



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)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва – 2020**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук», г. Москва

**Научный руководитель:**

**Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**  
доктор биологических наук, руководитель лаборатории функциональной геномики, отдела физиологических и молекулярных механизмов регуляции процессов онтогенеза и адаптации ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук» (ИФР РАН)

**Официальные оппоненты:**

**Кулуев Булат Разяпович**  
доктор биологических наук, заведующий лабораторией геномики растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

**Васина Дарья Владимировна**  
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярных основ биотрансформаций «ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН)

Защита состоится « 30 » июня 2020 г. в 12-00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.027.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499) 976-65-44, E-mail: [iab@iab.ac.ru](mailto:iab@iab.ac.ru); [marat131084@rambler.ru](mailto:marat131084@rambler.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ

Автореферат разослан « 27 » апреля 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



**Халилуев  
Марат Рушанович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

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 (С-С) связи между атомами углерода в ацильных цепях жирных кислот в двойную (С=С) 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. 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.

В растительной клетке за десатурацию ЖК отвечают растворимые ацил-АПБ-десатуразы и мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы. 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. дельта-9-ацил-АПБ 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 и обеспечивает, таким образом, субстратом другие десатуразы, которые последовательно образуют вторую (положение дельта-12), третью (дельта-15) и последующие двойные связи. Считается, что ацил-АПБ десатуразы растений, локализованы в хлоропластах (пластидах), тогда как мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы в микросомах эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

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, дельта-9-ацил-липидной десатуразы ( $\Delta 9$  десатураза) *Synechococcus vulcanus*, обусловлено в первую очередь тем, что в растительной клетке имеется большое количество дельта-9-ацил-АПБ десатураз, они недостаточно изучены, и не до конца понятно 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, 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.

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.

### **Степень разработанности темы исследований**

Клеточная локализация белков у всех живых организмов тесно взаимосвязана с их функциями. Получение экспериментальных данных о взаимосвязи локализации белка и его функциональной эффективности, может оказать неоценимую помощь в понимании регуляции ключевых биологических процессов на клеточном уровне. На сегодняшний день имеются только фрагментарные данные том, как локализация дельта-9-ацил-липидной десатуразы в различных компартментах растительной клетки взаимосвязана с ее функциональной эффективностью, а именно, с процессом модуляции ненасыщенности жирных кислот (ЖК) мембранных липидов растений

### **Цель исследования**

Изучение физиологической роли дельта-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 дельта-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* дельта-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 дельта-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 дельта-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 дельта-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 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 дельта-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**

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 дельта-9-ацил-липидную десатуразу.

При конструировании экспрессионных векторов использовались стандартные процедуры молекулярного клонирования и протоколы полимеразной цепной реакции (ПЦР). При агроинфекции 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 Носова с небольшими дополнениями.

Оценку локализации белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в тканях агрофильтрированных листьев проводили с помощью лазерной сканирующей микроскопии.

Оценку локализации белковых продуктов гибридного гена *desC-egfp* в протопластах проводили с помощью флуоресцентной микроскопии. Влияние дельта-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 представление научного доклада**

1. Создана серия экспрессионных векторов, несущих нативный *desC* и рекомбинантный ген *desC-egfp* с сигнальными последовательностями, которые направляют белковый продукт гена *desC* в такие компартменты растительной клетки как: хлоропласты, эндоплазматический ретикулум и цитоплазму.
2. Разработана системы транзientной экспрессии генов, удобной как для оценки сигнальных последовательностей, так и исследования локализации искомым белков в растительной клетке
3. 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.
4. Локализация белковых продуктов гена *desC* в цитоплазме, хлоропластах и ЭПР приводит к существенному изменению липидного метаболизма у двух видов табака.
5. Определена наилучшая клеточная локализация дельта-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. Эксперименты по анализу состава, массовой доли насыщенных и ненасыщенных ЖК суммарных липидов, а также оценки соотношения продукт/субстрат и индекса ненасыщенности ЖК проведены в трех биологических повторностях. 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.).

## Публикации

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

### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), конкретно пункту — пункту 8 и 9.

### Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

#### 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. Во второй серии векторов - pVIG-D9, pVIG-Lch-D9 и pVIG-LeB4-D9-ER – использован только нативный *desC* ген цианобактерий.

В pVIG-Lch-D9 и pVIG-Lch-D9E векторах нативный (*desC*) и гибридный (*desC-egfp*) ген, соответственно, имеет в 5'-области последовательность Lch, кодирующую транзитный пептид малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК) *A. thaliana*, которая обеспечивает локализацию целевых белков в хлоропластах. 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 (легумина типа B4) гороха (*Vicia faba*) для локализации белкового продукта в ЭПР, а в 3'-области добавлен фрагмент, кодирующий сигнал удержания белков в ЭПР – SRKDEL.

#### Растительный материал, штаммы агробактерий и агроинфильтрация

Растения *N. benthamiana* и *N. excelsior* выращивали при  $+22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 8-часовом фотопериоде, освещенности 100 мкмоль квантов/( $\text{m}^2\text{s}$ ) на гидропонике, используя в качестве питательной среды раствор Кнопа. pVIG-E, pVIG-D9, pVIG-D9E, pVIG-Lch-D9, pVIG-Lch-D9E, pVIG-D9-ER и pVIG-D9E-ER векторами трансформировали штамм агробактерий *A. tumefaciens* GV3101. Бактериальные трансформанты отбирали на среде с канамицином и обозначали в соответствии с используемым для трансформации экспрессионным вектором. Полученные трансформанты агробактерий использовали для агроинфильтрации, которую проводили в абаксиальную эпидерму листьев шестинедельных растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* с помощью шприца без иглы.

После агроинфильтрации растения табака культивировали в тех же условиях, в течение 7 суток. Для последующего анализа использовали агроинфильтрированные фрагменты листьев.

### **Получение протопластов**

Получения протопластов из фрагментов листьев с зонами флуоресценции проводили следующим образом. Фрагменты листьев были измельчены скальпелем, после чего добавляли 5 мл раствора, содержащего ½ макросолей SH среды, 0.4 М сорбитола, 4 мМ CaCl<sub>2</sub>, 12.5 мМ MES-KOH (pH 5.7), 1% целлюлазы Onozuka R10 (Kinki Yakult, Япония), 0.15% пектиназы Macerzyme R10 (Kinki Yakult), и 0.4% гемицеллюлазы Driselase (Fluka, США). Раствор готовили предварительно, осветляли центрифугированием, и замораживали. Протопласты выделяли при +15°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 мМ CaCl<sub>2</sub>, 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 мМ CaCl<sub>2</sub>.

### **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 фильтром 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 (lex BP 470 нм/40 нм; lem BP 525 нм/50 нм, где ex – возбуждение, em - эмиссия (флуоресценция)) использовали для регистрации флуоресценции GFP; фильтр № 45 (lex BP 560 нм/40 нм; lem 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).

### **Выделение и анализ жирных кислот суммарных липидов тканей листьев *Nicotiana benthamiana* и *N. excelsior* и их анализ**

Образцы (агроинфильтрованные участки листьев растений) измельчали скальпелем, нагревали до кипения 30 мин в изопропанол, содержавшем 0.001% антиоксиданта (ионола) и 1 мг маргариновой кислоты в качестве внутреннего стандарта (гептадекановой кислоты, 17:0), гомогенизировали в ступке и кипятили 60 мин в 8% растворе KOH в изопропанол. Изопропанол выпаривали, замещая его равным объемом воды, и неомыляемые липиды удаляли гексаном. Раствор подкисляли до pH 2, свободные ЖК экстрагировали гексаном и превращали их в метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) кипячением в смеси 10 мл CH<sub>3</sub>OH и 0.5 мл CH<sub>3</sub>COCl в течение 1 ч. МЭЖК очищали с помощью препаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинке с силикагелем и разделяли методом газо-жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии (ГЖХ-МС). Абсолютное содержание ЖК и их состав рассчитывали в процентах от их общего содержания в исследуемом образце.



### Статистический анализ результатов

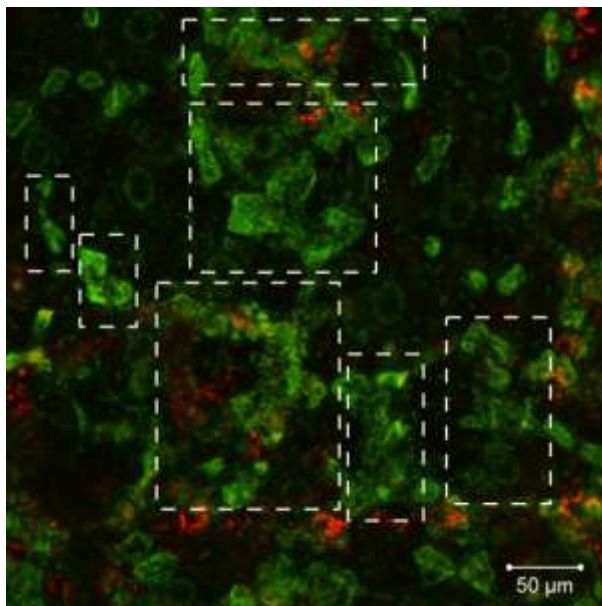
Все эксперименты по изучению субклеточной локализации дельта-9-ацил-липидной десатуразы были повторены независимо не менее трех раз. Для определения локализации целевых белков в протопластах проанализировано не менее 100 биологических образцов.

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 метода доверительных интервалов и 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

### **Основные результаты и обсуждение**

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

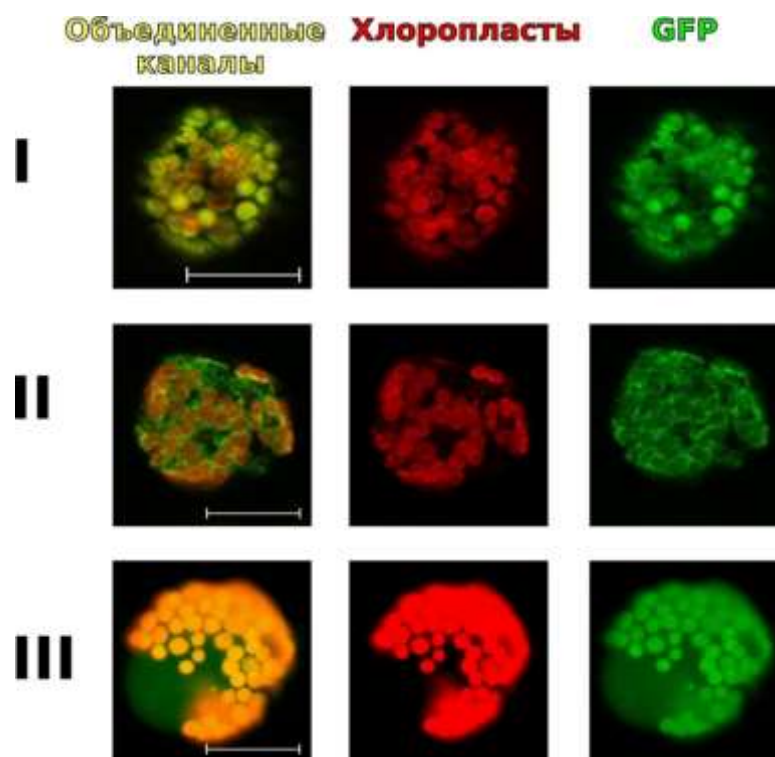
Для агроинфильтрации растений *N. benthamiana* были получены штаммы *A. tumefaciens* GV3101, несущие экспрессионные векторы pVIG-D9E, pVIG-Lch-D9E и pVIG-LeB4-D9E-ER. Эффективность транзientной экспрессии в растениях оценивали по флуоресценции репортерного белка eGFP. Через два-три дня после инфильтрации, очевидный GFP сигнал можно было наблюдать в агроинфильтрированных участках листьев, а пик флуоресценции eGFP был отмечен на четвертый-пятый день. 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 (рис. 1).



**Рис. 1.** Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия: флуоресценция GFP. Агробактерии, несущие экспрессионные вектор pVIG-Lch-DE были инфильтрированы в листья *N. benthamiana* и флуоресценцию GFP наблюдали через 4 дня после агроинфильтрации. Области флуоресценции отмечены пунктирными линиями.

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.

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 (рис. 2).



**Рис. 2.** Анализ субклеточной локализации слитых с GFP белков в протопластах табака, полученных из клеток агроинфильтрированной области листьев. Транзиентная 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.

В протопластах, полученных после агроинфильтрации штаммом, несущим pVIG-Lch-D9E плазмиду, практически все хлоропласты продемонстрировали флуоресценцию в жёлтой части спектра (рис. 2, 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*.

Добавление N-концевого сигнального пептида LeB4 индуцирует перенос химерного белка DesC-EGFP через мембрану ЭПР, а C-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 агроинфильтрации штаммом, несущим pVIG-LeB4-D9E-ER вектор (рис. 2, II).

Протопласты, полученные из агроинфильтрированных листьев штаммом, несущим pVIG-D9E вектор, показали сигнал флуоресценции слитого белка DesC-EGFP в цитоплазме (рис. 2, III).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что в протопластах из агроинфильтрированных участков растений можно четко дискриминировать локализацию слитых белков в ожидаемых компартментах.

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

Первоначально мы попытались выяснить, может ли измениться профиль ЖК после применения процедуры агроинфильтрации, и таким образом получить ответ о возможности применения метода транзиентной экспрессии для последующей оценки функциональной активности десатуразы.

Для этого провели сравнительный анализ ЖК состава, а также рассчитали индекс ненасыщенности (ИН), соотношение ЖК 18:1 к 18:0 (стеароил-десатуразное отношение (СДО)) и ЖК 16:1 к 16:0 (пальмитоил-десатуразное отношение (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).

После агроинфильтрации у *N. benthamiana* отмечено достоверное снижение только ЖК 18:1 и 16:3, а также СДО (табл. 1). 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 (табл. 3).

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* (табл. 1, 2).

Таким образом, полученные данные, в целом, позволяют предположить, что транзиентная 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.

Дополнительно, основываясь на полученных данных ЖК профиля у НТ-растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*, сравнили соотношения ЖК 18 к ЖК 16 (С18/С16) у этих двух видов табака, и выяснили, что это соотношение значительно отличается. Так, для *N. benthamiana* С18/С16 составило 3:1, 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* (табл. 3). 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: С18 – *N. benthamiana* и С16 – *N. excelsior*.

**Таблица 1.** ЖК состав листьев нетрансформированных (НТ) и трансформированных (Т) растений *N. benthamiana*. Значение ± стандартная ошибка 6 экспериментов.

<i>N. benthamiana</i>	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	ИН	СДО	ПДО
НТ	20.15± 0.82	2.75± 0.31	4.30± 0.18	3.73± 0.28	2.60± 0.10	8.74± 0.38	49.36± 1.70	1.94± 0.08	0.40± 0.06	0.12± 0.01
Т	22.16± 1.74	2.40± 0.35	3.27± 0.68*	3.15±0 .25	0.79± 0.17*	7.42± 0.25	52.74± 1.54	1.94± 0.03	0.22± 0.01*	0.10± 0.01

\* достоверные отличия ( $p \leq 0.05$ ) в значениях по сравнению с листьями экспрессирующими eGFP белок

**Таблица 2.** ЖК состав листьев нетрансформированных (НТ) и трансформированных (Т) растений *N. excelsior*. Значение ± стандартная ошибка 6 экспериментов.

<i>N. excelsior</i>	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	ИН	СДО	ПДО
НТ	39.56± 0.93	1.85± 0.42	4.89± 0.21	9.05± 0.24	5.08± 0.86	12.7± 0.42	23.38± 1.1	1.18± 0.06	0.34± 0.04	0.04± 0.02
Т	38.73± 1.53	3.54± 0.49*	3.84± 0.17*	10.2± 0.57	1.40± 0.20*	14.4± 0.57	23.61± 0.88	1.19± 0.05	0.12± 0.02*	0.08± 0.02

\* достоверные отличия ( $p \leq 0.05$ ) в значениях по сравнению с листьями экспрессирующими eGFP белок

**Таблица 3.** ЖК состав листьев нетрансформированных (НТ) растений *N. benthamiana* и *N. excelsior*. Значение ± стандартная ошибка.

	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	ИН	СДО	ПДО
<i>N. benthamiana</i>	20.15± 0.82	2.75± 0.31	4.30± 0.18	3.73± 0.28	2.60± 0.10	8.74± 0.38	49.36± 1.70	1.94± 0.08	0.40± 0.06	0.12± 0.01
<i>N. excelsior</i>	39.56± 0.93	1.85± 0.42	4.89± 0.21	9.05± 0.24	5.08± 0.86	12.7± 0.42	23.38± 1.1	1.18± 0.06	0.34± 0.04	0.04± 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), или слитый с сигнальными последовательностями (pVIG-Lch-D9 и pVIG-D9-ER), 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).

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 (табл. 4, 5, рис.3). 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 (табл. 4, 5, рис.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) (табл. 4, 5, рис.3). 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) (табл. 4, 5, рис.3). 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 (табл. 4, 5, рис.3).

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) (табл. 4, 5, рис.3).

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 белка в растительной клетке.

**Таблицы 4.** ЖК состав трансформированных листьев *N. Benthamiana* на 7 сутки после трансформации. Значения  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам.

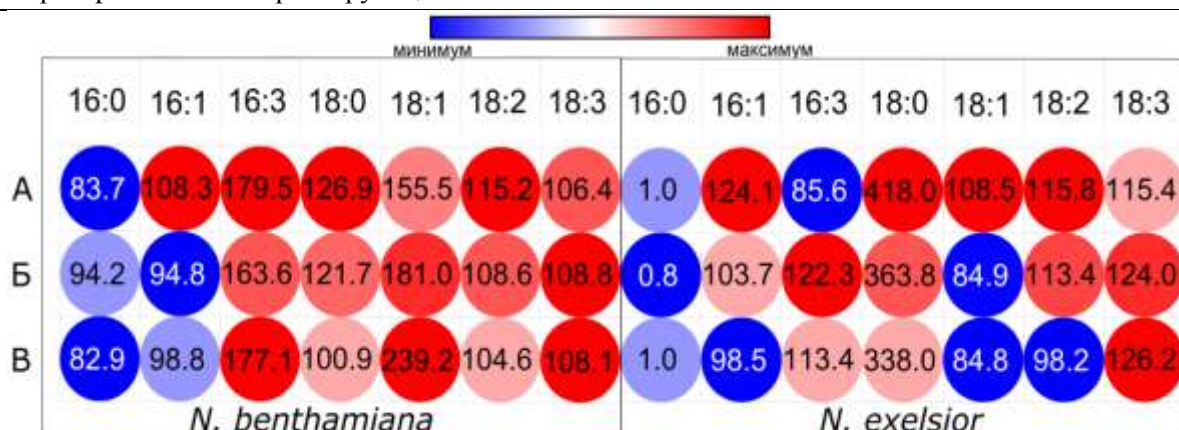
<i>N. benthamiana</i>	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	ИН	СДО	ПДО
pVIG-E	22.16 $\pm$ 1.74	2.40 $\pm$ 0.35	3.27 $\pm$ 0.68	3.15 $\pm$ 0.25	0.7 $\pm$ 0.17	7.4 $\pm$ 0.25	52.74 $\pm$ 1.54	1.94 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01
Цитоплазма	18.36 $\pm$ 0.9*	2.37 $\pm$ 0.40	5.79 $\pm$ 0.65*	3.19 $\pm$ 0.81	1.9 $\pm$ 0.28*	7.7 $\pm$ 0.23	57.00 $\pm$ 1.12*	2.05 $\pm$ 0.03*	0.35 $\pm$ 0.05*	0.12 $\pm$ 0.01
Хлоропласты	20.87 $\pm$ 0.86	2.28 $\pm$ 0.56	5.35 $\pm$ 0.94*	3.84 $\pm$ 0.17*	1.44 $\pm$ 0.21*	8.0 $\pm$ 0.13*	57.39 $\pm$ 1.43*	2.02 $\pm$ 0.02*	0.27 $\pm$ 0.02*	0.11 $\pm$ 0.02
ЭПР	18.5 $\pm$ 1.26*	2.60 $\pm$ 0.57	5.87 $\pm$ 0.55*	4.01 $\pm$ 0.25*	1.24 $\pm$ 0.12*	8.56 $\pm$ 0.31*	56.10 $\pm$ 1.16*	2.06 $\pm$ 0.04*	0.22 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01*

\* достоверные отличия ( $p \leq 0.05$ ) в значениях по сравнению с листьями трансформированными вектором pVIG-E и экспрессирующими eGFP белок

**Таблицы 5.** ЖК состав трансформированных листьев *N. excelsior* на 7 сутки после трансформации. Значения  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам.

<i>N. excelsior</i>	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	DBI	SDR	PDR
pVIG-E	38.73 $\pm$ 1.53	3.54 $\pm$ 0.49	3.84 $\pm$ 0.17	10.2 $\pm$ 0.57	1.40 $\pm$ 0.20	14.4 $\pm$ 0.57	23.61 $\pm$ 0.88	1.19 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02
Цитоплазма	0.40 $\pm$ 0.18*	3.48 $\pm$ 0.41	4.35 $\pm$ 0 .12*	34.6 $\pm$ 1.32*	1.19 $\pm$ 0.18	14.14 $\pm$ 0.63	29.80 $\pm$ 0.87*	1.40 $\pm$ 0.04*	0.03 $\pm$ 0.02*	0.90 $\pm$ 0.03*
Хлоропласты	0.29 $\pm$ 0.05*	3.67 $\pm$ 0.80	4.70 $\pm$ 0 .27*	37.2 $\pm$ 1.33*	1.19 $\pm$ 0.28	16.3 $\pm$ 0.55*	29.28 $\pm$ 1.90*	1.33 $\pm$ 0.04*	0.03 $\pm$ 0.01*	0.92 $\pm$ 0.05*
ЭПР	0.38 $\pm$ 0.07*	4.39 $\pm$ 1.66	3.28 $\pm$ 0 .66	42.7 $\pm$ 3.84*	1.52 $\pm$ 0.66	16.6 $\pm$ 0.70*	27.23 $\pm$ 0.81*	1.37 $\pm$ 0.06*	0.03 $\pm$ 0.01*	0.92 $\pm$ 0.02*

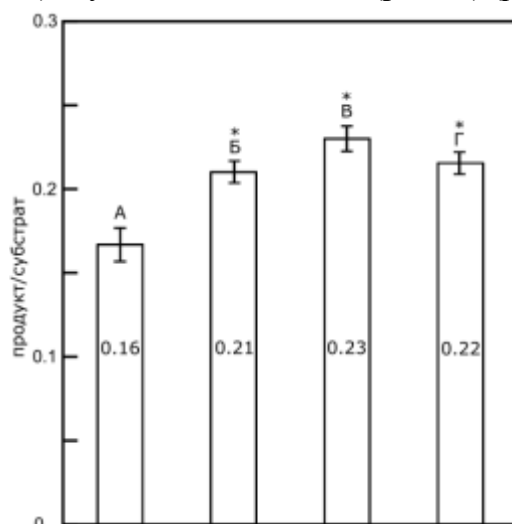
\* достоверные отличия ( $p \leq 0.05$ ) в значениях по сравнению с листьями трансформированными вектором pVIG-E и экспрессирующими eGFP белок



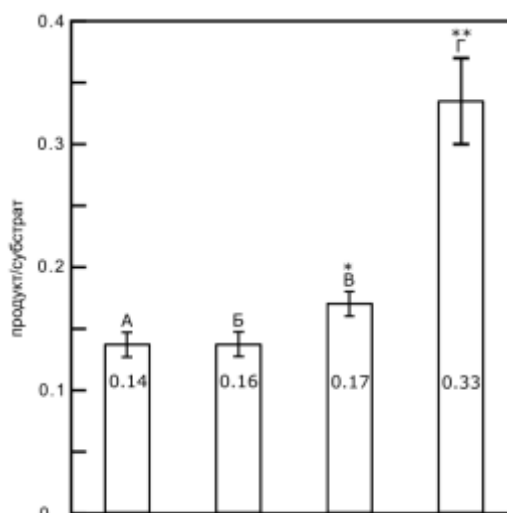
**Рис. 3.** Тепловая карта изменений содержания ЖК в листьях трансформированных растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* в процентах от контроля (pVIG-E) принятого за 100%, на 7 день после трансформации при локализации  $\Delta 9$  десатуразы в цитоплазме (А), хлоропластах (Б), и ЭПР (В).

### 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 ( $p \leq 0.01$ ) (рис.4), а у *N. Excelsior* в ЭПР ( $p \leq 0.05$ ) (рис.5).



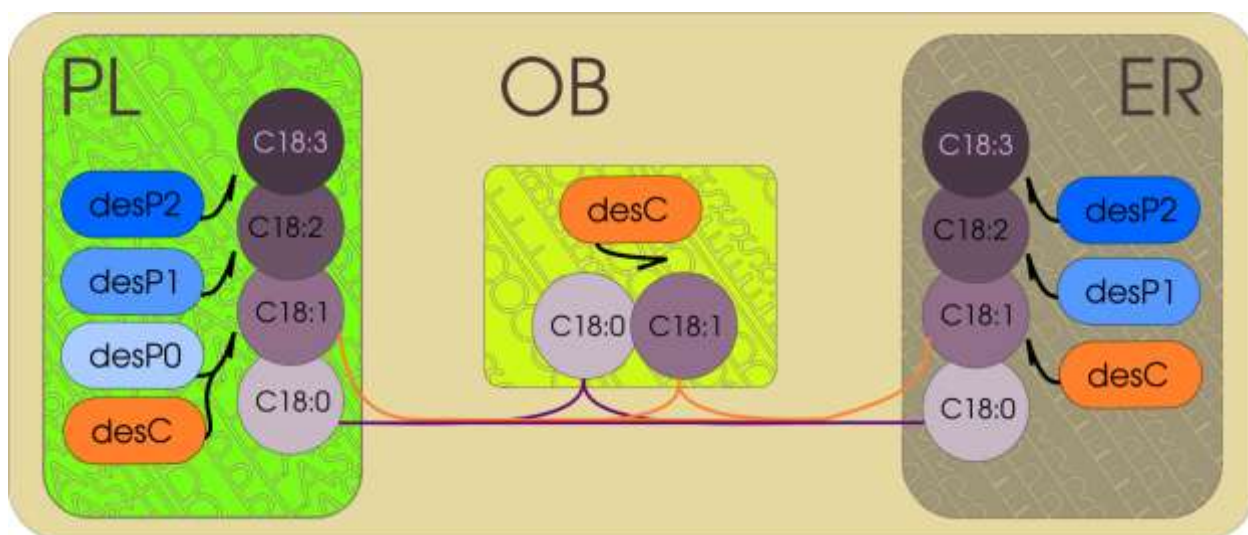
**Рис. 4.** Отношение продукт/субстрат в трансформированных листьях *N. Benthamiana*. А – контроль (pVIG-E, экспрессия eGFP белка). Б – цитоплазматическая локализация  $\Delta 9$  десатуразы. В – хлоропластная локализация  $\Delta 9$  десатуразы. Г – локализация  $\Delta 9$  десатуразы в ЭПР. Значение  $\pm$  стандартная ошибка по 6 экспериментам. \* – достоверное отличие значения от контроля (pVIG-E, экспрессия eGFP белка),  $p \leq 0.01$  (t-критерий Стьюдента).



**Рис. 5.** 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).



Несмотря 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 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). В отношении данного феномена может быть предложен следующий механизм, посредством которого увеличивается количество ПНЖК. Поскольку дельта-9-ацил-липидная десатураза относится к классу мембраносвязанных десатураз и не может функционировать, не будучи интегрированной в мембрану она демонстрирует функциональную активность. По-видимому, дельта-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 (рис. 6).



**Рис. 6.** 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.

## 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. 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. - Т.64, №4. - С. 363-371.
2. **Берестовой, М.А.** Растительные десатуразы: Роль в жизнедеятельности растений и биотехнологический потенциал / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, И.В. Голденкова-Павлова // Успехи современной биологии. - 2019. -Т. 139, № 4. - С. 338-351
3. **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 // *Biologia plantarum*. - 2020. - V. 64. - P. 167-177.

### Публикации в других изданиях, тезисы докладов

1. **Berestovoy, M.** Transient Gene Expression for the Characteristic Signal Sequences and the Estimation of the Localization of Target Protein in Plant Cell / M. Berestovoy, A.Tyurin, K.

Kabardaeva, Yu. Sidorchuk, A.Fomenkov, A. Nosov, I. Goldenkova-Pavlova // Bio-protocol. - 2018. - V. 8, №4. - P. e2738.

2. **Берестовой, М.А.** Использование транзientной экспрессии генов для характеристики сигнальных последовательностей и оценки локализации целевых белков в растительной клетке / М.А. Берестовой, А.А. Тюрин, К.В. Кабардаева, Ю.В. Сидорчук, А.А. Фоменков, А.В. Носов, И.В. Голденкова-Павлова // Сборник тезисов 21-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века». Пущино, 17-21.04.2017. - С. 252.
3. **Берестовой, М.А.** Жирно-кислотный состав растений *N. benthamiana* при различной локализации продуктов гена дельта-9-десатуразы / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, А.А. Тюрин, К.В. Кабардаева, Р.А. Сидоров, Д.А. Лось, И.В. Голденкова-Павлова // Материалы конференции «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты». Судак, 18-24.09.2017. - С. 104.
4. **Берестовой, М.А.** Применение транзientной экспрессии генов для исследования локализации белков в растительной клетке / М.А. Берестовой, А.А. Тюрин, Ю.В. Сидорчук, А.А. Фоменков, А.В. Носов, И.В. Голденкова-Павлова / Сборник тезисов 18-ой Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва, 19-20.04.2018. - С. 19.
5. **Берестовой, М.А.** Исследование функциональной роли  $\Delta 9$ -десатуразы в зависимости от внутриклеточной локализации в растительной клетке / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, А.А. Тюрин, Р.А. Сидоров, И.В. Голденкова-Павлова // Сборник тезисов 2-ой Научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений». Минск, 28-31.05.2018. - С. 36-37.
6. **Берестовой, М.А.** Изучение функциональной роли  $\Delta 9$ -десатуразы в зависимости от внутриклеточной локализации в растительной клетке с использованием транзientной экспрессии / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, А.А. Тюрин, Р.А. Сидоров, И.В. Голденкова-Павлова // Сборник тезисов Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018. Уфа, 13-17.06.2018. - С. 103.
7. **Берестовой, М.А.** Исследование локализации и функциональной роли белков в растительной клетке с помощью транзientной экспрессии, на примере ацил-липидной  $\Delta 9$ -десатуразы / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, А.А. Тюрин, Р.А. Сидоров, И.В. Голденкова-Павлова // Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости

растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды». Иркутск, 10-15.07.2018. - С. 1183-1186.

8. **Берестовой, М.А.** Транзиентная экспрессия гетерологичных генов в растениях - новые возможности для функциональной геномики растений, на примере гетерологичной  $\Delta 9$  ацил-липидной десатуразы / М.А. Берестовой, О.С. Павленко, А.А. Тюрин, Р.А. Сидоров, И.В. Голденкова-Павлова // Сборник тезисов IX Съезда общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего». Казань, 18–24 сентября 2019 г. - С. 67.