

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ БЕЛКОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ, НА ПРИМЕРЕ АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ $\Delta 9$ -ДЕСАТУРАЗЫ

М.А. Берестовой^{1,2}, О.С. Павленко², А.А. Тюрин², Р.А. Сидоров², И.В. Голденкова-Павлова²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, m.berestovoy1181@gmail.com

Аннотация. Нами проведено исследование локализации и функциональной роли целевого белка в растительной клетке с использованием унифицированных векторов для транзientной экспрессии, несущих последовательности гена $\Delta 9$ -десатуразы и лидерные последовательности для локализации белкового продукта гена в цитоплазме, хлоропластах и ЭР. Исследование включает тонкую визуализацию целевого белка в компартментах клеток и оценку изменения в составе и массовой доле жирных кислот в зависимости от локализации.

Ключевые слова: транзientная экспрессия, протопласты, агроинфильтрация, $\Delta 9$ -десатураза, субклеточная локализация.

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1183-1186

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 имеется недостаточно данных том, как локализация $\Delta 9$ -десатуразы в различных компартментах растительной клетки взаимосвязана с ее функциональной эффективностью, а именно, с процессом модуляции ненасыщенности жирных кислот (ЖК) мембранных липидов растений.

В данной работе нами проведен анализ локализации целевого белка в растительной клетке при использовании разных сигнальных последовательностей с последующим исследованием его функциональной роли. Для транзientной экспрессии в растениях табака *N. benthamiana* нами использовался гибридный ген *desC-egfp*, включающий последовательность *desC* гена, кодирующего $\Delta 9$ -десатуразу цианобактерий, и последовательность гена *egfp*, белковым продуктом которого является зеленый флуоресцентный белок. В растительные экспрессионные вектора введены последовательности, обеспечивающие транспорт белкового продукта гибридного *desC-egfp* гена в разные клеточные компартменты (хлоропласты и эндоплазматический ретикулум (ЭР)). Из агроинфильтрированных листьев взяты участки с максимальным уровнем флуоресценции eGFP с последующей оценкой локализации гибридного белка методом лазерной конфокальной микроскопии. Однако, с использованием этого метода оценить локализацию гибридного белка как в хлоропластах, так и ЭР оказалось затруднительно (рис. 1).

Вероятно, это обусловлено сложными очертаниями клеток и пространственной структурой самих растительных компартментов. Схожие ограничения при исследовании локализации белков в растительных клетках с использованием метода агроинфильтрации отмечены и другими исследователями [Wang et al., 2015; Xu et al., 2014].

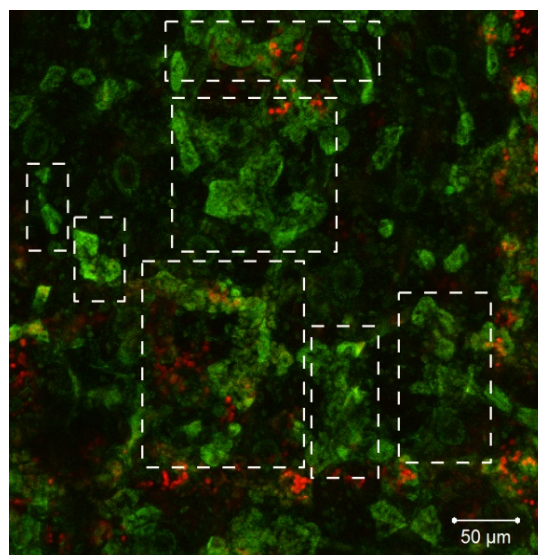


Рис. 1. Флуоресценция GFP в агроинфильтрированных листьях *Nicotiana benthamiana*. Агробактерии, несущие кассеты экспрессии слитых с GFP белков были инфильтрированы в листья *N. benthamiana* и флуоресценцию GFP наблюдали через 4 дня после агроинфильтрации при УФ свете. Области флуоресценции отмечены пунктирными линиями.

Чтобы преодолеть это ограничение, из участков агроинфильтрированных листьев с максимальной флуоресценцией выделены протопласты, которые затем были проанализированы с помощью флуоресцентной микроскопии. В результате продемонстрировано, что получение протопластов из инфильтрированной листовой ткани после транзientной экспрессии позволяет легко визуализировать локализацию целевых белковых продуктов в растительной клетке. А именно, нами визуализирована локализация слитого белка DesC-EGFP в соответствующих компартментах клетки для каждой сигнальной последовательности (рис. 2).

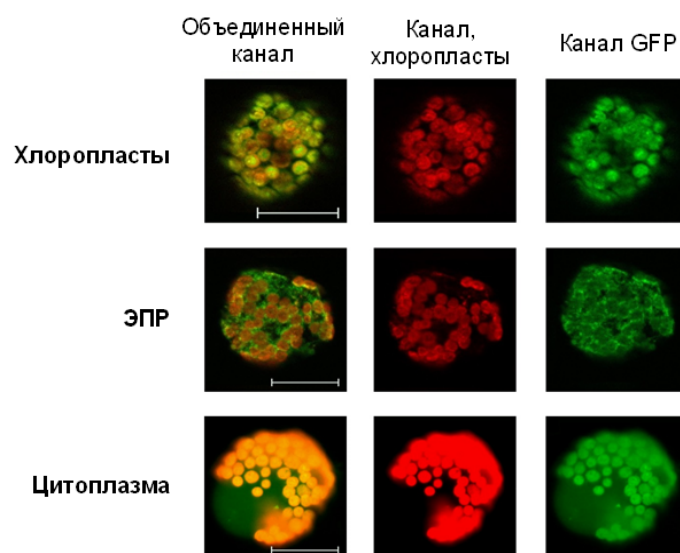


Рис. 2. Анализ субклеточной локализации слитых с GFP белков в протопластах табака, полученных из клеток агроинфильтрированной области листьев. Объединенные рисунки (первая колонка) включает зеленый канал (последняя колонка) и канал автофлуоресценции хлоропластов (средняя колонка). Размерность 10 μм.

Для того чтобы ответить на вопрос как локализации $\Delta 9$ десатуразы влияет на жирнокислотный состав суммарных липидов и как локализация дельта-9-десатуразы взаимосвязана с ее функциональной эффективностью, а именно, с процессом модуляции ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов растений, был изучен жирнокислотный состав суммарных липидов. На основе полученных данных о весовых процентах жирных кислот от их общего содержания в исследуемом образце и массы жирных кислот в миллиграммах относительно количества стандартного соединения (гептадекановой кислоты) было рассчитано отношение массы продукта реакции десатурации (олеиновая кислота) к массе его субстрата (стеариновая кислота) и индекс ненасыщенности (ИН). Было убедительно продемонстрировано, что отношение продукт/субстрат и значение ИН всегда выше у образцов, трансформированных плазмидами несущими ген дельта-9-десатуразы по сравнению с контрольными образцами (рис. 3-4) и значения рассчитанных показателей при разной локализации $\Delta 9$ -десатуразы в растительной клетке различаются.

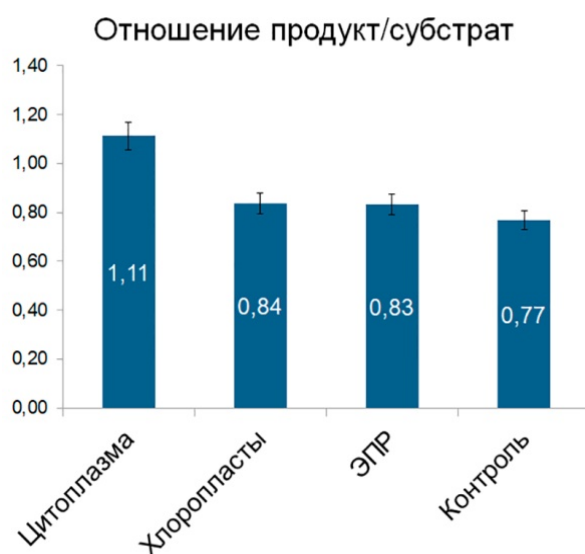


Рис. 3. Отношение продукта реакции десатурации к его субстрату в образцах.

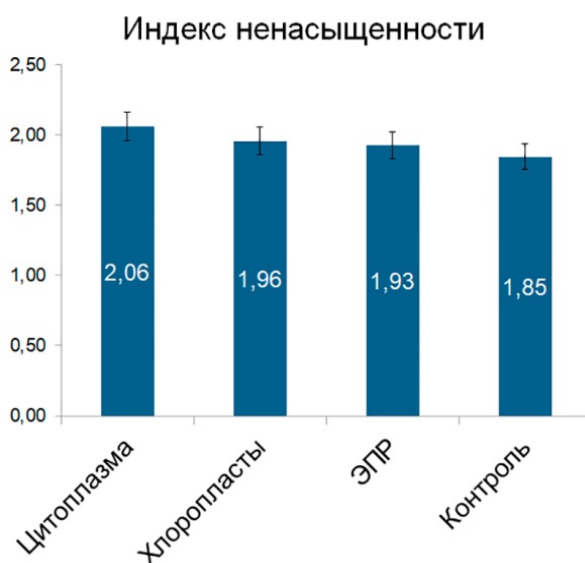


Рис. 4. Индекс ненасыщенности, рассчитанный по методу [Lyons et al., 1964].

Таким образом, нами доказано, что лидерные последовательности обеспечивают корректную локализацию белкового продукта рекомбинантного гена в соответствующих компартментах растительной клетки: в хлоропластах, в ЭР и в цитоплазме. Убедительно продемонстрирована региоспецифичность гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы в зависимости от ее локализации в растительной клетке. Оценен вклад $\Delta 9$ -десатуразы в состав и массовую долю насыщенных и ненасыщенных жирных кислот суммарных липидов, и установлено, что эти показатели при разной локализации $\Delta 9$ -десатуразы в растительной клетке различаются. Показано, что метод транзientной экспрессии может быть применен для изучения вклада десатураз в модуляцию жирнокислотного состава мембранных липидов растений. Предложена удобная, быстрая и надежная система транзientной экспрессии генов, перспективная для характеристики сигнальных последовательностей и оценки локализации целевых белков в растительной клетке, протокол которой включает агроинфильтрацию с последующим получением протопластов из агроинфильтрированных участков листьев.

Литература

Lyons J.M., Wheaton T.A., Pratt H.K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants// *Plant Physiol.* – 1964. – V. 39, No. 2. – P. 262–268.

Wang H., Wang W., Zhan J., Huang W., Xu H. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes // *Scientia Horticulturae.* – 2015. – V. 191. – P. 82–89.

Xu K., Huang X., Wu M., Wang Y., Chang Y., Liu K., Zhang J., Zhang Y., Zhang F., Yi L., Li T., Wang R., Tan G., Li C. A rapid, highly efficient and economical method of agrobacterium-mediated in planta transient transformation in living onion epidermis // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9, No. 1. – e83556.

USE TRANSIENT EXPRESSION FOR STUDY OF THE LOCALIZATION AND FUNCTIONAL ROLE OF PROTEINS IN A PLANT CELL, ON THE EXAMPLE OF ACYL-LIPID $\Delta 9$ -DESATURASE

M.A. Berestovoy, O.S. Pavlenko, A.A. Tyurin, R.A. Sidorov, I.V. Goldenkov-Pavlova

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
m.berestovoy1181@gmail.com

Abstract. We studied the localization and functional role of the target protein in the plant cell using unified vectors for transient expression with the gene sequence of $\Delta 9$ desaturase and leader sequences for localization the protein product of the gene in the cytoplasm, chloroplasts, and ER. The study includes fine visualization of the target protein in cell compartments and an estimation of the changes in composition and mass fraction of fatty acids, depending on its localization.

Keywords: *transient expression, protoplasts, agroinfiltration, $\Delta 9$ -desaturase, subcellular localization*