

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К.А. ТИМИРЯЗЕВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

---

*На правах рукописи*

**Берестовой Михаил Алексеевич**

**Дельта-9-Ацил-липидная десатураза: локализация и функциональная роль в  
растительной клетке**

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор

**И.В. Голденкова-Павлова**

**Москва – 2020**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....                                                                                                 | 4  |
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                          | 5  |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                        | 14 |
| 1.1 Растительные десатуразы жирных кислот .....                                                                        | 14 |
| 1.2 Классификация десатураз, их структура, механизм функционирования и локализация.....                                | 16 |
| 1.2.1 Растворимые десатуразы .....                                                                                     | 17 |
| 1.2.2 Мембраносвязанные десатуразы .....                                                                               | 19 |
| 1.2.3 Ацил-АПБ, ацил-КоА и ацил-липидные десатуразы .....                                                              | 22 |
| 1.2.4 Дельта и омега десатуразы.....                                                                                   | 22 |
| 1.3 Экспрессия и регуляция генов, кодирующих десатуразы .....                                                          | 23 |
| 1.4 Роль десатураз в поддержании гомеостаза клеточных мембран .....                                                    | 30 |
| 1.5 Биотехнологический потенциал применение десатураз для создания растений, толерантных к абиотическим стрессам ..... | 36 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....                                                                          | 45 |
| 2.1. Материалы и оборудование .....                                                                                    | 45 |
| 2.2. Методы исследования.....                                                                                          | 48 |
| 2.2.1 Конструирование растительных экспрессионных векторов .....                                                       | 48 |
| 2.2.2 Выращивание агробактерий их трансформация и селекция .....                                                       | 50 |
| 2.2.3 Выращивание растений .....                                                                                       | 51 |
| 2.2.4 Агроинфильтрация растений .....                                                                                  | 51 |
| 2.2.5 Получение протопластов.....                                                                                      | 52 |
| 2.2.6 Лазерная сканирующая и флуоресцентная микроскопия .....                                                          | 52 |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.7 Анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев табака.....                                                   | 53 |
| 2.3 Статистический анализ.....                                                                                                      | 56 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....                                                                                               | 58 |
| 3.1 Конструирование растительных экспрессионных векторов .....                                                                      | 58 |
| 3.2 Агроинфильтрация растений табака и оценка экспрессии гибридного гена в растительных тканях.....                                 | 60 |
| 3.3 Выделение протопластов и оценка локализации белковых продуктов .....                                                            | 61 |
| 3.4 Анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев <i>Nicotiana benthamiana</i> и <i>Nicotiana excelsior</i> ..... | 65 |
| 3.5 Определение оптимальной внутриклеточной локализации $\Delta 9$ десатуразы ..                                                    | 74 |
| Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....                                                                                  | 77 |
| ВЫВОДЫ.....                                                                                                                         | 85 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                             | 86 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АПБ – ацил-переносящий белок

ГЖХ-МС – газо-жидкостная хроматография / масс-спектрометрия

ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин

ЖК – жирная кислота

ИН – индекс ненасыщенности

МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин

МЖ – метилжасмонат

МЭЖК – метиловых эфиров жирных кислот

ПДО – пальмитоил-десатуразное отношение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РБФК – рибулозобифосфаткарбоксилаза

РВИ – ротационный вакуумный испаритель

РФК – реактивные формы кислорода

СДО – стеароил-десатуразное отношение

СКДГ – сульфокиновозилдиацилглицерол

СК – салициловая кислота

СОД – супероксиддисмутаза

ТСХ – тонкослойная хроматография

ФГ – фосфатидилглицерин

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Одним из механизмов адаптивного ответа растений на абиотические и биотические стрессовые факторы является модуляция ненасыщенности мембранных липидов. Этот процесс реализуется по средствам десатурации жирных кислот (ЖК) специфическими ферментами десатуразами. Десатуразы катализируют превращение одинарной (C-C) связи между атомами углерода в ацильных цепях жирных кислот в двойную (C=C) (Лось, 2014) и преобразовывают, таким образом, насыщенные ЖК в ненасыщенные. Наличие ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов приводит к разжижению липидного бислоя и предотвращает его фазовый переход в более твердое состояние (Macartney et al., 1994). Такой фазовый переход может привести к образованию отверстий в мембране, нарушению функциональности мембранных белков или полному разрушению мембраны, это в свою очередь может привести к гибели клетки (Alberts et al., 2015).

В растительной клетке за десатурацию ЖК отвечают растворимые ацил-АПБ-десатуразы и мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы (Los et al., 2013). Ключевую роль в процессе образования ненасыщенных ЖК, необходимых для поддержания оптимальной жидкокристаллической структуры мембран растительной клетки, играет дельта-9-ацил-АПБ десатураза, поскольку она образует первую двойную связь в цепи ЖК (López Alonso et al., 2003). Дельта-9-ацил-АПБ десатураза ( $\Delta 9$  ацил-АПБ десатураза,  $\Delta 9$  десатураза) превращает стеариновую кислоту (18:0) (первая цифра обозначает количество атомов углерода в молекуле жирной кислоты; вторая цифра – количество двойных связей) в олеиновую (18:1) вводя двойную связь между 9 и 10 атомом углерода в ацильной цепи ЖК (Troncoso-Ponce et al., 2016) и обеспечивает, таким образом, субстратом другие десатуразы, которые последовательно образуют вторую (положение  $\Delta 12$ ), третью ( $\Delta 15$ ) и последующие двойные связи (Napier, 2007). Считается, что ацил-АПБ десатуразы растений, локализованы в хлоропластах

(пластидах), тогда как мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы в микросомах эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (Los et al., 2013; Lou et al., 2014; Napier, 2007).

В качестве удобной модели в исследовании роли десатураз в механизмах адаптации растений часто используют экспрессию гетерологичных генов десатураз. Использование в исследованиях хорошо изученных гетерологичных десатураз, например  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы *Synechococcus vulcanus* (Герасименко и соавт., 2015; Orlova et al., 2003; Popov et al., 2006), обусловлено в первую очередь тем, что в растительной клетке имеется большое количество  $\Delta 9$  ацил-АПБ десатураз (Los et al., 2013; Zhang et al., 2009), они недостаточно изучены, и не до конца понятна роль этих десатураз в процессе образования ненасыщенных ЖК.

Хотя гетерологичная экспрессия генов некоторых десатураз в растениях была ранее уже описана, эти исследования в большинстве своем не подразумевали направленную транспортировку продуктов целого гена в специфический компартмент клетки. Исследователи в основном используют векторные конструкции без специфических последовательностей, обеспечивающих локализацию белковых продуктов целевых генов в том или ином компартменте клетки. Таким образом, обеспечивая локализацию гетерологичных десатураз в цитоплазме. Однако, исходя из данных о синтезе жирных кислот и липидов в растениях (Dar et al., 2017), можно предположить, что хлоропласты возможно более подходящее место для функционирования гетерологичных (в том числе и  $\Delta 9$ ) десатураз, поскольку в хлоропластах есть субстрат для реакции (стеариновая кислота), а так в хлоропластах локализованы десатуразы вводящие вторую и третью двойные связи в цепи жирных кислот. Кроме того, продукт реакции (олеиновая кислота) и субстрат для реакции десатурации (стеариновая кислота) катализируемой  $\Delta 9$  десатуразой транспортируются в ЭПР, где они могут быть использованы для синтеза фосфолипидов и триацилглицеринов при участии других десатураз, в том числе и гетерологичных (Dar et al., 2017; Los, Murata, 1998).

На сегодняшний день имеется недостаточно данных том, как локализация десатураз в различных компартментах растительной клетки взаимосвязана с их функциональной эффективностью, а именно, с процессом изменения ненасыщенности ЖК мембранных липидов. Для того чтобы прояснить этот вопрос в данном исследовании оценено влияния локализация  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы *Synechococcus vulcanus*. на ЖК состав суммарных липидов, а также, определен компартмент растительной клетки (ЭПР, хлоропласты и цитоплазма) в котором она будет лучше функционировать с позиции физиологической обоснованности локализации и востребованности продукта реакции другими десатуразами.

### **Цель исследования**

Изучение физиологической роли  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы в молекулярном механизме модуляции ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов растений, в зависимости от ее локализации в клетке.

### **Задачи исследования**

1. Сконструировать векторы, несущие рекомбинантный ген *desC*, в котором ген  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы имеет транскрипционно-трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена *egfp*, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), а также с последовательностями, обеспечивающими специфическую локализацию белковых продуктов целевого гена в различных компартментах клетки (в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме).
2. Сконструировать векторы, несущие нативную последовательность гена *desC*  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы, слитую с сигнальными последовательностями, которые направляют белковый продукт гена *desC* в такие компартменты растительной клетки как: хлоропласты, ЭПР и цитоплазму.

3. Оценить локализацию белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме растительной клетки в зависимости от использованной сигнальной последовательности.
4. Установить, как изменяется состав и массовая доля насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов в тканях листьев модельных растений табака за счет экспрессии гена  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы и различной компартментализации (хлоропласты, ЭПР, цитоплазма) ее белкового продукта в растительной клетке.
5. Выяснить в каких компартментах растительной клетки наиболее выражена функциональная активность  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы (введение десатуразой двойной связи в остаток стеариновой кислоты) за счет оценки соотношения продукта (олеиновой кислоты, 18:1) к субстрату (стеариновой кислоты, 18:0), а также за счет оценки индекса ненасыщенности (ИН).
6. Определить наилучшую клеточную локализацию гетерологичной  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы оказывающую наибольшее влияние на липидный метаболизм растений в зависимости от видовой принадлежности, на примере двух видов растений табака (*Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana excelsior*).

### Научная новизна исследования

Впервые созданы экспрессионные векторные конструкции, несущие нативный и рекомбинантный ген *desC* (является гомологом растительного гена *FAD Arabidopsis thaliana*) цианобактерий *Synechococcus vulcanus* с регуляторными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта целевого гена в различных компартментах растительной клетки. Разработана система транзientной экспрессии генов, удобная как для оценки сигнальных последовательностей, так и для изучения локализации заданных белков в растительной клетке. Показано, что сигнальные последовательности направляют белковые продукты целевого гена строго в специфические компартменты растительной клетки. Продемонстрировано, что локализация белкового продукта гена *desC* в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР приводит к достоверному



изменению состава и массовой доли насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов в листовой ткани растений. Получены приоритетные данные о влиянии экспрессии гетерологичной  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы в зависимости от ее локализации в растительной клетке и в зависимости от видовой принадлежности растений, на примере двух видов растений табака на липидный метаболизм растений.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Созданы векторы, обеспечивающие точную локализацию белкового продукта целевого гена в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме. Разработана простая и надежная система транзientной экспрессии генов, перспективная как для характеристики сигнальных последовательностей, так и для оценки локализации целевых белков в растительной клетке, объединяющая преимущества двух методов транзientной экспрессии генов в растениях: агроинфильтрации и трансфекции протопластов.

Показано, что локализация белковых продуктов гена *desC* в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР приводит к существенному изменению липидного метаболизма у двух видов табака. Увеличивается значение отношения продукт/субстрат реакции десатурации катализируемой  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы, вследствие этого увеличивается доля ЖК 18:1, 18:2 и 18:3, и, как следствие увеличивается индекс ненасыщенности ЖК.

Метод транзientной экспрессии может быть предложен для изучения вклада десатураз в модуляцию жирнокислотного состава мембранных липидов растений, так как требует меньших материальных и временных затрат, по сравнению с методом стабильной экспрессии, который требует получения и отбора трансгенных растений.

Полученные данные, станут основой при создании трансгенных растений, удобных для использования в качестве моделей при изучении роли модуляции ненасыщенности ЖК в защитных ответах на неблагоприятные условия окружающей среды, а также создании хозяйственно важных растений устойчивых

к стрессовым воздействиям и растений с измененным метаболизмом для получения растительных масел с заданными свойствами, которые могут быть востребованы в промышленности, производстве продуктов питания, фармацевтике и медицине.

### **Методология и методы исследования**

Экспериментальная работа проводилась на растениях *N. benthamiana* и *N. excelsior*. В качестве целевого гена использован ген *desC* цианобактерий *Synechococcus vulcanus*, который является гомологом растительного гена *FAD A. thaliana*, и кодирует  $\Delta 9$  ацил-липидную десатуразу.

При конструировании экспрессионных векторов использовались стандартные процедуры молекулярного клонирования и протоколы полимеразной цепной реакции (ПЦР). При агроинфильтрации листьев растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* использовали штамм GV3101 агробактерий *Agrobacterium tumefaciens*, предварительно трансформированный векторами, несущими целевой ген. Выделение протопластов для последующей оценки локализации белковых продуктов целевых генов, проводили по методу Nosov et al. с небольшими дополнениями (Nosov et al., 2014). Оценку локализации белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в тканях агроинфильтрированных листьев проводили с помощью лазерной сканирующей микроскопии. Оценку локализации белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в протопластах проводили с помощью флуоресцентной микроскопии. Влияние  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы на состав и массовую долю насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов тканей трансформированных листьев оценивали по изменению состава жирных кислот, проанализированного с помощью газо-жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии.

### Положения, выносимые на защиту

Создана серия векторов, обеспечивающих точную локализацию белкового продукта целевого гена в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме. Разработана простая и надежная система транзientной экспрессии генов, перспективная как для характеристики сигнальных последовательностей, так и для оценки локализации целевых белков в растительной клетке, объединяющая преимущества двух методов транзientной экспрессии генов в растениях: агроинфильтрации и трансфекции протопластов.

Оценена локализация белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в хлоропластах, ЭПР и цитоплазме растительной клетки в зависимости от использованной сигнальной последовательности. Векторы направляли белковые продукты целевого гена строго в ожидаемые компартменты растительной клетки (цитоплазма, хлоропласты и ЭПР).

Показано, что локализация белковых продуктов гена *desC* в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР приводит к существенному изменению липидного метаболизма у двух видов табака.

Определена наилучшая клеточная локализация  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы для *N. excelsior* (ЭПР) и *N. benthamiana* (хлоропласты).

### Степень достоверности результатов и апробация результатов работы

Для определения локализации целевых белков в протопластах проанализировано не менее 100 биологических образцов. Проведено шесть экспериментов по трансформации листьев табака векторами, несущими ген *desC* с дальнейшим анализом состава, массовой доли насыщенных и ненасыщенных ЖК суммарных липидов, а также оценки соотношения продукт/субстрат и индекса ненасыщенности ЖК. Для исследований было использовано современное, сертифицированное оборудование и реагенты. При проведении экспериментов использовались классические и современные молекулярно-биологические, биохимические методы и методы физиологии растений, а также методы анализа

экспериментального материала и статистики, которые подтверждают обоснованность и достоверность полученных экспериментальных результатов.

Результаты работы были представлены на 18-й Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 19-20 апреля 2018 г.), 2-й Научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, 28-31 мая 2018 г.), на Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018, (Уфа, 13-17 июня 2018 г.); Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.), на Межинститутском научном молодежном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, ИФР РАН, 11 апреля 2019 г.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликованы 4 научных работы, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 8 тезиса конференций.

### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно провел анализ научной литературы по теме диссертации. Автор непосредственно участвовал в постановке целей и задач настоящего исследования, самостоятельно проводил основные экспериментальные работы, связанные с агроинфильтрацией растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*, последующей пробоподготовкой биологических образцов для исследования локализации белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в протопластах трансформированных листьев *N. benthamiana*, а так же анализа состава и массовой доли, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов тканей трансформированных листьев с помощью газо-жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Анализ полученных результатов, а также изложение полученных результатов в виде научных

публикаций автор проводил совместно с научным руководителем диссертационной работы.

### **Структура и объем научно-квалификационной работы**

Диссертационная работа состоит из списка сокращений использованных в работе, введения, обзора литературы по теме исследования, описания методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Работа изложена на 102 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 13 рисунков. Библиографический список включает 148 источников, из них 140 на иностранном языке.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю И.В. Голденковой-Павловой за внимание и помощь на всех этапах выполнения диссертации, а также сотрудникам группы функциональной геномики ИФР РАН Тюрину А.А., Павленко О.С. и Садовской Н.С. за поддержку и ценные советы. Отдельно автор благодарит ведущего научного сотрудника лаборатории липидного обмена Сидорова Р.А. за помощь в анализе и интерпритации данных.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Растительные десатуразы жирных кислот

Биологические мембраны и их липидные компоненты являются естественным барьером и обеспечивают защиту клетки от практически любого стрессового фактора. В 1973 году (Lyons et al., 1973) была предложена мембранная теория устойчивости, в соответствии с которой гибель растений при низких температурах и адаптация к ним связана с жидкостными свойствами липидных бислоев внутриклеточных мембран.

Температурный и осмотический стрессы, а также нехватка воды вызывают изменения физических свойств клеточных мембран живых организмов. Липидная структура мембран определяет физико-химическое состояние мембраны, тогда как пространственная упаковка липидов, определяет ее текучесть. Снижение температуры, как и повышение концентрации осмотически активных веществ приводит к уменьшению текучести мембраны вследствие изменения пространственной организации липидов (Берестовой и соавт., 2019). Для поддержания определенного уровня текучести мембраны, при низких температурах, необходимы ненасыщенные жирные кислоты, поскольку температура их фазового перехода значительно ниже физиологических значений (Los et al., 2013).

Основную роль в процессе поддержания текучести мембран играют десатуразы жирных кислот. Десатуразы жирных кислот были найдены практически во всех организмах. Они относятся к классу ферментов оксидоредуктаз (Stuart, 1979). Для работы десатуразам требуется молекулярный кислород и два электрона. Десатуразы используют молекулярный кислород, для того чтобы оторвать два атома водорода в связи C-C создавая, таким образом, двойную связь C=C и превращая насыщенные жирные кислоты в ненасыщенные. В качестве побочного продукта реакции десатурации образуются две молекулы воды (Chalupský et al., 2014).

Первый этап в каскаде реакции десатурации ЖК в растительной клетке происходит в строме хлоропластов за счет превращения ЖК 18:0 в 18:1,  $\Delta^9$  ацил-АПБ десатуразой. ЖК 18:1 является предшественником всех полиненасыщенных ЖК (имеющих две (диеновые ЖК) или три (триеновые ЖК) двойные связи) с длиной цепи в 18 атомов углерода (Li-Beisson et al. 2010). Она может быть использована в качестве субстрата  $\omega^6$  десатуразами хлоропластов (кодируются генами семейства *FAD6*) для синтеза линолевой ЖК (18:2) или транспортирована в ЭПР, где за образование ЖК 18:2 отвечают собственные митохондриальные  $\omega^6$  десатуразы (кодируются генами семейства *FAD2*). ЖК 18:2 затем, может быть превращена в  $\alpha$ -линоленовую кислоту (18:3), в зависимости от локализации,  $\omega^3$  десатуразами хлоропластов (кодируются генами семейства *FAD3*) или ЭПР (кодируются генами семейств *FAD7* и *FAD8*) (Dar et al, 2017). ЖК 18:1, 18:2 и 18:3 необходимы для синтеза структурных и запасных липидов, кроме того линолевая и  $\alpha$ -линоленовая жирные кислоты очень важны для здорового питания человека и животных, которые не способны к их синтезу.

В растениях идентифицировано большое количество генов десатураз. В частности, в растениях *A. thaliana* идентифицировано 25 генов десатураз жирных кислот, из которых 7 генов кодируют  $\Delta^9$  ацил-АПБ десатуразы и 3 гена  $\Delta^9$  ацил-липидные десатуразы (Los et al., 2013). В растениях *N. benthamiana* на сегодняшний день обнаружено 28 генов десатураз жирных кислот и как минимум три из них кодируют  $\Delta^9$  ацил-АПБ десатуразы хлоропластов ([https://www.uniprot.org/uniprot/?query=stearoyl 9-desaturase AND organism:%22nicotiana%22&sort=organism&desc=no](https://www.uniprot.org/uniprot/?query=stearoyl+9-desaturase+AND+organism:%22nicotiana%22&sort=organism&desc=no); Wesley et al., 2001).

Почти все гены, кодирующие десатуразы, активируются низкими температурами. Исключение составляют гены  $\Delta^9$  десатураз, отвечающие за образование первой двойной связи. Гены, кодирующие  $\Delta^9$  десатуразы, всегда работают на одном постоянном уровне (Los, Murata, 2004), поскольку мембраны, состоящие из липидов с полностью насыщенными жирными кислотами, не могут функционировать, по причине перехода мембран в фазовое состояние геля. Для

того чтобы они находились в жидкокристаллической форме (естественной форме), необходима хотя бы одна двойная связь.

Параметры текучести мембран, являются определяющими для функционирования множества мембранно-связанных белков. Увеличение уровня ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов, т.е. увеличение содержания диеновых и триеновых ЖК, способствует адаптации растений к низким температурам. Помимо этого, ЖК 18:3 является предшественником жасмоновой кислоты, которая защищает растения от насекомых и патогенов за счет активации экспрессии генов защитного ответа (Carvalhais et al., 2013; Smith et al., 2009).

## **1.2 Классификация десатураз, их структура, механизм функционирования и локализация**

Согласно текущему мнению, предложены, как минимум три классификации десатураз: (1) по состоянию (растворимые и мембраносвязанные десатуразы); (2) по переносчику субстрата (ацил-АПБ), ацил-коэнзим А (ацил-КоА) и ацил-липидные десатуразы) и (3) по месту введения двойной связи (фронтально-концевые (дельта -  $\Delta$ ) и метил-концевые (омега -  $\omega$ ). При рассмотрении существующих классификаций следует отметить их взаимосвязь. Например, ацил-АПБ, ацил-КоА, ацил-липидные можно отнести как к фронтально-концевым, так и метил-концевым (Берестовой и соавт., 2019) (Рисунок 1).



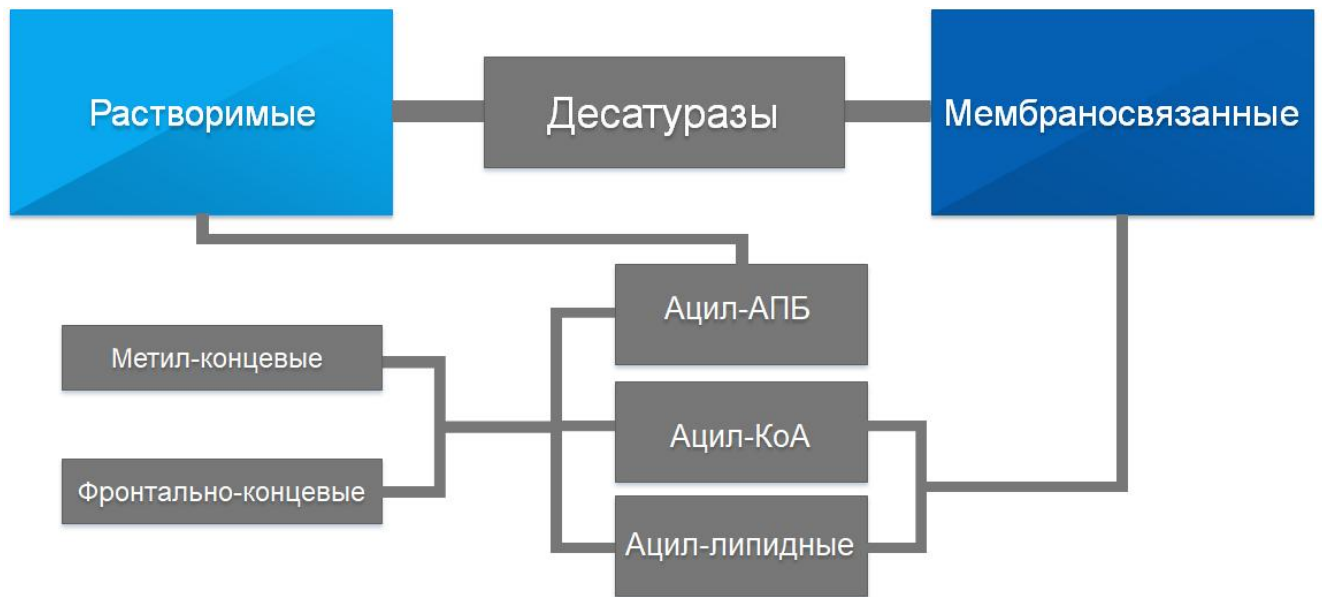


Рисунок 1. Взаимосвязь классификаций десатураз (Берестовой и соавт., 2019).

### 1.2.1 Растворимые десатуразы

Растворимые десатуразы чаще всего локализованы в строме хлоропластов высших растений (Lou, Shanklin, 2010; Lou et al., 2014). Для функционирования растворимых десатураз необходимо, чтобы субстрат (жирная кислота) был этерифицирован с АПБ, поэтому такие десатуразы чаще всего называют ацил-АПБ десатуразами (Лось, 2014).

Растворимые десатуразы образованы 11 белковыми  $\alpha$ -спиралями. Семь  $\alpha$ -спиралей формируют пучок, внутри которого располагается субстрат-связывающая полость. Четыре белковые  $\alpha$ -спирали формируют субстрат-связывающую полость (Guy et al., 2007; Moche et al., 2003). Два высоко консервативных мотива E/DxxH связывают два атома трехвалентного железа, и таким образом, образуют каталитический комплекс, в котором один из атомов железа взаимодействует с глутаминовой кислотой в положении 143 (E143) и гистидином в положении 146 (H146), другой – с глутаминовой кислотой в положении 229 и гистидином в положении 232 (Рисунок 2) (Shanklin, Cahoon, 1998; Moche et al., 2003).

Каталитический комплекс находится в месте изгиба гидрофобного канала, уходящего от поверхности вглубь кристаллической структуры фермента, в который входит субстрат. Изменения в распределении зарядов в гидрофобном

канале определяет глубину проникновения ЖК. Эти изменения влияют на специфичность десатуразы и положение, в котором образуется двойная связь, в зависимости от длины ЖК цепи (Lindqvist et al., 1996).

Механизм функционирования растворимых десатураз во многом схож с другими негемовыми ферментами, активный сайт каталитического комплекса которых содержит два атома железа (2Fe-сайт). Для активации атомов кислорода в 2Fe-сайте необходимы доноры электронов (Shanklin et al., 2009). Все известные растворимые ацил-АПБ десатуразы получают электроны от НАДФН через ферредоксины (Chazarreta-Cifre et al., 2011; Moore, 2018). Тем не менее, путь по которому электроны переносятся от ферредоксинов к 2Fe-сайту в каталитическом комплексе десатураз, до конца не изучен.

Анализ кристаллической структуры растворимых ацил-АПБ десатураз показал, что они имеют димерную, четвертичную структуру (Рисунок 2) (Moche et al., 2003; Guy et al., 2007). Дополнительно установлено, что во время ферментативного цикла, в результате окислительно-восстановительных реакций в ионах металлов в каждой субъединице, происходят конформационные изменения аминокислотных остатков в каталитическом центре фермента (Shanklin et al., 2009)

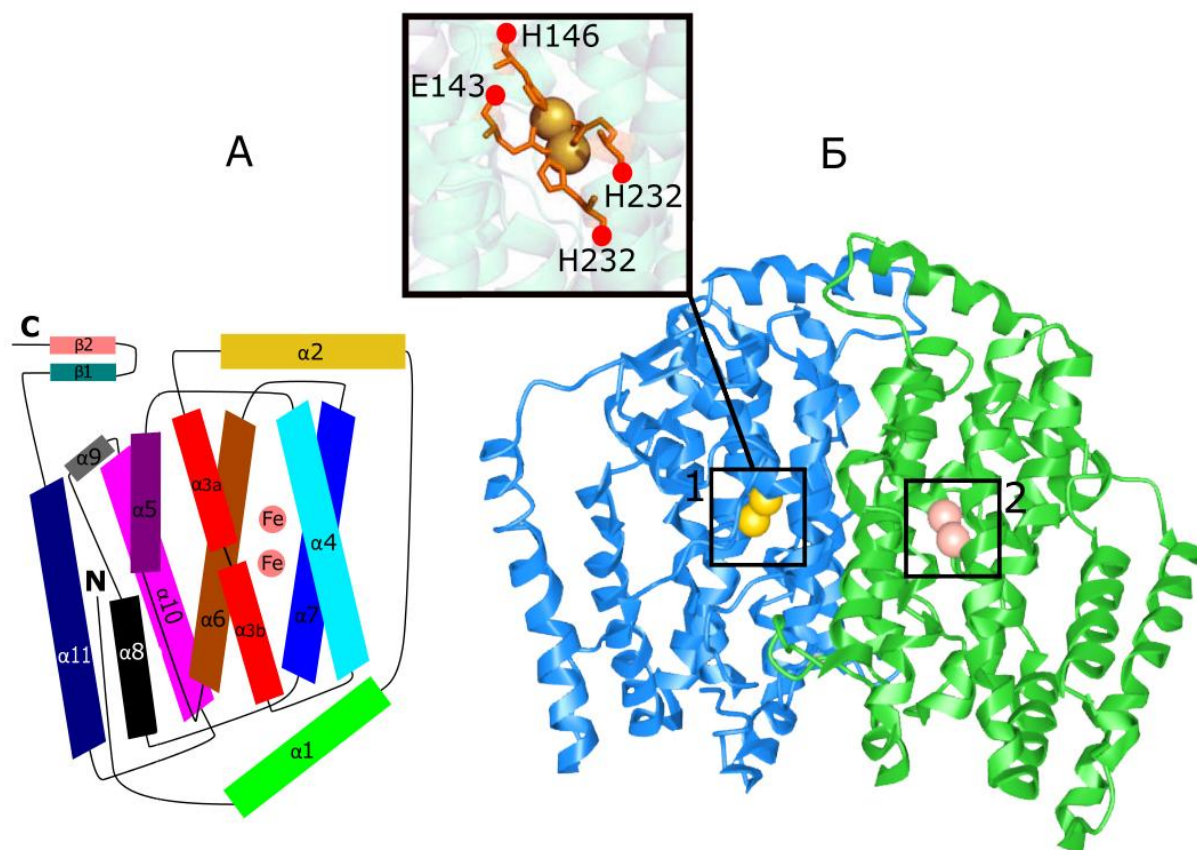


Рисунок 2. Кристаллическая структура растворимых ацил-АПБ десатураз на примере  $\Delta^9$ -стеароил-(18:0)-АПБ десатуразы клещевины обыкновенной.

А) Структура субъединицы  $\Delta^9$ -стеароил-(18:0)-АПБ десатуразы состоящая из 11  $\alpha$ -спиралей, на схеме отображен каталитический комплекс.

Б) Димер  $\Delta^9$ -стеароил-(18:0)-АПБ десатуразы каталитические комплексы отмечены цифрами 1 и 2.

### 1.2.2 Мембраносвязанные десатуразы

Семейство мембраносвязанных десатураз является намного большим и более разнообразным по сравнению с семейством растворимых десатураз. В клетках эукариот они обнаружены в ЭПР, плазматической мембране и мембранах хлоропластов (Yadav et al., 1993; McCartney et al., 2004). У прокариот они локализованы в плазматической мембране и мембране тилакоидов (Diaz et al, 2002).

Мембраносвязанные десатуразы представляют собой интегральные мембранные белки, которые довольно сложно выделить, а их структуру

охарактеризовать. На сегодняшний день существует мнение, что большинство мембраносвязанных десатураз имеют четырех-доменную структуру (Zäuner et al., 2012), однако существуют исключения. Например,  $\Delta 9$  десатураза *Pseudomonas* состоит из трех доменов (Garba et al., 2018), а структура  $\Delta 5$  ацил-липидной десатуразы *Bacillus subtilis*,  $\Delta 8$  десатуразы сфинголипидов *Brassica rapa* и  $\Delta 6$  десатуразы *Monilesaurus rouxii* включает шесть трансмембранных доменов (Diaz et al, 2002; Na-Ranong et al., 2006; Li et al., 2011).

Мембраносвязанные десатуразы содержат три консервативных гистидиновых мотива, которые, как полагают, ответственны за образование кластера из двух атомов металла в каталитическом комплексе, необходимого для поддержания каталитической активности фермента (Dar et al., 2017; Hernández et al., 2016).

Недавно определена структура мембраносвязанной стеароил-КоА десатуразы 1 человека и мыши (Рисунок 3) (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015), полученные данные согласуются со структурной моделью, описанной ранее. Согласно данным, стеароил-КоА десатураза состоит из цитоплазматического домена и четырех трансмембранных доменов. Одиннадцать  $\alpha$ -спиральных сегментов (у стеароил-КоА десатуразы 1 человека десять  $\alpha$ -спиральных сегментов) образуют цитоплазматический домен десатуразы и пучок, формирующий субстрат-связывающую полость десатуразы, в глубине которого находится каталитический комплекс, включающий два атома цинка. Каталитический комплекс расположен в месте изгиба гидрофобного канала, как и у растворимых десатураз, но изгиб канала неглубоко погружен в пучок, формирующий субстрат-связывающую полость (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015). Аналогично растворимым десатуразам форма и специфичность субстрат-связывающей полости мембраносвязанных десатураз определяется местом расположения ацильной группы ЖК. Однако каталитический комплекс, состоящий из двух атомов металла, у мембраносвязанных десатураз координируется тремя консервативными гистидин-богатыми мотивами и ранее неизвестным NxxxH гистидиновым мотивом (у стеароил-КоА десатуразы 1

мышь), локализованными в цитозольном домене (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015).

Несмотря на различия в металл-координирующих мотивах, механизм функционирования каталитического центра мембраносвязанных десатураз аналогичен механизму функционирования каталитического центра растворимых десатураз (Bai et al., 2015). В отличие от растворимых десатураз, использующих ферредоксины в качестве доноров (Chazarreta-Cifre et al, 2011; Wada et al., 1993), цитохром b5 является наиболее распространенным донором электронов для мембраносвязанных десатураз (Chazarreta-Cifre et al, 2011; Wada et al., 1993; Gostinčar et al., 2010; Guillou et al., 2004; Napier et al., 2003; Wang et al., 2015). Благодаря более доступному расположению каталитических сайтов мембраносвязанных десатураз возможен прямой перенос электронов от цитохрома b5 к десатуразе (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015).

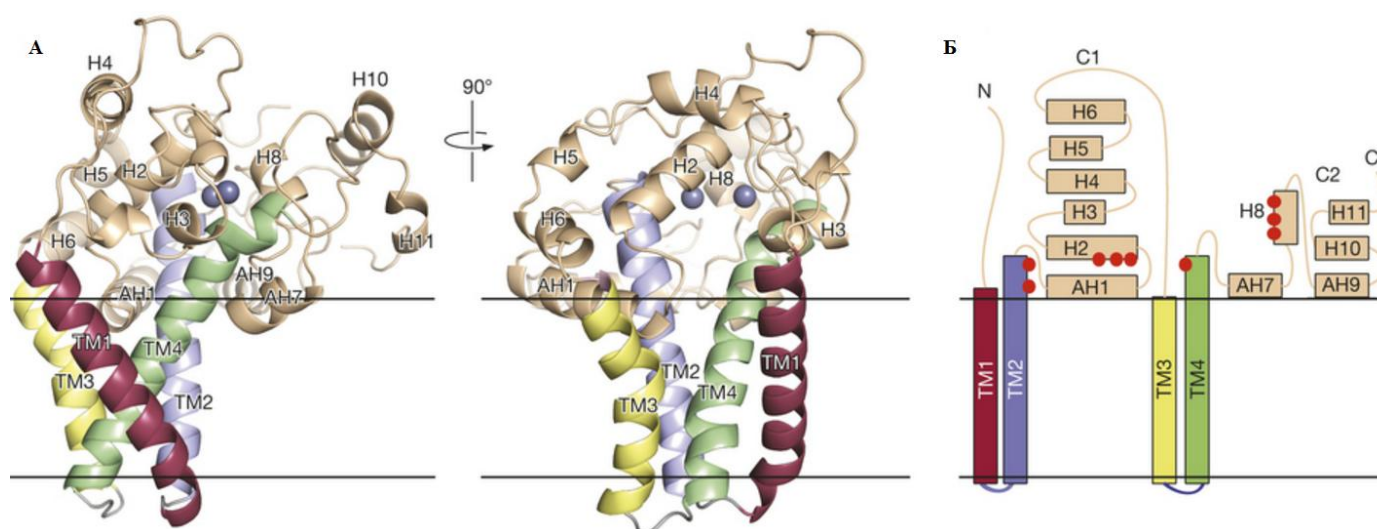


Рисунок 3. Структура и топология стеароил-КоА десатуразы 1 мыши (Bai et al., 2015).

А) Кристаллическая структура стеароил-КоА десатуразы 1 мыши показана по отношению к перпендикулярно ориентированной мембране, цитоплазма клетки располагается сверху. Два иона цинка, связанные с цитоплазматическим доменом десатуразы показаны как серые сферы. На рисунке ТМ 1, 2, 3, 4 – трансмембранные домены.

Б) Схема расположения спиралей десатуразы, цвета спиралей аналогичные рисунку слева. Оранжевые сферами обозначены консервативные остатки гистидина участвующие в координации сайта из двух атомов металла в каталитическом центре десатуразы.

### 1.2.3 Ацил-АПБ, ацил-КоА и ацил-липидные десатуразы

Еще одна классификация десатураз — разделение десатураз в зависимости от переносчика субстрата. Исходя из этой классификации, десатуразы могут быть разделены на три класса: ацил-АПБ, ацил-липидные и ацил-КоА десатуразы (Лось, 2001). Ацил-АПБ десатуразы обнаружены только в хлоропластах растений, где происходит *de novo* биосинтез ЖК, субстратом для этого типа десатураз служат ЖК, связанные с АПБ (Schultz et al., 2000; Zhang et al., 2015). Ацил-КоА десатуразы, как правило, связаны с мембраной и расположены в ЭПР эукариот. Ацил-КоА десатуразы используют в качестве субстрата жирные кислоты, связанные с коферментом А (Bai et al., 2015; Wang et al., 2015). Субстратом для ацил-липидных десатураз являются ЖК, входящие в состав сложных липидов, таких как гликоглицеролипиды, фосфоглицеролипиды и сфинголипиды (Лось, 2001). Ацил-липидные десатуразы локализованы преимущественно в ЭПР Chen, Thelen, 2013; Mori et al., 2016). Существует мнение, что все известные десатуразы млекопитающих являются ацил-КоА десатуразами (Nakamura, Nara, 2004).

### 1.2.4 Дельта и омега десатуразы

Основываясь на сайт-специфичности (введение новообразованной связи  $C=C$  по отношению к концам ЖК цепи и ранее введённым в молекулу ЖК  $C=C$  связям), десатуразы делят на две группы:  $\Delta$  десатуразы или фронтально-концевые десатуразы, и  $\omega$  десатуразы или метил-концевые десатуразы (Aitzetmülle, Tsevegсüren, 1994; Buist, 2004; Hitz et al., 1994; López Alonso et al., 2003; Reed et al., 2000; Sperling et al., 2003; Yadav et al., 1993).  $\Delta$  десатуразы образуют как первую связь  $C=C$  в положении  $\Delta^9$  ацильной цепи ЖК, так и связи между

существующей C=C связью и карбоксильным концом субстрата. Предполагают, что  $\Delta 9$  десатуразы являются наиболее древними ферментами из всех десатураз, поскольку представлены во всех живых организмах (López Alonso et al., 2003). Другая группа десатураз, которая также известна как  $\omega$  десатуразы или метил-концевые десатуразы, катализирует образование связи C=C между уже существующими C=C связями и метильным концом ЖК цепи (Берестовой и соавт., 2019).

### 1.3 Экспрессия и регуляция генов, кодирующих десатуразы

Большинство жирных кислот в мембранах растений являются ненасыщенными. Их уровень ненасыщенности сильно зависит от изменения температуры, интенсивности освещения, диеты, концентрации осмотических веществ и солей (Iba, 2002; Kim, Ntambi, 1999; Kis et al., 1998; Los, Murata, 1998; Nishida, Murata, 1996; Somerville, Browse, 1991). Исследования показали, что гены, кодирующие белки десатураз имеют большое значение для адаптации растений, которые постоянно сталкиваются с различными неблагоприятными воздействиями окружающей среды.

Среди генов десатураз жирных кислот высших растений, наиболее изучены гены *A. thaliana*. В частности, одним из первых клонированных генов десатураз был клонирован ген *FAD2 A. thaliana*, который кодирует  $\Delta 12$  ацил-липидную десатуразу ЭПР (Okuley et al., 1994). В дальнейшем ортологи гена *FAD2* были клонированы и охарактеризованы для множества других видов высших растений, включая сою (Lakhssassi et al., 2017; Schlueter et al., 2007), рапс (Jung et al., 2011; Yang et al., 2012), хлопчатник (Liu et al., 1999; Zhang et al., 2009), арахис (Pandey et al., 2014), лен (You et al., 2014) и люцерну (Zhang et al., 2018).

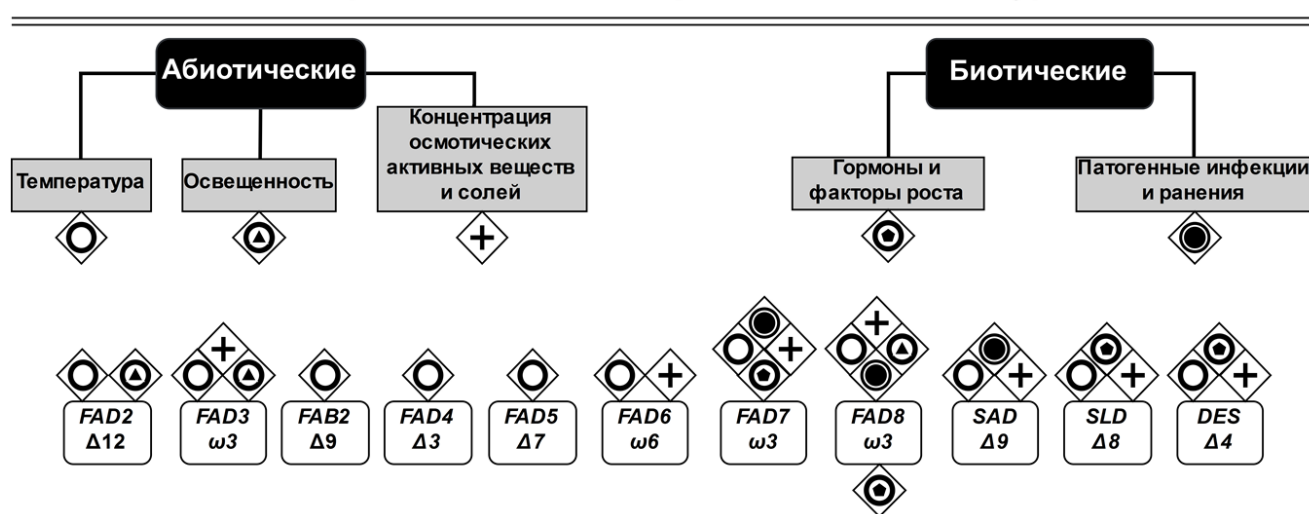
Десатуразы жирных кислот растений кодируются ядерными генами, однако, в основном, осуществляют десатурацию ЖК липидов в ЭПР и хлоропластах. При этом гены, кодирующие десатуразы, экспрессируются в большинстве растительных тканей, однако уровень их экспрессии может быть различен. Это



убедительно продемонстрировано в ряде работ для генов  $\omega 3$  и  $\omega 6$  десатураз, и  $\Delta 12$ ,  $\Delta 9$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 7$  десатураз (Chi et al., 2017; Dong et al., 2016; Zhang et al., 2012).

Согласно экспериментальным данным, экспрессия генов десатураз жирных кислот может быть индуцирована гормонами, а также биотическими (фитопатогены различного происхождения) и абиотическими факторами воздействия (температура, освещенность, концентрация осмотически активных веществ и солей) (Chi et al., 2017; Harwood, 1998; Sui et al., 2018; Xue et al., 2018; Zhang et al., 2018) (Рисунок 4).

### Факторы активации экспрессии генов десатураз



### Уровни регуляции экспрессии десатураз

| Транскрипционный                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Посттранскрипционный                                                                                                                                                  | Посттрансляционный                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><math>\Delta 3</math>, <math>\Delta 4</math>, <math>\Delta 7</math>, <math>\Delta 8</math>, <math>\Delta 9</math>, <math>\Delta 12</math>, <math>\omega 3</math>, <math>\omega 6</math> десатуразы</b><br>1) снижение температуры – увеличение уровня мРНК<br>2) увеличение температуры – снижение уровня мРНК | <b><math>\Delta 12</math>, <math>\omega 3</math> десатуразы</b><br>Увеличение количества диеновых ЖК без увеличения уровня мРНК.<br>Механизм регуляции пока не изучен | <b><math>\omega 3</math> десатураза</b><br>1) изменения аминокислотной последовательности увеличивает активность и время полужизни продуктов гена;<br>2) специализированный участок С-концевой области регулирует активность десатуразы |

Рисунок.4. Схема регуляции экспрессии генов десатураз. FAD, FAB, SAD, SLD и DES – гены десатураз.  $\Delta 12$  и  $\omega 3$  и. т. д – десатуразы. Каждому фактору активации экспрессии генов десатураз соответствует собственный знак (Берестовой и соавт., 2019).



В настоящее время убедительно доказана взаимосвязь между изменением температуры, концентрацией осмотических веществ и солей с экспрессией некоторых генов десатураз у высших растений. Например, при изучении влияния температуры на экспрессию генов десатураз продемонстрировано, что она, в большинстве случаев, увеличивается в ответ на воздействие низких температур (Dong et al., 2016; Feng et al., 2017; Liu et al., 2015; Zhang et al., 2018), тогда как при повышении температуры отмечена обратная реакция (Dong et al., 2016; Zhang et al., 2018). Так, у люцерны (*Medicago truncatula*) под действием низких температур экспрессия генов *FAD3* и *FAD7* (кодируют  $\omega 3$  десатуразы, локализованы в ЭПР и хлоропластах соответственно) значительно увеличивается по сравнению с растениями, выращенными в нормальных условиях. На основании этих результатов высказано предположение, что эти десатуразы могут играть ключевую роль в реакции растений на низкотемпературный стресс (Zhang et al., 2018). Сходные результаты получены при исследовании генов десатураз хлопчатника. Ген *FAD7/8-1*, кодирующий  $\omega 3$  десатуразу, локализованную в хлоропластах, продемонстрировал повышенный профиль экспрессии в ответ на низкие температуры. При этом, повышение экспрессии этого гена наблюдалось и в ответ на засуху (Yurchenko et al., 2014). Экспрессия большинства генов десатураз жирных кислот огурца усиливается в ответ на холод и подавляется высокой температурой. Так экспрессия генов десатураз *FAD2* и *FAD3* (кодируют  $\Delta 12$  и  $\omega 3$  десатуразы соответственно), белковые продукты которых локализованы в ЭПР, и генов десатураз *FAD4*, *FAD5*, *FAD6*, *FAD7* (кодируют  $\Delta 3$ ,  $\Delta 7$ ,  $\omega 6$  и  $\omega 3$  десатуразы соответственно), белковые продукты которых локализованы в хлоропластах, повышается при снижении температуры. При этом высокие температуры вызывают репрессию экспрессии как генов десатураз локализованных в хлоропластах (*FAB2*, *FAD4*, *FAD5*, *FAD6* ( $\Delta 9$ ,  $\Delta 3$ ,  $\Delta 7$  и  $\omega 6$  десатуразы)), так и десатураз *FAD2*, *FAD3* ( $\Delta 12$  и  $\omega 3$  десатуразы), локализованных в ЭПР (Dong et al., 2016).

Как указано выше, не только температурные изменения, но и солевой стресс также оказывает влияние на экспрессию генов десатураз. Например, у арахиса

(*Arachis hypogaea*) при солевом стрессе (инкубация арахиса в присутствии NaCl в концентрации 250 мМ в течение 4 суток) наблюдается снижение экспрессии  $\omega 3$  десатуразы и ее восстановление после снятия стрессового воздействия. Так, при солевом стрессе изменяется ЖК состав, а именно, достоверно снижается содержание ЖК 18:3 (Sui et al., 2018), наряду со снижением активностей супероксиддисмутазы (СОД) и аскорбатпероксидазы (АП) и, вследствие этого, увеличением содержания супероксид аниона ( $O_2^{\bullet-}$ ) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ). Роль экспрессии гена, кодирующего  $\omega 3$  десатуразу (*LeFAD3*), локализованную в ЭПР, в толерантности растений к солевому стрессу продемонстрирована на экспериментальных моделях трансгенных растений томатов (Wang et al., 2014). Так, солевой стресс не сказывается на ростовых характеристиках трансгенных растений томатов в отличие от растений дикого типа и трансгенных растений, которые экспрессировали антисмысловую последовательность гена *LeFAD3*. Эти результаты могут быть объяснены тем, что трансгенные растения томатов с конститутивной экспрессией гена десатуразы *LeFAD3* способны к поддержанию целостности мембран при действии стрессового фактора, что подтверждено методом трансмиссионной электронной микроскопии (Wang et al., 2014). Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли десатурации мембранных липидов, которая обусловлена экспрессией генов десатураз, в регуляции текучести мембран и адаптации растений к изменению температуры и концентрации солей в почве.

В исследованиях экспрессии генов десатураз выяснена важная роль посттранскрипционных и посттрансляционных модификаций в регуляции функционирования десатураз (Рисунок 4). Согласно текущему мнению, изменение ЖК состава липидов клеточных мембран растений при снижении температуры, по всей видимости, происходит также и за счет таких модификаций, а не только за счет увеличения уровня мРНК десатураз (Darg et al., 2017). На примере экспрессии в дрожжах семя-специфичных изоформ десатураз *FAD2-1A* и *FAD2-1B* из растений сои, отличающихся 24 аминокислотными остатками, продемонстрировано, что изоформа *FAD2-1B* более стабильна при повышенных

температурах (Tang et al., 2005). У  $\omega$  десатураз *FAD3* хлопчатника (*Gossypium raimondii*) и *A. thaliana*, локализованных в ЭПР, также отмечено регулирование активности низкой температурой как на уровне транскрипции (снижение температуры приводит к увеличению мРНК, а затем накоплению соответствующего фермента (Liu et al., 2015; Wang, Xu, 2010)), так и на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (изменения в 5'-нетранслируемой области мРНК гена десатуразы или аминокислотной последовательности в N-концевой области фермента увеличивают активность гена *FAD3* и время полужизни продуктов этого гена при низких температурах (Tang et al., 2005; Wang, Xu, 2010)).

Matsuda et al. исследовали посттрансляционные механизмы регуляции активности  $\omega 3$  десатуразы *FAD8* *A. thaliana* в ответ на изменение температуры. Так, убедительно продемонстрировано, что активность десатуразы регулируется за счет С-концевой области, а именно, активность этой десатуразы снижается при высокой температуре только в том случае, если десатураза содержит специфическую С-концевую область (Matsuda et al., 2005).

Согласно экспериментальным данным, фитогормоны также могут регулировать экспрессию генов десатураз, и в ряде случаев в тканеспецифичной манере. Так, при обработке растений арахиса абсцизовой кислотой (АБК), уровень транскриптов  $\omega 3$  десатуразы (локализация в хлоропластах),  $\Delta 12$  десатуразы (локализация в ЭПР),  $\Delta 8$  и  $\Delta 4$  десатураз сфинголипидов увеличивается только в корнях (Chi et al., 2017). Противоположная закономерность отмечена при действии АБК на уровень экспрессии  $\omega 3$  десатуразы чиа (*Salvia hispanica*) и периллы (*Perilla frutescens*): экспрессия этих генов первоначально репрессируется, а затем восстанавливается через 48 часов. Воздействие салициловой кислотой (СК) и метилжасмонатом (МЖ) на растения *S. hispanica* и *P. frutescens* приводит к увеличению экспрессии генов  $\omega$  десатураз (*FAD3*, *FAD7*, *FAD8*) (Xue et al., 2018). Убедительное экспериментальное подтверждение регулирования экспрессии генов десатураз фитогормонами продемонстрировано при изучении промотора гена *FAD2* *A. thaliana*,

кодирующего  $\Delta 12$  десатуразу. В этом исследовании с использованием стратегии репортерных генов продемонстрировано, что активность промотора гена *FAD2* снижается в листьях и корнях при действии 24-эпибрассинолида, АБК и СК. При этом этот эффект гормонов проявлялся в дозозависимой манере. Так, отмечено снижение активности промотора гена *FAD2*, которое было пропорционально увеличению концентрации СК. Высокие концентрации АБК или 24-эпибрассинолида снижали активность промотора в листьях и корнях, но малые количества этих гормонов вызывали снижение активности промотора только в корнях (Yuan et al., 2012). Таким образом, вышеизложенное свидетельствует о том, что экспрессия генов десатураз растений регулируется гормонами, при этом регуляция экспрессии этих генов тканеспецифична и проявляется в дозозависимой манере (Берестовой и соавт., 2019).

Возможность регуляции экспрессии генов десатураз фитогормонами в первую очередь говорит о возможном участии десатураз в процессах передачи сигналов. Так, десатуразы вовлечены в биосинтез промежуточных соединений, например, ЖК 18:3, необходимой для биосинтеза жасмоната – гормона играющего важную роль в развитии растений и в реакциях растений на стресс (Хуе et al., 2018). По-видимому, регуляция экспрессии генов десатураз гормонами необходима не только для поддержания текучести мембран под воздействием стресса, но и для запуска дополнительных клеточных механизмов, необходимых для адаптации растений к действию стрессовых факторов как абиотического, так и биотического происхождения (Берестовой и соавт., 2019).

Согласно текущему мнению, такие биотические факторы как фитопатогены, а также поранения индуцируют экспрессию генов десатураз. В этот процесс индукции в качестве сигнальных молекул могут быть вовлечены и растительные гормоны (например, МЖ, АБК, этилен), олигосахариды и олигопептиды (Хуе et al., 2018), а также такие ЖК, как 18:2 и 18:3 (Dar et al., 2017). Модуляция экспрессии генов десатураз в этом случае может играть роль защитного механизма в обеспечении устойчивости растений к биотическим стрессовым факторам, что убедительно подтверждено в ряде исследований, в том числе и с

использованием моделей трансгенных растений, экспрессирующих гетерологичные гены десатураз (Берестовой и соавт., 2019). Например, трансгенные растения томата, экспрессирующие ген стеароил-десатуразы грибного происхождения (*Flammulina velutipes*), проявляют повышенную устойчивость к воздействию фитопатогенов за счет увеличения выделения восков (Kamthan et al., 2012). Трансгенные растения картофеля, экспрессирующие  $\Delta 12$  ацил-липидную десатуразу из цианобактерий *Synechosystis sp. PCC 6803*, помимо увеличения относительного содержания полиненасыщенных ЖК (ЖК 18:2 и 18:3) характеризуются высоким показателем устойчивости к возбудителю фитофтороза (*Phytophthora infestans*) по сравнению с исходной формой (Юрьева и соавт., 2014).

Убедительные экспериментальные подтверждения роли десатураз в защитных механизмах растений получены с использованием трансгенных технологий на мутантных растениях с дефицитом экспрессии разных генов десатураз. Например, экспрессия гена *TaSSI2* кодирующего стеароил-АПБ десатуразу пшеницы в растениях *A. thaliana*, риса, сои, мутантных по гену стеароил-АПБ десатуразы (*ssi2*-мутанты), привела к повышению устойчивости растений к широкому кругу фитопатогенов, в том числе и к мучнистой росе (Hu et al., 2018; Song et al., 2013). Помимо устойчивости к биотическим факторам, перенос и экспрессия гена *TaSSI2* в трансгенных растениях может быть перспективным подходом и к созданию растений устойчивых к засухе, поскольку стеароил-АПБ десатураза участвует в биосинтезе восков (Hu et al., 2018).

Согласно современным экспериментальным данным, поранения также увеличивают экспрессию генов десатураз у растений, приводя в месте поранения к накоплению триеновых кислот и жасмоната в хлоропластах (Лось, 2014). Триеновые кислоты в хлоропластах, такие как, например, ЖК 18:3, играют роль предшественников в биосинтезе жасмоната, который, в свою очередь, является одним из ключевых участников в запуске защитных механизмов растений. Для иллюстрации процессов усиления экспрессии генов десатураз при поранении можно привести ген *FAD7* портулака (*Portulaca oleracea*), который кодирует  $\omega 3$  десатуразу хлоропластов. Он индуцируется поранением с параллельным

увеличением содержания ЖК 18:3 (Teixeira et al., 2010). Достоверное увеличение экспрессии стеароил-АПБ десатуразы, кодируемой геном *CsSAD*, отмечено и при поранениях растений чая (Ding et al., 2016). Экспрессия  $\omega 3$  десатураз у *S. hispanica* и *P. frutescens* также усиливалась при раневом воздействии. При этом увеличение экспрессии генов  $\omega$  десатураз коррелирует с активацией биосинтеза и приводит к достоверному накоплению жасмоната (Xue et al., 2018).

Таким образом, в настоящее время убедительно продемонстрировано, что экспрессия генов десатураз регулируется действием различных стрессовых факторов и гормонов, что позволяет включить их в список ключевых участников, как процессов сигнализации, так и механизмов защиты и адаптации растений к биотическим и абиотическим факторам (Берестовой и соавт., 2019).

#### **1.4 Роль десатураз в поддержании гомеостаза клеточных мембран**

Индукцируемые окружающей средой динамические изменения в композиции липидов, соотношении липидов и белков, а также присутствие растительных стеролов в мембранах растений, являются важными факторами, контролирующими гомеостаз клеточных мембран (Espenshade, Hughes, 2007; Mullineaux, Kirchhoff, 2009). Десатуразы играют в этом процессе одну из ключевых ролей, так как отвечают за модуляцию ненасыщенности жирных кислот. Модуляция ненасыщенности жирных кислот в свою очередь определяет изменения в текучести мембран. Под воздействием внешних факторов, таких как температура, осмотический стресс, засуха, происходят изменения в организации липидного бислоя мембраны, вызывая либо разжижение мембраны, либо увеличение ее жесткости (Рисунок 5).

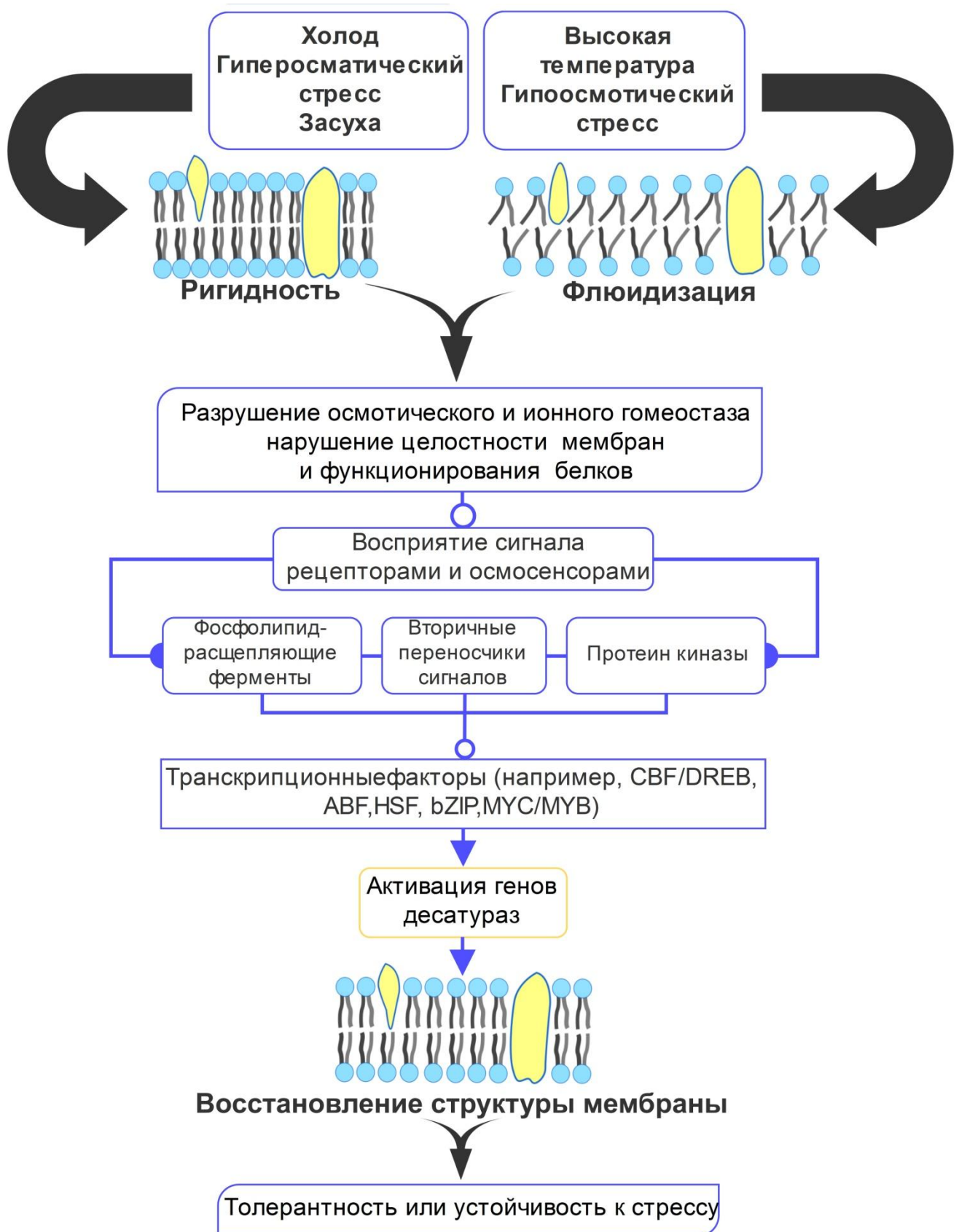


Рисунок 5. Схема процессов, происходящих в растительной клетке в ответ на абиотический стресс.

Влияние изменения температуры на текучесть мембраны были впервые продемонстрированы с помощью поляризации флуоресценции флуоресцентного зонда DPH (1.6-дифенил-1.3.5-гексатриен). DPH включается в мембрану параллельно ацильным цепям мембранных липидов. Его флуоресценция слабо деполяризуется при стабильном взаимодействии с жесткими мембранами, и увеличивается при разжижении мембраны (Los, Murata, 1998).

Текучесть мембраны зависит от двух ключевых факторов: состав липидов (степень ненасыщенности ацильных групп ЖК в молекуле глицеролипида) и соотношение липидов различных классов в липидном бислое (Iba, 2002; Vigh et al., 1998). Уменьшение доли насыщенных жирных кислот предотвращает чрезмерное затвердевание мембраны при понижении температуры. Уменьшение текучести мембраны может быть скомпенсирована путем десатурации ЖК мембранных липидов. В противоположность этому, повышение температуры приводит к флюидизации мембран (Рисунок 5). Для предотвращения чрезмерного разжижения мембраны, клетка синтезирует мембраностабилизирующие белки и осуществляет замещение ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов, вновь синтезированными насыщенными ЖК (Los, Murata, 1998; Ohlrogge, Browse, 1995).

На сегодняшний день взаимосвязь текучести клеточных мембран, степени ненасыщенности ЖК в мембранных липидах и изменения липидного состава в клетке достаточно хорошо изучена. Так, при изучении воздействия низких температур на мутантные растения *A. thaliana*, у которых был инактивирован ген *ADS1*, кодирующий ацил-КоА десатуразу, было выявлено, что содержание ЖК 18:1 в мутантных растениях *ADS1* было на 20% ниже, чем у дикого типа. Липидный анализ показал, концентрация разновидностей моногалактозилдиацилглицерина (МГДГ) с длинной цепи в 34 углеродных атомом в мутантах *ads1* было ниже, чем у дикого типа. Липидный позиционный анализ выявил снижение количество жирной кислоты 18:1 в положении sn-2 МГДГ. Помимо этого, у мутантных растений наблюдалось повышение



содержания цитозольного кальция в ответ на снижение температуры (Ding et al., 2016).

Повышенная экспрессия гена *CbFAD3*,  $\omega 3$  десатуразы *Chorispora bungeana*, в растениях табака, способствовала поддержанию текучести мембран, это в свою очередь привело к увеличению устойчивости растений к холоду, засухе и солевому стрессу. Увеличение содержания ЖК 18:3 в трансгенных растениях, индуцировало активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы плазматической мембраны, тем самым изменяя индуцированную стрессом сигнализацию  $\text{Ca}^{2+}$ . В трансгенных линиях также активировалась система инактивации реактивных форм кислорода (РФК) (Shi et al., 2018).

Среди многочисленных клеточных процессов, на которые может влиять вариативность состава мембранных липидов, фотосинтез вероятно наиболее чувствителен к таким изменениям. Корректировка уровня ненасыщенности ЖК, входящих в состав липидов тилакоидных мембран обеспечивает поддержание текучести мембран на достаточном для функционирования фотосинтетического аппарата уровне, что в свою очередь влияет на способность растений адаптироваться к температурному стрессу (Porov et al., 2017).

Липидная основа тилакоидных мембран состоит в основном из четырех типов галактолипидов: монолактозилдиацилглицерина (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерина (ДГДГ), фосфатидилглицерина (ФГ) и сульфоквиновозилдиацилглицерола (СКДГ). На МГДГ и ДГДГ приходится около 70-80% от общего количества липидов. Соотношения основных галактолипидов тилакоидных мембран стабильны, что указывает на наличие механизмов, обеспечивающих гомеостаз мембранных липидов в тилакоидах. Основные особенности этого гомеостаза заключаются в контроле соотношений МГДГ/ДГДГ и СКДГ/ФГ в тилакоидах цианобактерий и хлоропластов, и отношения ДГДГ/ФГ на уровне всей клетки хлоропластсодержащих эукариот (Boudière et al., 2014). Специфический состав внутренних и наружных мембран хлоропластов меняется под воздействием температуры. При снижении температуры наблюдается

снижения МГДГ и ДГДГ, тогда как при ее повышении происходит обратный процесс (Han, 2016).

Клеточные мембраны служат препятствием для прохождения большинства ионов и крупных молекул благодаря своему строению. Изменение осмолярности внешней среды может вызвать как выход воды из клеток и уменьшение объема цитоплазмы и как следствие снижение тургора клеток, так и привести к накоплению воды, разбуханию клетки и в конечном итоге, может вызвать гибель клеток.

Увеличение солености почвы, возникающая в основном за счет повышения концентрации NaCl, является одним из распространенных абиотических факторов, который влияет на рост и урожайность сельскохозяйственных культур во многих регионах мира. При изучении влияние осмотического стресса на растениях *Arabidopsis* было выявлено, что  $\omega$ 6 десатураза, локализованная в ЭПР, необходима для поддержания устойчивости к высоким концентрациям NaCl. Физиологическое влияние осмотического стресса проявлялось в повышении концентрации мононенасыщенных ЖК и снижении концентрации диеновых жирных кислот у мутантных растений со сниженной активностью  $\omega$ 6 десатураза. Кроме того, активность ион-транспортирующей системы ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортер) была снижена, вследствие чего происходило накопление ионов Na в цитоплазме клеток корня растения, что делало растения более чувствительными к солевому стрессу во время прорастания семян и начальных стадий роста проростков (Zhang et al., 2012).

Повышение концентрации NaCl в почве приводит к значительному снижению урожайности растений. Кроме того, под воздействием солевого стресса происходит изменение состава жирных кислот. В частности, концентрация петроселиновой и линолевой кислот пропорционально уменьшается с увеличением концентрации NaCl, тогда как доля пальмитиновой кислоты увеличивается. Уменьшается общий уровень выхода растительных масел из семян *Cuminum cyminum* и ухудшается их качество. По аналогии с температурным стрессом, солевой стресс вызывает изменения в работе многих ферментов,

включая десатуразы жирных кислот. Нарушается метаболизм липидов вследствие накопления  $\text{Na}_2$  и  $\text{Cl}_2$ . Уменьшение активности десатуразы приводит к снижению содержания мембранных полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), тогда как количество вновь синтезированных насыщенных жирных кислот увеличивается (Bettaieb Rebey et al., 2017).

Еще одним абиотическим стрессом, оказывающим существенное влияние на рост и развития растений, является засуха. Повреждение клеточных мембран во время засухи обусловлено высыханием листьев, и образованием РФК в хлоропластах. Поддержание целостности и стабильности клеточных мембран жизненно важно для адаптации растений к засухе (Rebouças et al., 2017). Уровень стабильности клеточной мембраны во время засухи во многом зависит от состава и содержания жирных кислот в липидном бислое клеточных мембран.

Во время засухи растения модифицируют липидного состав клеточных мембран таким образом, чтобы сохранить их целостность и текучесть. Ремоделирование состава мембранных липидов связано с двумя типами изменений: изменение соотношения полярных липидов, таких как МГДГ и ДГДГ, и изменения уровня насыщенности и длины цепи ЖК. Например, у растений *A. thaliana* снижение отношения МГДГ/ДГДГ в мембранах хлоропластов привело к увеличению устойчивости растений к засухе и снижению температуры. В случае плазматической мембраны, на целостность липидного бислоя влияет изменение доли фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Эти процессы оказывают большое влияние на поддержание функций трансмембранных белков и активности фотосистем растений (Perlikowski et al., 2016).

Воздействие гипоосмотического стресса на текучесть мембраны изучено недостаточно, но было высказано предположение, что гипотонический стресс может приводить к разжижению мембраны аналогично высокой температуре. Помимо увеличения текучести мембраны такой вид стрессового воздействия повышает активность протонных насосов, а также индуцирует образование РФК, что может вызвать дополнительное повреждение мембраны (Hyskova, Ryslava, 2018).

Температурный и осмотический стрессы, а также нехватка воды вызывают изменения физических свойств клеточных мембран живых организмов. Клеточная мембрана играет роль сенсора, с помощью которого клетка воспринимает изменения окружающей среды. Ее липидная структура является ключевым фактором, определяющим физико-химическое состояние мембраны, тогда как пространственная упаковка липидов, определяет текучесть мембраны. Снижение температуры, как и повышение концентрации осмотически активных веществ (гиперосмотический шок) приводит к уменьшению текучести мембраны вследствие изменения пространственной организации липидов. Для поддержания определенного уровня текучести мембраны, необходимы ненасыщенные жирные кислоты. В противоположность этому, насыщенные жирные кислоты жизненно важны для клетки в условиях высоких температур и гипоосмотического шока, поскольку остаются плотно упакованными и сохраняют более высокую температуру плавления. Следовательно, текучесть мембраны определяется сложным балансом между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами (Берестовой и соавт., 2019).

### **1.5 Биотехнологический потенциал применение десатураз для создания растений, толерантных к абиотическим стрессам**

Исследования функционирования десатураз, а также их локализации и особенностей экспрессии их генов сыграли важную роль в понимании процессов адаптации растений. Фундаментальные знания, полученные в результате таких исследований, используются и могут быть использованы в дальнейшем для получения сельскохозяйственных культур с улучшенными питательными свойствами и устойчивых к разного рода стрессовым воздействиям. Конструирование таких растений стало возможно не только благодаря данным о структуре и экспрессии генов десатураз, но и разработке генно-инженерных подходов, в том числе и технологий геномного редактирования (Берестовой и соавт., 2019).

При создании растений, невосприимчивых к стрессовым воздействиям, и растений с улучшенными питательными свойствами учеными могут быть использованы несколько стратегий для достижения поставленной цели (Таблица 1) (Берестовой и соавт., 2019).

Самые популярные и, можно сказать, ставшие уже классическими стратегии это:

1. мутагенез (обработка семян мутагенами (например, этилметансульфонатом) с последующим отбором растений, соответствующих искомым свойствам);
2. инсерционный мутагенез (введение в целевой ген нуклеотидных последовательностей мобильных генетических элементов и Т-ДНК с целью получения линий с измененной экспрессией целевого гена — нокаут, замолкание гена, увеличение экспрессии с помощью специализированных промоторов, дополнительное введение генов, в том числе гетерологичных (генов других видов)) (Берестовой и соавт., 2019).

Таблица 1. Биотехнологический потенциал десатураз

| Десатураза | Растение                                      | Стратегия модификации           | Свойства изменённого растения                                          | Ссылка                  |
|------------|-----------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| ω3         | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | Направленный мутагенез (нокаут) | Снижение ЖК 16:3 и 18:3 увеличило выживаемость при 30°C.               | (Routaboulet al., 2012) |
| Δ9         | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | Инсерционный мутагенез (нокаут) | Снижение ЖК 18:1. Морозоустойчивость                                   | (Chen, Thelen, 2016)    |
| ω3         | <i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Zhongshu 4 | Подавление экспрессии           | Увеличение ЖК 18:2, снижение ЖК 18:3. Низкая восприимчивость к 30-40°C | (Wang, Xu, 2010)        |

|                                      |                                                             |                                                 |                                                                                                          |                          |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| ω3                                   | <i>Solanum<br/>esculentum</i><br>cv.<br>Micro-Tom,<br>Block | Посттранскрипц<br>ионное<br>замолкание<br>генов | Увеличение<br>моногалактозилдиацилг<br>лицеринов 36:4 и 34:4.<br>Низкая<br>восприимчивость к 30-<br>40°C | (Nakamura et al., 2016)  |
| ω3                                   | <i>Lycopersicon<br/>esculentum</i><br>cv.<br>Zhongshu 4     | Увеличение<br>экспрессии                        | Увеличение ЖК 18:3,<br>снижение ЖК 18:2.<br>Солеустойчивость                                             | (Wang et al., 2014)      |
| ω3                                   | <i>Lycopersicon<br/>esculentum</i><br>cv.<br>Zhongshu 4     | Увеличение<br>экспрессии                        | Увеличение ЖК 18:3,<br>снижение ЖК 18:2.<br>Морозоустойчивость                                           | (Yu et al., 2009)        |
| Δ9 <i>Sapium<br/>sebiferum</i>       | <i>Brassica<br/>napus</i>                                   | Гетерологичная<br>экспрессия                    | Увеличение ЖК 18:2,<br>ЖК 18:3.<br>Морозоустойчивость                                                    | (Peng et al., 2018)      |
| ω3<br><i>Chorispora<br/>bungeana</i> | <i>Nicotiana<br/>benthamiana</i>                            | Гетерологичная<br>экспрессия                    | Увеличение ЖК 18:3.<br>Устойчивость к холоду,<br>засухе, солевому<br>стрессу                             | (Shi et al., 2018)       |
| Δ9 <i>Solanum<br/>commersonii</i>    | <i>Solanum<br/>lycopersicon</i><br>cv.<br>Zhongshu 8        | Гетерологичная<br>экспрессия                    | Увеличение ЖК 18:2.<br>Устойчивость к холоду                                                             | (Li et al., 2015)        |
| ω3 <i>Brassica<br/>napus</i>         | <i>Solanum<br/>esculentum</i><br>cv.<br>Micro-Tom           | Гетерологичная<br>экспрессия                    | Увеличение ЖК 18:2,<br>ЖК 18:3.<br>Морозоустойчивость                                                    | (Domínguez et al., 2010) |

|                                                        |                              |                                     |                                                                                                |                              |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| $\Delta 9, \Delta 12$<br><i>Synechococcus vulcanus</i> | <i>Nicotiana tabacum</i>     | Гетерологичная экспрессия           | Увеличение ЖК 18:3.<br>Снижение ЖК 18:2.<br>Устойчивость к холоду, солевому стрессу, патогенам | (Герасименко и соавт., 2015) |
| $\Delta 12$                                            | <i>Arachis hypogaea</i> L    | Редактирование генома (TALEN)       | Увеличение ЖК 18:1.<br>Биофортификация                                                         | (Wen et al., 2018)           |
| $\Delta 12$                                            | <i>Glycine max</i> (L.) Merr | Редактирование генома (TALEN)       | Увеличение ЖК 18:1.<br>Снижение ЖК 18:2, ЖК 18:3. Биофортификация                              | (Demorest et al., 2016)      |
| Фитоеен десатураза                                     | <i>Musa</i> cv. Rasthali     | Редактирование генома (CRISPR/Cas9) | Альбинизм и изменение окраски                                                                  | (Kaur et al., 2018)          |
| $\Delta 12$                                            | <i>Brassica napus</i>        | Редактирование генома (CRISPR/Cas9) | Увеличение ЖК 18:1.<br>Биофортификация                                                         | (Okuzaki et al., 2018)       |

Мутагенез применяют, как правило, для получения растений дефектных по одному или нескольким генам, кодирующим десатуразы (Таблица 1). Так, использование мутагенеза позволило получить мутанты *A. thaliana* дефектные сразу по трем генам десатураз *FAD3-2*, *FAD 7-2* и *FAD8*. У мутантов наблюдалось сниженное содержание ЖК с тремя двойными связями (16:3 и 18:3). При этом уменьшение количества ненасыщенных ЖК улучшило фотосинтетические свойства тилакоидных мембран и увеличило выживаемость растений при температуре выше 30°C. Однако исследователям не удалось получить стабильной линии с ценным мутантным признаком (Routaboulet al., 2012).

Инсерционный мутагенез постепенно вытесняет такие традиционные способы получения растений с заданными свойствами как селекция и мутагенез. Эта стратегия получила широкое применение для создания растений с измененным метаболизмом и невосприимчивых к стрессовым воздействиям

(Таблица 1). Так, например, данная стратегия позволила получить мутанты *A. thaliana* с нокаутным геном *ADS1* (ацил-КоА десатураза хлоропластов ( $\Delta 9$ )), которые демонстрировали невосприимчивость к пониженным температурам по сравнению с контрольными растениями, кроме того, анализ ЖК состава показал снижение на 20% содержания ЖК 18:1 по сравнению с контролем (Chen, Thelen, 2016). Другой подход заключается в избирательном подавлении экспрессии целевого гена. Это может быть достигнуто за счет экспрессии антисмысловых последовательностей генов, кодирующих десатуразы. С помощью данного метода получены растения томата с выключенным геном *LeFAD3*  $\omega 3$  десатуразы. Для этих растений характерно изменение в ЖК профиле (увеличенное количество ЖК 18:2 и сниженное количество ЖК 18:3), что привело к низкой восприимчивости к повышенным температурам (30-40°C) (Wang et al., 2010). За счет посттранскрипционного замолкания гена *FAD7* получена другая линия томатов с такими же свойствами (Nakamura et al., 2016).

Использование для экспрессии генов десатураз специализированного промотора с целью увеличения экспрессии генов десатураз позволило получить растения способные произрастать на засоленных почвах (Таблица 1). Данный подход применен при создании трансгенных томатов с повышенной экспрессией гена *LeFAD3*  $\omega 3$  десатуразы, локализованной в ЭПР. Трансгенные растения обладали лучшими ростовыми характеристиками под воздействием солевого стресса по сравнению с нетрансформированными растениями (Wang et al., 2014). Увеличение экспрессии того же самого гена у томатов улучшает их выживаемость при низких температурах за счет повышения содержания  $\alpha$ -линоленовой ЖК. Изменения в составе липидов обеспечило поддержание текучести мембран. Это напрямую повлияло на функционирование фотосинтетического аппарата растений (Yu et al., 2009).

Гетерологичная экспрессия генов десатураз может позволить получить большое количество видов устойчивых к абиотическим стрессам. К примеру, гетерологичная экспрессия гена *SsSAD*, кодирующего стеароил-АПБ десатуразу ( $\Delta 9$ ) сального дерева (*Sapium sebiferum*), в растениях рапса (*Brassica napus* L.)



позволила изменить липидный метаболизм таким образом, что у *B. napus* увеличивалось содержание ЖК 18:2 и 18:3. Такое увеличение полиненасыщенных ЖК привело к существенному повышению морозоустойчивости растений (Peng et al., 2018). Shi et al. удалось получить растения трансгенного табака *N. benthamiana*, экспрессирующие ген *CbFAD3* микросомальной  $\omega 3$  десатуразы криофита *Chorispora bungeana*. Экспрессия гена *CbFAD3* в растениях табака конститутивно увеличивала содержание  $\alpha$ -линоленовой ЖК как в листьях, так и в корнях, это обеспечило поддержание текучести мембран и понижало восприимчивость растений к холоду, засухе и солевому стрессу (Shi et al., 2018). Трансгенные растения картофеля с повышенной экспрессией гена ацил-АПБ десатуразы ( $\Delta 9$ ) (*ScoSAD*) паслёна (*Solanum commersonii*) продемонстрировали устойчивость к заморозкам, которая обусловлена высоким содержанием линолевой кислоты в растениях (Li et al., 2015). Введение генов двух  $\omega 3$  десатураз (хлоропластной *FAD3* и эндоплазматической *FAD7*, катализирующих превращение линолевой ЖК в  $\alpha$ -линоленовую) рапса в растения томата привело к повышенной устойчивости последних к низким температурам (Domínguez et al., 2010). Одновременная гетерологичная экспрессия генов двух других десатураз  $\Delta 9$  и  $\Delta 12$  *S. vulcanus* в *N. tabacum*, привела к увеличению доли  $\alpha$ -линоленовой кислоты с одновременным уменьшением уровня линолевой кислоты. Данные изменения в ЖК составе растений могут улучшить устойчивость растений к абиотическим стрессам и патогенам. Кроме того, у трансгенных растений, экспрессирующих гены десатураз, увеличивалась активность СОД, это также может оказать положительное воздействие на устойчивость к солевому стрессу (Герасименко и соавт., 2015) (Таблица 1).

Новейшим подходом, который может быть применен как для биофортификации (улучшения питательных свойств сельскохозяйственных культур) растений, так и для создания культур способных произрастать в условиях постоянного воздействия различных стрессовых факторов, является направленное редактирование генома. На сегодняшний день успешно применяются системы редактирования генома при помощи сайт-специфических

нуклеаз. Сайт-специфические нуклеазы восстанавливают двухцепочечные разрывы ДНК в местах, где необходима модификация последовательности ДНК. На данный момент разработаны три системы редактирования генома TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease), ZFN (Zinc finger nuclease) и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein 9) (Gaj et al., 2013; Osakabe, Osakabe, 2015). Данные технологии стали мощным инструментом для внедрения полезных генетических изменений в различные сельскохозяйственные культуры (Таблица 1).

На данный момент в литературных источниках недостаточно данных о применении сайт-специфических нуклеаз непосредственно для целей создания сельскохозяйственных культур, устойчивых к стрессовым воздействиям, но имеющиеся данные говорят о применимости данного подхода (Берестовой и соавт., 2019). Однако есть некоторые достижения в области направленного редактирования генов десатураз в целях биофортификации растений и увеличения сроков хранения продуктов питания, в частности масел, полученных из таких растений (Haun et al., 2014; Demorest et al., 2016; Wen et al., 2018; Abe et al., 2018) (Таблица 1).

Технология TALEN была использована для введения мутаций в ген *FAD2* ( $\Delta 12$  десатураза) сои и арахиса с целью его выключения, и улучшения, таким образом, их питательных свойств и удлинения сроков хранения продуктов питания, произведённых на основе данных растений. Нокаут генов привел к значительному увеличению содержания ЖК 18:1, снижению ЖК 18:2 и ЖК 18:3 (Haun et al., 2014; Demorest et al., 2016; Wen et al., 2018). Нокаут гена *OsFAD2-1* риса, произведённый той же технологией, позволил получить генетически стабильные растения с увеличенным в 0.5–2 раза содержанием олеиновой ЖК по сравнению с контрольными растениями (Abe et al., 2018).

Недавно Bonawitz с коллегами продемонстрировал принципиальную возможность использования ZFN для модификации генов десатураз растений (Bonawitz et al., 2018). В своей работе они успешно интегрировали несколько трансгенов в локус гена *FAD2-1a* культуры клеток ткани и эмбрионов сои. И

продемонстрировали возможность применения технологии ZFN для улучшения питательных свойств сельскохозяйственных культур посредством целенаправленной интеграции трансгенов.

CRISPR/Cas9 – технология экономически более эффективная по сравнению с другими методами редактирования генома и в последнее время находит все более широкое применение. Исследования по редактированию генома растений были выполнены как для однодольных, так и двудольных растений, таких как *N. benthamiana* (Li et al., 2015), *N. tabaccum* (Gao et al., 2014), *A. thaliana* (Li, Zhang, Sheen, 2014), *Oryza sativa* (Shan et al., 2014), а также сорго (Jiang et al., 2013). На сегодняшний день использование CRISPR/Cas9 для редактирования генов десатураз ограничивается, в основном, модельными экспериментами. Для этих целей удобной мишенью оказался ген фитоеен десатуразы *PDS*. Эта десатураза вводит две транс двойные связи между одиннадцатым и двенадцатым атомами углерода фитоеена (важного соединения в биосинтезе каротиноидов) превращая его в  $\zeta$ -каротин. При выключении данного гена растения приобретают характерные фенотипические признаки: альбинизм или существенное изменение окраски растений. С помощью CRISPR/Cas9 получены модельные растения банана и маниока, с нокаутом по гену фитоеен десатуразы (Kaur et al., 2018; Odipio et al., 2018).

CRISPR/Cas9 удобна еще и тем, что может быть использована для растений, у которых ограничены возможности модификации вследствие сложности их размножения семенами. Десертный банан сорта Кавендиш был модифицирован системой CRISPR/Cas9. В результате выключения гена *PDS* изменилась не только окраска растений, но и ростовые характеристики, в частности, у растений наблюдался карликовый фенотип (Naim et al., 2018).

CRISPR/Cas9 успешно опробована на другом гене десатураз – *FAD2*. Okuzaki et al. удалось получить стабильную линию *B. napus*, имеющую модификации в гене *FAD2* в виде удаления 4 пар оснований в последовательности гена. Эта модификация привела к значительному изменению содержания олеиновой ЖК (Okuzaki et al., 2018).

Создание растений, пригодных для сельскохозяйственного назначения, обладающих улучшенными адаптивными и питательными свойствами, с каждым годом приобретает все большую необходимость. Десатуразы жирных кислот в данном случае являются удобной мишенью для генно-инженерных манипуляций (Берестовой и соавт., 2019).

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и оборудование

#### *Реактивы*

ДНК-лигаза T4 (Евроген, Россия);

Taq-ДНК-полимераза (Евроген, Россия);

Pfu-Taq-ДНК-полимераза (Евроген, Россия);

Праймер F1 – GGGCCCACATCATCCTTAGAA;

Праймер R1 – GAATTCGGACAACGCTTTGGG;

Праймер F2 – GAATTCGTGAGCAAGGGCGAG;

Праймер R2 – CCCGGGCTTGTAGTACAGCTCGT;

Праймер F3 – GGTACCATGGCTTCTATGATATC;

Праймер R3 – GGGCCCCTGATATTCAACSTATAT;

Праймер F4 – GGTACCATGTCCAAACSTTTTCT;

Праймер R4 – GGGCCCTGCTAAACATGTGCT;

Плазмида pVIG-T 2D;

Плазмида pQE-desC;

Плазмида pPGG;

Плазмида pVIG-T 1A;

Плазмида pVIG-S2B;

Штамм GV3101 агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* (из коллекции ИФР РАН);

Среда LB (MP Biomedicals, США)

Рифампицин (Fisher Scientific, США);

Гентамицин (Thermo Fisher Scientific, Gibco, США);

Канамицин (Thermo Fisher Scientific, Gibco, США);

MES (Sigma-Aldrich, США);

Ацетосирингон (Abscam, США);

Изопропиловый спирт (Экос 1, Россия);

n-Гексан (Экос 1, Россия);

Гидроксид калия (KOH) (Химмед, Россия);  
Спирт этиловый 96% (Химмед, Россия);  
Метанол (Экос 1, Россия);  
Бензол (Экос 1, Россия);  
Диэтиловый эфир (Экос 1, Россия);  
Ацетилхлорид (Экос 1, Россия);  
Среда MS (Sigma-Aldrich, США);  
Сахароза (Химмед, Россия);  
Сорбитол (Химмед, Россия);  
Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) (Химмед, Россия);  
Tris-HCl (Sigma-Aldrich, США);  
Хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ ) (Химмед, Россия);  
Дигидроортофосфат аммония ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) (Химмед, Россия);  
Дигидроортофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Химмед, Россия);  
Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) (Химмед, Россия);  
Хлорид железа ( $\text{FeCl}_3$ ) (Химмед, Россия);  
Серная кислота ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Экос 1, Россия);  
Целлюлаза Onozuka R10 (Kinki Yakult, Япония);  
Пектиназа Macerozyme R10 (Kinki Yakult, Япония);  
Гемицеллюлаза Driselase (Fluka, США);  
Пластины для препаративной тонкослойной хроматографии Kieselgel 60 (Merck, США);  
Центрифужные пробирки на 50мл (Falcon, США);  
Микроцентрифужные пробирки (Eppendorf, Германия);

### ***Оборудование***

Трансиллюминатор ETX (Vilber Lourmat, Германия);  
Микроскоп LSM 780 NLO (Zeiss, Германия) на базе AxioObserver Z1 (Zeiss, Германия), снабженный объективом LD Plan APOCHROMAT 63x/0.75, набором

фильтром Set 10 (BP 450-490, FT 510, BP 515-565), лазером Argon – 458, 488, 514 нм с цифровой камерой AxioCam MRm;

Микроскоп Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с цифровой камерой AxioCam MR и блоками фильтров: фильтр № 38 ( $\lambda_{ex}$  BP 470 нм/40 нм;  $\lambda_{em}$  BP 525 нм/50 нм, где  $\lambda_{ex}$  – возбуждение,  $\lambda_{em}$  – эмиссия (флуоресценция)), № 45 ( $\lambda_{ex}$  BP 560 нм/40 нм;  $\lambda_{em}$  BP 630 нм/75 нм);

Модуль ApoTome (Zeiss, Германия);

Лабораторная Центрифуга ELMi (Латвия);

Амплификатор C1000 (Biorad, США);

Микроцентрифуга Minispin (Eppendorf, Германия);

Холодильник с морозильной камерой на  $-20^{\circ}\text{C}$  (Indesit, Италия);

Морозильник на  $-80^{\circ}\text{C}$  (Sanyo, Япония);

Шейкер-инкубатор ES-20 (Biosan, Латвия);

Хроматограф Agilent 7890AGC (Agilent Technologies, Inc., США);

Ротационный испаритель RV-10 Basic (IKA, Германия)

Водяная баня MPC-208B (Huber, Германия);

Колбонагреватель (Россия).

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1 Конструирование растительных экспрессионных векторов

При конструировании экспрессионных векторов использовались стандартные процедуры молекулярного клонирования и протоколы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Все ферменты, используемые при конструировании векторов (эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК-лигаза, Taq- и Pfu-ДНК-полимеразы, фосфатазы) были использованы согласно протоколам фирм-изготовителей (Тюрин и соавт., 2017).

Для конструирования всех экспрессионных векторов, первоначально требовалось получить последовательность *desC* гена, кодирующего  $\Delta 9$  ацил-липидную десатуразу *Synechococcus vulcanus*. Для этого была использована плаزمида pQE-*desC* (Maali et al., 2007) в качестве матрицы и праймеры F1 (прямой) -GGGCCCACATCATCCTTAGAA и R1 (обратный) – GAATTCGGACAACGCTTTGGG (в прямой и обратный праймеры введены сайты рестрикции *ApaI* и *EcoRI*, соответственно). Продукты ПЦР затем были клонированы в pPGG вектор (Вячеславова и соавт., 2012), предварительно гидролизированный по сайтам рестрикции *ApaI* и *EcoRI*. В результате был получен вектор pPGG-*desC* несущий последовательность  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы. На следующем этапе получали последовательность *egfp* гена, кодирующую зеленый флуоресцентный белок. В качестве матрицы используя плазмиду pQE-*egfp* и праймеры F2 - GAATTCGTGAGCAAGGGCGAG и R2 – CCCGGGCTTGTAAGTACAGCTCGT (в прямой и обратный праймеры введены сайты рестрикции *EcoRI* и *SmaI*, соответственно) (Piruzian et al., 2002). Полученный с помощью ПЦР фрагмент клонировали в pPGG-*desC* плазмиду, предварительно гидролизованную по сайтам рестрикции *EcoRI* и *SmaI*, с образованием pPGG-*desC-egfp* плазмиды. Корректность сборки гибридного гена подтверждена секвенированием (Евроген, Россия) (Тюрин и соавт., 2017).

Чтобы получить растительный экспрессионный вектор pVIG-D9E, несущий гибридный ген *desC-egfp*, предварительно выделили фрагмент pPGG-*desC-egfp*



вектора, содержащего последовательность *desC-egfp*, ограниченную сайтами рестрикции *ApaI* и *SmaI*. Затем, клонировали фрагмент *pPGG-desC-egfp* плазмиды в вектор *pVIG-T1A* (Вячеславова и соавт., 2012, Тюрин и соавт., 2017), предварительно гидролизированный по сайтам рестрикции *ApaI* и *SmaI*.

Растительный экспрессионный вектор, несущий *desC-egfp* гибридный ген, слитый с последовательностью транзитного пептида малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (Lch) *A. thaliana* (ген *ats1A*, NCBI, X13611), получали следующим образом. С помощью ПЦР получили последовательность Lch, кодирующую транзитный пептид малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (РБФК), используя *pVIG-S2B* плазмиду (Вячеславова и соавт., 2012, Тюрин и соавт., 2017), в качестве матрицы и праймеры F3 - GGTACCATGGCTTCTATGATATC и R3 – GGGCCCCTGATATTCAACTATAT (в прямой и обратный праймеры введены сайты рестрикции *KpnI* и *ApaI*, соответственно). Далее, полученный ПЦР продукт клонировали в *pVIG-DE* вектор, предварительно гидролизированный по сайтам *KpnI* и *ApaI*, с образованием *pVIG-Lch-D9E* вектора.

Растительный экспрессионный вектор, несущий *desC-egfp* гибридный ген, слитый с последовательностями, обеспечивающими транспорт белка и его удержание в ЭПР, получали в несколько этапов. Первоначально, с помощью ПЦР получили последовательность LeB4, кодирующую транспортный пептид, используя *pVIG-T2D* плазмиду (Вячеславова и соавт., 2012, Тюрин и соавт., 2017), в качестве матрицы и праймеры F4 - GGTACCATGTCCAAACSTTTTCT и R4 – GGGCCCCTGCTAAACATGTGCT (в прямой и обратный праймеры введены сайты рестрикции *KpnI* и *ApaI*, соответственно). Полученный ПЦР продукт клонировали в *pVIG-DE* вектор, предварительно гидролизированный по сайтам рестрикции *KpnI* и *ApaI*, в результате был получен вектор *pVIG-LeB4-DE*. На следующем этапе, фрагмент *pVIG-T2D* плазмиды ограниченный сайтами рестрикции *SmaI* и *XbaI* и несущий последовательность, кодирующую SRKDEL - сигнал удержания белков в ЭПР и сигнал полиаденилирования, клонировали в *pVIG-LeB4-DE* вектор,

предварительно гидролизированный по сайтам рестрикции SmaI и XbaI, с образованием pVIG-LeB4-D9E-ER вектора (Рисунок 6) (Тюрин и соавт., 2017).

Корректность слияния гибридного гена с соответствующими лидерными сигналами в растительных экспрессионных векторах pVIG-Lch-D9E и pVIG-LeB4-D9E-ER подтверждена секвенированием (Евроген, Россия).

Аналогичная схема получения растительных экспрессионных векторов была применена для создания векторных конструкций pVIG-DE, pVIG-Lch-DE и pVIG-LeB4-DE-ER использованных при исследовании влияния локализации  $\Delta 9$  десатуразы на жирнокислотный состав суммарных липидов тканей листьев. Отличие данных векторных конструкций от экспрессионных векторов, описанных выше, заключалось только в отсутствии последовательности кодирующий ген *egfp* (Рисунок 7). Корректность слияния гена *desC* с лидерными последовательностями направляющими продукт гена в различные компартменты растительной клетки так же была подтверждена секвенированием (Евроген, Россия) (Тюрин и соавт., 2017).

### 2.2.2 Выращивание агробактерий их трансформация и селекция

Штамм агробактерий *A. tumefaciens* GV3101 высевали в 5 мл среды LB с рифампицином (50 мкг/мл) и гентамицином (25 мкг/мл) и выращивали в течение ночи при 28°C. Затем бактериальную культуру переносили в 95 мл среды LB без антибиотика и наращивали клетки до оптической плотности OD600 = 0.5-0.6. Клетки осаждали при 3500 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл холодного (0°C) буфера содержащего 150 mM NaCl и 10 mM Tris-HCl pH 7.0. Далее клетки осадили и ресуспендировали в 2 мл буфера содержащего 20 mM CaCl<sub>2</sub> и 10 mM Tris-HCl pH 7.0. Полученные таким образом компетентные клетки были сразу использованы для трансформации (Тюрин и соавт., 2017).

Процесс трансформации осуществлялся следующим образом, к компетентным клеткам были добавлены экспрессионные векторы pVIG-DE, pVIG-Lch-DE и pVIG-LeB4-DE-ER. Клетки инкубировали на льду в течение 20

минут, после чего осуществляли нагрев культуры в течение 5 минут при 37°C, затем клетки инкубировали в течение 5 минут на льду и добавляли по 2 мл среды LB без антибиотика и инкубировали при температуре 28°C при перемешивании на скорости 160 об/мин в течение двух часов. Далее клетки рассеивали на чашки Петри на среду с канамицином. Выросшие колонии были выделены и ресуспендированы 100-150 мкл среды LB без антибиотика, после чего заморожены (Тюрин и соавт., 2017).

### 2.2.3 Выращивание растений

Растения *N. benthamiana* и *N. excelsior* выращивали при +20±2°C, 8-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>/с) на гидропонике, в течение 6 недель. В качестве питательной среды был использован раствор Кнопа (Тюрин и соавт., 2017).

### 2.2.4 Агроинфильтрация растений

Трансформированные клетки *A. tumefaciens*, штамм GV3101, после разморозки выращивали в течение 48 часов при +27°C в среде LB с антибиотиками рифампицином (50 мкг/мл), гентамицином (25 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл) при перемешивании на скорости 160 об/мин. Каждые 12 часов проводили обновление среды LB с теми же антибиотиками, дополненной 20 мкМ ацетосирингона и 10 мМ MES. Клетки наращивали до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0.8. Клетки осаждали при 3000 g в течение 5 минут и ресуспендировали в буфере для агроинфильтрации, содержащем однократную среду MS, 10 мМ MES-KOH (pH 5.6), 2% сахарозы, 200 мкМ ацетосирингона, до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 2.4. Далее клетки инфильтрировали в абаксиальную эпидерму листа шестинедельных растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* с помощью шприца без иглы, объемом 5 мл. Результат трансформации оценивали на четвертые сутки после агроинфильтрации. Оценку качества проведенной трансформации проводили с помощью визуализации зон экспрессии гибридного гена *desC-egfp* в

листьях растений табака при 312 нм, используя трансиллюминатор ETX (Vilber Lourmat, Германия) (Тюрин и соавт., 2017).

### **2.2.5 Получение протопластов**

Получения протопластов из фрагментов листьев с зонами флуоресценции проводили по методу Nosov et al. (Nosov et al., 2014) с модификациями. Фрагменты листьев были измельчены скальпелем, после чего добавляли 5 мл раствора, содержащего  $\frac{1}{2}$  макросолей SH среды, 0.4 М сорбитола, 4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 12.5 mM MES-KOH (pH 5.7), 1% целлюлазы Onozuka R10 (Kinki Yakult, Япония), 0.15% пектиназы Macerozyme R10 (Kinki Yakult), и 0.4% гемицеллюлазы Driselase (Fluka, США). Раствор готовили предварительно, осветляли центрифугированием, и замораживали. Протопласты выделяли при  $+15^\circ\text{C}$  при перемешивании на скорости 50 об/мин в течение 12 часов. Суспензию протопластов фильтровали через нейлоновую сетку с размером ячеек 40 мкм, переносили в 10 мл пробирки для центрифугирования и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Осадок протопластов ресуспендировали в 10 мл раствора 0.5 М сорбита и 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 100 g в течение 5 мин при комнатной температуре (процедуру повторяли дважды). Осадок протопластов ресуспендировали в 1.5 мл раствора 0.5 М сорбита и 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Тюрин и соавт., 2017).

### **2.2.6 Лазерная сканирующая и флуоресцентная микроскопия**

Лазерную сканирующую микроскопию протопластов проводили с использованием микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss, Германия) на базе AxioObserver Z1 (Zeiss, Германия), снабженного объективом LD Plan APOCHROMAT 63x/0.75, набором фильтров Set 10 (BP 450-490, FT 510, BP 515-565), лазером Argon – 458, 488, 514 нм. Результаты визуализировали с помощью цифровой камеры AxioCam MRm и программного обеспечения ZEN. Флуоресценцию в протопластах регистрировали при помощи микроскопа Axio

Imager Z2 (Zeiss, Германия) с цифровой камерой AxioCam MR и блоками фильтров: фильтр № 38 ( $\lambda_{ex}$  BP 470 нм/40 нм;  $\lambda_{em}$  BP 525 нм/50 нм, где  $ex$  – возбуждение,  $em$  – эмиссия (флуоресценция)) использовали для регистрации флуоресценции GFP; фильтр № 45 ( $\lambda_{ex}$  BP 560 нм/40 нм;  $\lambda_{em}$  BP 630 нм/75 нм) использовали для регистрации автофлуоресценции хлорофилла. Для регистрации флуоресценции витальных препаратов использовали модуль ApoTome (Zeiss, Германия), который позволяет снизить внефокусную флуоресценцию. Изображения обрабатывали, используя программу AxioVision 4.8 (Zeiss, Германия) (Тюрин и соавт., 2017).

### **2.2.7 Анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев табака**

#### *Фиксация материала*

Агроинфильтрацию проводили по описанной выше процедуре. Результат трансформации оценивали на седьмые сутки после агроинфильтрации. Получение метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) из листьев *N. benthamiana* и *N. excelsior*, трансформированных экспрессионными векторами, обеспечивающими локализацию белкового продукта гена в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР, проводили следующим образом. На первом этапе была произведена фиксация материала для дальнейшего использования. Для этого собранные листья, трансформированные экспрессионными векторами, помещали в стеклянные банки и заливали *изо*-пропанолом таким образом, чтобы листья были полностью в него погружены, после чего, выдерживали в течение 15 минут на водяной бане при +60°C. Зафиксированные образцы до анализа хранили при температуре -20°C.

#### *Получение МЭЖК*

Непосредственно получение МЭЖК производили по следующему протоколу. Гомогенизированные листья вместе с *изо*-пропанолом, в котором хранились пробы, был перенесен в круглодонную 50 мл колбу. К раствору был добавлен внутренний стандарт (гептадекановая кислота, 17:0), в количестве не

превышающим 7% от общего количества ЖК. После чего, растворитель в колбе с образцом был выпарен досуха на ротационном вакуумном испарителе. Колба была помещена в ротационный испаритель RV-10 Basic (IKA) для выпаривания избытков жидкости при температуре 60°C и скорости вращения 130 об/мин. Далее к сухому остатку в колбе добавили 25 мл раствора 4% КОН в 80% этаноле, колбу поместили в колбонагреватель и нагревали при температуре кипения смеси (~80°C) в течение 1 часа, после чего сконцентрировали содержимое колбы примерно в 5 раз на ротационном вакуумном испарителе (РВИ). Затем сконцентрированный в 5 раз раствор разбавляли дистиллированной водой до объема около 10 мл. Неомыляемые компоненты смеси экстрагировали 10-15 мл порциями *n*-гексана трижды. Для ускорения разделения фаз, пробы центрифугировали в течение 5 минут на скорости 20000 об/мин, после чего верхнюю (гексановую) фазу удаляли.

Доведение pH раствора до значения 2.5 осуществили 20% раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. К раствору добавили равный объем *n*-гексана и центрифугировали полученный раствор на скорости 20000 об/мин в течение 5 минут, затем перенесли гексановую фазу в колбу и выпаривали досуха в ротационном испарителе при температуре 60°C и скорости вращения 130 об/мин. К сухому остатку в колбе вносили 10 мл метанола, далее добавляли по каплям, при постоянном и аккуратном встряхивании, 1 мл ацетилхлорида. Получившийся раствор поместили в колбонагреватель, нагревали при температуре 80°C в течение 45 минут, выпаривали раствор досуха на ротационном испарителе и экстрагировали МЭЖК *n*-гексаном.

#### *Очистка МЭЖК с помощью препаративной тонкослойной хроматографии*

Очистку МЭЖК осуществляли с помощью препаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Kieselgel 60 (Merck) размерами 5×10 см и толщиной сорбента (силикагеля) 200 мкм, предварительно промытых 0.001% раствором 2'7'-дихлорфлюоресцеина в 50% метаноле. На стартовую зону

пластинки микрошприцем наносили раствор МЭЖК в *n*-гексане (~5-15 мг), после чего пластинку помещали в хроматографическую камеру. Подвижная фаза: *n*-гексан, диэтиловый эфир в объемном соотношении 95:5. Зону, содержащую МЭЖК, обнаруживали в УФ  $\lambda=365$  нм. Сорбент, содержащий МЭЖК, переносили в колбу Бунзена с фильтрующей воронкой, и бензолом элюировали МЭЖК. Растворитель упаривали досуха на РВИ и перерастворяли МЭЖК в 500 мкл *n*-гексана

### *Определение содержания и состава жирных кислот*

Состав метиловых эфиров жирных кислот определяли с помощью газожидкостной хроматографии / масс-спектрометрии (ГЖХ-МС) на приборе Agilent 7890AGC (Agilent Technologies, Inc., США) с 60-м капиллярной колонкой DB-23 с внутренним диаметром 0.25 мм с привитой (50% цианопропил) метилполисилоксановой полярной жидкой фазой (толщина слоя 0.25 мкм). Условия разделения: расход газа-носителя (гелия) 1 мл/мин; объем пробы 1 мкл; делитель потока 1:20, температура испарителя 260°C. Программа градиента температуры колонки: от 130°C до 170°C со скоростью 6.5°C/мин, от 170°C до 215°C со скоростью 2.75°C/мин, выдержка при 215°C в течение 25 мин, от 215°C до 240°C со скоростью 40°C/мин и выдержка при 240°C в течение 50 мин. Рабочая температура МС-детектора (5975C MSD) составляла 240°C, энергия ионизации 70 эВ.

Результаты хроматографического анализа получали в виде хроматограммы. Идентификацию МЭЖК осуществляли путем сравнения их времени удержания со временем удержания стандартного соединения (гептадекановой кислоты, 17:0). Массовые доли (содержание) ЖК определяли в процентах от их общего содержания в исследуемом образце по формуле:

$$M\% = (S_i/S_{17:0}) \cdot 100\%$$

где  $S_i$  – площадь пика определяемой ЖК,  $S_{17:0}$  – площадь пика стандартного соединения.

Для оценки степени ненасыщенности ЖК в исследуемых образцах использовали индекс ненасыщенности (ИН), который рассчитывали по методу Lyons et al. (Lyons, 1964) по следующей формуле:

$$\text{ИН} = ((\text{М}) + 2 * (\text{Д}) + 3 * (\text{Т})) / 100$$

где М – сумма массовых долей моновенасыщенных ЖК, Д – сумма массовых долей дивенасыщенных ЖК, Т – сумма массовых долей тривенасыщенных ЖК.

Оценку активности Δ9 десатуразы проводили по отношению продукта реакции десатурации к его субстрату по формуле:

$$\text{Продукт/субстрат} = (\%18:1) / (\%18:0)$$

где %18:1 – массовая доля олеиновой кислоты, %18:0 – массовая доля стеариновой кислоты.

Стеароил-десатуразное отношение (СДО) определяли по формуле:

$$\text{СДО} = (\%18:1) / (\%18:0 + \%18:1).$$

Пальмитоил- десатуразное отношение (ПДО) определяли по формуле:

$$\text{ПДО} = (\%16:1) / (\%16:0 + \%16:1)$$

где %16:0 – массовая доля пальмитиновой кислоты 16:0, %16:1 – массовая доля пальмитолеиновой кислоты.

### 2.3 Статистический анализ

Все эксперименты по изучению субклеточной локализации Δ9 ацил-липидной десатуразы были повторены независимо не менее трех раз. Для определения локализации целевых белков в протопластах проанализировано не менее 100 биологических образцов.

Все эксперименты по трансформации листьев каждого из видов табака с дальнейшим анализом ЖК состава суммарных липидов были повторены независимо не менее шести раз. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica v. 9.0 и Microsoft Office Excel 2007. Достоверность различия значений определялось с помощью парного t-критерия Стьюдента (применяли t-критерий Стьюдента,  $p \leq 0.05$ ). На графиках,



построенных по полученным данным, представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Конструирование растительных экспрессионных векторов

Две серии экспрессионных векторов были сконструированы. В первой серии векторов - pVIG-D9E, pVIG-Lch-D9E и pVIG-LeB4-D9E-ER – использован *desC-egfp* гибридный ген, который получен слиянием *desC* гена, кодирующего  $\Delta 9$ -десатуразу цианобактерий, и *egfp*, белковым продуктом которого является оптимизированный для экспрессии в клетках эукариот зеленый флуоресцентный белок (Рисунок 6). Отметим, что в гибридном гене стартовый кодон для флуоресцентного белка удален во избежание альтернативной трансляции. Во второй серии векторов - pVIG-D9, pVIG-Lch-D9 и pVIG-LeB4-D9-ER – использован только нативный *desC* ген цианобактерий (Тюрин и соавт., 2017).

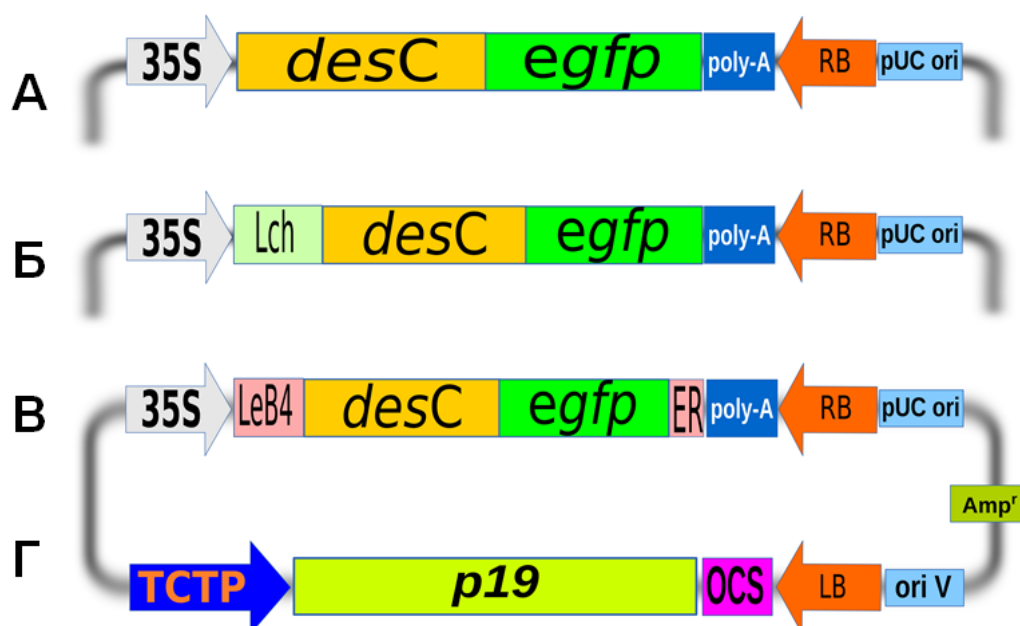


Рисунок 6. Схема векторных конструкций, использованных для исследования локализации  $\Delta 9$  десатуразы в компартментах клеток листьев *N. benthamiana*: pVIG-D9E (А); pVIG-Lch-D9E (Б) и pVIG-LeB4-D9E-ER (В), общая часть векторных конструкций (Г). Каждая конструкция содержит общую часть, представленную только на панели «Г», и несет ген вируса *Cymbidium ringspot* (CymRSV), кодирующий белок-супрессор «замолкания» генов (p19) под контролем промотора гена, кодирующего белок трансляционного контроля опухоли (TCTP) и терминирующей последовательности гена октопин синтетазы

(OCS). Обозначения на схеме: LB и RB – левая и правая граница T-ДНК области; oriV – точка начала репликации для *Agrobacterium tumefaciens*; Amp<sup>r</sup> – кассета устойчивости к ампицилину; и pUC ori – точка начала репликации для *Escherichia coli*; 35S – CaMV 35S промотор; poly-A – сигнал полиаденирования; egfp – ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок; desC – ген, кодирующий  $\Delta 9$  десатуразу *Synechococcus sp.*; Lch – лидерный сигнал, гена малой субъединицы РБФК *A. thaliana*; LeB4 – лидерный сигнал гена LeB4 (легумина типа B4) гороха (*Vicia faba*); ER – последовательность (SKDREL) в 3'-концевой области целевого гена, кодирующая аминокислоты С-концевой области белка (Тюрин и соавт., 2017).

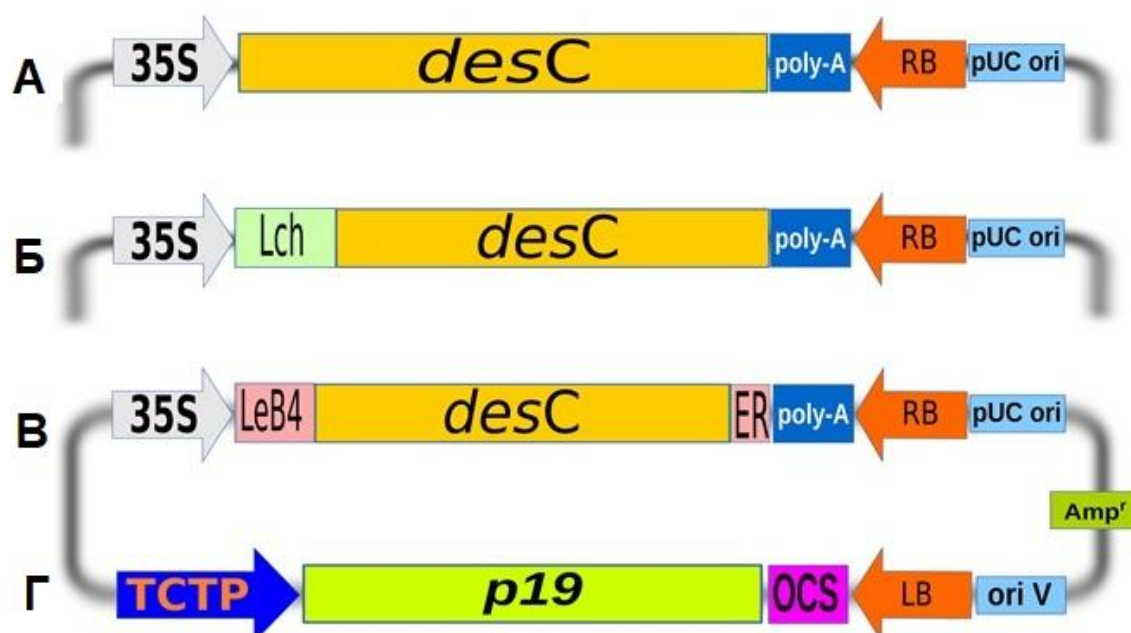


Рисунок 7. Схема векторных конструкций, использованных для исследования локализации  $\Delta 9$  десатуразы в компартментах клеток листьев *N. benthamiana*: pVIG-D9 (А); pVIG-Lch-D9 (Б) и pVIG-LeB4-D9-ER (В), общая часть векторных конструкций (Г). Обозначения аналогичны рисунку 6.

В pVIG-Lch-D9 и pVIG-Lch-D9E векторах нативный (*desC*) и гибридный (*desC-egfp*) ген, соответственно, имеет в 5'-области хорошо охарактеризованный сигнал, обеспечивающий локализацию целевых белков в хлоропласты (Рисунок 6Б, 7Б) (Герасименко и соавт., 2015). В экспрессионных векторах pVIG-LeB4-D9-

ER и pVIG-LeB4-D9E-ER в 5'-области целевых генов (*desC* и *desC-egfp*) клонирована последовательность, соответствующая сигнальному пептиду LeB4 для локализации белкового продукта в ЭПР, а в 3'-области добавлен фрагмент, кодирующий сигнал удержания белков в ЭПР – ER (Рисунок 6В, 7В) (Вячеславова и соавт., 2012; Alanen et al., 2011). В векторах pVIG-Lch-D9, pVIG-Lch-D9E, pVIG-D9-ER и pVIG-D9E-ER иницирующий трансляцию AUG кодон введен в 5'-область последовательности, кодирующей сигнальный пептид Lch и LeB4, и удален у целевых генов, во избежание альтернативной трансляции.

В pVIG-D9 и pVIG-D9E экспрессионных векторах целевые гены (*desC* и *desC-egfp*) не содержат дополнительных сигнальных последовательностей ни в 5'-, ни в 3'-области, и их экспрессия контролируется только промотором 35S РНК CaMV, что не предполагает какой-либо специфической компартментализации белковых продуктов этих генов (Рисунок 6А, 7А). Все векторы созданы на основе pVIG-T конструкции, разработанной нами ранее специально для эффективной транзientной экспрессии гетерологичных генов в растениях (Вячеславова и соавт., 2012). Т-ДНК область этого вектора несет последовательность гена p19, вируса томатов, который кодирует супрессор посттранскрипционного замолкания генов, под контролем ТСТР промотора (Рисунок 6Г, 7Г) (Вячеславова и соавт., 2012). Первая серия векторов была использована для изучения субклеточной локализации гетерологичной десатуразы в растительных клетках, вторая серия – для сравнительного анализа модуляции ЖК состава мембранных липидов растений в зависимости от субклеточной локализации гетерологичной  $\Delta 9$ -десатуразы (Тюрин и соавт., 2017).

### **3.2 Агроинфильтрация растений табака и оценка экспрессии гибридного гена в растительных тканях**

Для агроинфильтрации растений *N. benthamiana* были получены штаммы *A. tumefaciens* GV3101, несущие экспрессионные векторы pVIG-D9E, pVIG-Lch-D9E и pVIG-LeB4-D9E-ER. Эффективность транзientной экспрессии в растениях оценивали по флуоресценции репортерного белка eGFP. Через два-три дня после

инфильтрации, очевидный GFP сигнал можно было наблюдать в агроинфильтрированных участках листьев, а пик флуоресценции eGFP был отмечен на четвертый-пятый день (Рисунок 8) (Тюрин и соавт., 2017).

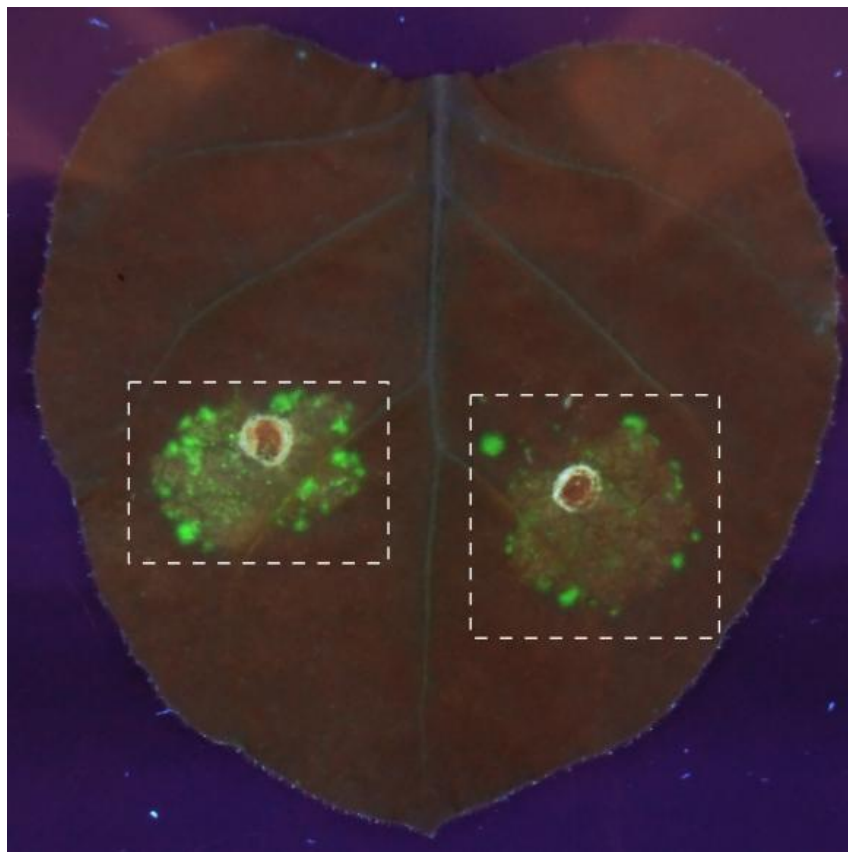


Рисунок 8. Флуоресценция GFP в агроинфильтрированных листьях *N. benthamiana*: Агробактерии, несущие кассеты экспрессии слитых с GFP белков были инфильтрированы в листья *N. benthamiana* и флуоресценцию GFP наблюдали через 4 дня после агроинфильтрации при УФ свете. Области флуоресценции отмечены пунктирными линиями (Тюрин и соавт., 2017).

### 3.3 Выделение протопластов и оценка локализации белковых продуктов

В этот период (4-5 дней после агроинфильтрации) были взяты участки листьев с максимальным уровнем флуоресценции для последующей оценки локализации белковых продуктов методом лазерной конфокальной микроскопии. Однако визуализация локализации гибридного белка по флуоресценции в специфических компартментах клетки с использованием агроинфильтрированной

ткани затруднена и идеальных отображений локализации белков, как в хлоропластах, так и ЭПР не удалось получить (Рисунок 9) (Тюрин и соавт., 2017).

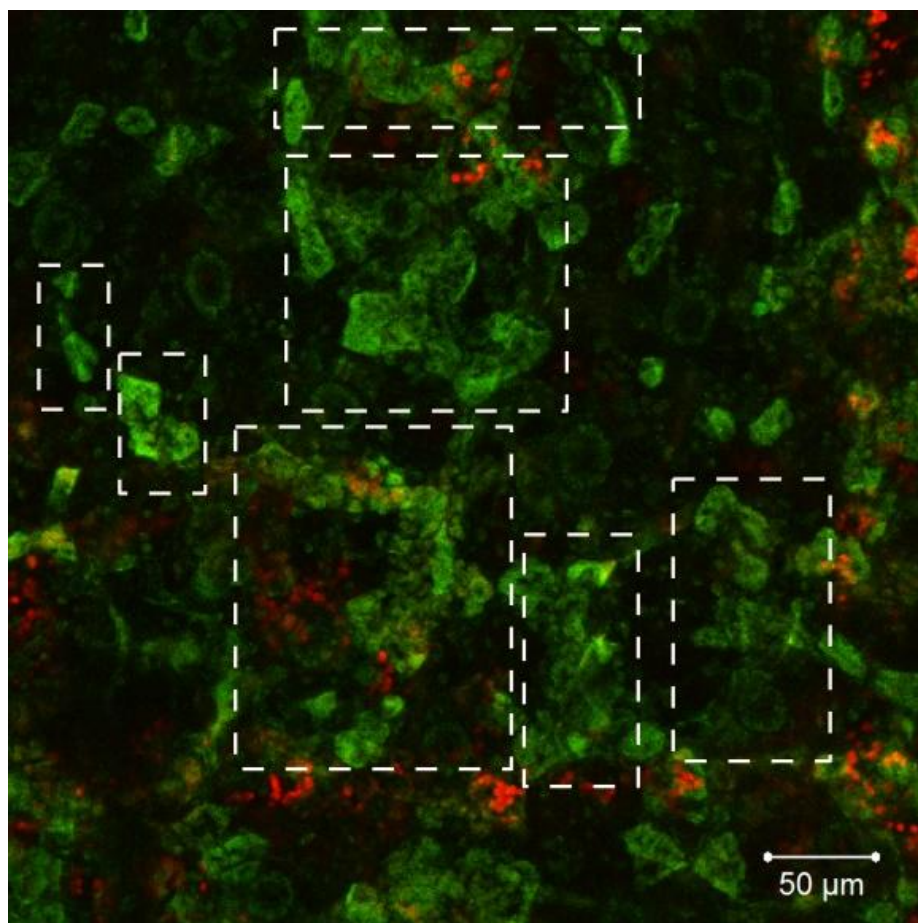


Рисунок 9. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия: флуоресценция GFP. Агробактерии, несущие экспрессионные вектор pVIG-Lch-D9E были инфильтрированы в листья *N. benthamiana* и флуоресценцию GFP наблюдали через 4 дня после агроинфильтрации. Размерность 50 μm. Области флуоресценции отмечены пунктирными линиями (Тюрин и соавт., 2017).

Вероятно, это обусловлено сложными очертаниями клеток, а также сложной пространственной структурой самих растительных компартментов и их локализацией внутри клетки. Схожие ограничения для визуализации локализации белков в растительных клетках при использовании метода агроинфильтрации отмечены и другими исследователями (Wang et al., 2015; Xu et al., 2014, Тюрин и соавт., 2017).

Для того чтобы преодолеть трудности в визуализации локализации белков в специфических компартментах растительной клетки при агроинфильтрации, провели эксперименты, дающие возможность проверить, могут ли протопласты, полученные из клеток агроинфильтрированной области листьев, использоваться для точной оценки субклеточной локализации белков. Возможность использования такого протокола базируется на том, что флуоресцентные слитые белки, будучи идеальными маркерами для визуализации субклеточной локализации белков, характеризуются стабильностью и, как следствие, стабильной флуоресценцией в живых клетках (Тюрин и соавт., 2017).

Первоначально, мы оптимизировали протокол выделения протопластов из табака, что позволило обеспечить достаточно большой выход жизнеспособных протопластов пригодных для флуоресцентной микроскопии. При оптимизации протокола выделения протопластов и последующего его применения для субклеточной локализации гибридных белков методом флуоресцентной микроскопии использовали участки листьев *N. benthamiana* с максимальным уровнем флуоресценции (Рисунок 8) (Тюрин и соавт., 2017).

Получение протопластов из растительной ткани, агроинфильтрированной штаммами агробактерий с разными экспрессионными векторами, и их анализ методом флуоресцентной микроскопии, показали, что флуоресценция всегда обнаруживалась в предсказанных органеллах протопластов (Рисунок 10) (Тюрин и соавт., 2017).



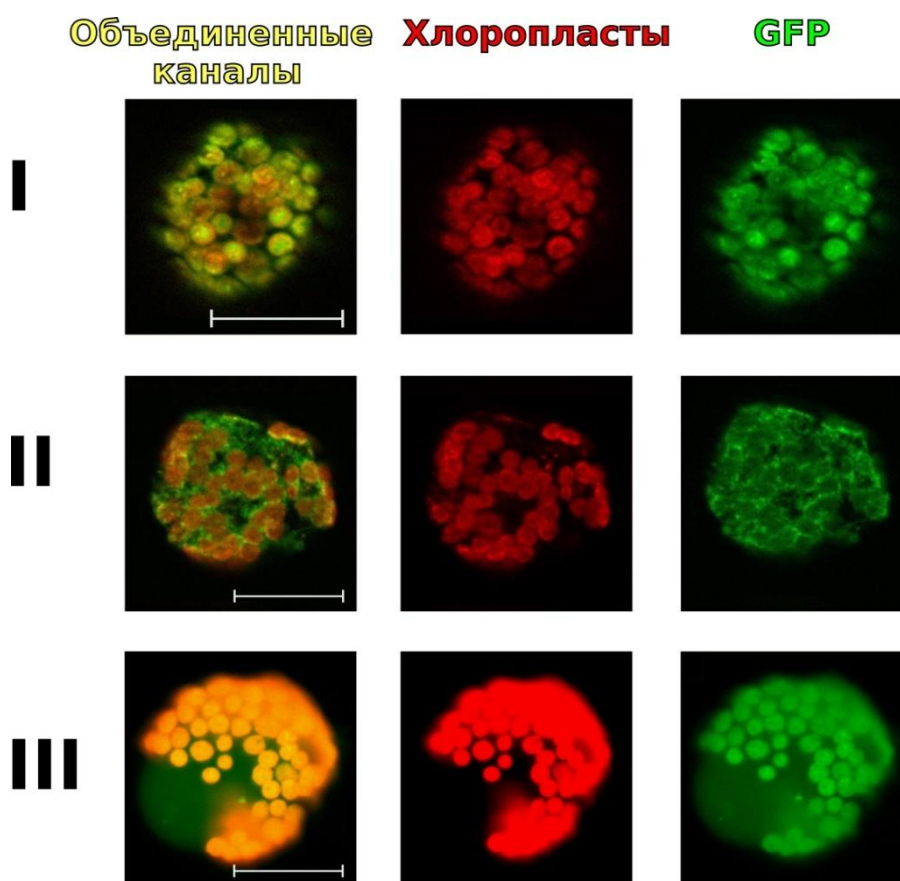


Рисунок 10. Анализ субклеточной локализации слитых с GFP белков в протопластах табака, полученных из клеток агроинфицированной области листьев. Транзистентная экспрессия pVIG-Lch-D9E, pVIG-LeB4-D9E-ER и pVIG-D9E векторов показывает, что GFP слитый белок локализован в хлоропластах (I), в ЭПР (II) и цитоплазме (III), соответственно. Объединенные рисунки (первая колонка) включает зеленый канал (последняя колонка) и канал автофлуоресценции хлоропластов (средняя колонка). Размерность 40 мкм (Тюрин и соавт., 2017).

Так, в протопластах, полученных после агроинфекции штаммом, несущим pVIG-Lch-D9E плазмиду, практически все хлоропласты продемонстрировали флуоресценцию в жёлтой части спектра (Рисунок 10, I), что свидетельствует о хлоропластной локализации DesC-EGFP слитого белка, который переносится в эти компартменты за счет сигнальной последовательности (Lch) малой субъединицы РБФК *A. thaliana* (Тюрин и соавт., 2017).



Добавление N-концевого сигнального пептида LeB4 индуцирует перенос химерного белка DesC-EGFP через мембрану ЭПР, а С-концевой сигнал SRKDEL у химерного белка удерживает его в ЭПР, в результате этого, сигнал флуоресценции от слитого белка был успешно выявлен в ЭПР протопластов, полученных после агроинfiltrации штаммом, несущим pVIG-LeB4-D9E-ER вектор (Рисунок 10, II) (Тюрин и соавт., 2017).

Протопласты, полученные из агроинfiltrированных листьев штаммом, несущим pVIG-D9E вектор, показали сигнал флуоресценции слитого белка DesC-EGFP в цитоплазме (Рисунок 10, III) (Тюрин и соавт., 2017).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что в протопластах из агроинfiltrированных участков растений можно четко дискриминировать локализацию слитых белков в ожидаемых компартментах (Тюрин и соавт., 2017).

### **3.4 Анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев *Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana excelsior***

*Анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев N. benthamiana и N. excelsior трансформированных вектором, несущим ген egfp*

Следует отметить, что метод транзientной экспрессии в растениях для оценки функциональной активности десатураз ранее не был использован. Этот метод сопряжен хоть и с незначительным, но поранением листьев при агроинfiltrации. На сегодняшний день известно, что экспрессия десатураз жирных кислот растений, в том числе и  $\Delta 9$  десатуразы, может активироваться в ответ на поранение (Dar et al., 2017; Xue et al., 2018). В связи с этим, первоначально мы попытались выяснить, может ли измениться профиль ЖК после применения процедуры агроинfiltrации, и таким образом получить ответ о возможности применения метода транзientной экспрессии для последующей оценки функциональной активности десатуразы (Berestovoy et al., 2020).

Для этого провели сравнительный анализ ЖК состава, а также рассчитали ИН, соотношение ЖК 18:1 к 18:0 (СДО) и ЖК 16:1 к 16:0 (ПДО) в контрольных, нетрансформированных листьях растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* (далее обозначены как НТ-растения), а так же в листьях растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*, к которым применена агроинфильтрация штаммом агробактерий, несущим экспрессионный вектор pVIG-E, с конститутивной экспрессией репортерного *egfp* гена (далее обозначены как Т-растения) (Berestovoy et al., 2020).

После агроинфильтрации у *N. benthamiana* отмечено достоверное снижение только ЖК 18:1 и 16:3, а также СДО (Таблица 2). В отношении композиции ЖК в листьях контрольных и агроинфильтрированных растений *N. excelsior*, нами отмечено достоверное снижение содержания ЖК 18:1, 16:3 и СДО, так и статистически значимое увеличение ЖК 16:1 (Таблица 3) (Berestovoy et al., 2020).

В целом полученные результаты демонстрируют, что агроинфильтрация, как потенциально возможный стрессовый фактор (поранение), по-видимому, не вызывает заметную активацию экспрессии растительных десатураз, включая и  $\Delta 9$  десатуразу, поскольку профили линолевой (18:2), линоленовой кислоты (18:3), и значения ИН остались неизменными, а содержание олеиновой кислоты (18:1) и СДО достоверно снизились при агроинфильтрации, как *N. benthamiana*, так и *N. excelsior* (Таблица 2, 3) (Berestovoy et al., 2020).

Таким образом, полученные данные, в целом, позволяют предположить, что транзистная экспрессия генов в растении за счет агроинфильтрации подходит для оценки функциональной активности  $\Delta 9$  десатураз и агроинфильтрация штаммом, несущим вектор pVIG-E с конститутивной экспрессией репортерного *egfp* гена, может быть применена как обоснованный и надежный контроль (Berestovoy et al., 2020).

Дополнительно, основываясь на полученных данных ЖК профиля у НТ-растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*, сравнили соотношения ЖК 18 к ЖК 16 (C18/C16) у этих двух видов табака, и выяснили, что это соотношение значительно отличается. Так, для *N. benthamiana* C18/C16 составило 2.4:1, а для *N.*

*excelsior* - 1:1. Помимо этого, отмечены и различия в ИН и ПДО, которые у *N. benthamiana* достоверно выше по сравнению с *N. excelsior* (Таблица 4). Таким образом, два вида табака, выбранных нами в качестве модельных растений для оценки функциональной активности гетерологичной десатуразы, в отношении ЖК состава могут быть отнесены к разным типам растений: C18 – *N. benthamiana* и C16 - *N. excelsior* (Berestovoy et al., 2020).

Таблица 2. ЖК состав листьев нетрансформированных (НТ) и трансформированных (Т) растений *N. benthamiana*.

[illegible]

Таблица 3. ЖК состав листьев нетрансформированных (НТ) и трансформированных (Т) растений *N. excelsior*. Значение  $\pm$  стандартная ошибка 6 экспериментов (Berestovoy et al., 2020).

[illegible]

Таблица 4. ЖК состав листьев нетрансформированных (НТ) растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*. Значение  $\pm$  стандартная ошибка (Berestovoy et al., 2020).

|                              | <b>16:0</b>         | <b>16:1</b>        | <b>16:3</b>        | <b>18:0</b>        | <b>18:1</b>        | <b>18:2</b>        | <b>18:3</b>         | <b>ИН</b>          | <b>СДО</b>         | <b>ПДО</b>         |
|------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b><i>N. benthamiana</i></b> | 20.15 $\pm$<br>0.82 | 2.75 $\pm$<br>0.31 | 4.30 $\pm$<br>0.18 | 3.73 $\pm$<br>0.28 | 2.60 $\pm$<br>0.10 | 8.74 $\pm$<br>0.38 | 49.36 $\pm$<br>1.70 | 1.94 $\pm$<br>0.08 | 0.40 $\pm$<br>0.06 | 0.12 $\pm$<br>0.01 |
| <b><i>N.eexcelsior</i></b>   | 39.56 $\pm$<br>0.93 | 1.85 $\pm$<br>0.42 | 4.89 $\pm$<br>0.21 | 9.05 $\pm$<br>0.24 | 5.08 $\pm$<br>0.86 | 12.7 $\pm$<br>0.42 | 23.38 $\pm$<br>1.1  | 1.18 $\pm$<br>0.06 | 0.34 $\pm$<br>0.04 | 0.04 $\pm$<br>0.02 |

*Анализ жирнокислотного состава суммарных липидов тканей листьев Nicotiana benthamiana и N. excelsior экспрессирующих ген desC в различных компартментах клетки*

Для оценки функциональной активности гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы в зависимости от ее локализации в растительной клетке были использованы штаммы агробактерий, несущих вторую серию векторов, в которых ген гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы не имеет сигнальной последовательности (pVIG-D9, Рисунок 7А), или слитый с сигнальными последовательностями (pVIG-Lch-D9 - Рисунок 7Б, и pVIG-D9-ER – Рисунок 7В), для того, чтобы обеспечить локализацию целевого белка в разных субклеточных компартментах растений (хлоропласт и ЭПР). Эксперимент был проведен на двух видах модельных растений табака *N. benthamiana* и *N. excelsior*. В этих экспериментах в качестве контроля использовали агроинфильтрацию модельных растений штаммом, несущим вектор pVIG-E (конститутивная экспрессия репортерного *egfp* гена) (Berestovoy et al., 2020).

Функциональную активность десатуразы исследовали путем сравнения профилей жирных кислот. Сравнительный анализ ЖК состава, СДО, ПДО и ИН, показал достоверное увеличение содержание только ЖК 18:2 и 18:3, а также ИН в листьях агроинфильтрированных растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* по сравнению с контролем. При этом увеличение ЖК 18:3 и ИН не зависело от локализации  $\Delta 9$  десатуразы в компартментах растительной клетки, тогда как увеличение ЖК 18:2 характерно только при локализации  $\Delta 9$  десатуразы в хлоропластах и ЭПР, но не в цитоплазме. Помимо этого, содержание ЖК 16:1 осталось без изменений у всех вариантов агроинфильтрированных *N. benthamiana* и *N. excelsior*, в отличие от ЖК 16:0 и ЖК 16:3. Так, для ЖК 16:0 отмечено достоверное снижение у всех вариантов растений, за исключением варианта с хлоропластной локализацией для *N. benthamiana*, но при этом следует особо отметить, что все варианты *N. excelsior* характеризуются значительным снижением содержания ЖК 16:0 (в среднем в 10 раз). Содержание ЖК 16:3 достоверно увеличено у всех агроинфильтрированных вариантов *N. benthamiana*,

но не *N. excelsior*, для которого достоверное увеличение отмечено только при локализации  $\Delta 9$  десатуразы в цитоплазме и хлоропластах, но не в ЭПР. Сравнительный анализ ЖК 18:0 и ЖК 18:1 у всех агроинфильтрированных вариантов *N. benthamiana* и *N. excelsior* позволил выявить некоторые особенности этих показателей. Так, количество ЖК 18:0 достоверно увеличено у всех агроинфильтрированных вариантов *N. benthamiana* и *N. excelsior*, за исключением варианта *N. benthamiana* с локализацией гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы в цитоплазме. Однако, все варианты *N. excelsior* характеризуются существенным увеличением количества ЖК 18:0 (более чем в 3 раза). Содержание ЖК 18:1 имеет противоположные тенденции у агроинфильтрированных вариантов *N. benthamiana* и *N. excelsior*: если для всех вариантов локализации гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. benthamiana* отмечено достоверное увеличение ЖК 18:1, то у *N. excelsior* – достоверных изменений ЖК 18:1 не выявлено (Berestovoy et al., 2020).

При сравнении ПДО и СДО также отмечены противоположные тенденции для агроинфильтрированных вариантов *N. benthamiana* и *N. excelsior*. Так для всех вариантов локализации гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы, за исключением локализации в ЭПР, у *N. benthamiana* отмечено достоверное увеличение СДО, и только для варианта с локализацией в ЭПР – достоверное увеличение ПДО. Для *N. excelsior* – СДО снижается, в отличие от ПДО, которое демонстрирует существенное увеличение (в среднем в 10 раз) (Таблица 5, 6) (Berestovoy et al., 2020).

Таким образом, эти результаты демонстрируют, что термофильная цианобактериальная  $\Delta 9$  десатураза, транзистентно экспрессированная в двух видах табака, вызывает значительные изменения в липидном метаболизме листьев в сторону увеличения ненасыщенности жирных кислот и ее функциональная активность может зависеть как от использованного вида модельного растения - *N. benthamiana* и *N. excelsior*, так и от локализации DesC в растительной клетке (Berestovoy et al., 2020).

Таблицы 5. ЖК состав трансформированных листьев *N. benthamiana* на 7 сутки после трансформации. Значения  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам (Berestovoy et al., 2020).

[illegible]



Таблицы 6. ЖК состав трансформированных листьев *N. excelsior* на 7 сутки после трансформации. Значения  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам (Berestovoy et al., 2020).

[illegible]

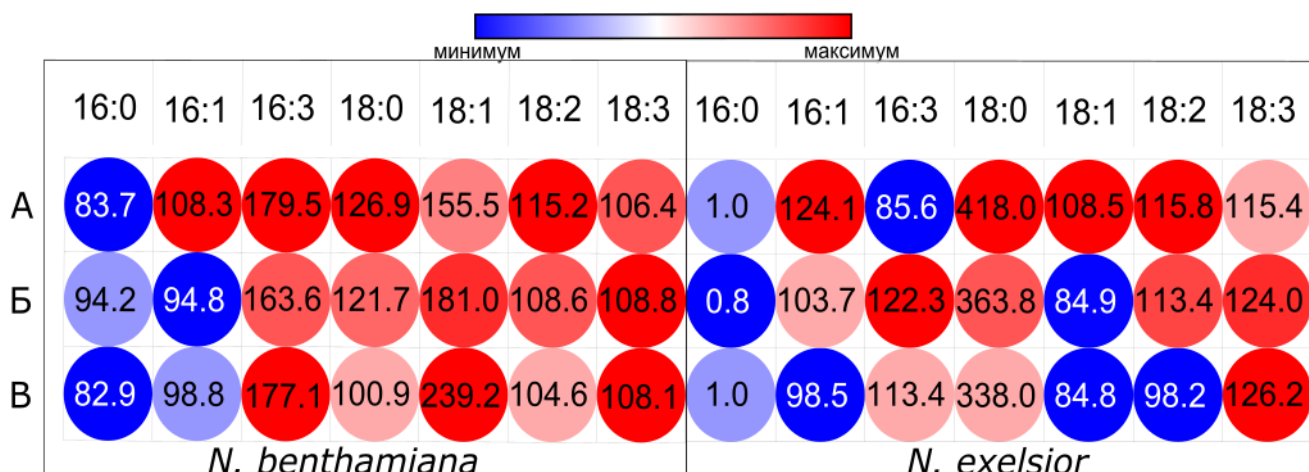


Рисунок 11. Тепловая карта изменений содержания ЖК в листьях трансформированных растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* в процентах от контроля (pVIG-E) принятого за 100%, на 7 день после трансформации при локализации  $\Delta 9$  десатуразы в цитоплазме (А), хлоропластах (Б), и ЭПР (В) (Berestovoy et al., 2020).

### 3.5 Определение оптимальной внутриклеточной локализации $\Delta 9$ десатуразы

По нашему мнению, наиболее наглядным параметром оценки величины активности гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы, в том или ином компартменте растительной клетки, является значение отношения продукт/субстрат реакции десатурации. Данный параметр непосредственно отражает величину активности  $\Delta 9$  десатуразы, поскольку  $\Delta 9$  десатураза специфична в отношении стеариновой кислоты (вводит двойную связь между 9 и 10 атомом углерода в ацильной цепи жирной кислоты). Сравнение отношения продукт/субстрат показало, что наибольшая активность гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. benthamiana* наблюдается в хлоропластах ( $p \leq 0.01$ ) (Рисунок 11), а у *N. excelsior* в ЭПР ( $p \leq 0.05$ ) (Рисунок 12) (Berestovoy et al., 2020).

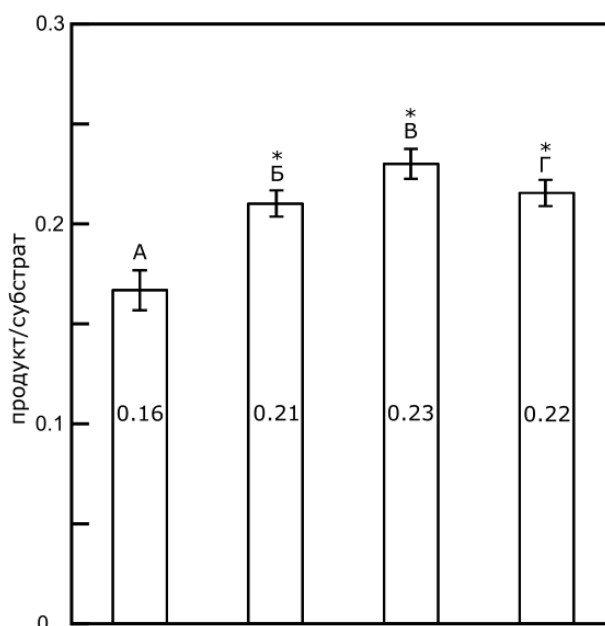


Рисунок 11. Отношение продукт/субстрат в трансформированных листьях *N. benthamiana*. А – контроль (pVIG-E, экспрессия eGFP белка). Б – цитоплазматическая локализация  $\Delta 9$  десатуразы. В – хлоропластная локализация  $\Delta 9$  десатуразы. Г – локализация  $\Delta 9$  десатуразы в ЭПР. Значение  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам. \* – достоверное отличие значения от контроля (pVIG-E, экспрессия eGFP белка),  $p \leq 0.01$  (t-критерий Стьюдента) (Berestovoy et al., 2020).

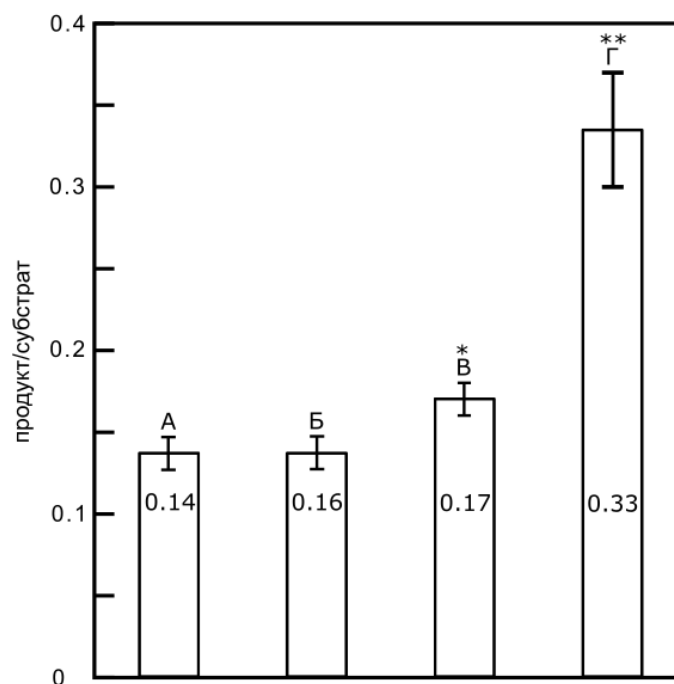


Рисунок 12. Отношение продукт/субстрат в трансформированных листьях *N. excelsior*. А – контроль (pVIG-E, экспрессия eGFP белка). Б – цитоплазматическая локализация  $\Delta 9$  десатуразы. В – хлоропластная локализация  $\Delta 9$  десатуразы. Г – локализация  $\Delta 9$  десатуразы в ЭПР. Значение  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам. \*, \*\* – достоверное отличие значения от контроля (pVIG-E, экспрессия eGFP белка),  $p \leq 0.01$  и  $p \leq 0.05$  соответственно (t-критерий Стьюдента) (Berestovoy et al., 2020).

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе была произведена попытка ответить на следующие вопросы:

- можно ли в принципе применить подход транзientной экспрессии генов в модельных растениях табака для изучения функциональной активности десатураз, на примере гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы;
- есть ли преференции у одного из выбранных компартментов растительной клетки (цитоплазма, хлоропласт и ЭПР) для функционирования гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы;
- зависит ли функциональная активность гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы от использованного вида модельного растения - *N. benthamiana* и *N. excelsior*.

Цианобактериальная  $\Delta 9$  десатураза *S. vulcanus* была выбрана с опорой на ранее полученные предсказания и экспериментальные данные. Известно о гомологии ацил-КоА десатураз (ADS) растений и  $\Delta 9$  ацил-липидных десатураз цианобактерий (Bryant et al., 2016; Chen, Thelen, 2016; Smith et al., 2016; Los et al., 2013). Термофильная  $\Delta 9$  ацил-липидная десатураза при конститутивной экспрессии в трансгенных растениях табака (*Nicotiana tabacum*) и с локализацией в цитоплазме (Orlova et al., 2003) или хлоропластах (Герасименко и соавт., 2015) эффективно превращает стеариновую кислоту (18:0) в олеиновую кислоту (18:1) и вызывает значительные изменения в липидах мембран листьев в сторону увеличения ненасыщенности жирных кислот (Герасименко и соавт., 2015; Orlova et al., 2003). И наконец, термофильная  $\Delta 9$  ацил-липидная десатураза может распознавать и десатурировать два субстрата - липид-связанные жирные кислоты 16:0 и 18:0 (Kiseleva et al., 2000), проявляя предпочтение к стеариновой ЖК (18:0) и незначительную специфичность в отношении пальмитиновой ЖК (16:0) (1% по сравнению с ЖК 18:0) при экспрессии в *N. tabacum* (Герасименко и соавт., 2015; Orlova et al., 2003).

Для изучения физиологической роли генов, а также для оценки функциональной активности продуктов целевых генов исследователи используют разнообразные генно-инженерные подходы, включая создание трансгенных растений с экспрессией целевых генов и выключение экспрессии целевых генов за счет применения технологии РНК-интерференции. Следует отметить, что системы стабильной трансформации для многих растений достаточно сложно разработать, а стратегии на основе эктопической экспрессии, несмотря на их применимость, даже в модельных растениях *A. thaliana*, требуют значительных временных и материальных затрат. Учитывая, что для ряда видов табака, и, в частности, для *N. benthamiana* и *N. excelsior*, разработаны высокоэффективные системы транзientной экспрессии (Gerasymenko et al., 2019), в настоящее время функции многих белков, в том числе и в растениях, идентифицированы и прояснены на основе данных о транзientной экспрессии целевых генов в этих растениях табака (Anwar et al., 2018; Ji et al., 2018; Li et al., 2019; Sheludko et al., 2018; Thodberg et al., 2018).

Растения имеют много десатураз жирных кислот, которые отвечают за синтез большей части ПНЖК. Их важная роль для изменения составов жирных кислот в семенах масличных культур, а также в жизнедеятельности растений при действии биотических и абиотических стрессов подтверждена экспериментально (Craig et al., 2008; Los et al., 2013; Orlova et al., 2003; Shi et al., 2018; Smith et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Однако многие представители этого класса ферментов остаются, не охарактеризованы с точки зрения их функциональной активности, субстратной специфичности, и их физиологической роли в растительных клетках. Это зачастую обусловлено трудоемкостью генно-инженерных подходов и длительностью проводимых манипуляций, как правило, используемых в таких исследованиях. В связи с вышеизложенным, возникает вопрос можно ли оценить функциональную активность гетерологичной десатуразы, используя метод транзientной экспрессии генов в растениях, как надежный и простой подход для изучения функции генных продуктов?

Сохранение, в целом, профиля ЖК в листьях растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* при их трансформации вектором VIG-E по сравнению с растениями дикого типа (Таблица 2 и 3), позволило сделать обоснованное заключение о том, что метод транзientной экспрессии генов в растениях может быть применен для оценки активности гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы. При этом агроинфильтрация штаммом, несущим вектор pVIG-E, определена как корректный контроль для этих исследований.

Как отмечено выше,  $\Delta 9$  ацил-липидная десатураза может катализировать десатурацию двух субстратов - ЖК 16:0 и 18:0 (Kiseleva et al., 2000). Результаты сравнительного анализа ЖК профиля у растений дикого типа *N. benthamiana* и *N. excelsior*, дали возможность отнести эти модельные растения к двум разным типам в отношении ЖК композиции, а именно, *N. benthamiana* является представителем C18 типа, а *N. excelsior* - C16 (Таблица 4). В связи с этим, можно ожидать, что в этих двух модельных растениях гетерологичная  $\Delta 9$  десатураза будет иметь разное предпочтение к одному из субстратов, ЖК 16:0 - у *N. excelsior* и ЖК 18:0 – у *N. benthamiana*.

Для того чтобы выяснить применимость транзientной экспрессии в модельных растениях табака для изучения функциональной активности и/или субстратной специфичности гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы, проведен сравнительный анализ композиции ЖК у растений агроинфильтрированных штаммами, несущими вектор pVIG-E и векторами, несущими целевой ген цианобактериальной  $\Delta 9$  десатуразы (далее, будут обозначены как DesC растения) (Таблица 2 и 3). Нами отмечены разные эффекты у двух модельных видов табака оказываемые на состав и содержание ЖК. Так, детальный сравнительный анализ состава жирных кислот у *N. benthamiana* показал следующее: уровень одной из основных насыщенных кислот - 16:0 снизился, а другой - 18:0 – увеличился. При этом количество мононенасыщенной ЖК 16:1 не изменилось, а количество 18:1 достоверно увеличилось (Таблица 5, Рисунок 11). Помимо этого, у растений транзientно экспрессирующих  $\Delta 9$  десатуразу отмечено значительное увеличение и основных триеновых жирных кислот - 16:3 и 18:3, а также индекса

ненасыщенности (ИН) (Таблица 5, Рисунок 11). Следовательно, весьма вероятно, что транзистная экспрессия гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы привела к накоплению конечных продуктов вследствие большей доступности промежуточных продуктов и/или прямой активации ферментов, которые выполняют последующие стадии десатурации. Это явление отмечено и в трансгенных растений, стабильно экспрессирующих гетерологичные  $\Delta 9$  десатуразы, в том числе и из *S. Vulcanus* (Герасименко и соавт., 2015; Bryant et al., 2016; Craig et al., 2008; Dar et al., 2017; Los et al., 2013; Zhao et al., 2015).

При сравнении профиля ЖК у *N. excelsior* показано, что при транзистной экспрессии гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы изменяются уровни основных насыщенных кислот (по сравнению с *N. benthamiana*) (Рисунок 11). Так, количество ЖК 16:0 и 18:0 драматическое снижается и увеличивается, соответственно, но при этом достоверно увеличивается только количество мононенасыщенной ЖК 16:1, а количество 18:1, в целом, сохраняется на уровне контроля (Таблица 6, Рисунок 11). Помимо этого, при экспрессии гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. excelsior* также значительно изменилось соотношение C18/C16 (1:3 – для НТ-растений и pVIG-E растений и 10:1 – для DesC растений). Увеличение соотношения C18/C16, а также увеличение абсолютных количеств жирных кислот C18, с соответственным снижением ЖК C16, в листьях DesC растений потенциально может быть вызвано повышенной активностью синтазы жирных кислот II, которая, вероятно, происходит по причине увеличения потребления стеариновой кислоты за счет высокой экспрессии  $\Delta 9$  десатуразы (Orlova et al., 2003). Этот механизм клеточной регуляции, по всей видимости, необходим для поддержания общего уровня ненасыщенности, с целью сохранения оптимальной текучести мембран при нормальных условиях жизнедеятельности растений (Los et al., 2013). Отметим, что содержание других родственных ненасыщенных жирных кислот, в том числе 16:3 и 18:3, а также ИН, при экспрессии гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы в листьях *N. excelsior* до некоторой степени увеличились (Таблица 6, Рисунок 11). Эти результаты свидетельствуют о том, что гетерологичная  $\Delta 9$  десатураза, отвечая за синтез олеиновой и



пальмитолеиновой кислот, в значительной степени способствует и накоплению ПНЖК.

Полученные данные также продемонстрировали, что  $\Delta 9$  десатураза *S. vulcanus* при транзientной экспрессии в растениях, в целом, проявляет субстратную специфичность и к ЖК 16:0, и к 18:0, как у *N. benthamiana*, так и у *N. excelsior* (Таблица 5 и 6, Рисунок 11), хотя, как было продемонстрировано ранее, при стабильной экспрессии эта же десатураза в трансгенных растениях *N. tabacum* проявляет предпочтение к ЖК 18:0 (Герасименко и соавт., 2015; Orlova et al., 2003).

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет с уверенностью утверждать, что функциональная активность и субстратная специфичность гетерологичных  $\Delta 9$  десатураз может быть прояснена с использованием транзientной экспрессии целевых генов десатураз в модельных растениях табака *N. benthamiana* и *N. excelsior*.

Как упомянуто выше, гетерологичные десатуразы, катализирующие конверсию ЖК 18:0 в 18:1 эффективно функционируют в растениях как при локализации в цитоплазме (Orlova et al., 2003; Zhao et al., 2015), так и в пластидах (Герасименко и соавт., 2015; Craig et al., 2008), с последующим образованием ПНЖК за счет активности специфических десатураз растений, локализованных в ЭПР и пластидах.

В этом исследовании мы также попытались выяснить есть ли предпочтения у разных компартментов растительной клетки (цитоплазма, хлоропласт и ЭПР) для функционирования гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы, и, прежде всего, в отношении количества ПНЖК и ИН. Для этого определили ЖК состав в листьях *N. benthamiana* и *N. excelsior* экспрессирующих *desC* ген цианобактерий в различных компартмента растительной клетки. Сравнение полученных данных с контрольными растениями (экспрессирующими ген *egfp*), позволили нам определить, что  $\Delta 9$  десатураза *S. vulcanus* при транзientной экспрессии в разных клеточных компартментах растительной клетки, в целом, обеспечивает достоверное увеличение ПНЖК, ИН (Таблица 5 и 6, Рисунок 11) и отношения

продукт/субстрат (Рисунок 11 и 12) у двух видов табака *N. benthamiana* и *N. excelsior*. Сравнение отношения продукта реакции десатурации (олеиновая кислота) к субстрату (стеариновая кислота) показало – наибольшая активность гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. benthamiana* наблюдается в хлоропластах, а у *N. excelsior* в ЭПР.

Достоверное увеличение ПНЖК за счет локализации гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы в пластидах хорошо аргументируется наличием в этом компартменте растительной клетки стеариновой кислоты (18:0) как субстрата для этого фермента, и последующей десатурацией продукта реакции (олеиновой кислоты (18:1)) в ПНЖК за счет специфических десатураз растений, также локализованных в этом компартменте (Dag et al., 2017) (Рисунок 13).

В ЭПР ЖК 18:0 (как субстрат для гетерологичной  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы), доставляемая с пулом ЖК связанных с коэнзимом А (ЖК-КоА) из цитоплазмы (как правило, из липидных тел) в ЭПР, может быть превращена в ЖК 18:1, с дальнейшей превращением в ПНЖК за счет специфических десатураз растений, локализованных в ЭПР (Dag et al., 2017; Los et al., 2013) (Рисунок 13).

Не смотря на полученные данные о приоритетной локализации гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы (*N. benthamiana* – хлоропласты (пластиды), *N. excelsior* – ЭПР) нельзя не отметить того факта, что при локализации  $\Delta 9$  десатуразы в цитоплазме также происходит существенное изменение в липидном метаболизме, выраженное в увеличении содержания ПНЖК. В отношении данного феномена может быть предложен следующий механизм, посредством которого увеличивается количество ПНЖК. Поскольку  $\Delta 9$  ацил-липидная десатураза относится к классу мембраносвязанных десатураз и не может функционировать, не будучи интегрированной в мембрану (Chintalapati et al., 2006). По-видимому,  $\Delta 9$  ацил-липидная десатураза все же встраивается в мембранные структуры, не связанные с ЭПР и хлоропластами. Возможно, в этом случае используется механизм обмена жирных кислот между мембранами пластид и ЭПР, т.е. гетерологичная десатураза катализирует десатурацию ЖК 18:0, представленную в цитоплазматическом пуле ЖК-КоА, а продукт

десатурации ЖК 18:1, по-видимому, дальше может импортироваться в пластиды и/или ЭПР, где происходит образование ПНЖК за счет десатураз растений, специфических для каждого компартмента (Рисунок 13).

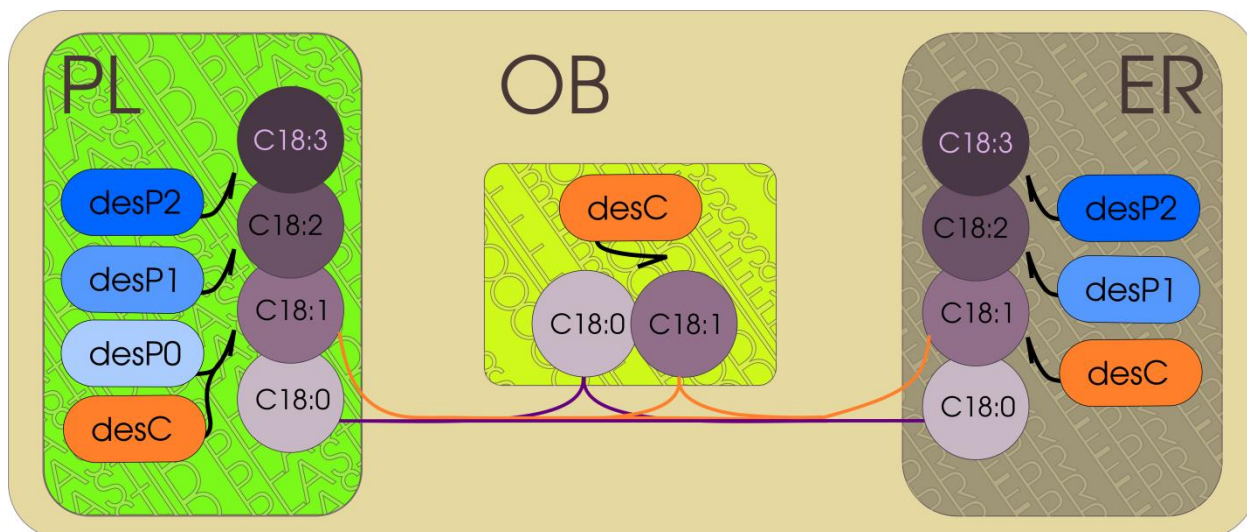


Рисунок 13. Предполагаемая схема функционирования гетерологичных десатураз в различных компартментах растительной клетки. PL – пластиды; ER – ЭПР; OB – липидное тело; desC –  $\Delta^9$  десатураза; desP0, P1, P2 – растительные десатуразы вводящие первую, вторую и третью двойную связь в ацильной цепи ЖК соответственно ( $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ ,  $\Delta^{15}$ ); C18:0 (стеариновая), 18:1 (олеиновая), 18:2 (линолевая), 18:3 (линоленовая) жирные кислоты.

Вместе с этим, полученные результаты позволяют рекомендовать *N. benthamiana* и *N. excelsior* в качестве модельных растений в исследованиях по оценке функциональной активности и/или субстратной специфичности гетерологичных десатураз, не только  $\Delta^9$  десатуразы, но и десатуразы, которые катализируют превращение ЖК 18:1 в ПНЖК. Поскольку апробированные нами в этом исследовании модельные растения *N. benthamiana* и *N. excelsior* характеризуются существенными различиями в ЖК составе, а также соотношением C18/C16, выбор модельного растения, безусловно, будет зависеть от конкретной цели исследования.

Необходимо подчеркнуть преимущество использованных в данном исследовании экспрессионных векторов для транзientной экспрессии целевых

генов в растениях, которые были сконструированы нами ранее (Вячеславова и соавт., 2012). Оно заключается во включении в состав векторов дополнительной кассеты экспрессии для гена белка p19 вируса томатов – супрессора посттранскрипционного замолкания генов, контролируемой сильным конститутивным ТСТР промотором. Это дает возможность противодействовать механизму посттранскрипционного замолкания при сверхэкспрессии гетерологичных генов в растениях, который, как правило, запускается при транзientной экспрессии и препятствует эффективной экспрессии гетерологичного гена (Gerasymenko et al., 2019). Также это позволяет использовать только один штамм бактерий для агроинфильтрации в отличие от других векторов, для которых необходимо использовать процедуру котрансформации двумя штаммами агробактерий, один из которых несет вектор с геном белка p19, а другой вектор с целевым геном (Вячеславова и соавт., 2012; Тюрин и соавт., 2017).

Таким образом, нами предложена и апробирована транзientная экспрессия генов в растениях, которая продемонстрировала свою применимость для изучения функциональной активности и субстратной специфичности гетерологичных десатураз. Транзientная экспрессия – более простой подход, требующий меньших временных и материальных затрат, по сравнению с технологией получения трансгенных растений как для стабильной экспрессии, так и для замолкания генов. Используя транзientную экспрессию, в частности, для оценки локализации, функциональной активности и субстратной специфичности десатураз различного происхождения, возможно, поддержать молекулярное размножение новых генотипов, содержащих лучшие комбинации соответствующих аллелей и заложить основы нового поколения трансгенов, в том числе и с использованием технологий геномного редактирования, и как следствие, принести большую пользу человечеству.

## ВЫВОДЫ

1. Сконструированы экспрессионные векторные конструкции, несущие ген *desC* цианобактерий *Synechococcus vulcanus* с регуляторными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта целевого гена в различных компартментах растительной клетки (цитоплазма, хлоропласты и ЭПР).
2. Разработана и апробирована система транзientной экспрессии генов, подходящая как для оценки сигнальных последовательностей, так и для исследования локализации искомым белков в клетках растений.
3. Показано, что сигнальные последовательности направляют белковые продукты целевого гена в специфические компартменты растительной клетки.
4. Продемонстрировано, что при транзientной экспрессии гетерологичная  $\Delta 9$  десатураза, отвечая за синтез олеиновой и пальмитолеиновой кислот, в значительной степени способствует и накоплению ПНЖК.
5. Полученные результаты убедительно свидетельствуют, что  $\Delta 9$  ацил-липидная десатураза, транзientно экспрессированная в двух видах табака, вызывает значительные изменения в липидном метаболизме листьев в сторону увеличения ненасыщенности жирных кислот.
6. Функциональная активность десатуразы зависит как от использованного вида модельного растения - *N. benthamiana* и *N. excelsior*, так и от локализации фермента в растительной клетке.
7. Наибольшая активность гетерологичной  $\Delta 9$  десатуразы у *N. benthamiana* наблюдается в хлоропластах, а у *N. excelsior* в ЭПР.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берестовой М.А. Десатуразы жирных кислот растений: роль в жизнедеятельности растений и биотехнологический патенциал / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, И.В. Голденкова-Павлова // Успехи современной биологий. – 2019. – 139(4). – С. 338-351.
2. Вячеславова, А.О. Серия модульных векторов для стабильной и транзientной экспрессии гетерологичных генов в растениях / А.О. Вячеславова, О.Н. Мустафаев, А.А. Тюрин, Шимшилашвили, И.Н. Бердичевец, Д.М. Шаяхметова, М.А. Голденков, В.С. Фадеев, Ю. В. Шелудько, И.В. Голденкова-Павлова // Генетика. – 2012. – 48. – С. 1046-1056.
3. Герасименко, И.М. Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены  $\Delta 9$ - или  $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы / Ю.В. Герасименко, И.М. Сахно, Л.А. Кирпа, А.Н. Остапчук, Т.А. Хаджиев, И.В. Голденкова-Павлова, Ю.В. Шелудько // Физиология растений. – 2015. – 62(3). – С. 307–316.
4. Лось, Д.А. Структура, регуляция эспрессии и функционирование десатураз жирных кислот / Д.А. Лось // Успехи биологической химии. – 2001. – 1. – С. 163-198.
5. Лось, Д.А. Десатуразы жирных кислот / Д.А. Лось // Научный мир. – 2014 – С. 18-30.
6. Тюрин, А.А. Простая и надежная система транзientной экспрессии генов для характеристики сигнальных последовательностей и оценки локализации целевых белков в растительной клетке / А.А. Тюрин, К.В. Кабардаева, М.А. Берестовой, Ю.В. Сидорчук, А.А. Фоменков, А.В. Носов, И.В. Голденкова-Павлова // Физиология растений. – 2017. – 64(4). – С. 363-371.
7. Юрьева, Н.О. Экспрессия гена  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы *Synechocystis* sp. PCC 6803 повышает устойчивость растений картофеля к поражению фитофторой / Н.О. Юрьева, С.Н. Кирсанова, Л.Н. Кукушкина, В.П. Пчёлкин, Г.И.

- Соболькова, Х.Р. Никифорова, И.В. Голденкова-Павлова, А.М. Носов, В.Д. Цыдендамбаев// Физиология растений. – 2014. – 61(5). – С. 713-720.
8. Abe, K. Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing / K. Abe E. Araki, Y. Suzuki // *Plant Physiol Biochem.* – 2018. – 131. – P. 58–62.
  9. Aitzetmüller, K. Seed Fatty Acids, «Front-End»-Desaturases and Chemotaxonomy — a Case Study in the Ranunculaceae / K. Aitzetmüller, N. Tsevegsüren // *J. Plant Physiol.* – 1994. – 4–5(143). – P. 538–543.
  10. Alanen, H.I. Beyond KDEL: The Role of Positions 5 and 6 in Determining ER Localization / H.I. Alanen, I.B. Raykhel, M.J. Luukas, K.E. Salo, L.W. Ruddock // *J Mol Biol.* – 2011. – 3(409). – P. 291–297.
  11. Alberts, B. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter / Garland Science. – 2015. – P. 571.
  12. Anwar, M. Ectopic Overexpression of a Novel R2R3-MYB, NtMYB2 from Chinese Narcissus Represses Anthocyanin Biosynthesis in Tobacco / M Anwar, G Wang, J Wu, S. Waheed, A.C. Allan, L. Zeng // *Molecules.* – 2018. – 4(23). – P. 781.
  13. Bai, Y. X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase / Y. Bai, J.G. McCoy, E.J. Levin, P. Sobrado, K.R. Rajashankar, B.G. Fox, M. Zhou // *Nature.* – 2015. – 524. – P. 252–256.
  14. Berestovoy M. Altered fatty acid composition of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana excelsior* leaves under transient overexpression of the cyanobacterial desC gene / M. Berestovoy, O.S. Pavlenko, A.A. Tyurin, E.N. Gorshkova, I.V. Goldenkova-Pavlova // *Biol Plantarum.* – 2020. – 64. – P. 167-177.
  15. Bettaieb Rebey, I. Relation between salt tolerance and biochemical changes in cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds / I. Bettaieb Rebey S Bourgo, F.Z. Rahali, K. Msaada, R. Ksouri, B. Marzouk. // *J Food Drug Anal.* – 2017. – 2(25). – P. 391–402.
  16. Bonawitz, N.D. Zinc finger nuclease-mediated targeting of multiple transgenes to an endogenous soybean genomic locus via non-homologous end joining / N.D. Bonawitz, W.M. Ainley, A. Itaya, S.R. Chennareddy, T. Cicak, K. Effinger, K. Jiang, T.K. Mall, P.R. Marri, J.P. Samuel, N. Sardesai, M. Simpson, O. Folkerts, R. Sarria,

- S.R. Webb, D.O. Gonzalez, D.H. Simmonds, D.R. Pareddy // *Plant Biotechnol J.* – 2019. – 4(17). – P. 750–761.
17. Boudière, L. Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking / L. Boudière, M. Michaud, D. Petroutsos, F. Rébeillé, D. Falconet, O. Bastien, S. Roy, G. Finazzi, N. Rolland, J. Jouhet, M.A. Block, E. Maréchal // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – 4(1837). – P. 470–480.
18. Bryant, F.M. ACYL-ACYL CARRIER PROTEIN DESATURASE2 and 3 Are Responsible for Making Omega-7 Fatty Acids in the Arabidopsis Aleurone / F.M. Bryant, O. Munoz-Azcarate, A.A. Kelly, F. Beaudoin, S. Kurup, P.J. Eastmond // *Plant Physiol.* – 2016. – 1(172). – P. 154–162.
19. Buist, P. H. Fatty acid desaturases: selecting the dehydrogenation channel / P.H. Buist // *Nat Prod Rep.* – 2004. – P. 249–262.
20. Carvalhais, L.C. Activation of the jasmonic acid plant defence pathway alters the composition of rhizosphere bacterial communities / L.C. Carvalhais, P.G. Dennis, D.V. Badri, G.W. Tyson, J.M. Vivanco, P.M. Schenk // *PLoS One.* – 2013. – 2(8). – P. e56457.
21. Chalupský, J. Reactivity of the Binuclear Non-Heme Iron Active Site of  $\Delta 9$  Desaturase Studied by Large-Scale Multireference Ab Initio Calculations / J. Chalupský, T.A. Rokob, Y. Kurashige, T. Yanai, E. Solomon, L. Rulíšek, M. Srnec // *J Am Chem Soc.* – 2014. – 45(136). – P. 15977–15991.
22. Chazarreta-Cifre, L. Role of ferredoxin and flavodoxins in *Bacillus subtilis* fatty acid desaturation / L. Chazarreta-Cifre, L. Martiarena, D. de Mendoza, S.G. Altabe // *J Bacteriol.* – 2011. – 16(193). – P. 4043–4048.
23. Chen, M. Acyl-lipid desaturase 2 is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis* / M. Chen, J.J. Thelen // *Plant Cell.* – 2013. – 4(25). – P. 1430–1444.
24. Chen, M. Acyl-lipid desaturase 1 primes cold acclimation response in *Arabidopsis* / M. Chen, J.J. Thelen // *Physiol Plant.* – 2016. – 1(158). – P. 11–22.
25. Chi, X. Isolation and functional analysis of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.) / X. Chi, Z. Zhang, N. Chen, X. Zhang, M. Wang, M.



- Chen, T. Wang, L. Pan, J. Chen, Z. Yang, X. Guan, S. Yu // PLoS One. –2017. – 12(12). – P. e0189759.
26. Chintalapati, S. A novel Delta9 acyl-lipid desaturase, DesC2, from cyanobacteria acts on fatty acids esterified to the sn-2 position of glycerolipids / S. Chintalapati, J.S. Prakash, P. Gupta, S. Ohtani, I. Suzuki, T. Sakamoto, N. Murata, S. Shivaji // Biochem J. – 2006. –2(398). – P. 207–14.
27. Craig, W. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance / W. Craig, P. Lenzi, N. Scotti, M. De Palma, P. Saggese, V. Carbone, N. McGrath Curran, A.M. Magee, P. Medgyesy, T.A. Kavanagh, P.J. Dix, S. Grillo, T. Cardi // Transgenic Res. – 2008. – 5 (17). – P. 769–782.
28. Dar, A.A. The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role / A.A. Dar, A.R. Choudhury, P.K Kancharla, N. Arumugam // Front Plant Sci. – 2017. – 8. – P. 1789.
29. Demorest, Z.L. Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil / Z.L. Demorest, A. Coffman, N.J. Baltes, T.J. Stoddard, B.M. Clasen, S. Luo, A. Retterath, A. Yabandith, M.E. Gamo, J. Bissen, L. Mathis, D.F. Voytas, F. Zhang // BMC Plant Biol. – 2016. – 1(16). – P. 225.
30. Diaz, A.R. Membrane Topology of the Acyl-Lipid Desaturase from *Bacillus subtilis* / A.R. Diaz, M.C. Mansilla, A.J. Vila, D. de Mendoza // J Biol Chem. – 2002. – 50(277). – P. 48099–48106.
31. Ding, Z.T. CsSAD: a fatty acid desaturase gene involved in abiotic resistance in *Camellia sinensis* (L.) / Z.T. Ding, J.Z. Shen, L.L. Pan, Y.U. Wang, Y.S. Li, Y. Wang, H.W. Sun // Genet Mol Res. – 2016. – 1(15). – P. 15017512.
32. Domínguez, T. Increasing  $\omega$ -3 Desaturase Expression in Tomato Results in Altered Aroma Profile and Enhanced Resistance to Cold Stress / T. Domínguez, M.L. Hernández, J.C. Pennycooke, P. Jiménez, J.M. Martínez-Rivas, C. Sanz, E.J. Stockinger, J.J. Sánchez-Serrano, M. Sanmartín // Plant Physiol. – 2010. – 2(153). – P. 655.

33. Dong, C.J. Characterization of the Fatty Acid Desaturase Genes in Cucumber: Structure, Phylogeny, and Expression Patterns / C.J. Dong, N. Cao, Z.G. Zhang, Q.M. Shang // PLoS One. – 2016. – 11(3). – P. e0149917.
34. Espenshade, P. J. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes / P. J. Espenshade, A. L. Hughes // Annu Rev Genet. – 2007. – 41 – P. 401–427.
35. Feng, J. Genome-wide identification of membrane-bound fatty acid desaturase genes in *Gossypium hirsutum* and their expressions during abiotic stress / J. Feng, Y. Dong, W. Liu, He Q1, M.K. Daud, J. Chen, S. Zhu // Sci Rep. – 2017. – 7. – P. 45711.
36. Gaj, T. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering / T. Gaj, C.A. Gersbach, C.F. Barbas // Trends Biotechnol. – 2013. – 7(31). – P. 397–405.
37. Gao, J. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum* / J. Gao, G. Wang, S. Ma, X. Xie, X. Wu, X. Zhang, Y. Wu, P. Zhao, Q. Xia // Plant Mol Biol. – 2015. – 1–2(87). – P. 99–110.
38. Garba, L. Homology modeling and docking studies of a  $\Delta 9$ -fatty acid desaturase from a Cold-tolerant *Pseudomonas* sp. AMS8 / L. Garba, M.A. Mohamad Yusoff, K.B. Abd Halim, S.N. H.I.M. Shukuri Mohamad Ali, S.N. Oslan, R.N. Zaliha Raja Abd // PeerJ. – 2018. – 6. – P. e4347.
39. Gerasymenko, I. Combinatorial biosynthesis of small molecules in plants: Engineering strategies and tools / I. Gerasymenko, Y. Sheludko, S. Fräbel, A. Staniek, H. Warzecha // Methods Enzymol. – 2019. – 617. – P. 413–442.
40. Gostinčar, C. The Evolution of Fatty Acid Desaturases and Cytochrome b5 in Eukaryotes / C. Gostinčar, M. Turk, N. Gunde-Cimerman. // J Membr Biol. – 2010. – 1–3(233). – P. 63–72.
41. Guillou, H. Distinct roles of endoplasmic reticulum cytochrome b5 and fused cytochrome b5-like domain for rat  $\Delta 6$ -desaturase activity / H. Guillou, S. D'Andrea, V. Rioux, R. Barnouin, S. Dalaine, F. Pedrono, S. Jan, P. Legrand // J Lipid Res. – 2004. – 1(45). – P. 32–40.
42. Guy, J.E. The crystal structure of the ivy Delta4-16:0-ACP desaturase reveals structural details of the oxidized active site and potential determinants of

- regioselectivity / J.E. Guy, E. Whittle, D. Kumaran, Y. Lindqvist, J. Shanklin // *J Biol Chem.* – 2007. – 27(282). – P. 19863–19871.
43. Han, X. *Lipidomics : comprehensive mass spectrometry of lipids* / X. Han // John Wiley & Sons, Inc. – 2016. – P 412–413.
  44. Harwood, J.L. *Plant Lipid Biosynthesis. Fundamentals and Agricultural Applications* / J.L Harwood // Cambridge University Press. – 1998. – P.113.
  45. Haun, W. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family / W. Haun, A. Coffman, B.M. Clasen, Z.L. Demorest, A. Lowy, E. Ray, A. Retterath, T. Stoddard, A. Juillerat, F. Cedrone, L. Mathis, D.F. Voytas, F. Zhang // *Plant Biotechnol J.* – 2014. – 7(12). – P. 934–940.
  46. Hernández, M.L. Differential Contribution of Endoplasmic Reticulum and Chloroplast  $\omega$ -3 Fatty Acid Desaturase Genes to the Linolenic Acid Content of Olive (*Olea europaea*) Fruit / M.L.Hernández, M.D. Sicardo, J.M. Martínez-Rivas // *Plant Cell Physiol.* – 2016. – 1(57). – P. 138–151.
  47. Hitz, W.D. Cloning of a higher-plant plastid omega-6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium / W.D. Hitz, T.J. Carlson, J.R. Booth, A.J. Kinney, K.L. Stecca, N.S. Yadav // *Plant Physiol.* – 1994. – 105. – P. 635–641.
  48. Hu, L. Multi-functional roles of TaSSI2 involved in Fusarium head blight and powdery mildew resistance and drought tolerance / L. Hu, J.J. Mu, P.S. Su // *J Integ Agricult.* – 2018. – 2(17). – P. 368–380.
  49. Hyskova, V. Hyperosmotic versus Hypoosmotic Stress in Plants / V. Hyskova, H. Ryslava // *Biochem Analyt Biochem.* – 2018. – 01(07). – P. 1–4.
  50. Iba, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance / K. Iba // *Annu Rev Plant Biol.* – 2002. – 1(53). – P. 225–245.
  51. International Union of Biochemistry. *Enzyme nomenclature, 1978: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzymes.* / International Union of Biochemistry. Nomenclature Committee, International Union of Biochemistry, Commission on Biochemical Nomenclature // Academic Press. – 1979. – P. 606.

52. Ji, X.J. Splice Variants of the Castor WRI1 Gene Upregulate Fatty Acid and Oil Biosynthesis When Expressed in Tobacco Leaves / X.J. Ji, X. Mao, Q.T. Hao, B.L. Liu, J.A. Xue, R.Z. Li // *Int J Mol Sci.* – 2018. – 1(19). – P. 146.
53. Jiang, W. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice / W. Jiang, H. Zhou, H. Bi, M. Fromm, B. Yang, D.P. Weeks // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – 20(41). – P. e188.
54. Jung, J.H. Identification of functional BrFAD2-1 gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from Brassica rapa and development of Brassica napus containing high oleic acid contents / J.H. Jung, H. Kim, Y.S. Go, S.B. Lee, C.G. Hur, H.U. Kim, M.C. Suh // *Plant Cell Rep.* – 2011. – 10(30). – P. 1881–1892.
55. Kamthan, A. Expression of a fungal sterol desaturase improves tomato drought tolerance, pathogen resistance and nutritional quality / A. Kamthan, M. Kamthan, M. Azam, N. Chakraborty, S. Chakraborty, A. Datta // *Sci Rep.* – 2012. – 1(2). – P. 951.
56. Kaur, N. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome / N. Kaur, A. Alok, Shivani, N. Kaur, P. Pandey, P. Awasthi, S. Tiwari // *Funct Integr Genomics.* – 2018. – 1(18). P. 89–99.
57. Kim, Y.C. Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase Genes: Role in Cellular Metabolism and Preadipocyte Differentiation / Y.C. Kim, J.M. Ntambi // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – 1(266). – P. 1–4.
58. Kis, M. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes / M. Kis, O. Zsiros, T. Farkas, H. Wada, F. Nagy, Z. Gombos // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – 8(95). – P. 4209–14.
59. Kiseleva, L.L. Expression of the gene for the delta9 acyl-lipid desaturase in the thermophilic cyanobacterium / L.L. Kiseleva, T.S. Serebriiskaya, I. Horvath, L. Vigh, A.A. Lyukevich, D.A. Los // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2000. – 3(2). – P. 331–338.
60. Lakhssassi, N. Characterization of the FAD2 Gene Family in Soybean Reveals the Limitations of Gel-Based TILLING in Genes with High Copy Number / N. Lakhssassi, Z. Zhou, S. Liu, V. Colantonio, A. AbuGhazaleh, K. Meksem // *Front Plant Sci.* – 2017. – 8. – P. 324.

61. Li-Beisson, Y. Acyl-lipid metabolism / Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, Mats X. Andersson, Vincent Arondel, Philip D. Bates, Sébastien Baud, D. Bird, A. DeBono, T.P. Durrett, R.B. Franke, I.A. Graham, K. Katayama, A.A. Kelly, T. Larson, J.E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K.M. Schmid, H. Wada, R. Welte, C. Xu, R. Zallot, J. Ohlrogge // *The arabidopsis book*. – 2010. – 8. – P. e0133.
62. Li, F. Cloning and functional characterization of SAD genes in potato / F. Li, C.S. Bian, J.F. Xu, W.F. Pang, J. Liu, S.G. Duan, Z.G. Lei, P. Jiwan, L.P. Jin // *PLoS One*. – 2015. – 3(10). – P. e0122036.
63. Li, J.F. Targeted Plant Genome Editing via the CRISPR/Cas9 Technology / J.F. Li, D. Zhang, J. Sheen // *Methods Mol Biol*. – 2015. – 1284 – P. 239–255.
64. Li, S.F. Newly identified essential amino acid residues affecting  $\Delta 8$ -sphingolipid desaturase activity revealed by site-directed mutagenesis / S.F. Li, L.Y. Song, G.J. Zhang, W.B. Yin, Y.H. Chen, R.R. Wang, Z.M. Hu // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2011. – 1–2(416). – P. 165–171.
65. Li, S. The hypersensitive induced reaction 3 (HIR 3) gene contributes to plant basal resistance via an EDS 1 and salicylic acid-dependent pathway / S. Li, J. Zhao, Y. Zhai // *Plant J*. – 2019. – 5(98). – P. 783–797.
66. Lindqvist, Y. Crystal structure of  $\Delta 9$  stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other diiron proteins / Y. Lindqvist, W. Huang, G. Schneider, J. Shanklin // *Embo J*. – 1996. – 15. – P. 4081-4092.
67. Liu, Q. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a microsomal w-6 fatty acid desaturase from cotton (*Gossypium hirsutum*) / Q. Liu, S.P. Singh, C. Brubaker, Y. Li, X. Zhang, F. Xue, X. Nie, Q. Zhu, J. Sun // *Aust J Plant Physiol*. – 1999. – 26. – P. 101-106.
68. Liu, W. Characterization of 19 Genes Encoding Membrane-Bound Fatty Acid Desaturases and their Expression Profiles in *Gossypium raimondii* Under Low Temperature / W. Liu, W. Li, Q. He, M.K. Daud, J. Chen, S. Zhu // *PLoS One*. – 2015. – 4(10). – P. e0123281.

69. López Alonso D. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases / D. López Alonso, F.García-Maroto, J.Rodríguez-Ruiza, J.A. Garrido, M.A. Vilches // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2003. – 10(31). – P. 1111–1124.
70. Los, D.A. Structure and expression of fatty acid desaturases / D.A. Los, N. Murata // *Biochim Biophys Acta*. – 1998. – 1(1394). – P. 3–15.
71. Los, D.A. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals / D.A. Los, N. Murata // *Biochim Biophys Acta*. – 2004. – 1–2(1666). –P. 142–157.
72. Los D.A. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions / D.A. Los, K.S. Mironov, S.I. Allakhverdiev // *Photosynthesis Research*. – 2013 – 2–3(116). – P. 489–509.
73. Lou, Y. Shanklin J. Evidence that the yeast desaturase Ole1p exists as a dimer in vivo / Y. Lou, J. Shanklin // *J Biol Chem*. – 2010. – 285. – P. 19384-90.
74. Lou, Y. FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo / Y. Lou, J. Schwender, J. Shanklin // *J Biol Chem*. – 2014. – 289. – P. 17996-18007.
75. Lyons, J.M. Relationship between the Physical Nature of Mitochondrial Membranes and Chilling Sensitivity in Plants / J.M. Lyons, T.A. Wheaton, H.K. Pratt // *Plant Physiol*. – 1964. – 2(39). – P. 262–268.
76. Lyons, J.M. Chilling Injury in Plants / J.M. Lyons // *Ann Rev Plant Physiol*. – 1973. – 1(24). – P. 445–466.
77. Maali R. Comparative expression in *Escherichia coli* of the native and hybrid genes for acyl-lipid delta(9) desaturase / R. Maali, Kh.R. Shimshilashvili, V.P. Pchelkin V.D. Tsydendambaev, A.M. Nosov, D.A. Los, I.V. Goldenkova-Pavlova // *Genetika*. – 2007. – 2(43). – P. 176–82.
78. Macartney, A.I. Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition /A.I. Macartney, B. Maresca, A.R. Cossins (Ed.), *Temperature Adaptation of Biological Membranes* // London, Portland Press. –1994. – P. 129-139.
79. Matsuda, O. A Temperature-sensitive Mechanism That Regulates Post-translational Stability of a Plastidial  $\omega$ -3 Fatty Acid Desaturase (FAD8) in *Arabidopsis*

Leaf Tissues / O. Matsuda, H. Sakamoto, T. Hashimoto, K. Iba // *J Biol Chem.* – 2005. – 5(280). – P. 3597–3604.

80. McCartney, A.W. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini / A.W. McCartney, J.M. Dyer, P.K. Dhanoa, P.K. Kim, D.W. Andrews, J.A. McNew, R.T. Mullen // *Plant Journal.* – 2004. – 2(37). – P. 156–73.

81. Moche, M. Azide and Acetate Complexes Plus Two Iron-depleted Crystal Structures of the Di-iron Enzyme  $\Delta^9$  Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase / M. Moche, J. Shanklin, A. Ghoshal, Y. Lindqvist // *J Biol Chem.* – 2003. – 278(27). – 25072-25080.

82. Mori, N. Construction of Global Acyl Lipid Metabolic Map by Comparative Genomics and Subcellular Localization Analysis in the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae* / N. Mori, T. Moriyama, M. Toyoshima, N. Sato // *Front Plant Sci.* – 2016. – 7. – P. 958.

83. Mullineaux, C.W. Role of lipids in the dynamics of thylakoid membranes / C.W. Mullineaux, H. Kirchhoff // *Springer Science, Dordrecht.* – 2009. – P. 283–294.

84. Na-Ranong, S. Targeted mutagenesis of a fatty acid  $\Delta^6$ -desaturase from *Mucor rouxii*: Role of amino acid residues adjacent to histidine-rich motif II / S. Na-Ranong, K. Laoteng, P. Kittakoop, M. Tanticharoen, S. Cheevadhanarak // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – 4(339). – P. 1029–1034.

85. Naim, F. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9 / F. Naim, B. Dugdale, J. Kleidon, A. Brinin, K. Shand, P. Waterhouse, J. Dale // *Transgenic Res.* – 2018. – 5(27). – P. 451–460.

86. Nakamura, M.T. Structure, function, and dietary regulation of  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$ , and  $\Delta^9$  desaturases / M.T. Nakamura, T.Y. Nara // *Ann Rev Nutrition.* – 2004. – 1(24). – P. 345–376.

87. Nakamura, S. Conferring high-temperature tolerance to nontransgenic tomato scions using graft transmission of RNA silencing of the fatty acid desaturase gene / S. Nakamura, K. Hondo, T. Kawara, Y. Okazaki, K. Saito, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka, M. Nishiguchi // *Plant Biotechnol J.* – 2016. – 2(14). – P. 783–790.

88. Napier, J.A. The role of cytochrome b5 fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids / J.A. Napier, L.V. Michaelson, O. Sayanova // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. – 2003. – 2(68). – P. 135–43.
89. Napier, J.A. The Production of Unusual Fatty Acids in Transgenic Plants / J.A. Napier // *Ann Rev Plant Biol*. – 2007. – 1(58). – P. 295–319.
90. Nishida, I. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids / I. Nishida, N. Murata // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. – 1996. – 1(47). – P. 541–568.
91. Nosov, A.V. Extra perspectives of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine click reaction with fluorochrome azides to study cell cycle and deoxyribonucleoside metabolism / A.V. Nosov, A.A. Fomenkov, A.S. Mamaeva, A.E. Solovchenko, G.V. Novikova // *Russ J Plant Physiol*. – 2014. – 6(61). – P. 899–909.
92. Odipio, J. Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing of Phytoene desaturase in Cassava / J. Odipio, T. Alicai, I. Ingelbrecht, D.A. Nusinow, R. Bart, N.J. Taylor. // *Front Plant Sci*. – 2017. – 8. – P. 1780.
93. Ohlrogge, J. Lipid biosynthesis / J. Ohlrogge, J. Browse // *Plant Cell*. – 1995 – 7 – P. 957-970.
94. Okuley, J. Arabidopsis FAD2 Gene Encodes the Enzyme That Is Essential for Polyunsaturated Lipid Synthesis / J. Okuley, J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark, J. Browse // *Plant Cell*. – 1994. – 1(6). – P. 147–158.
95. Okuzaki, A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus* / A. Okuzaki, T. Ogawa, C. Koizuka, K. Kaneko, M. Inaba, J. Imamura, N. Koizuka // *Plant Physiol Biochem*. – 2018. – 131. – P. 63–69.
96. Orlova, I.V. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants / I.V. Orlova, T.S. Serebriiskaya, V. Popov, N. Merkulova, A.M. Nosov, T. Trunova, V.D. Tsydendambaev, D.A. Los // *Plant Cell Physiol*. – 2003. – 44. – P. 447–450.
97. Osakabe, Y. Genome Editing with Engineered Nucleases in Plants / Y. Osakabe, K. Osakabe // *Plant Cell Physiol*. – 2015. – 3(56). – P. 389–400.



98. Pandey, M.K. Identification of QTLs associated with oil content and mapping FAD2 genes and their relative contribution to oil quality in peanut (*Arachis hypogaea*L.) / M.K. Pandey, M.L. Wang, L. Qiao, S. Feng, P. Khera, H. Wang, B. Tonniss, N.A. Barkley, J. Wang, C.C. Holbrook, A.K. Culbreath, R.K. Varshney, B.Guo // BMC Genet. – 2014. – 1 (15). – P. 133.
99. Peng, D. Enhancing freezing tolerance of *Brassica napus* L. by overexpression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene (SAD) from *Sapium sebiferum* (L.) Roxb / D. Peng, B. Zhou, Y. Jiang, X. Tan, D. Yuan, L. Zhang // Plant Sci. – 2018. – 272. – P. 32–41.
100. Perlikowski, D. Remodeling of Leaf Cellular Glycerolipid Composition under Drought and Re-hydration Conditions in Grasses from the *Lolium-Festuca* Complex / D. Perlikowski, S. Kierszniowska, A. Sawikowska, P. Krajewski, M. Rapacz, Ä. Eckhardt, A. Kosmala // Front Plant Sci. – 2016. – 7. – P. 1027.
101. Piruzian, E. A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* / E. Piruzian, I. Goldenkova, K. Musiychuk, N.S. Kobets, I.P. Arman, I.V. Bobrysheva, I.A. Chekhuta, D. Glazkova // Mol Gen Genomics. – 2002. – 5(266). – P. 778–786.
102. Popov, V.N. The involvement of acyl-lipid  $\Delta 9$ -desaturase in the development of chilling tolerance of sensitive plants / V.N. Popov, N.V. Kipaikina, N. V. Merkulova, I. V. Orlova, T.S. Serebriiskaya, D.A. Los, T.I. Trunova, V.D. Tsydendambaev // Doklady Biological Sciences. – 2006. – 1(407). – P. 149–152.
103. Popov, V.N. Changes in fatty acid composition of lipids in chloroplast membranes of tobacco plants during cold hardening / V.N. Popov, O.V. Antipina, V.P. Pchelkin, V. D. Tsydendambaev // Russ J Plant Physiol. – 2017. – 2(64). – P. 156–161.
104. Rebouças, D.M. Combined Effects of Ozone and Drought on the Physiology and Membrane Lipids of Two Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Cultivars / D.M. Rebouças, Y.M. De Sousa, M. Bagard, J.H. Costa, Y. Jolivet, D.F. De Melo, A. Repellin. // Plants (Basel). – 2017. – 1(6). – P. e14

105. Reed, D.W. Characterization of the *Brassica napus* extraplastidial linoleate desaturase by expression in *Saccharomyces cerevisiae* / D.W. Reed, U.A. Schäfer, P.S. Covello // *Plant Physiol.* – 2000. – 3(122). – P. 715–20.
106. Routaboul, J.M. *Arabidopsis* mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids / J.M. Routaboul, C. Skidmore, J.G. Wallis // *J Exp Bot.* – 2012. – 3 (63). – P. 1435–1443.
107. Schlueter, J.A. The FAD2 Gene Family of Soybean: Insights into the Structural and Functional Divergence of a Paleopolyploid Genome / J.A. Schlueter, I.F. Vasylenko-Sanders, S. Deshpande, J. Yi, M. Siegfried, B.A. Roe, S.D. Schlueter, B.E. Scheffler, R.C. Shoemaker // *Crop Sci.* – 2007. – 47.
108. Schultz, D.J. Stearoyl-acyl carrier protein and unusual acyl-acyl carrier protein desaturase activities are differentially influenced by ferredoxin / D.J. Schultz, M.C. Suh, J.B. Ohlrogge // *Plant Physiol.* – 2000. – 2(124). – P. 681–92.
109. Shan, Q. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system / Q. Shan, Y. Wang, J. Li, C. Gao // *Nat Protoc.* – 2014. – 10(9). – P. 2395–2410.
110. Shanklin, J. Desaturation and related modifications of fatty acids / J. Shanklin, E. B. Cahoon // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 1998. – 49. – P. 611–641.
111. Shanklin, J. Desaturases: Emerging Models for Understanding Functional Diversification of Diiron-containing Enzymes / J. Shanklin, J.E. Guy, G. Mishra, Y. Lindqvist // *Journal of Biological Chemistry.* – 2009. – 28(284). – P. 18559–18563.
112. Sheludko, Y.V. Transient Expression of Human Cytochrome P450s 2D6 and 3A4 in *Nicotiana benthamiana* Provides a Possibility for Rapid Substrate Testing and Production of Novel Compounds / Y.V. Sheludko, I.M. Gerasymenko, H. Warzecha // *Biotechnol J.* – 2018. – 11(13). – P. 1700696.
113. Shi, Y. Integrated regulation triggered by a cryophyte  $\omega$ -3 desaturase gene confers multiple-stress tolerance in tobacco / Y. Shi, X. Yue, L. An // *J Exp Bot.* – 2018. – 8(69). – P. 2131–2148.
114. Smith, J.L. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants / J.L. Smith, C.M. Moraes, M.C. De Mescher // *Pest Management Sci.* – 2009. – 5(65). – P. 497–503.

115. Smith, M.A. Involvement of Arabidopsis ACYL-COENZYME A DESATURASE-LIKE2 (At2g31360) in the biosynthesis of the very-long-chain monounsaturated fatty acid components of membrane lipids / M.A. Smith, M. Dauk, H. Ramadan, H. Yang, L.E. Seamons, R.P. Haslam, F. Beaudoin, I. Ramirez-Erosa, L. Forseille // *Plant Physiol.* – 2013. – 1(161). – P. 81–96.
116. Somerville, C, *Plant Lipids: Metabolism, Mutants, and Membranes* / C. Somerville, J. Browse // *Science*. – 1991. – 5002(252). – P. 80–87.
117. Song, N. Overexpression of a wheat stearyl-ACP desaturase (SACPD) gene TaSSI2 in Arabidopsis ssi2 mutant compromise its resistance to powdery mildew / N. Song, Z. Hu, Y. Li, C. Li, F. Peng, Y. Yao, H. Peng, Z. Ni, C. Xie, Q. Sun // *Gene*. – 2013. – 2(524). – P. 220–227.
118. Sperling, P. The evolution of desaturases / P. Sperling, P. Ternes, T.K. Zank // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. – 2003. – 2(68). – P. 73–95.
119. Stearyl 9-desaturase organism:nicotiana in UniProtKB [Электронный ресурс]. [https://www.uniprot.org/uniprot/?query=stearyl 9-desaturase AND organism:%22nicotiana%22&sort=organism&desc=no](https://www.uniprot.org/uniprot/?query=stearyl+9-desaturase+AND+organism:%22nicotiana%22&sort=organism&desc=no).
120. Sui, N. Transcriptomic and Physiological Evidence for the Relationship between Unsaturated Fatty Acid and Salt Stress in Peanut / N. Sui, Y. Wang, S. Liu, Z. Yang, F. Wang, S. Wan // *Front Plant Sci.* – 2018. – 9. – P. 7.
121. Moore, T.S. Lipid Metabolism in Plants / T.S. Moore // *Science*. – 2018 – P. 55–56.
122. Tang, G.Q. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation / G.Q. Tang, W.P. Novitzky, H. Carol Griffin, S.C. Huber, R.E. Dewey // *Plant J.* – 2005. – 3(44). – P. 433–446.
123. Teixeira, M.C.  $\omega$ -3 Fatty Acid Desaturase Genes Isolated from Purslane ( *Portulaca oleracea* L.): Expression in Different Tissues and Response to Cold and Wound Stress / M.C. Teixeira, I.S. Carvalho, M. Brodelius // *J Agricultural Food Chem.* – 2010. – 3(58). – P. 1870–1877.
124. Thodberg, S. Elucidation of the Amygdalin Pathway Reveals the Metabolic Basis of Bitter and Sweet Almonds ( *Prunus dulcis* ) / S. Thodberg, J.D. Cueto, R. Mazzeo // *Plant Physiol.* – 2018. – 3(178). – P. 1096–1111.

125. Troncoso-Ponce, M.A. Transcriptional Activation of Two Delta-9 Palmitoyl-ACP Desaturase Genes by MYB115 and MYB118 Is Critical for Biosynthesis of Omega-7 Monounsaturated Fatty Acids in the Endosperm of Arabidopsis Seeds / M.A. Troncoso-Ponce, G Barthole, G Tremblais, A. To, M. Miquel, L. Lepiniec, S. Baud // *The Plant Cell*. – 2016. – 10(28). – P. 2666–2682.
126. Vigh, L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? / L. Vigh, B. Maresca, J.L. Harwood // *Trends Biochemical Sci.* – 1998. – 10(23). – P. 369–374.
127. Wada, H. In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes / H. Wada, H. Schmidt, E. Heinz, N. Murata // *Jof Bacteriol.* – 1993. – 2(175). – P. 544–547.
128. Wang, C.T. The 5' untranslated region of the FAD3 mRNA is required for its translational enhancement at low temperature in Arabidopsis roots / C.T. Wang, Y.N. Xu // *Plant Sci.* – 2010. – 3(179). – P. 234–240.
129. Wang, H.S. A tomato endoplasmic reticulum (ER)-type omega-3 fatty acid desaturase (LeFAD3) functions in early seedling tolerance to salinity stress / H.S. Wang, C. Yu, X.F. Tang, Z.J. Zhu, N.N. Ma, Q.W. Meng // *Plant Cell Rep.* – 2014. – 1(33). – P. 131–142.
130. Wang, H. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate / H. Wang, M.G. Klein, H. Zou, W. Lane, G. Snell, I. Levin, K. Li, B.C. Sang // *Nat Struct Mol Biol.* – 2015. – 7(22). – P. 581–585.
131. Wang, H. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes / H. Wang, W. Wang, J. Zhan, W. Huang, H. Xu // *Sci Horticulturae.* – 2015. – 191. – P. 82–89.
132. Wen, S. TALEN-mediated targeted mutagenesis of fatty acid desaturase 2 (FAD2) in peanut (*Arachis hypogaea* L.) promotes the accumulation of oleic acid / S. Wen, H. Liu, X. Li, X. Chen, Y. Hong, H. Li, Q. Lu, X. Liang // *Plant Mol Biol.* – 2018. – 1–2(97). – P. 177–185.

133. Wesley, S.V. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants / S.V. Wesley, C.A. Helliwell, N.A. Smith, M.B. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green, P.M. Waterhouse // *Plant J.* – 2001. – 6(27). – P. 581–590.
134. Xu, K. A Rapid, Highly Efficient and Economical Method of Agrobacterium-Mediated In planta Transient Transformation in Living Onion Epidermis / K. Xu, X. Huang, M. Wu, Y. Wang, Y. Chang, K. Liu, J. Zhang, Y. Zhang, F. Zhang, L. Yi, T. Li, R. Wang, G. Tan, C. Li // *PLoS One.* – 2014. – 1(9). – P. e83556.
135. Xue, Y. Omega-3 fatty acid desaturase gene family from two  $\omega$ -3 sources, *Salvia hispanica* and *Perilla frutescens*: Cloning, characterization and expression / Y. Xue, B. Chen, A.N. Win, C. Fu, J. Lian, X. Liu, R. Wang, X. Zhang, Y. Chai // *PLoS One.* – 2018. – 1(13). – P. e0191432.
136. Yadav, N.S. Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases / N.S. Yadav, A. Wierzbicki, M. Aegerter, C.S. Caster, L. Pérez-Grau, A.J. Kinney, W.D. Hitz, J.R. Booth, B. Schweiger, K.L. Stecca // *Plant Physiol.* – 1993. – 103. – P. 467–476.
137. Yang Q. Identification of FAD2 and FAD3 genes in *Brassica napus* genome and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents / Q. Yang, C. Fan, Z. Guo, J. Qin, J. Wu, Q. Li, T. Fu, Y. Zhou // *Theor Appl Genet.* – 2012. – 4(125). – P. 715–729.
138. You F.M. Genome-wide Identification and Characterization of the Gene Families Controlling Fatty Acid Biosynthesis in Flax (*Linum usitatissimum* L) / F.M. You, P. Li, S. Kumar, R. Ragupathy, Z. Li, Y.B. Fu, S. Cloutier // *J Proteom Bioinformat.* – 2014. – 10(07). – P. 310-326.
139. Yu, C. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato / C. Yu, H.S. Wang, S. Yang, X.F. Tang, M. Duan, Q.W. Meng // *Plant Physiol Biochem.* – 2009. – 11–12(47). – P. 1102–1112.
140. Yuan, S. Abiotic Stresses and Phytohormones Regulate Expression of FAD2 Gene in *Arabidopsis thaliana* / S. Yuan, X. Wu, Z. Liu, H.B. Luo, R.Z. Huang // *J Integ Agricult.* – 2012. – 1(11). – P. 62–72.

141. Yurchenko, O.P. Genome-wide analysis of the omega-3 fatty acid desaturase gene family in *Gossypium* / O.P. Yurchenko, S. Park, D.C. Ilut, J.J. Inmon, J.C. Millhollon, Z. Liechty, J.T. Page, M.A. Jenks, K.D. Chapman, J.A. Udall, M.A. Gore, J.M. Dyer // *BMC Plant Biol.* – 2014. – 1(14). – P. 312.
142. Zäuner, S. A cytochrome b5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii* / S. Zäuner, W. Jochum, T. Bigorowski, C. Benning // *Eukaryotic Cell.* – 2012. – 7(11). – P. 856–63.
143. Zhang, D. Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (FAD2-4) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants / D. Zhang, I.L. Pirtle, S.J. Park // *Plant Physiol Biochem.* – 2009. – 6(47). – P. 462–471.
144. Zhang, J. *Arabidopsis* Fatty Acid Desaturase FAD2 Is Required for Salt Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth / J. Zhang, H. Liu, J. Sun, B. Li, Q. Zhu, S. Chen, H. Zhang // *PLoS One.* 2012. – 1(7). – P. e30355.
145. Zhang, J. A stearyl-acyl carrier protein desaturase, NbSACPD-C, is critical for ovule development in *Nicotiana benthamiana* / J. Zhang, J. Li, H. Garcia-Ruiz, P.D. Bates, T.E. Mirkov, X. Wang // *Plant J.* – 2014. – 3(80). – P. 489–502.
146. Zhang, Y. Characterization of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene family from chocolate tree, *Theobroma cacao* L / Y. Zhang, S.N. Maximova, M.J. Guiltinan // *Front Plant Sci.* 2015. – 6. – P. 239.
147. Zhang, Z. Genome-wide identification and expression analysis of the fatty acid desaturase genes in *Medicago truncatula* / Z. Zhang, X. Wei, W. Liu, X. Min, X. Jin, B. Ndayambaza, Y. Wang // *Biochem and Biophys Res Commun.* – 2018. – 2(499). – P. 361–367.
148. Zhao, N. Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds / N. Zhao, Y. Zhang, Q. Li, R Li, X. Xia, X. Qin, H. Guo // *Plant Physiol Biochem.* – 2015. – 87. – P. 9–16.