

ПОДХОДЫ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ К ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ В РАСТЕНИЯХ

© 2024 г. И. А. АБДЕЕВА¹, Ю. С. ПАНИНА¹,
Л. Г. МАЛОШЕНОК^{1,2}

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

² Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва

I. Введение. II. Синтетические репрессоры фитогормональных ответов. III. Синтетические микропротеины. IV. Малые синтетические молекулы. V. Синтетические агрегирующие белки. VI Синтетическое монотело. VII Аптамеры. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Синтетическая биология – это новое направление в биологических исследованиях, представляющее собой дизайн и конструирование уникальных биологических систем с «запрограммированными» функциями и свойствами [1]. Подходы синтетической биологии заключаются в переходе от простых методов генетической инженерии

Принятые сокращения: HACR – гормонально активируемые репрессоры на основе Cas9; CRISPR – кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными спейсерами; Cas9 – CRISPR-ассоциированный белок; dCas9 – мутантная форма белка Cas9, лишенная каталитической активности; sgRNA – единая направляющая, или гидовая, РНК; tracrRNA – транс-активирующая РНК; ARF – факторы транскрипции, узнающие последовательность TGTCTC, встречающуюся в промоторах генов белков, участвующих в ауксин зависимой регуляции; AUX/IAA – негативный регулятор генной экспрессии; TPL – TOPLESS репрессора; CRY1 – криптохром 1; GFP – зеленый флуоресцентный белок; Venus – желтый флуоресцентный белок; BR – Брассиностероиды; BRI1 – киназа, является основным компонентом BR; BK1 – ингибитор рецепторных киназ; BAK1 BAK1 – активная серин/треонин киназа; APRs – регионы, подверженные агрегации; TANGO – программный продукт; BIN2 – вторая киназа; САБ – синтетические агрегирующие блоки; FTIR – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье; FN3 – фибронектина III типа; EJC – комплекс сращивания экзонов; PAP – пептидный аптамер.

Адрес для корреспонденции: maloshenoklg@gmail.com, insaz@yandex.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1064.

к конструированию синтетических функциональных систем, обособленных модулей, выполняющих те или иные заданные функции в клетке более точно и с меньшим отрицательным эффектом. Развитие синтетической биологии стало возможным за счет объединения методов геной инженерии с методами биоинформатики, благодаря переходу от линейной интерпретации генов и геномов к их функциональным сетевым взаимосвязям и проверкам выдвигаемых гипотез *in vivo*. Развитие методов и подходов синтетической биологии – это следующий и необходимый шаг не только к изучению функционирования генетического аппарата живых систем, но и к генетическим модификациям живых объектов с целью придания им требуемых свойств и функций.

Растения являются, возможно, самыми удобными объектами для приложения подходов синтетической биологии. С момента начала окультуривания дикорастущих растений человек пытался их улучшить. Синтетическая биология может дать новый импульс для создания сельскохозяйственных растений с заданными полезными свойствами. Также подходы синтетической биологии позволят ускорить изучение фундаментальных процессов генетической регуляции в растениях. Важным формальным фактором возможности генетических манипуляций над живыми объектами является прохождение этического комитета. В отличие от животных и, тем более, человека, для растений эта процедура полностью отсутствует.

На сегодняшний день основная масса работ по синтетической регуляции экспрессии генов фокусируется на уровне транскрипции посредством создания синтетических промоторов и факторов транскрипции. Также используется РНК-интерференция как посттранскрипционный метод нокдауна целевого гена. Однако нецелевые эффекты и трансгенерационная нестабильность являются основными недостатками этого метода [2]. Были созданы технологии геномной инженерии, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, и система CRISPR-Cas9, которые делают возможными сайт-специфические модификации генома [3]. Недостатками технологий геномной инженерии являются нецелевые эффекты и полная потеря функции генов, что может быть губительно или даже летально для организма.

Направленная посттрансляционная модификация для регуляции признаков может преодолеть эти проблемы за счет точной настройки активности белка без вмешательства в структуру хроматина и без изменения общего метаболизма растения. При этом посттрансляционная регуляция не только самая прицельно точная, но и самая быстрая,

так как функциональное воздействие происходит непосредственно на целевые мишени в клетке, а не на их регуляторные элементы и предшественники.

В данном обзоре мы освещаем различные методы и подходы синтетической биологии к посттрансляционной регуляции различных генетических программ в растениях.

II. СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕПРЕССОРЫ ФИТОГОРМОНАЛЬНЫХ ОТВЕТОВ

Генетические программы роста и развития в растениях в значительной степени координируются набором фитогормонов [4]. Сигнальный путь ауксина реализуется через взаимодействие трех семейств белков: ARF, AUX/IAA и TIR1/AFB, каждое из которых имеет несколько членов с дублирующими регуляторными функциями и перекрестно регулируемые множеством других сигналов [5-6]. Поэтому у исследователей существует потребность в инструментах, с помощью которых станет возможно предсказуемо определить как данный фитогормон регулирует работу интересующего гена (белка) [7]. В настоящее время применяются методы, заключающийся в направленном уменьшении или в увеличении экспрессии целевых генов – компонентов нативного гормонального сигнального механизма [8]. При этом для изучения только одного узлового компонента генной сети заданного регуляторного процесса исследователи часто вынуждены создавать множественных мутантов по генам, лежащим в основе такой сети. Такой подход снижает точность, поскольку эти гены часто дублируют функции друг друга, и, таким образом, этот подход приводит к большему количеству нецелевых эффектов. Кроме того, эти методы часто требуют внесения дополнительной копии целевого гена в растительный геном в нетипичный контекст хроматина, что затрудняет анализ фенотипических эффектов.

Чтобы попытаться преодолеть вышеописанные сложности с изучением сетей фитогормональной регуляции авторы разработали новый подход, заключающийся в создании набора синтетических модульных репрессоров на основе Cas9, активируемых гормонами (Hormone-Activated Cas9-based Repressors – HACR, произносится как «хакеры») [9]. Быстрые фитогормональные ответы часто связаны с прямой деградацией белков, имеющих в своем составе соответствующие дегроны. Дегрон – это часть белковой молекулы, которая регулирует скорость его протеолиза. Фитогормон, связавшись с дегроном, запускает путь деградации соответствующего белка. Для работы некоторых дегронов

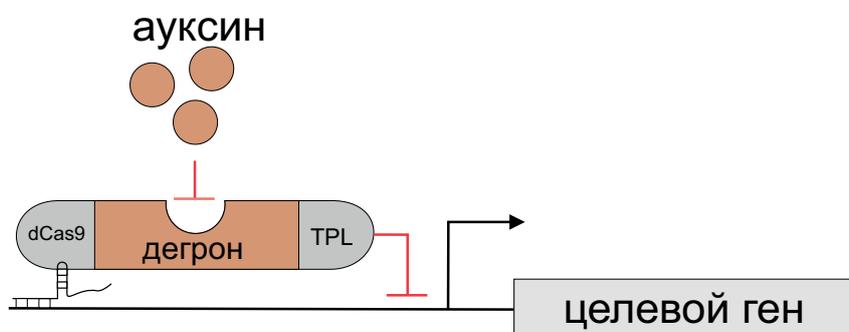


Рис. 1. Схема работы функционального модуля HACR.

(убиквитин-зависимых) необходимо, чтобы белок был помечен убиквитином [10–12]. Авторы создали генетическую конструкцию, в которой слили дезактивированный белок Cas9 (dCas9) из *Streptococcus pyogenes* [13] с высокочувствительным ауксин индуцированным дегроном [14] и первыми 300 аминокислотами TOPLESS репрессора (TPL) [15] (рис. 1).

В результате dCas9 связан с гидовой РНК (gRNA), которая направляет HACR на целевой промотор с соответствующей комплементарной последовательностью, где HACR фактически становится репрессором транскрипции данного целевого гена. При накоплении ауксина последовательность дегрона нацеливает HACR на путь убиквитинирования с последующей протеасомной деградацией, и репрессия целевого гена снимается. Таким образом, параллельно естественному ауксиновому ответу ауксин вызывает ослабление репрессии генов-мишеней HACR. Для проверки гипотезы экспериментаторы получили трансгенные растения, экспрессирующие гены HACRs и gRNA, нацеленные на конститутивно экспрессируемый ген-репортер Venus-люциферазы. Исходные растения *Arabidopsis* были генетически модифицированы таким образом, чтобы они конститутивно экспрессировали флуоресцентный белок. Экспрессия HACR выключала ген этого флуоресцентного белка. Авторы показали, что в отсутствие ауксина в клетке не было флуоресценции. При добавлении экзогенного ауксина в растениях детектировали высокий уровень флуоресценции, что означало деградацию HACR репрессора. Это помогло точно оценить количество гормона в различных частях растения. Авторы показали, что HACR могут помочь отслеживать уровни ауксина в развивающемся растении.

Далее авторы провели схожий эксперимент, но уже с целевым геном вместо репортера с целью перепрограммирования фенотипа растения. Известно, что ауксин контролирует количество и расположение ветвей на растении. Этот сложный процесс зависит от того, насколько сильно ауксин способствует экспрессии гена PIN1. Khakhar и др. [9] разработали HACR, который подавляет PIN1, и создали математическую модель, описывающую влияние этого вмешательства. Как и предсказывало моделирование, HACR изменил силу взаимосвязи между PIN1 и ауксином, что привело к появлению растений с меньшим количеством ветвей – свойство, представляющая интерес для сельского хозяйства.

Для проверки универсальности метода HACR, авторы создали аналогичные ауксиновым, синтетические модули для других фитогормонов – гиббереллина и жасмоновой кислоты. Результаты были аналогичные, как с ауксиновым модулем.

III. СИНТЕТИЧЕСКИЕ МИКРОПРОТЕИНЫ

Исследования последних лет показали, что определенные малые белки, названные *микротеины* регулируют большие мультидоменные белки на посттрансляционном уровне [16–18]. Типичные микротеины – это небольшие белки (около 20 кДа), состоящие из одного домена, способного к белок-белковым взаимодействиям. Микротеины препятствуют образованию белковых комплексов, связывая белки-мишени в нефункциональные гетеродимеры. В растениях было идентифицировано несколько микротеинов, участвующих в регуляции транскрипционных факторов [16, 18]. Более того, было показано, что сами транскрипционные факторы растений могут регулироваться сверхэкспрессией их соответствующих доменов, отвечающих за белок-белковые взаимодействия [19].

Авторы использовали программный продукт miPfinder [20], для поиска и классификации микротеинов и их потенциальных партнеров в растениях *Arabidopsis*. Авторы сделали упор на поиск микротеинов не к транскрипционным факторам, а к широкому кругу различных белков. Были выбраны ранее хорошо охарактеризованные мультидоменные белки из трех различных классов: гидролазы, лиазы и белки с рецепторной функцией [21].

МИКРОПРОТЕИНЫ ГИДРОЛАЗ

В качестве представителя класса гидролаз авторы выбрали белок DCL1 (DICER-LIKE1) из *Arabidopsis thaliana*, являющийся РНКазой III типа с геликазным доменом. Данный белок осуществляет процессинг первичной микроРНК или при-микроРНК (pri-miRNA от англ. *primary*-первичный) в растениях и, следовательно, играет важную роль в развитии растений [22, 23]. Молекулы при-микроРНК, имеющие вторичную структуру в виде шпилек, в ходе дальнейшего процессинга трансформируются в предшественники микроРНК или пре-микроРНК (pre-miRNA от англ. *precursor*- предшественник). Процессинг из при-микроРНК в пре-микроРНК осуществляется ферментным комплексом, состоящим из белка DCL1 и его функциональных партнеров – белков HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1), SERRATE (SE), and DAWDLE (DDL) [24–29]. Функциональный домен белка DCL1 под названием PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE (PAZ) отвечает за взаимодействие белков SE и DDL данного ферментного комплекса [28–29].

Авторы предположили, что можно воспрепятствовать образованию ферментного комплекса белков DCL1, HYL1, SE, и DDL путем сверхэкспрессии синтетического микропротеина, полученного из домена PAZ белка DCL1. И как следствие должен был быть нарушен биогенез микро-РНК.

Двугибридный анализ в дрожжевой системе показал, что домен PAZ действует как домен белок-белкового взаимодействия и способен образовывать гомодимеры. Этот результат указывает на то, что miP-DCL1 может связывать DCL1 в нефункциональный комплекс.

Для проверки рабочей гипотезы авторы создали трансгенные растения *Arabidopsis*, конститутивно экспрессирующие DCL1 PAZ домен (miP-DCL1). Примерно 30% полученных трансгенных растений линии 35S::miP-DCL1 обладали множественными существенными дефектами развития, похожими на описанные ранее мутанты *Arabidopsis* по гену *dcl1* такими как измененные формы семядолей, измененная форма листьев, маленькие розетки и дефекты цветков. Для дальнейших экспериментов были отобраны именно такие линии трансгенных растений.

Ранее было известно, что мутанты с потерей функции по генам *DCL1*, *HYL1*, *SE*, и *DDL* характеризовались накоплением незрелой при-микроРНК и сниженным количеством зрелой микроРНК.

Авторы измерили полуколичественно уровни незрелой и зрелой микроРНК. Все линии 35S::miP-DCL1 показывали высокие уровни зрелой микроРНК, гораздо выше чем даже в растениях дикого типа.

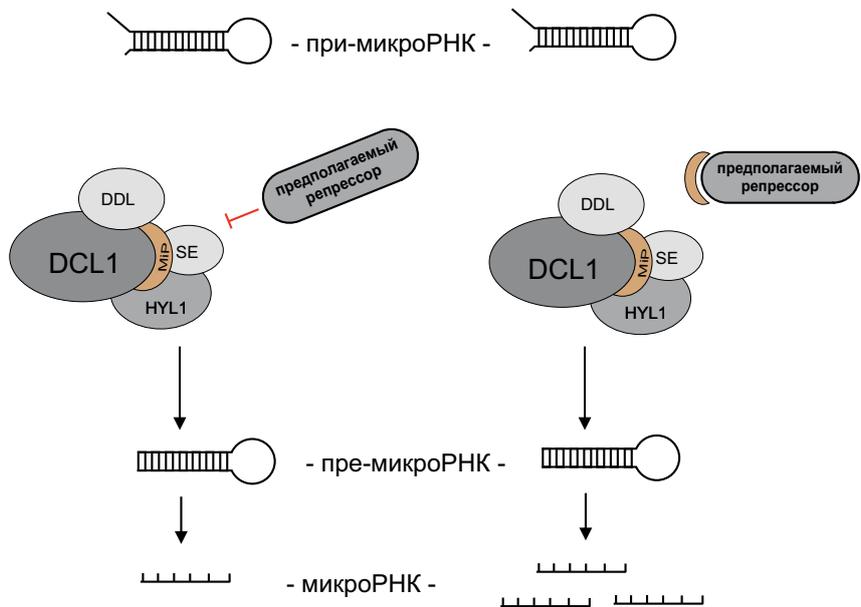


Рис. 2. Предполагаемая модель функционирования микропротеина miP-DCL1.

Такой результат предполагает, что miP-DCL1 работает как активатор DCL1 и увеличивает процессинг микроРНК. Поскольку микропротеины могут взаимодействовать с любыми полноразмерными белками, которые имеют в своем составе схожий, либо комплементарный домен, способный к белок-белковому взаимодействию, авторы предположили, что miP-DCL1 может взаимодействовать с неким неизвестным супрессором, ингибитором белка DCL1, который похожим способом связывается с DCL1 и препятствует его активности. Конкуrentно связываясь с таким предполагаемым супрессором, микропротеин активизирует белок DCL1 и запускает работу ферментного комплекса, что выражается в высоком уровне накопления зрелой микроРНК (рис. 2).

Такой эффект говорит в пользу того, что подобные синтетические микропротеины могут быть использованы для исследования биологической активности определенных белковых доменов.

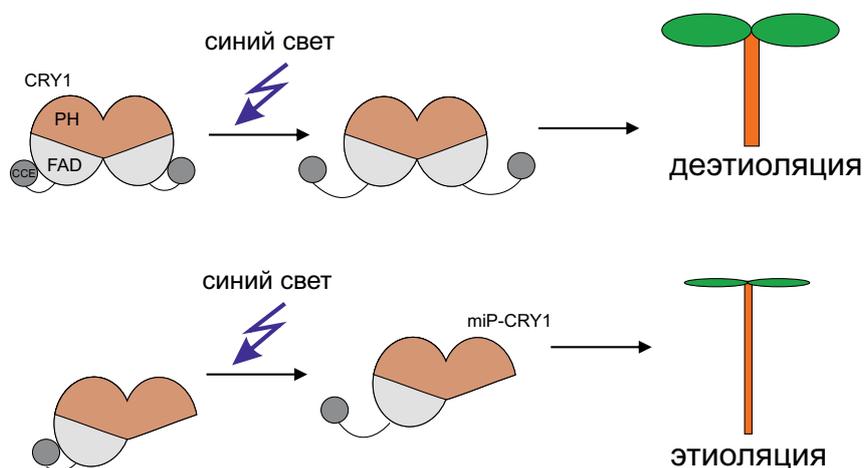


Рис. 3. Схема подавления функции белка CRY1 микропротеином miP-CRY1.

МИКРОПРОТЕИНЫ ЛИАЗ

Белок CRY1 относится к семейству флавопротеиновых фоторецепторов, найденных как у животных, так и в растениях [30, 31]. В растениях CRY1 участвует в передаче сигнала в ответ на синий свет, и регулирует такие процессы, как деэтиоляция (процесс перехода растения с роста в темноте, к росту на свету) и фотопериодическое цветение [32–35]. CRY1 для проявления своей фоторецепторной активности должны сформировать гомодимеры [36–37]. Мономер CRY1 состоит из трех субдоменов: PH, FAD, и CCE [38]. Домен CCE проводит сигнал, FAD-домен отвечает за чувствительность к синему свету [39], и PH-домен принимает участие в гомодимеризации [36, 40]. CRY1 непосредственно участвует в деэтиоляции растений в ответ на синий свет. Неактивный CRY1 гомодимер активируется синим светом. Далее CCE домен подвергается фосфорилированию, которое вызывает конформационные изменения олигомера CRY1 (рис. 3). После чего, активированный CRY1 гомодимер начинает взаимодействовать с другими белками, вызывая ответ на синий свет, заключающийся в регуляции множества генов [31, 38].

Авторы предположили, что синтетический микропротеин, нацеленный на PH субдомен CRY1, будет мешать способности белка CRY1 образовывать гомодимер и, таким образом, будет вызывать формирование нефункциональных гетеродимерных комплексов. В результате ожидалось, что растения со сверхэкспрессией синтетического

микропротеина будут фенотипически схожи с мутантными растениями по гену *cry1*, проявляющие этиоляцию в условиях синего света.

Чтобы проверить эту гипотезу были созданы трансгенные растения *Arabidopsis*, сверхэкспрессирующие кодирующую последовательность субдомена PH, микропротеин, названный miP-CRY1. В результате из 10 полученных линий трансгенных растений 35S::miP-CRY1, 8 линий фенотипически были похожими на мутантные фенотипы по генам *cry1*, *cry2*.

Для проверки зависимости в наблюдаемых изменениях от света, растения выращивали при разных световых условиях (синий свет, белый свет и отсутствие света). Во всех экспериментах трансгенные растения 35S::miP-CRY1 вели себя как двойные мутанты по генам *cry1*, *cry2*.

Также авторы в дрожжевой двугибридной системе показали сильное взаимодействие между белками miP-CRY и CRY1.

В совокупности эти результаты показали, что растения со сверхэкспрессией miP-CRY1 ведут себя как растения с двойной мутацией *cry1cry2*, и miP-CRY1 способен взаимодействовать с полноразмерным белком CRY1. Авторы продемонстрировали, что домен PH CRY1 можно использовать для негативной регуляции активности белка CRY1 по типу микропротеина и, таким образом, влиять на реакцию растения на синий свет.

МИКРОПРОТЕИНЫ РЕЦЕПТОРОВ

BRI1 является основным компонентом BR (Brassinosteroid Response) пути трансмембранной передачи сигнала от фитогормонов брассиностероидов в клетку. BRI1 содержит домен, богатый лециновыми повторами и экспонированный в межклеточное пространство, островковый домен, трансмембранный домен, а также внутриклеточную часть, состоящую из примыкающей к мембране области, киназного домена и С-концевой области [41]. BRI1 образует лиганд-независимый гомодимер и может взаимодействовать с другими белками (рис. 4.).

Белок BKI1 (kinase inhibitor1) поддерживает BRI1 в неактивной форме посредством гетеродимеризации с его внутриклеточным киназным доменом и, таким образом, блокирует возможность взаимодействия с его ко-рецептором BAK1 (BRI1-associated receptor kinase1). При взаимодействии фитогормона с внеклеточным доменом белка BRI1 происходит базовая активация киназной активности BRI1, что приводит к диссоциации комплекса BKI1–BRI1 [42]. Полная активация BRI1 происходит посредством его взаимодействия с BAK1 и их трансфосфорилирования [43, 44]. Активированный белок BRI1 индуцирует экспрессию генов BR пути [41].

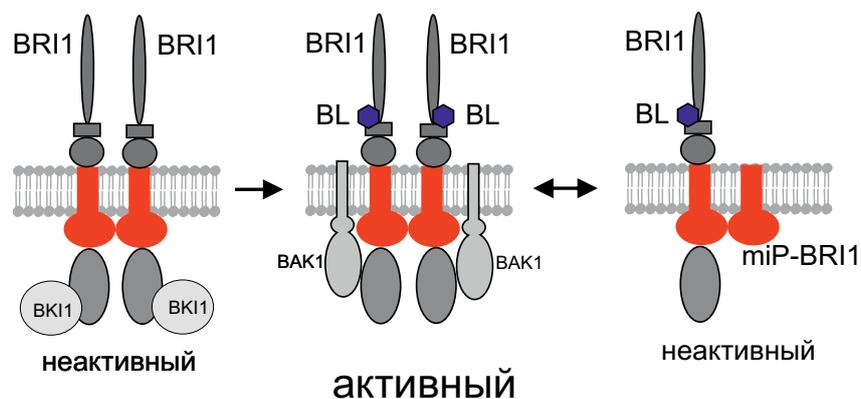


Рис. 4. Модель регуляции активности белка BRI1 посредством miP- BRI1.

Авторы предположили, что синтетический микропротеин, способный связать BRI1 в нефункциональный гетеродимер, предотвратит его взаимодействие с WAK1 после базовой активации BRI1 (рис 4). Был создан синтетический микропротеин miP-BRI1, содержащий последовательность от околомембранного домена, вплоть до трансмембранного домена, полностью включив его, чтобы быть уверенными, что синтетический микропротеин будет способен прикрепляться к плазматической мембране, где локализован BRI1. Далее были созданы трансгенные растения *Arabidopsis*, где данный синтетический микропротеин показывал стабильную экспрессию под сильным конститутивным 35S промотором. Большинство линий трансгенных растений проявляли фенотип, схожий с мутантными линиями по гену *bri1*. Линии трансгенных растений 35S::miP-BRI1, как и ожидалось, показали в экспериментах нечувствительность к обработке brassinостероидами.

Экзогенная обработка brassиностероидным гормоном изменяет экспрессию большого числа генов в растениях, например гена, кодирующего белок CPD, который участвует в биосинтезе BR и по принципу отрицательной обратной связи сильно подавляется в норме при обработке растения данным фитогормоном. Авторы измерили уровень экспрессии CPD в обработанных фитогормональными препаратами трансгенных растениях линиях 35S::miP-BRI1. Как и ожидалось, экспрессия CPD в трансгенных растениях была снижена незначительно. Поэтому был сделан вывод, что miP-BRI1 функционирует как синтетический микропротеин.

Таким образом, авторы показали, что синтетические микропротеины взаимодействуют с мультидоменными белками и изменяют их биологическую активность. Данные результаты свидетельствуют в пользу того, что концепция синтетических регуляторных микропротеинов выходит за рамки регуляции факторов транскрипции, и может быть более предложена для широкого круга белков, где требуется их прицельная регуляция.

IV. МАЛЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ

Определенные малые молекулы могут быть использованы для направленной быстрой и обратимой регуляции функций соответствующих белков. Например, химические соединения аналоги АТФ, такие как NM-PP1, специфически ингибируют определенные мутантные формы протеинкиназ [45]. Альтернативная стратегия основана на использовании мутантного дестабилизирующего домена (DD) белка FK506 и рапамицин-связывающего белка. Слияние DD с целевым белком приводит его к быстрой деградации посредством 26S протеасомы. Синтетическая молекула, производная рапамицина Shld1 (Shld1), способная проникать в клетки растений, имеет высокое сродство к DD и, стабильно связываясь с ним, препятствует протеосомной деградации слитого белка быстрым, дозозависимым и обратимым образом [46]. Система DD-Shld1 была успешно использована в различных типах клеток и организмах, включая *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Caenorhabditis elegans* и *Leishmania major* [47–50].

В предыдущих работах авторы адаптировали систему DD-Shld1 для модельных растений *Arabidopsis* [51]. Однако без лиганда не удавалось получить в растениях стабильное отсутствие экспрессии целевого гена. Происходило накопление целевого белка, и степень его накопления коррелировала с уровнем экспрессии слитого гена. Поэтому авторы добавили в экспрессионную систему дополнительные детерминанты нестабильности, добавив к N-концу DD остаток аргинина (R) и к C-концу остаток лизина (K). Кроме этого, с N-конца RDDK был слит с убиквитином. Эта модифицированная система RDDK-Shld1 не демонстрировала фонового накопления независимо от уровней экспрессии целевого гена. Более того, функциональная активность слитого белка индуцировалась Shld1-зависимым образом, подтверждая доказательство применимости системы RDDK-POI [51].

Для проверки применимости системы RDDK-Shld1 на сельскохозяйственных культурах, авторы провели эксперименты на рисе и пшенице (рис. 5.) [52].

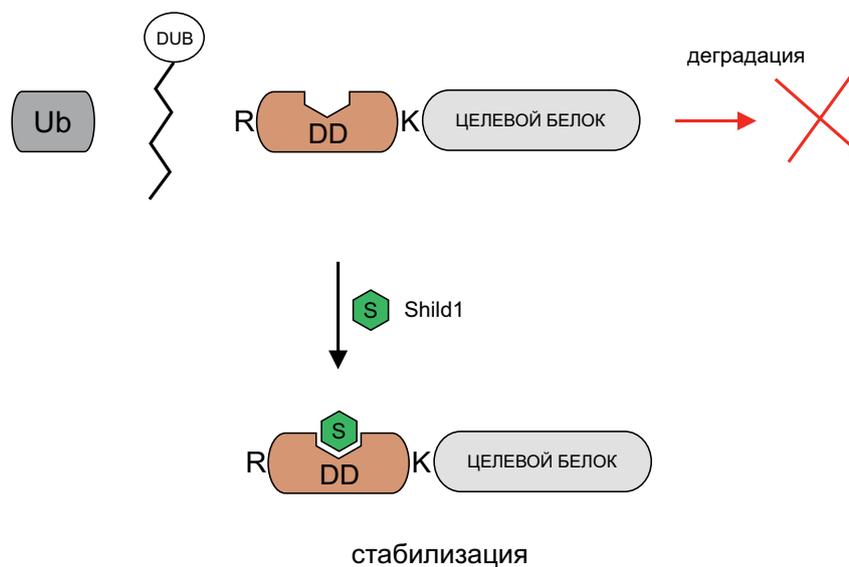


Рис. 5. Функциональная схема Shld1-зависимого накопления слитого белка RDDK-EGFP (целевой белок) в трансгенных растениях риса.

Слитый ген Ub-RDDK управляется промотором убиквитина кукурузы. Во время трансляции слияние с убиквитином (Ub) быстро расщепляется эндогенными деубиквитирующими ферментами (DUBs), высвобождающими N-концевой остаток аргинина (R). Лизин (K) включен в качестве потенциального реципиента для убиквитинирования слитого белка сразу после дестабилизирующего домена (DD). Таким образом, слитые белки будут разрушаться 26S-протеасомой. Shld 1 специфически связывается с доменом DD таким образом, что слитый целевой белок стабилизируется.

Результаты экспериментов (рис. 5.) однозначно свидетельствуют в пользу того, что в значимых сельскохозяйственных культурах функции определенных экзогенных и эндогенных белков, экспрессирующихся под контролем RDDK, можно контролировать Shld1-зависимым способом. Более того, накопление слитых с RDDK целевых белков может модулироваться пространственно и во времени с помощью малых синтетических молекул Shld1. Работа предоставляет полезный инструментарий для непосредственного изучения функций белков и контроля экспрессии трансгенов в однодольных сельскохозяйственных культурах.

V. СИНТЕТИЧЕСКИЕ АГРЕГИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

Агрегация белков определяется наличием у них коротких участков, способных агрегировать APRs (aggregation-prone regions) размеров как правило от 5 до 15 аминокислотных остатков [53, 54]. После агрегации белки теряют свою нативную пространственную структуру, как правило, теряя также функциональную активность.

Последовательности APRs можно предсказывать, используя программный продукт TANGO [55].

Для поиска белков, способных к агрегации С. Betti с соавторами применили алгоритм TANGO к протеому *Arabidopsis* [56]. Результаты показали, что 80% белков растения содержат потенциальные APR участки и поскольку агрегация зависит от последовательности, в принципе, должно быть возможно индуцировать агрегацию целевых белков путем воздействия на них короткими соответствующими целевыми агрегирующими пептидами.

Исследователи проверили рабочую гипотезу на белках с киназной активностью в растениях *Arabidopsis*. Была выбрана BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2) киназа из семейства киназ GSK3/ASKs, как хорошо изученная киназа, негативно регулирующая BR сигнальный путь [44, 57, 58].

Для модуляции агрегирующих свойств APR были разработаны различные синтетические агрегирующие блоки (слэбы). Каждый САБ (SAB) был с С-конца слит с репортером GFP для визуализации эффектов.

Были получены трансгенные растения *Arabidopsis*, конститутивно экспрессирующие созданные генетические конструкции. С помощью FTIR спектроскопии авторы показали образование в растениях амилоидободобных структур. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии с было показано, что агрегаты BIN2 SABs наблюдались в цитозоле.

Для оценки специфичности индуцированных агрегатов был проведен эксперимент по ко-локализации синтетических протеинов и их целей. В эксперименте по двойному мечению синтетических протеинов и их целевых партнеров, наблюдалась строгая ко-локализация между APR и их целями.

Для проверки гипотезы о потере функции целевых белков в растениях за счет экспрессии SAB был проанализирован фенотип трансгенных растений. Линии трансгенных растений характеризовались удлинненным гипокотилем и более длинными корнями, чем контрольные растения. Все линии трансгенных растений прояв-

ляли частичную устойчивость к ингибитору BR ответа – brassинозолу. Исследователи также установили, что в трансгенных растениях подавлена экспрессия генов биосинтеза фитогормонов brassиностероидов (которые в норме регулируются по принципу отрицательной обратной связи), а именно генов *cpd* (constitutive photomorphogenic dwarf), *dwf4* (DWARF4). И напротив, увеличена экспрессия транскрипционного фактора Brassinazole resistant1 (BZR1), регулируемого по принципу положительной обратной связи с присутствием данного фитогормона. Также авторы показали, что трансгенные растения со сверхэкспрессией синтетических агрегирующих белков к белку BIN2 частично восстанавливали фенотип мутантных растений по гену *bri1-5*, кодирующему рецептор brassиностероидов.

Таким образом, авторы показали, что специфичные агрегирующие белки могут быть использованы для направленного создания фенотипов, ассоциированных с белковой агрегацией, причем в различных субклеточных компартментах. Это исследование указывает на потенциальное применение индуцированной направленной агрегации в качестве полезного инструмента для подавления функций белка в растениях.

VI. СИНТЕТИЧЕСКОЕ МОНОТЕЛО

Высокоспецифичное молекулярное распознавание является отличительной чертой белок-белковых взаимодействий. Подходы, основанные на использовании стабильного белкового каркаса как матрицы и высокопроизводительных методов направленной эволюции для достижения строгой специфичности, оказались весьма успешными. Белковый каркас – это молекула, которая способна представлять различные аминокислотные последовательности на своей поверхности, за счет которых происходит молекулярное распознавание. Каркас плюс вариабельная часть представляют собой монотело. В этом данный принцип схож с принципом работы классических антител. С момента своего создания в качестве молекулярного каркаса в 1998 году домен фибронектина III типа (FN3) стал наиболее широко использоваться в качестве основы для конструирования синтетических монотел.

Для направленного выключения функции целевого белка на посттрансляционном уровне в растениях мы разработали синтетическую модульную систему убиквитин-протеосомной деградации, где распознавание целевого белка осуществлялось благодаря синтезированному нами синтетическому монотелу к данному белку [59, 60].

Для создания удобной модели селективной элиминации по убиквитин-протеасомному пути было необходимо выбрать пару взаимодействующих белков, которую было бы легко детектировать. В качестве такой пары были выбраны зеленый флуоресцентный белок (GFP) и монотело к нему. Ген, кодирующий последовательность монотела, был химически синтезирован на основе аминокислотной последовательности монотела с учетом частот встречаемости кодонов в растениях и дрожжах и отсутствию сайтов сплайсинга. Таким образом, в качестве синтетического модуля распознавания выступало монотело к GFP. Взаимодействие белка GFP и монотела было подтверждено с помощью дрожжевого двугибридного анализа. В качестве основы для конструирования убиквитин-лигазы E3, с модифицированным доменом, отвечающим за распознавание белка-мишени GFP, был выбран ген *Chip* из *Arabidopsis thaliana*, относящийся к E3 – U-box, осуществляющих специфическую деградацию белков мишеней.

Известно, что у убиквитин-лигазы *Chip Arabidopsis thaliana* за распознавание субстрата отвечает N-концевой TPR домен. Нами были получены два варианта гена *Chip*, лишённого 100 и 140 аминокислот на N-конце белковой молекулы, ответственных за распознавание нативных субстратов. Таким образом, мы сконструировали деградационный модуль, лишённый функции узнавания. Путем слияния модуля деградации с модулем распознавания мы получили синтетические генетические конструкции *chip-mboby* и предположили, что они могут работать в растениях. Верификация белок-белковых взаимодействий полученных бифункциональных модульных белков с мишенью, белком GFP, была осуществлена с помощью дрожжевой двугибридной системы.

Методами флуоресцентной микроскопии и флуориметрии мы показали, что при инфльтрации растений *N. benthamiana*, конститутивно экспрессирующих ген *gfp*, агробактериями, несущими гибридный ген E3 убиквитин-лигазы *Chip* с доменом узнавания белка GFP, наблюдается существенное снижение сигнала флуоресценции, что свидетельствует в пользу эффективной элиминации функции целевого белка.

VII. АПТАМЕРЫ

Аптамеры являются высоко аффинными и очень специфичными лигандами. Олигонуклеотидные и пептидные аптамеры зарекомендовали себя как перспективный инструмент для решения разнообразных прикладных задач, в которых требуется прочное и селективное связывание определенной молекулярной мишени. Показано, что аптамеры могут с успехом заменить антитела в методиках ELISA, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), Вестерн-блоттинга и др. Они удачно применяются в качестве сенсоров различных молекул-мишеней. Будучи аналогами антител, аптамеры имеют целый ряд преимуществ, что делает их привлекательной основой для развития альтернативных генетических технологий.

ПЕПТИДНЫЕ АПТАМЕРЫ

Отбор пептидных аптамеров к функциональным белкам растений может быть использован и для направленного регулирования метаболических процессов, изменения фенотипа и изучения молекулярно-биологических процессов.

Авторами исследования выбран пептидный аптамер (PAP), содержащий 16 аминокислот и препятствующий работе функционального белка MAGO NASHI (OsMAGO) в растениях риса – ключевого компонента в комплексе сшивания экзонов (Exon junction complex, EJC) [61]. Аптамер PAP был идентифицирован путем скрининга библиотеки пептидов в дрожжевой двугибридной системе с использованием OsMAGO1 в качестве мишени. Y14 это другой ключевой компонент этого же комплекса сшивания экзонов, который проявляет совместную функциональную активность с MAGO NASHI. Ранее было установлено, что белки MAGO и Y14 возникли у эукариот и совместно коэволюционировали так, что стали способны к образованию автономного функционального гетеродимера [62]. Авторы показали *in vitro* конкурентное связывание с белком MAGO аптамера PAP и белка Y14. В эксперименте по подавлению экспрессии гена *tago* с помощью метода РНК интерференции (линии трансгенных растений MAGO-RNAi) в мутантных растениях наблюдались сильные фенотипические изменения. Чтобы проверить непосредственно в растениях риса функцию исследуемого белкового гетеродимера, исключив по возможности сторонние негативные эффекты, связанные с измененным синтезом целевого белка в результате РНК интерференции, авторы создали трансгенные растения риса со сверхэкспрессией PAP. При этом в отличие от нокаута методом РНК

интерференции, полностью сохранялся нативный биосинтез и накопление белка MAGO в растениях. Фенотип трансгенных растений, экспрессирующих PAP оказался сильно похожим на фенотип растений линий MAGO-RNAi. Это свидетельствует в пользу того, что именно белковый гетеродимер MAGO-Y14 является функциональным модулем в растительной клетке. Именно конкурентное связывание PAP с MAGO дестабилизирует функцию гетеродимера MAGO-Y14 в рисе.

Применение аптамера PAP показывает, что пептидные аптамеры представляют собой альтернативный подход к функциональной геномике высших растений, выступая в качестве ингибиторов и модуляторов активности целевых белков.

РНК-АПТАМЕРЫ

Основная область применения аптамеров – медицина. И большой пласт работ посвящен разработке и получению аптамеров именно с целью лекарственной терапии. При этом очень часто исследователи сталкиваются с проблемой быстрой деградации аптамеров, особенно РНК-аптамеров. Это существенно, поскольку при лекарственной терапии их необходимо вводить в кровоток, а их период полужизни невысок, и, практически, невозможно постоянно вводить новые дозы лекарства. Кроме того, ограничение на применение РНК-аптамеров накладывает еще и их способность взаимодействовать с внутриклеточными рецепторами. Все это касается, прежде всего, их применения в медицине, в то время как использование их в сельском хозяйстве не имеет таких трудностей. И представляется нам довольно перспективным. На сегодняшний день для создания растений, в том числе сельскохозяйственных культур, с повышенным иммунитетом применяются различные технологии генетической инженерии, в основном направленных на экспрессию антимикробных пептидов животного происхождения, генов фитоалексинов и специфических генов растений, ответственных за распознавание фитопатогенов.

Нами предложено использовать для этих целей РНК-аптамеры [63]. Возможность подавлять функции отдельных белков, играющих принципиальную роль в защитной реакции растений, путем связывания их со специально подобранным РНК-аптамером представляется крайне интересным решением при разработке растений с повышенным иммунитетом. В растениях РНК-аптамер можно легко вводить в клетку путем агробактериальной трансформации соответствующей кодирующей ДНК. При достижении состояния равновесия в процессах транскрипции и деградации в растительной клетке будет поддер-

живаться определенным уровнем РНК-аптамера, что позволяет решить вопрос с нестабильностью РНК-аптамеров. Помимо этого, преимущество использования РНК-аптамеров заключается еще и в том, что для ингибирования с их помощью не требуется синтез белка, ингибирование осуществляется на уровне РНК, что освобождает клетку от дополнительного энергоемкого процесса.

В качестве модельного растения был выбран табак сорта *N. bentamiana*, а в качестве модельного белка – зеленый флюоресцентный белок GFP. Мы синтезировали последовательность РНК-аптамера, ингибирующего активность GFP (Apt-Gfp).

Синтетическими конструкциями, несущими Apt-Gfp была проведена агробактериальная инфильтрация трансгенных растений *N. bentamiana*, конститутивно экспрессирующих белок GFP. На седьмой день после инфильтрации провели количественное измерение флуоресценции и, как и ожидалось, в данных растениях уровень флуоресценции был существенно подавлен.

Таким образом, нами была экспериментально показана возможность использования РНК-аптамеров для ингибирования функций собственных белков растений. С большой долей уверенности мы можем утверждать применимость этого метода и для ингибирования внешних, чужеродных белков, например, белков патогена. В случае, когда РНК-аптамер ингибирует, к примеру, функцию какого-то ключевого белка патогена, мы сможем повысить устойчивость растения к стрессовому воздействию.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения в ходе эволюции развили сложные сети генетической регуляции, которые способны очень точно обрабатывать входящую из окружающего мира информацию и давать многообразные функциональные ответы (часто очень сложные и опосредованные), регулируя экспрессию генов на уровнях транскрипции, деградации мРНК, трансляции и оборота белков. Характерной чертой регуляторных генных сетей растений является то, что сигнальные молекулы обычно малы, а сигнальные пути часто короткие и содержат ограниченное количество модульных генетических частей. В настоящее время подходы синтетической биологии к использованию этих генетических частей и механизмов для надежной и точной регуляции экспрессии генов в растениях находятся в начале своего бурного развития.

Представленные в настоящем обзоре исследовательские работы, кроме того, что все они связаны с направленной регуляцией генети-

ческого аппарата растений на посттрансляционном уровне, все они обладают рядом перспективных свойств. Эти синтетические подходы снижают нецелевые эффекты от вмешательства в растительный геном и гораздо в меньшей степени влияют на рост и развитие растений, чем традиционные методы генетической инженерии. Они обеспечивают эффективный механизм отрицательной обратной связи для избирательного нокдауна целевых белков.

Разработка подобных синтетических подходов обеспечивает возможность для перепрограммирования метаболизма растений в фундаментальных и прикладных целях для улучшения признаков сельскохозяйственных культур. Подобные подходы можно было бы использовать для более тонкой и точной настройки регуляции белков, например, для индуцируемого, субклеточного или опосредованного клеточным циклом или циркадным ритмом обмена белков. Они также могли бы быть использованы для преодоления пагубных или летальных последствий некоторых мутаций с потерей функций.

Несмотря на то, что эти синтетические методы разработаны на модельных видах растений, таких как *Arabidopsis* и табак, они обладают большим потенциалом для практического применения в полевых условиях. Безусловно, на своем пути исследователи сталкиваются с препятствиями вследствие очень разветвленной регуляторной сети растений с петлями обратной связи, избыточными компонентами и буферными эффектами. Еще одно серьезное препятствие связано с ограниченным инструментарием для синтетической биологии растений. Стратегии рационального проектирования и конструирования предсказуемых синтетических устройств и путей в растительных клетках для регуляции экспрессии генов имеют решающее значение для будущих исследований функциональной геномики, генетической и метаболической инженерии и улучшения свойств сельскохозяйственных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Одинокоев Г.Н., Сафронов В.А. (2014) Синтетическая биология: риски и перспективы, *Проблемы особо опасных инфекций*, **3**, 5–10.
2. Frizzi, A. and Huang, S. (2010) Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology, *Plant Biotechnology Journal*, **8** (6), 655–677.
3. Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F. 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnology*, **31**, 397–405.
4. Vanstraelen, M., Benkova, E. (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **28**, 463–487.
5. Koltai, H. (2015) Cellular events of strigolactone signalling and their crosstalk with auxin in roots, *Journal of Experimental Botany*, **66**, 4855–4861.
6. Naseem, M., Kaltdorf, M., Dandekar, T. (2015) The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 4885–4896.
7. Brophy, J.A.N., LaRue, T., Dinneny, J.R. (2017) Understanding and engineering plant form, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **S1084–9521**, 30382–30388.
8. Voytas, D.F., Gao C. (2014) Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges, *PLoS Biology*, **12**, e1001877.
9. Khakhar, A., Leydon, A. R., Lemmex, A. C., Klavins, E. & Nemhauser, J. L. (2018) Synthetic hormone-responsive transcription factors can monitor and reprogram plant development, *eLife*, **7**, e34702.
10. Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C., Shaul, Y. A. (2005) Mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73, *Genes & Development*, **19**, 316–321.
11. Eroles, J., Coffino, P. (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1843**, 216–221.
12. Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation, *Annual Review Of Genetics*, **30**, 405–439.
13. Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S., Qi, L.S. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, **154**, 442–451.
14. Moss, B.L., Mao, H., Guseman, J.M., Hinds, T.R., Hellmuth, A., Kovenock, M., Noorassa, A., Lanctot, A., Villalobos, L.I., Zheng, N., Nemhauser, J.L. (2015) Rate motifs tune auxin/indole-3-Acetic acid degradation dynamics, *Plant Physiology*, **169**, 803–813.
15. Pierre-Jerome, E., Jang, S.S., Havens, K.A., Nemhauser, J.L., Klavins, E. (2014) Recapitulation of the forward nuclear auxin response pathway in yeast, *PNAS*, **111**, 9407–9412.
16. Staudt, A.C., Wenkel S. (2011) Regulation of protein function by 'micro-Proteins', *EMBO Rep*, **12**, 35–42.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

17. Graeff, M., Wenkel, S. (2012) Regulation of protein function by interfering protein species, *Biomolecular Concepts*, **3**, 71–78.
18. Eguen, T., Straub, D., Graeff, M., Wenkel, S. (2015) MicroProteins: small sizebig impact, *Trends Plant Science*, **20**, 477–482.
19. Seo, P.J., Hong, S.Y., Ryu, J.Y., Jeong, E.Y., Kim, S.G., Baldwin, I.T., Park, C.M. (2012) Targeted inactivation of transcription factors by overexpression of their truncated forms in plants, *Plant Journal*, **72**, 162–172.
20. Straub, D., Wenkel, S. (2017) Cross-species genome-wide identification of evolutionary conserved micro-Proteins, *Genome Biology Evolution*, **9**, 777–789.
21. Dolde, U., Rodrigues, V., Straub, D., Bhati, K.K., Choi, S., Yang, S.W., Wenkel, S. (2018) Synthetic Micro-Proteins: versatile tools for posttranslational regulation of target proteins. *Plant Physiology*, **176**, 3136–3145.
22. Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., Ray, A. (2002) DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development, *Trends Plant Science*, **7**, 487–491.
23. Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669–687.
24. Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fukuhara, T. (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana, *Plant Molecular Biology*, **57**, 173–188.
25. Kurihara, Y., Takashi, Y., Watanabe, Y. (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis, *RNA*, **12**, 206–212.
26. Dong, Z., Han, M.H., Fedoroff, N. (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **105**, 9970–9975.
27. Liu, C., Axtell, M.J., Fedoroff, N.V. (2012) The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis, *Plant Physiology*, **159**, 748–758.
28. Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., Walker, J.C., et al. (2008) The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **105**, 10073–10078.
29. Machida, S., Chen, H.Y., Adam, Yuan Y. (2011) Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE, *Nucleic Acids Research*, **39**, 7828–7836.
30. Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals, *Science*, **284**, 760–765.
31. Chaves, I., Pokorný, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals, *Annual Review of Plant Biology*, **62**, 335–364.
32. Ahmad, M., Cashmore, A.R. (1993) HY4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor, *Nature*, **366**, 162–166.

33. Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., Lin, C. (1998) Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors, *Science*, **279**, 1360–1363.
34. Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., Cashmore, A.R. (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 2686–2690.
35. El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Raz, V., Koornneef, M. (2001) A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2, *Nature Genetics*, **29**, 435–440.
36. Sang, Y., Li, Q.H., Rubio, V., Zhang, Y.C., Mao, J., Deng, X.W., Yang, H.Q. (2005) N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1, *Plant Cell*, **17**, 1569–1584.
37. He, S.B., Wang, W.X., Zhang, J.Y., Xu, F., Lian, H.L., Li, L., Yang, H.Q. (2015) The CNT1 domain of Arabidopsis CRY1 alone is sufficient to mediate blue light inhibition of hypocotyl elongation, *Molecular Plant*, **8**, 822–825.
38. Liu, B., Yang, Z., Gomez, A., Liu, B., Lin, C., Oka, Y. (2016) Signaling mechanisms of plant cryptochromes in Arabidopsis thaliana, *Journal of Plant Research*, **129**, 137–148.
39. Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D., Liu, Y., Cashmore, A.R. (2000) The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response, *Cell*, **103**, 815–827.
40. Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M., Raibekas, A.A., Jorns, M.S., Dutton, P.L., Cashmore, A.R. (1995) Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1, *Science*, **269**, 968–970.
41. Kim, T.W., Wang, Z.Y. (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors, *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 681–704.
42. Wang, X., Chory, J. (2006) Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane, *Science*, **313**, 1118–1122.
43. Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., Walker, J.C. (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling, *Cell*, **110**, 213–222.
44. Nam, K.H., Li, J. (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling, *Cell*, **110**, 203–212.
45. Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E. et al. (2000) A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase, *Nature*, **407**, 395–401.
46. Banaszynski, L.A., Chen, L.C., Maynard-Smith, L.A., Ooi, A.L. and Wandless, T.J. (2006) A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules, *Cell*, **126**, 995–1004.
47. Cho, U., Zimmerman, S.M., Chen, L.C., Owen, E., Kim, J.V., Kim, S.K. and Wandless, T.J. (2013) Rapid and tunable control of protein stability in *Caenorhabditis elegans* using a small molecule, *PLoS ONE*, **8**, e72393.
48. Dvorin, J.D., Martyn, D.C., Patel, S.D., Grimley, J.S., Collins, C.R., Hopp, C.S., Bright, A.T. et al (2010) A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite eg-

- ress from erythrocytes, *Science*, **328**, 910–912.
49. Herm-Götz, A., Agop-Nersesian, C., Münter, S., Grimley, J.S., Wandless, T.J., Frischknecht, F. and Meissner, M. (2007) Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*, *Nature Methods*, **4**, 1003–1005.
 50. Madeira da Silva, L., Owens, K.L., Murta, S.M. and Beverley, S.M. (2009) Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106**, 7583–7588.
 51. Su, L., Li, A., Li, H., Chu, C. and Qiu, J.L. (2013) Direct modulation of protein level in *Arabidopsis*, *Molecular Plant*, **6**, 1711–1714.
 52. Jingbo, Zhang, Kangquan Yin, Juan Sun, Jinlan Gao, Qiuli Du, Huali Li and Jin-Long Qiu (2018) Direct and tunable modulation of protein levels in rice and wheat with a synthetic small molecule, *Plant Biotechnology Journal*, **16**, 472–481.
 53. Rousseau, F., Serrano, L., Schymkowitz, J.W.H. (2006) How evolutionary pressure against protein aggregation shaped chaperone specificity, *Journal of Molecular Biology*, **355**, 1037–1047.
 54. Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., Eisenberg, D. (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **107**, 3487–3492.
 55. Fernandez-Escamilla, A-M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins, *Nature Biotechnology*, **22**, 1302–1306.
 56. Betti, C., Vanhoutte, I., Coutuer, S., Rycke, R.D., Mishev, K., Vuylsteke, M., Aesaert, S., Rombaut, D., Gallardo, R., Smet, F. De, Xu, J., Lijsebettens, M. Van., Breusegem, F. Van., Inzé, D., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and Russinova, E. (2016) Sequence-specific protein aggregation generates defined protein knock-downs in plants, *Plant Physiology*, **171**, 773–787.
 57. Vert, G., Chory, J., Chory, J. (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling, *Nature*, **441**, 96–100.
 58. Yan, Z., Zhao, J., Peng, P., Chihara, R.K., Li, J. (2009) BIN2 functions redundantly with other Arabidopsis GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling, *Plant Physiology*, **150**, 710–721.
 59. Maloshenok, L.G., Abdeeva, I.A., Panina, J.S., Piruzian, E.S., Zolotareno, A.D., Bruskin, S.A. (2018) Development of Methods for the Target-Specific Protein Elimination in Plants, *Russian Journal of Genetics*, **54**, 1353–1357.
 60. Dzhafarov, M., Abdeeva, I., Zolotareno, A., Panina, J., Piruzian, E., Bruskin, S., Maloshenok, L. (2018) A modified E3 ubiquitin ligase CHIP of *Arabidopsis thaliana* for the target degradation of GFP, *Open Bio*, **8**, 177–178.
 61. Gong, P., Quan, H., He, C. (2014) Targeting MAGO proteins with a peptide aptamer reinforces their essential roles in multiple rice developmental pathways, *Plant Journal*, **80**, 905–914.
 62. Gong, P.C., Zhao, M. and He, C.Y. (2014) Slow co-evolution of the MAGO and Y14 protein families is

- required for the maintenance of their obligate heterodimerization mode, *PLoS ONE*, **9**, e84842.
63. Abdeeva, I.A., Maloshenok, L.G., Pogorelko, G.V., Mokrykova, M.V., Bruskin, S.A. (2019) RNA-aptamers-As targeted inhibitors of protein functions in plants, *Journal Plant Physiology*, **232**, 127–129.