336. *Wroblewski T., Tomczak A., Michelmore R.* Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis* // *Plant Biotechnology Journal*. 2005. Vol. 3. № 2. P. 259–273.
337. *Wu K., Xie Q., Liu X., Fu Y., Li S., Yu X., Li W., Zhao P., Ren Y., Ruan M., Zhang X.* Capsid protein of turnip crinkle virus suppresses antiviral RNA decay by degrading *Arabidopsis* Dcp1 via ubiquitination pathway // *The Plant Journal*. 2025. Vol. 121. № 5. P. e70075.
338. *Wu X., Cheng X.* Intercellular movement of plant RNA viruses: Targeting replication complexes to the plasmodesma for both accuracy and efficiency // *Traffic*. 2020. Vol. 21. № 12. P. 725–736.
339. *Wu X., Liu J., Chai M., Wang J., Li D., Wang A., Cheng X.* The Potato Virus X TGBp2 Protein Plays Dual Functional Roles in Viral Replication and Movement // *Journal of Virology*. 2019. Vol. 93. № 5. P. e01635-18.
340. *Wu Y.Y., Hou B.H., Lee W.C., Lu S.H., Yang C.J., Vaucheret H., Chen H.M.* DCL2- and RDR6-dependent transitive silencing of SMXL4 and SMXL5 in *Arabidopsis* dcl4 mutants causes defective phloem transport and carbohydrate over-accumulation // *Plant Journal*. 2017. Vol. 90. № 6. P. 1064–1078.
341. *Xie D., Chen M., Niu J., Wang L., Li Y., Fang X., Li P., Qi Y.* Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in *Arabidopsis* // *Nature Cell Biology*. 2020. Vol. 23. № 1. P. 32–39.
342. *Xie L., Shang W., Liu C., Zhang Q., Sunter G., Hong J., Zhou X.* Mutual association of Broad bean wilt virus 2 VP37-derived tubules and plasmodesmata obtained from cytological observation // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. № 21552. P. 1–11.
343. *Xie Z., Allen E., Wilken A., Carrington J.C.* DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Vol. 102. № 36. P. 12984–12989.
344. *Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E., Carrington J.C.* Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants // *PLOS Biology*. 2004. Vol. 2. № 5. P. e104.
345. *Xie Z., Kasschau K.D., Carrington J.C.* Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation // *Current Biology*. 2003. Vol. 13. № 9. P. 784–789.
346. *Xu J., Chua N.H.* *Arabidopsis* Decapping 5 Is Required for mRNA Decapping, P-Body Formation, and Translational Repression during Postembryonic Development //

The Plant Cell. 2009. Vol. 21. № 10. P. 3270–3279.

347. Yang Z., Ebright Y.W., Yu B., Chen X. HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide // Nucleic Acids Research. 2006. Vol. 34. № 2. P. 667–675.
348. Ye K., Malinina L., Patel D.J. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing // Nature. 2003. Vol. 426. № 6968. P. 874–878.
349. Yelina N.E., Erokhina T.N., Lukhovitskaya N.I., Minina E.A., Schepetilnikov M. V., Lesemann D.E., Schiemann J., Solovyev A.G., Morozov S.Y. Localization of Poa semilatent virus cysteine-rich protein in peroxisomes is dispensable for its ability to suppress RNA silencing // The Journal of general virology. 2005. Vol. 86. № Pt 2. P. 479–489.
350. Yong Chung H., Lacatus G., Sunter G. Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing // Virology. 2014. Vol. 460–461. № 1. P. 108–118.
351. Yoshida N., Shimura H., Masuta C. Allexiviruses may have acquired inserted sequences between the CP and CRP genes to change the translation reinitiation strategy of CRP // Archives of Virology. 2018. Vol. 163. № 6. P. 1419–1427.
352. Yoshida T., Shiraishi T., Hagiwara-Komoda Y., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Fujimoto Y., Yusa A., Yamaji Y., Namba S. The Plant Noncanonical Antiviral Resistance Protein JAX1 Inhibits Potexviral Replication by Targeting the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase // Journal of Virology. 2019. Vol. 93. № 3.
353. Yoshikawa M., Han Y.W., Fujii H., Aizawa S., Nishino T., Ishikawa M. Cooperative recruitment of RDR6 by SGS3 and SDE5 during small interfering RNA amplification in *Arabidopsis* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2021. Vol. 118. № 34. P. e2102885118.
354. Zaitlin M. Elucidation of the genome organization of tobacco mosaic virus // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 1999. Vol. 354. № 1383. P. 587–591.
355. Zamyatnin A.A., Solovyev A.G., Bozhkov P. V., Valkonen J.P.T., Morozov S.Y., Savenkov E.I. Assessment of the integral membrane protein topology in living cells // Plant Journal. 2006. Vol. 46. № 1. P. 145–154.
356. Zamyatnin A.A., Solovyev A.G., Savenkov E.I., Germundsson A., Sandgren M., Valkonen J.P.T., Morozov S.Y. Transient Coexpression of Individual Genes Encoded by the Triple Gene Block of Potato mop-top virus Reveals Requirements for TGBp1 Trafficking // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2004. Vol. 17. № 8. P. 921–930.
357. Zhang J., Dong J., Xu Y., Wu J. V2 protein encoded by Tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor // Virus Research. 2012a. Vol. 163. № 1. P. 51–58.

358. *Zhang T., Zhao X., Jiang L., Yang X., Chen Y., Song X., Lu Y., Peng J., Zheng H., Wu Y., MacFarlane S., Chen J., Yan F.* p15 encoded by Garlic virus X is a pathogenicity factor and RNA silencing suppressor // *Journal of General Virology*. 2018. Vol. 99. № 11. P. 1515–1521.
359. *Zhang X., Du P., Lu L., Xiao Q., Wang W., Cao X., Ren B., Wei C., Li Y.* Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs // *Virology*. 2008. Vol. 374. № 2. P. 351–360.
360. *Zhang X., Yuan Y.R., Pei Y., Lin S.S., Tuschl T., Patel D.J., Chua N.H.* Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense // *Genes & Development*. 2006. Vol. 20. № 23. P. 3255–3268.
361. *Zhang X., Zhang X., Singh J., Li D., Qu F.* Temperature-Dependent Survival of Turnip Crinkle Virus-Infected *Arabidopsis* Plants Relies on an RNA Silencing-Based Defense That Requires DCL2,AGO2, and HEN1 // *Journal of Virology*. 2012b. Vol. 86. № 12. P. 6847–6854.
362. *Zhang X., Zhang X., Wu K., Liu Z., Li D., Qu F.* Incomplete DRB4-dependence of the DCL4-mediated antiviral defense // *Scientific Reports*. 2016a. Vol. 6. № 1. P. 39244.
363. *Zhang X., Zhu Y., Liu X., Hong X., Xu Y., Zhu P., Shen Y., Wu H., Ji Y., Wen X., Zhang C., Zhao Q., Wang Y., Lu J., Guo H.* Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis* // *Science*. 2015. Vol. 348. № 6230. P. 120–123.
364. *Zhang Z., Liu X., Guo X., Wang X.J., Zhang X.* *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing // *Nature Plants* 2016 2:5. 2016b. Vol. 2. № 5. P. 1–7.
365. *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 // *Current Biology*. 2012. Vol. 22. № 8. P. 689–694.
366. *Zhao Z.X., Yang S.J., Yin X.X., Yan X.L., Hassan B., Fan J., Li Y., Wang W.M.* ARGONAUTE 1: a node coordinating plant disease resistance with growth and development // *Phytopathology Research*. 2023. Vol. 5. № 1. P. 1–13.
367. *Zhou Z.S., Dell'Orco M., Saldarelli P., Turturo C., Minafra A., Martelli G.P.* Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A // *Journal of General Virology*. 2006. Vol. 87. № 8. P. 2387–2395.
368. *Ziebell H., Murphy A.M., Groen S.C., Tungadi T., Westwood J.H., Lewsey M.G., Moulin M., Kleczkowski A., Smith A.G., Stevens M., Powell G., Carr J.P.* Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco // *Scientific Reports*. 2011. Vol. 1. № 1. P. 1–7.
369. *Zilberman D., Cao X., Jacobsen S.E.* ARGONAUTE4 control of locus-specific

siRNA accumulation and DNA and histone methylation // Science. 2003. Vol. 299. № 5607. P. 716–719.