

*На правах рукописи*



**Демиденко Артем Владимирович**

**Выделение и функциональный анализ нового АБК-регулируемого  
гена и кодируемого им белка из *Lupinus luteus***

**03.01.05 – физиология и биохимия растений**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Москва – 2010**

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Учреждения  
Российской академии наук Института физиологии растений  
им. К.А.Тимирязева РАН, г. Москва

**НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:**

Доктор биологических наук, профессор,	Кузнецов Виктор Васильевич
Кандидат биологических наук	Кудрякова Наталья Васильевна

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:**

Доктор биологических наук	Клячко Нелла Леопольдовна
Доктор биологических наук	Соловьев Александр Александрович

**ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:**

Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет

Защита диссертации состоится «22» июня в 15 часов на заседании диссертационного  
совета Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте  
физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва,  
ул. Ботаническая, д.35.

Факс: (495) 977 80 18, электронная почта: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии  
наук Института физиологии растений им. К А Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «21» мая 2010 г.

Ученый секретарь совета  
по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В связи с тем, что растениям свойственен прикрепленный образ жизни, они должны приспосабливаться к многочисленным внешним воздействиям и соответствующим образом координировать свой рост и развитие. Растительные гормоны – группа различных по структуре малых молекул – являются центральными сигнальными единицами в процессе интеграции различных стимулов окружающей среды с генетической программой растений. Большинство гормонов вовлечено во множество различных процессов в течение роста и развития растений (Кулаева., Прокопцева, 2004; Алехина и др, 2005; De Smet et al, 2006).

Единая картина гормонального сигналинга пока не создана, и, несмотря на то, что было предпринято немало попыток объединения имеющихся данных, современная модель представляет собой набор условно связанных фрагментарных путей регуляции, относящихся к индивидуальным гормонам, и лишь в немногих случаях описаны взаимодействия элементов регуляторных систем от двух и более гормонов. Однако все возрастающее количество данных указывает на то, что гормональная регуляция у растений организована не в виде линейных, изредка пересекающихся путей, а в виде общей сети, узлы которой, связанные с ответами на различные стимулы, находятся в постоянном взаимодействии между собой (Santner and Estelle, 2009).

Одним из наиболее важных направлений в физиологии растений, имеющим фундаментальное и прикладное значение, является изучение механизмов толерантности растений к стрессовым условиям окружающей среды. *Абсцизовая кислота (АБК)* играет ключевую роль в регулировании механизмов обеспечения устойчивости к широкому спектру стрессов окружающей среды (Addicott, 1983), а также к биопатогенам. АБК отвечает за устойчивость к засухе, повышенной засоленности и холодовому стрессу, т.о. позволяя растениям колонизировать экологические ниши, где доступность воды крайне ограничена, либо непостоянна. Существуют предположения, что в 21 столетии недостаток воды станет одной из наиболее тяжелых проблем окружающей среды. В связи с этим, модификации в биосинтезе и восприятии АБК также привлекают внимание как потенциальные меры повышения устойчивости злаков и других сельскохозяйственных культур к засухе (Wasilewska et al., 2008; Sirichandra et al., 2009).

Недавно, в связи с обнаружением эндогенной АБК у различных видов многоклеточных животных, была описана значимость этого гормона для организмов, принадлежащих к другим биологическим царствам (Puce et al., 2004, Bruzzone et al., 2007), что позволяет предположить значительное родство и консервативность сигнальных механизмов, изучение которых на растительных объектах также позволит сделать вклад в общее знание о сигнальных системах живых организмов в целом.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы являлось изучение физико-химических свойств и биологической активности белка, кодируемого АБК- и цитокинин-зависимым геном *CIP2.1*.

В соответствии с поставленной целью были выдвинуты следующие задачи:

1. Выделение и характеристика АБК-регулируемого гена *CIP2.1* из генома *Lupinus luteus*.
2. Структурный анализ белка, кодируемого геном *CIP2.1*. Биоинформационный поиск гомологов гена *CIP2.1* в других растительных геномах.
3. Получение рекомбинантного белка, представляющего собой фрагмент *CIP2.1*. Изучение его физико-химических свойств *in vitro*.
4. Получение и очистка поликлональных антител к фрагменту белка *CIP2.1*.
5. Тест на связывание с АБК – исследование с помощью аффинной хроматографии и методов ИФА с анти-идиотипическими антителами к АБК.
6. Изучение с помощью полученных поликлональных антител динамики содержания белка *CIP2.1* в люпине и его гомологов в *Arabidopsis thaliana* под воздействием гормонов и абиотических стрессов.
7. Изучение регуляции экспрессии генов-гомологов гена *CIP2.1* в растениях *Arabidopsis thaliana* (с использованием данных об экспрессии этих генов на уровне мРНК, доступных в базах коллективного пользования).
8. Получение и отбор чистых линий инсерционных мутантов по отдельным генам-гомологам *CIP2.1* из *A. thaliana* и морфофизиологический анализ полученных линий.

**Научная новизна работы.** Впервые выделен и охарактеризован неизвестный ранее АБК- и цитокинин-регулируемый ген (*CIP2.1*) из *Lupinus luteus* и кодируемый им белок. Найдены гомологи *CIP2.1* в 22 геномах различных растений (как

двудольных, так и однодольных). Показана консервативность структуры изучаемого белка CIP2.1 и близких ему белков.

Получена и аффинно очищена фракция кроличьих IgG, высоко специфичная к рекомбинантному cip154fr.

Методами аффинной хроматографии и твердофазного ИФА показано, что фрагмент белка CIP2.1 – cip154fr – способен связывать АБК, ковалентно сшитую с сефарозой, а также антиидиотипические антитела к АБК, что характеризует полный белок CIP2.1 как АБК-связывающий и является важным доводом в пользу участия этого белка в сигналинге или метаболизме АБК.

Для *CIP2.1* и его гомологов из *Arabidopsis thaliana* показана положительная регуляция на уровне мРНК и на уровне белковых продуктов в ответ на обработку АБК и на воздействие таких абиотических стрессов, как засоление и гипотермия.

Описаны мутанты по генам гомологов *CIP2.1* из *Arabidopsis thaliana* (*At1g21670* и *At4g01870*). Мутантные растения обладали измененными реакциями на АБК – фенотип по состоянию устьиц и боковых корней имитировал ответ на АБК в отсутствии гормона, что подчеркивает участие изучаемой группы генов в АБК-сигналинге.

**Практическое значение работы.** Полученные в диссертационной работе результаты имеют фундаментальное и прикладное значение. Данные о гене *CIP2.1* из *Lupinus luteus* и о его гомологах из других растений могут быть использованы при подготовке лекционного материала по физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений. Устойчивость растений к абиотическим стрессам является признаком, имеющим практическую ценность. Выявление генов, экспрессия которых изменяется в ответ на воздействие абиотических стрессов, позволит дополнить информацию о механизмах устойчивости растений к ним. В перспективе возможно применение генно-инженерных подходов с использованием данных диссертационной работы для получения растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды.

**Апробация работы.** Результаты исследований по теме диссертации были представлены на Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), Конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии»

(Ростов-на-Дону, 2006), Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), Международной конференции «Физико-химические основы структурно функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), Международной конференции "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера", (Апатиты, 2009).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 2 статьи в рецензируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 155 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 33 рисунка; список литературы включает 211 наименований, из которых 200 – на иностранном языке.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объектами исследования** являлись проростки *Lupinus luteus*, растения дикого типа *Arabidopsis thaliana* экотипа Colambia-0 и инсерционные мутанты *Arabidopsis thaliana* экотипа Colambia-0 по генам *At1g21670* и *At4g01870*.

**Условия выращивания растений.** Растения *Lupinus luteus* выращивали в климатической камере при 23°C в кюветах на увлажненной фильтровальной бумаге в темноте, либо при постоянном освещении 120 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>\*с). Растения *Arabidopsis thaliana* выращивали в почвенной, либо в стерильной культуре (1/2 среды Мурасиге-Скуга) в климатической камере при 23°C и освещенности 120 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>\*с) в условиях длинного светового дня (8 ч темнота, 16 ч свет). Возраст растений считали в днях после прорастания.

### **Методы исследования.**

**Обработка гормонами.** Проростки люпина обрабатывали абсцизовой кислотой (АБК, 76 мкМ) и цитокинином (БАП, 22 мкМ). Инкубацию с гормонами проводили в темноте, либо на свету, в кюветах.

**Выделение ДНК из различных образцов и ПЦР-анализ** проводили в соответствии с методическим руководством (Маниатис и др., 1984). TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR) проводили как указано в работе авторов метода (Liu et al., 1995).

Выделение РНК проводили с реактивом TRIZOL (Chomczynski et al., 1987). Дифференциальный дисплей и Northern-блоттинг проводили как указано в более ранней работе нашей лаборатории (Cherepneva et al., 1998). Секвенирование проводили на оборудовании Applied Biosystems в ЗАО "Синтол" (Москва).

Для биоинформационного анализа были использованы следующие программы и он-лайн ресурсы: NCBI (National center of bioinformatics, USA, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), TIGR-TGI (The Institute of genome research - The Gene Indices, [compbio.dfci.harvard.edu/tgi](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi)), EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), TAIR-ABRC (The Arabidopsis Information Resource - Arabidopsis Biological Resource Center, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), NASC (European (Nottingham) Arabidopsis Stock Centre, [arabidopsis.info](http://arabidopsis.info)), CDD (Conserved Domain Database, [www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd)), Pfam (Protein families database, <http://pfam.sanger.ac.uk/>), EXPASY.ORG (Gasteiger et al., 2005), программный пакет VectorNTI Suite 9 (Invitrogen), программа CN3D (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>).

Клонирование последовательности CIP2.1 в векторе для экспрессии pQE-30, трансформацию штамма *E. coli* M15, экспрессию рекомбинантного белка и аффинную очистку на Ni-NTA сефарозе проводили в соответствии с руководством производителя QIAexpress Kit (QIAGEN). Иммунизацию кроликов рекомбинантным белком cip154fr и получение специфической поликлональной сыворотки проводили, как описано в литературе (Егоров и др., 1991). Выделение фракции IgG проводили на ProteinG-Sepharose (Sigma) в соответствии с руководством производителя. Выделение специфической к cip154fr фракции IgG проводили с помощью метода «истощения» (Rybicki, 1986).

Определение АБК-связывающих свойств рекомбинантного белка cip154fr проводили на АБК-конъюгированной сефарозе 4В. Подтверждение специфичности связывания белка с гормоном проводили с помощью различных методов твердофазного ИФА (взаимодействие с антиидиотипическими антителами к АБК - аиАТ<sup>АБК</sup>, вытеснение гормоном аиАТ<sup>АБК</sup>, конкурентное связывание с АБК в системе с антителами к АБК).

Инсерционные мутанты *A.thaliana* Col-0 по генам-гомологам CIP2.1 – *At4g01870* и *At1g21670* – были получены из банков семян ABRC ([arabidopsis.org](http://arabidopsis.org)) и

NASC (arabidopsis.info). Отбор чистых линий проводили с использованием двух праймеров к соответствующему гену, фланкирующих область вставки, и двух праймеров на область вставки – ее левую и правую границу. Праймеры подбирали с помощью VectorNTI Suite 9 (Invitrogen).

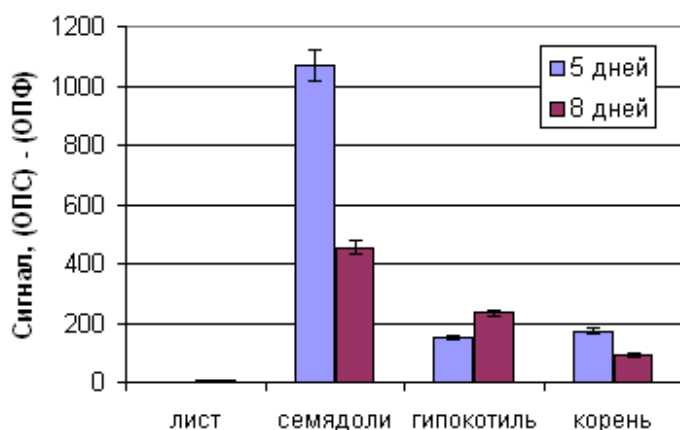
Морфофизиологический анализ мутантов *A. thaliana*. Проводили оценку потери влаги розеточными листьями мутантных растений в сравнении с диким типом; визуальную оценку развития корневой системы мутантов выращенных на вертикальной агаризованной среде; оценку удлинения корней в присутствии АБК различных концентраций. Указанные тесты являются классическими подходами для оценки чувствительности растений к АБК (Vogel et al., 1998; Shen et al., 2006; Iwama et al., 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

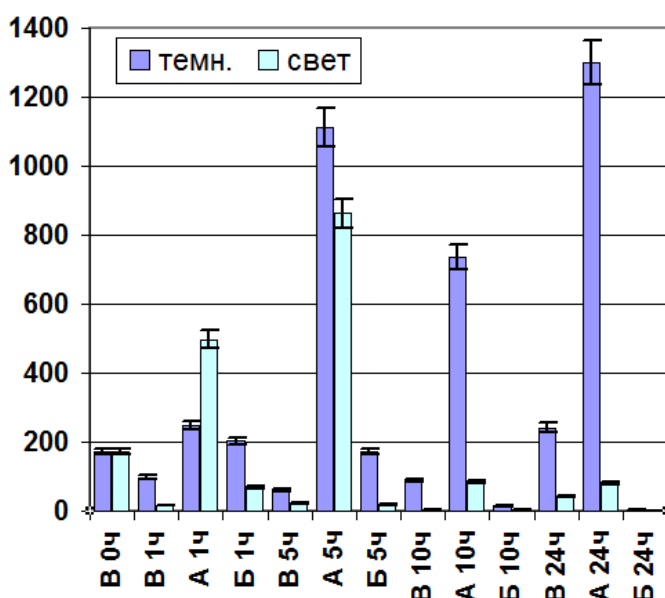
**1. Выделение и первичная характеристика гена.** Известно, что растения на ранних стадиях развития являются очень чувствительными к действию различных фитогормонов, поэтому для обнаружения новых гормон-регулируемых генов были выбраны молодые проростки люпина желтого (*Lupinus luteus* L.). Из различных вариантов, контрольных растений и растений, которые были предварительно обработаны фитогормонами (АБК и цитокинином), была выделена тотальная РНК и методом дифференциального дисплея проводился поиск гормон-регулируемых мРНК. Одна из попавших в поле нашего зрения мРНК в значительной степени положительно регулировалась абсцизовой кислотой (АБК, 76 мкМ) и незначительно подавлялась цитокинином (БАП, 22 мкМ). Соответствующая ей полноразмерная кДНК была выделена, клонирована и секвенирована. В связи с тем, что обработка цитокинином снижала содержание обнаруженной мРНК, кодирующий ее ген был назван *CIP2.1* (cytokinin-inhibited protein 2.1 – по продукту, кодируемому этим цитокинин-ингибируемым геном, размер гена - около 2100 п.о.). Однако, поскольку эффект АБК был более значителен (**рис. 1Б**), дальнейшая работа была сконцентрирована на изучении эффектов абсцизовой кислоты. Ген представлен одной копией в геноме люпина желтого, что было показано методом Саузерн-гибридизации.



А.



Б.



**Рис. 1.** Определение содержания матричной РНК *CIP2.1* в пробах из *Lupinus luteus* методом Нозерн-гибридизации. Оценка проведена с помощью ImageQuant TL, (GE Healthcare) по оптической плотности полос. ОПС – оптич. плотность сигнала; ОПФ – оптич. плотность фона.

А. Проростки 5- и 8-дневного возраста. Содержание мРНК *CIP2.1* в различных органах.

Б. Проростки 8-дневного возраста. Обработка гормонами. В – контроль (вода); А – АБК(76 мкМ); Б - (БАП, 22 мкМ)

С помощью праймеров, подобранных к границам последовательности кДНК, была секвенирована последовательность гена *CIP2.1*, что при сравнении с кДНК показало, что выделенный ген не содержит интронов. Методом Нозерн-гибридизации было проведено исследование динамики мРНК изучаемого гена. Показано, что ген экспрессируется преимущественно в семядолях на ранних стадиях развития проростков люпина желтого (рис. 1А). Экспрессия гена чувствительна к свету – активация гена под влиянием АБК на свету была выражена в меньшей степени.

**2. Биоинформационный анализ.** Для того чтобы выяснить имеет ли изучаемый нами белок близкородственные белки с известной функцией или несет какие-либо известные функциональные домены, нами был предпринят анализ белка с помощью различных биоинформационных Интернет-ресурсов. Поиск по гомологии в

базах данных обнаружил наличие близких к *CIP2.1* экспрессируемых последовательностей (EST-tags) в 22 растительных геномах (как двудольных, так и

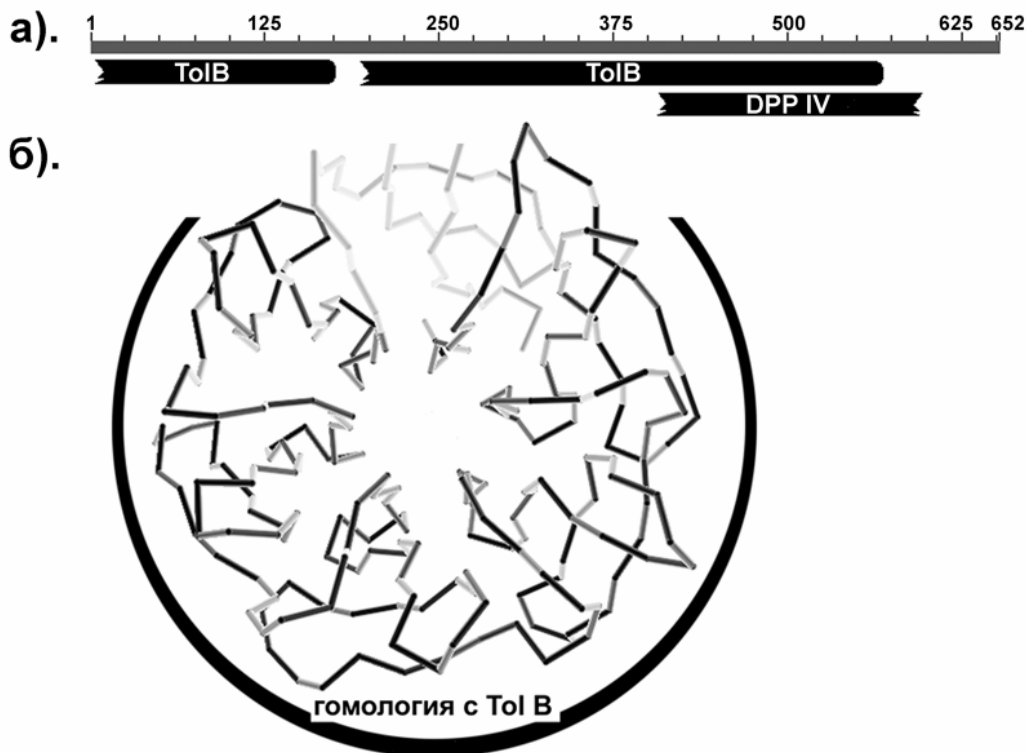
однодольных). С помощью программного инструментария, использующего различные алгоритмы BLAST, доступного на сайтах таких Интернет-проектов, как NCBI, TIGR-TGI, EMBL-EBI, по гомологии с *CIP2.1* в полностью секвенированном геноме *Arabidopsis thaliana* были выявлены три гена с неизвестной функцией (*At4g01870*, *At1g21670*, *At1g21680*), обладающие наибольшей степенью сходства с исследуемым геном из *Lupinus luteus*– инсерционные мутанты по двум из этих генов были получены и использованы в дальнейшей работе. В результате проведенного биоинформационного анализа последовательностей генов *CIP2.1* и его гомологов в других видах растений, а также последовательностей кодируемых ими белков (рис. 2), была выявлена высокая степень их межвидового сходства, что говорит в пользу консервативности функции этой группы белков.

Транслированные генные посл-ти	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620													
At4g01870	NNAFP	CSPDGKSI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	NGESNG	---GG	IRRLT	GEWIDT	HCUSPK	GLIFSS	NRHNP	ETVFG	AVVVR	PDGTGLRR								
At1g21670	NNAFP	PSPDGKRI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EKGES	-----	GFRL	TNGNWD	TIAW	SPDGM	IVFAS	NREFP	ETLL	-MNIYV	VHPDGTGLRR							
TGI_seq_Oryza sativa	NDAFP	VSPCGKVI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	AHGEDV	GAGEGT	IRRLT	GEWIDT	HPSP	SPDGLI	AFSS	NRHDP	ETNA	VFSIY	LVVRPDG	GLRRV						
TGI_seq_Aquilegia	NNAFP	CSPDGKHI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	NGEV	----	NGE	IRQL	TKGFW	IDTTP	SPSPD	GLIAF	SSSTR	HNPDD	VECF	SIYLV	VRPDGT	GLRRV				
TGI_seq_Lactuca sativa	NNAFP	CSPDGKSI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EGEFKF	---NG	GIR	QTEG	WIDT	HPSP	SPDGLI	AFSS	NRHNP	DN	EAF	SIYI	NSPDG	ENTRR				
TGI_seq_Lycopersicon esculentum	NNAFP	CSPDGKHI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	KGELEG	---GG	IRQL	TEGFW	IDTTP	SPSPD	GLIAF	SSNR	HNP	DVTC	F	SIYV	IHP	GTGL	---			
TGI_seq_potato	NNAFP	CSPDGKHI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	KGELEG	---GG	IRQL	TEGFW	IDTTP	SPSPD	GLIAF	SSNR	HNP	EV	C	F	SIYV	IHP	GTGLRR			
TGI_seq_Sorghum	NDAFP	VSPCGKVI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	TARGED	----	G	LRL	TEG	WIDT	HPSP	SPDGLI	AFSS	NRHDP	NP	V	F	S	IYLV	VRPDG	GLRRV	
TGI_seq_Pine	NNAFP	SSPDGKQI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EKGE	---	G	IHAL	TEG	WIDT	HPSP	SPDGLI	AFSS	NRDD	PE	GGY	F	SIYLV	HPDGTGL	HRV		
TGI_seq_Brassica napus	NNAFP	PSPDGKLI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EKGXDR	----	G	VRL	TEG	AWDT	HC	USP	DGEVIA	FAS	DRE	NP	SGS	-	EL	FLI	HP	GTGLRR
TGI_seq_Populus	NNAFP	VSPDGKVI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	SEGEN	----	G	YRL	TEG	WSDT	HCN	USP	DGEVIA	FAS	DRE	NP	SGS	-	EL	FLI	HP	GTGLRR
TGI_seq_Maize	NNAFP	PSPDGKVI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EDGE	---	G	IRRL	TEG	WSDT	HCN	USP	DGEVIA	FAS	DRE	NP	SGS	-	F	IYV	HP	GTGLRRV
TGI_seq_nicotiana	NNAFP	PSPDGKVI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EGET	---	G	YRL	TEG	SWTD	HCN	USP	DDVIA	FAS	DRE	NP	SGS	-	FD	HFV	HP	GTGLRRV
TGI_seq_Vitis Vinifera	NNAFP	PSPDGKVI	VFRS	GRSGH	KNLYINDA	EGE	---	G	IHL	TEG	WTD	HCN	USP	DGV	IVFAS	DRE	NP	SGS	-	EL	YV	IHP	GTGLRRV
positives: 89.6% identity: 34.4%											* **			**			**			**			

**Рис. 2.** Сравнение с помощью алгоритма AlignX транслированных последовательностей из геномов различных растений демонстрирует очень высокую межвидовую степень консервативности исследуемых белков. Цветовая маркировка: светло-серый – абсолютная консервативность (помечено звездочками); серый – высокая степень консервативности; темно-серый – низкая степень консервативности (либо замена высоко-консервативной аминокислоты без существенного изменения локальных характеристик последовательности). Сокращения: TGI\_seq – префикс, поясняющий, что последовательность белка или его фрагмента получена с помощью web-ресурса The Gene Index Project. После префикса даны видовые или родовые названия источников (растений), из генома которых были получены эти последовательности в качестве EST (Expression sequence tags). Первыми двумя строчками даны последовательности генов-гомологов *CIP2.1* из *Arabidopsis thaliana*.

Также были найдены факты, говорящие в пользу консервативности структуры этих белков: в ряде доступных в настоящее время полных последовательностей, проанализированных с помощью ресурса InterPro, было показано наличие функционально значимых аминокислотных повторов PD40-типа, составляющих основу для построения третичной бета-пропеллерной структуры. Для многих белков с известной функцией показано, что данная структура может выполнять функцию

«белковой платформы», на базе которой может происходить сборка различных белковых комплексов. С помощью базы консервативных доменов CDD (Conservative Domain Database) определен ближайший гомолог с известной структурой и функцией, белок TolB из *E. coli* (рис. 3).



**Рис. 3.** Расположение консервативных доменов в последовательности белка гена *At4g01870* (такое же расположение доменов свойственно и *At1g21670*).

а). Домены, распознанные в составе последовательности базой CDD (Conservative Domain Database). TolB – области белка *At4g01870*, гомологичные белку TolB *E. coli*. DPP IV – области белка *At4g01870*, гомологичные с дипептидилпептидазой IV типа.

б). Бета-пропеллерная структура бактериального TolB белка: темным цветом отмечены области гомологии с белковыми последовательностями *At4g01870* и *At1g21670*.

TolB участвует в структурно-функциональной организации Tol-Pal системы бактериальной клетки, предназначенной для защиты клетки от проникновения пептидных токсинов (колицинов), а так же для поддержания водно-солевого обмена клетки бактерии (Bonsor et al., 2009). Также было выявлено частичное сходство их С-концевой части с дипептидилпептидазой IV типа (DPP IV), однако сохранение функции пептидазы требует дополнительной экспериментальной проверки.



**Рис. 4.** Схема вектора pQE-30 (Qiagen), экспрессирующего белок *cip154fr*.

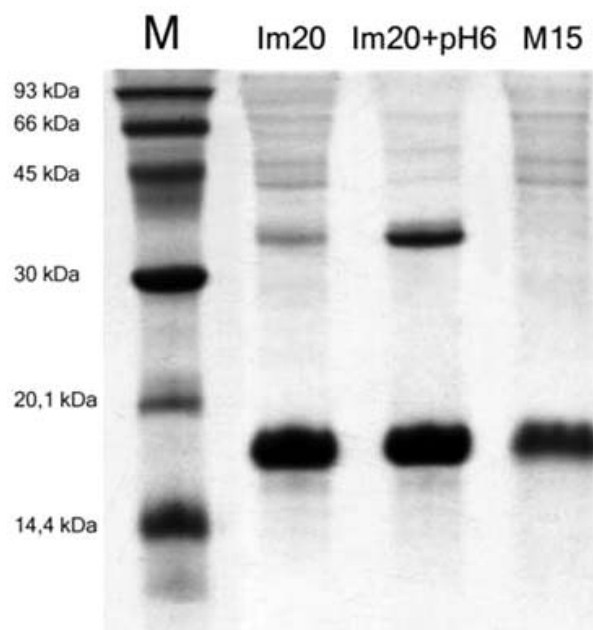
pQE-30 (Qiagen) (рис. 4).

Полноразмерная кДНК (2137 п.о.), полученная из фаговой библиотеки экспрессирующихся последовательностей люпина желтого (созданной ранее), была проклонирована в векторе pBlueScript II KS+ (Stratagene) по сайту *EcoRI*.

Затем с помощью ПЦР, в котором в один из праймеров был введен сайт рестрикции *Bam*HI заменой одного нуклеотида А->С, а в качестве второго праймера был использован стандартный для этого вектора праймер Т3, был получен фрагмент с одной заменой в положении 241 исходной кДНК. Этот фрагмент был рестриктирован по

**3. Экспрессия и очистка рекомбинантного белка и получение антител к нему.** С целью получения поликлональных антител для изучения экспрессии гена *CIP2.1* на уровне белка, а также для изучения физико-химических свойств самой белковой молекулы CIP2.1 нами была предпринята попытка получить рекомбинантный белок в *E.coli*.

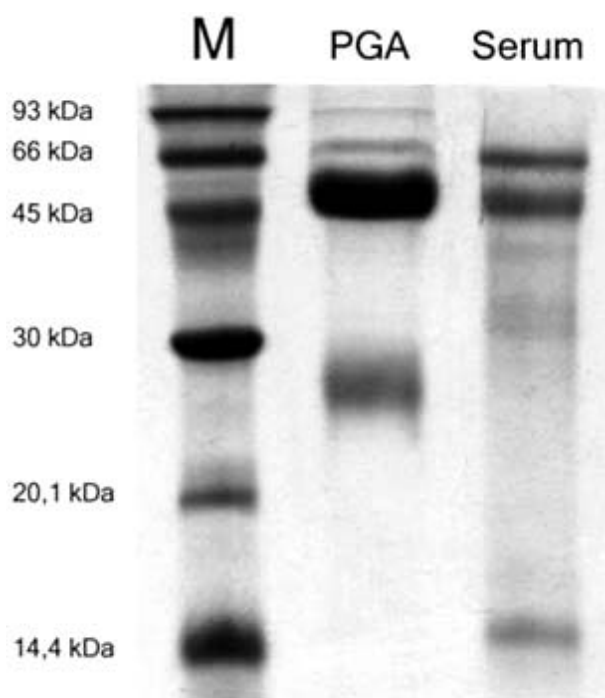
Экспрессирующая конструкция была получена на базе вектора



**Рис. 5.** Результаты очистки рекомбинантного белка *cip154fr* с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA Sepharose (Qiagen).

М – низкомолекулярный белковый маркер (Amersham); Im20 – элюция в денатурирующих условиях 8 М мочевиной pH 8.0 с 20 мМ имидазолом; Im20+pH6.0 – элюция в денатурирующих условиях 8 М мочевиной pH6.3 с 20 мМ имидазолом; M15 – тотальный белок, выделенный из бактерий штамма M15, несущих pQE30+cip154fr, после индукции IPTG.

введенному сайту *Bam*HI и сайту *Hind*III, присутствующему в MCS-зоне (multicloning site) вектора и клонирован по этим сайтам в векторе pQE-30. Однако экспрессии белка, соответствующего этому фрагменту добиться не удалось, вероятно, по причине токсичности продукта для *E. coli*. Для получения конструкции, экспрессирующей белок меньшего размера, была удалена 3'-область последовательности при помощи рестрикции по сайту *Cl*aI (внутренний сайт рестрикции, нативно присутствующий в *CIP2.1*) и сайту *Hind*III (MCS-зона вектора pBlueScript II KS+). После рестрикции полученные «липкие концы» были обработаны экзонуклеазным фрагментом полимеразы Кленова и лигированы. В результате в векторе pQE-30 остался фрагмент длиной 429 п.о., соответствующий области 237--665 п.о. исходной кДНК, что вместе с участком, кодирующим 6xHis и «линкер», составило 462 п.о. Этот участок успешно был экспрессирован в гетерологической системе: в штамме *E. coli M15*.



**Рис. 6.** Полученный препарат очищенных антител к *cip154ft*. PGA – белок, элюированный с колонки ProteinG-Sepharose – фракция IgG; Serum – сыворотка после прохождения через ProteinG--Sepharose – тест на полноту связывания иммуноглобулиновой фракции.

значениями pH отмывочного раствора (в конечном итоге были выбраны: 20 мМ имидазол и pH 6,3), удалось добиться чистоты получаемого рекомбинантного белка, близкой к 100% (оценку чистоты препарата белка проводили по отношению

Экспрессируемый белок представлял собой рекомбинантный фрагмент белка *CIP2.1*, содержащий 6xHis, размером 154 аминокислотных остатка и молекулярной массой 17,5 кДа (рис. 5). Полученный рекомбинантный белок очищали от примесей других белков клеток *E. coli M15* с использованием аффинной хроматографии на Gravity Flow-колонке с Ni-NTA-Sepharose (Qiagen).

С помощью варьирования концентрации конкурентного заместителя 6xHis метки – имидазола – с различными

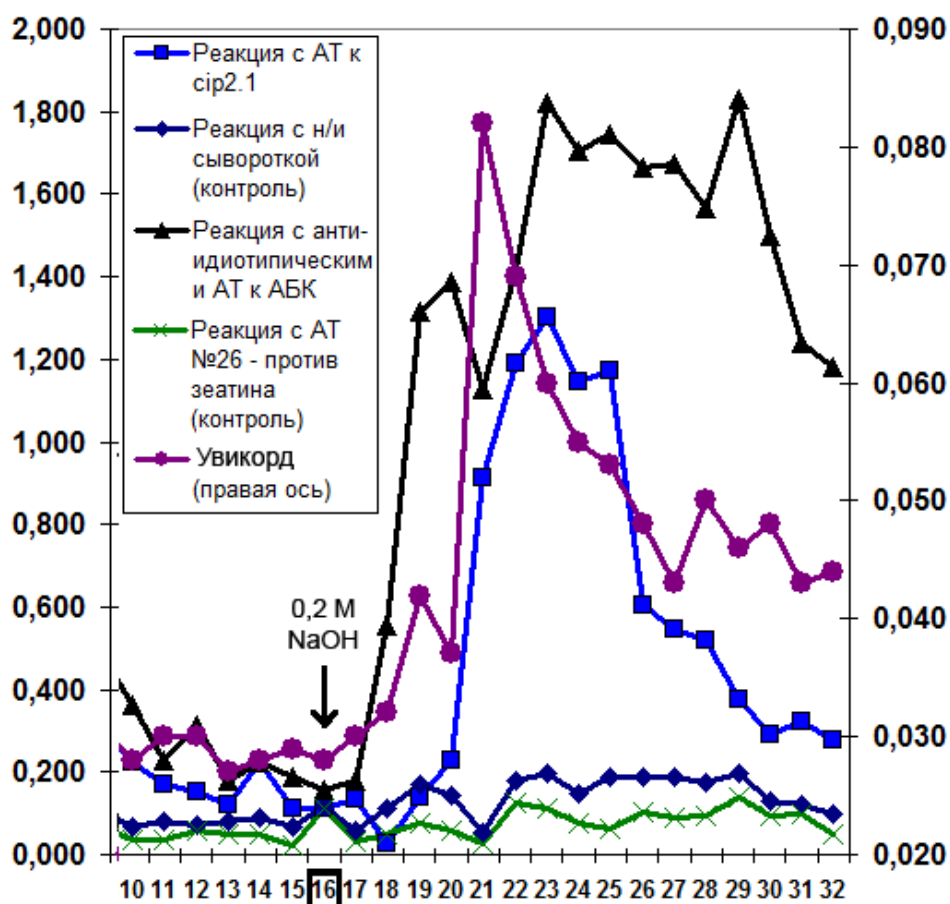
плотности специфических полос на геле к плотности всего трека в программе ImageQuant TL, (GE Helthcare).

С использованием полученного рекомбинантного белка проводили иммунизацию кроликов. После развития вторичного иммунного ответа, отбирали кровь и получали сыворотку. Из полученных сывороток аффинной хроматографией на Protein G-Sepharose были выделены иммуноглобулины типа G (IgG). Из полученного препарата IgG методом истощения на мембране с сорбированным СІР2.1 была выделена фракция иммуноглобулинов, преимущественно взаимодействующая с изучаемым белком (рис. 6).

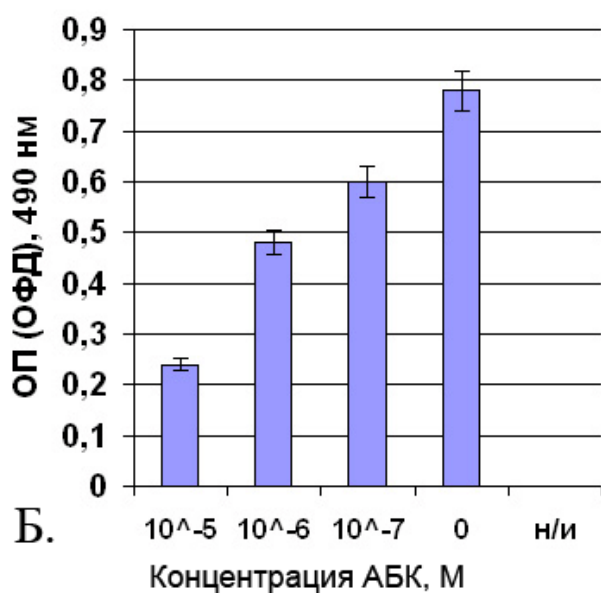
**4. АБК – связывающие свойства СІР2.1.** Целью данного этапа работы являлось исследование АБК-связывающих свойств рекомбинантного фрагмента белка. Белок был очищен путем аффинной хроматографии на Ni-NTA-Sepharose (Qiagen) до чистоты порядка 99%, что было оценено компьютерным расчетом оптической плотности на электрофорезном геле.

Полученный препарат очищенного белка был нанесен на аффинную колонку с Sepharose 6В, ковалентно связанной с АБК. 100% белка связалось с колонкой, что было продемонстрировано при промывке колонки с помощью буфера высокой ионной силы (содержащего 200 мМ NaCl). Белок полностью элюировался с колонки раствором, содержащим 0.2 М NaOH (**рис.7а**). Фракции, полученные с колонки, были сорбированы на полистироловые планшеты Costar серии HiBond.

Для дополнительного подтверждения АБК-связывающих свойств рекомбинантного белка методом непрямого иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием антиидиотипических антител к АБК было продемонстрировано их высокоспецифическое связывание со 154-аминокислотным фрагментом изучаемого белка СІР2.1, что явным образом указывает на АБК-связывающие свойства последнего. Чтобы продемонстрировать специфичность данного связывания параллельно с тестами на связывание с антиидиотипическими антителами были проведены тесты на связывание с преиммунной сывороткой и сывороткой, имеющей другую специфичность – в нашем случае в качестве второй сыворотки использовались антитела к конъюгату зеатин—БСА



А.



Б.

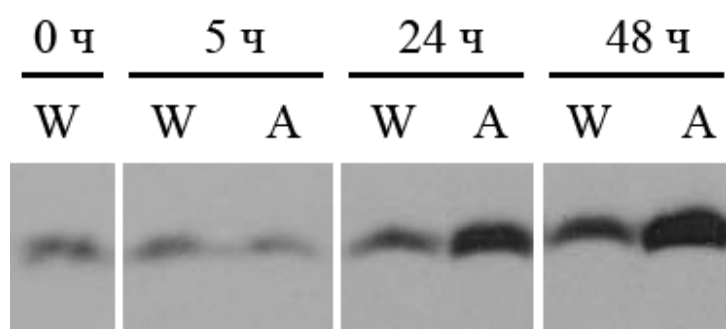


В.

**Рис. 7.** Подтверждение АБК-связывающих свойств рекомбинантного белка *сiр154fr*. А. Аффинная хроматография и ИФА с аиАТ к АБК. Левая ордината – ОП.пл.(ОФД) 490 нм (все реакции с АТ); правая ордината – показания увикорда, ОП.пл. 280 нм; ось абсцисс – номера фракций (4 мл), собранные с колонки с АБК-сефарозой. С 1-ой по 16-ю фракцию – отмывка избытка и неспецифики буфером высокой ионной силы, с 16ой фракции – элюция 0,2М NaOH. Б. Прямая система вытеснения (сорбирован *сiр154fr* из пика, гормон вытесняет аиАТ к АБК из комплекса с *сiр154fr*); В. Конкурентная система вытеснения (сорбирован АБК-овальбумин, гормон, либо *сiр154fr* вытесняют АТ к АБК из комплекса с АБК-овальбумином)

В этих двух контрольных вариантах взаимодействие CIP2.1 с антителами методом ИФА не детектировалось, что дополнительно указывает на специфичность взаимодействия изучаемого белка с АБК, в особенности, в совокупности с данными, полученными по специфическому связыванию белка CIP2.1 с АБК-конъюгированной сефарозой. Кроме того, для дополнительного подтверждения специфичности взаимодействия АБК с рекомбинантным белком *сip154fr*, были поставлены опыты на базе ИФА по конкурентному связыванию АБК с *сip154fr*. В т.н. «прямой системе» (рис. 7б) на планшеты был сорбирован *сip154fr*, полученный из фракций пика, полученного при аффинной хроматографии на АБК-конъюгированной сефарозе. При этой постановке гормон вытеснял аиАТ к АБК из комплекса с *сip154fr* – большие концентрации гормона вытесняли антитела из комплекса с *сip154fr*, что еще раз доказывает специфичность взаимодействия АБК с рекомбинантным белком *сip154fr*. В «конкурентной системе» (рис. 7в) на планшеты был сорбирован АБК-овальбумин, при этом различные концентрации АБК, либо различные количества *сip154fr*, полученного из пика элюции, вытесняют АТ к АБК из комплекса с АБК-овальбумином. Показана количественная зависимость взаимодействия рекомбинантного белка *сip154fr* с сорбированным АБК-овальбумином, что опять же указывает на специфичность взаимодействия гормона с изучаемым белком.

Таким образом, доказаны АБК-связывающие свойства фрагмента белка CIP2.1 – *сip154fr*, что может характеризовать полный белок, как АБК-связывающий и является важным доводом в пользу участия этого белка в сигналинге или метаболизме АБК.



**Рис. 8.** Накопление белка CIP2.1 в семядолях 3-дневных растений *Lupinus luteus* в ответ на обработку абсцизовой кислотой.

W – контроль (вода); А – АБК(76 мкМ)

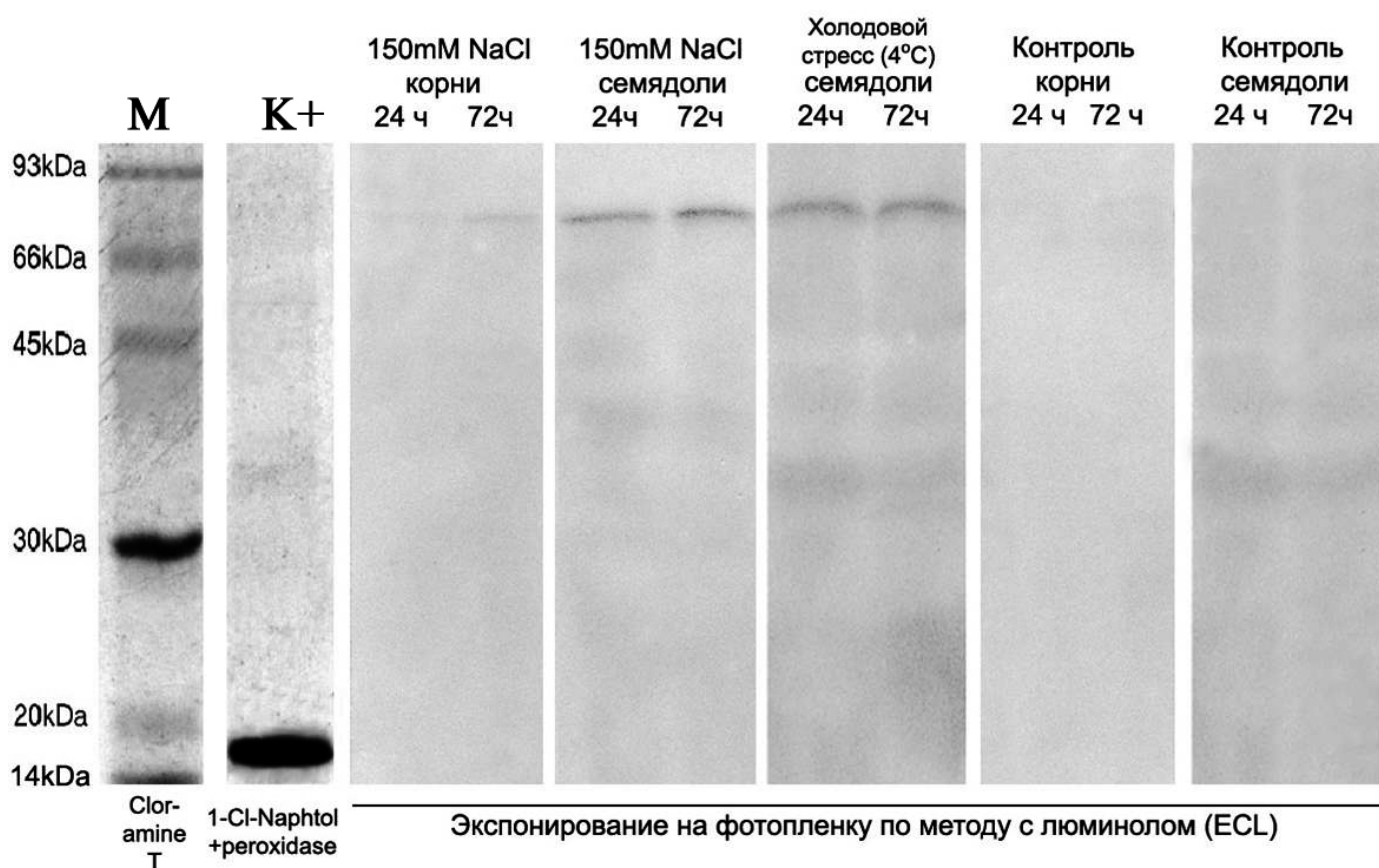
## 5. Изучение экспрессии CIP2.1 *Lupinus luteus* и его генов-гомологов из *Arabidopsis thaliana* (*At1g21670* и *At4g01870*) на уровне мРНК и белка.

С помощью полученных на ранних этапах работы специфических антител к белку *сip154fr* изучали экспрессию этого гена на уровне белка.



Предполагалось выяснить, сохраняется ли органно-специфичность экспрессии, показанная ранее на уровне мРНК Нозерн-блоттингом (рис. 1), на уровне содержания изучаемого белка под воздействием абиотических стрессов, в обеспечении ответа на которые, как известно, вовлечена абсцизовая кислота

По результатам твердофазного ИФА и вестерн-блотов с антителами к *cip154fr* выявлено сохранение органно-специфичности экспрессии гена *CIP2.1 Lupinus luteus* на уровне белка и показано АБК-зависимое накопление белкового продукта *CIP2.1* в семядолях (рис.8), что соответствует данным, полученным ранее на уровне РНК. Также было изучено изменение содержания белка *CIP2.1* в ответ на такие абиотические стрессы, как гипотермия и засоление – показано накопление изучаемого белка в семядолях в ответ на эти стрессы (рис.9).



**Рис. 9.** Индуцируемая экспрессия *CIP2.1* в 10-дневных проростках в ответ на абиотические стрессы (гипотермию и засоление). М – низкомолекулярный белковый маркер (Amersham); К+ - положительный контроль специфического связывания антител (взаимодействие с *cip154fr*).

Кроме того, получены предварительные данные, характеризующие экспрессию на белковом уровне генов-гомологов *CIP2.1* из *Arabidopsis thaliana* - *At1g21670* и *At4g01870* – продемонстрировано наличие продуктов в диапазоне ожидаемых

молекулярных масс в 7- и 16-дневных растениях, а также усиление сигнала в ответ на обработку АБК и воздействие комплексным абиотическим стрессом «засоление+гипотермия». Также методом ИФА на полистироловых планшетах показана суточная динамика белка из *Arabidopsis thaliana*, взаимодействующего с антителами к cip154fr – показано наличие суточного максимума и минимума (данные приводятся в диссертации).

Полученные предварительные результаты хорошо соотносятся с данными, полученными нами в результате обработки информации из Интернет-баз коллективного пользования, где представлены результаты экспериментов с использованием полногеномных ДНК-микрочипов производства фирмы Affimetrix. При помощи программных ресурсов (Microarray Expression Search), доступных он-лайн на сайте проекта TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) было выявлено, что изменение экспрессии исследуемых генов-гомологов *CIP2.1* связаны с эмбриогенезом и ранними стадиями развития проростков *A. thaliana*, с действием холодового стресса, с засолением, а также было выявлено различное содержание мРНК *CIP2.1*-подобных генов в разных органах растения. Полученные данные по экспрессии изучаемых генов *Arabidopsis thaliana* на уровне мРНК дали подтверждение гипотезе о гомологии генов *CIP2.1* с *At1g21670* и *At4g01870*, так как наряду с высоким сходством последовательностей ДНК были выявлены сходные профили экспрессии – усиление уровня транскрипции под воздействием АБК и абиотических стрессов, таких как гипотермия и засоление (Рис. 10, на примере одного из генов *At4g01870*). Это дает основание предположить сходные функции исследуемых генов в растениях.

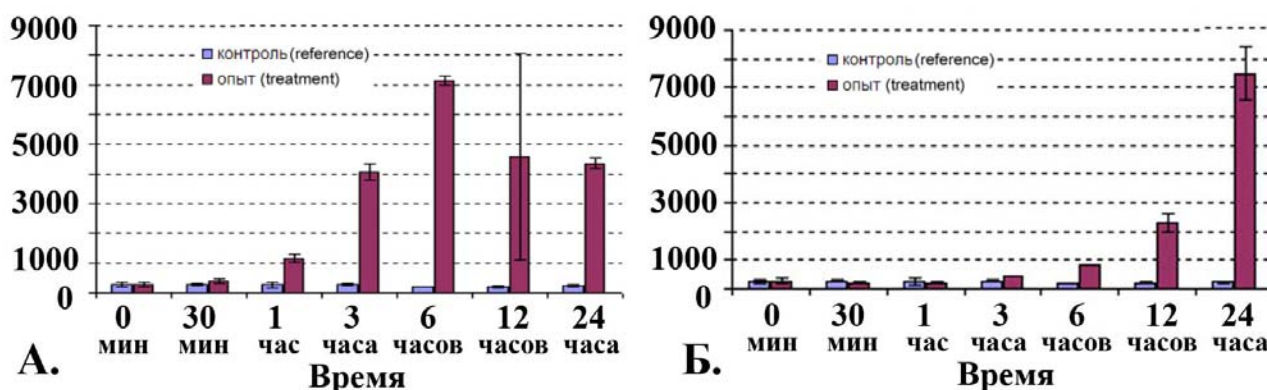


Рис. 10. Экспрессия одного из генов-гомологов *CIP2.1* – *At4g01870* – в ответ на гипотермию в корнях 18-дневных проростков *A.thaliana* в ответ на засоление – 150 mM NaCl (А) , и в ответ на гипотермию – 4°C (Б). Данные Affimetrix 25K.

**6. Изучение инсерционных мутантов по генам-гомологам *CIP2.1*.** В ходе изучения физиолого-биохимической роли АБК-активируемого белка *CIP2.1* из люпина желтого (*Lupinus luteus*) и его гомологов в других растениях также были проанализированы морфо-физиологические реакции двух мутантных линий *A. thaliana*, в каждой из которых был инактивирован один из двух обнаруженных генов-гомологов *CIP2.1*. Семена растений с инактивированными генами *At4g01870* и *At1g21670* были получены из банков семян ABRC(USA) и NASK(UK) – семена растений с инактивированным *At1g21680* не были найдены в банках семян.

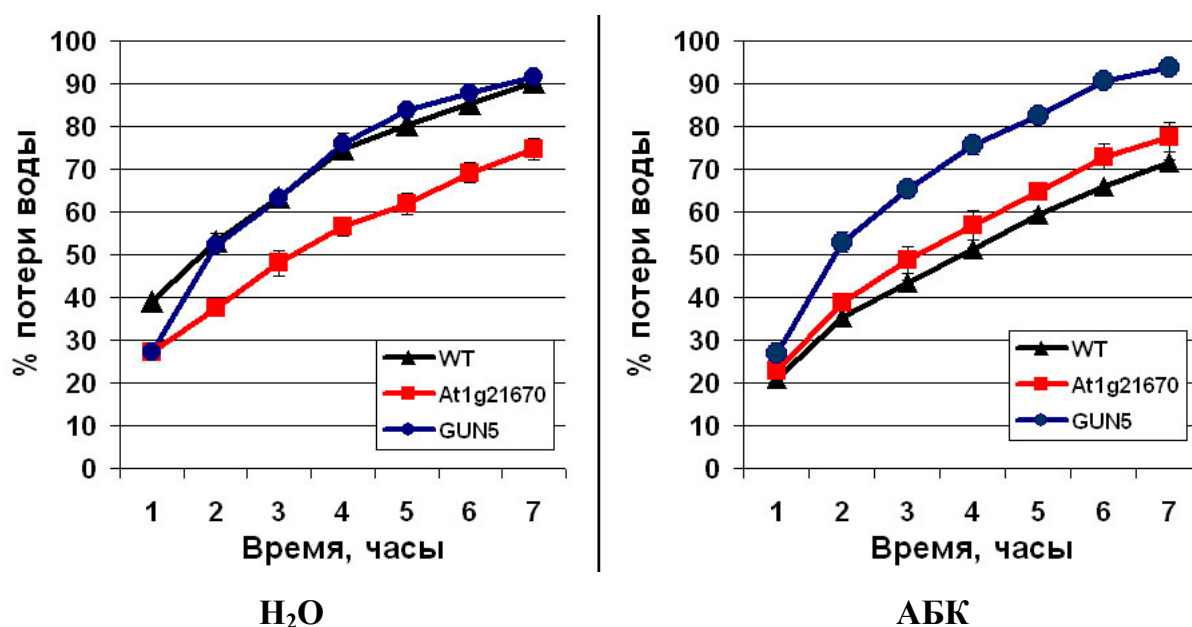
Определение растений «чистой линии» по вставке в гены *At1g21670* и *At4g01870* проводили с помощью ПЦР с праймерами, фланкирующими область слияния Т-ДНК с целевым геном и ПЦР с праймерами, фланкирующими область вставки. Однако четкое подтверждение гомозиготности вставки было получено лишь для линии с инсерцией в *At1g21670*. Подобное подтверждение, однако, не удалось получить для линии со вставкой в ген *At4g01870*. Несмотря на использование стандартных последовательностей праймеров, взятых с сайтов ABRC(USA) и NASK(UK), не был получен продукт ПЦР на область слияния Т-ДНК с целевым геном, хотя вставка Т-ДНК в геноме предполагаемого инсерционного мутанта по гену *At4g01870* наследовалась, что было подтверждено ее ПЦР с праймерами на внутреннюю область вставки в нескольких поколениях растений. В связи с возникшими проблемами определения гомозиготности вставки предполагаемый инсерционный мутант по гену *At4g01870* был исключен из последующих исследований до экспериментального подтверждения, либо опровержения наличия аннотированной на сайтах ABRC(USA) и NASK(UK) мутации.

С целью получения более подробных данных о возможных функциях *in vivo* белка *CIP2.1* мы исследовали ряд физиологических ответов, определяемых АБК, таких как прорастание семян, переход к цветению, старение листьев, ответ на обезвоживание, а также удлинение корней и рост гипокотилей под влиянием гормонов у мутантных растений с инсерцией в *At1g21670*.

АБК, как известно, задерживает прорастание семян, и эта реакция видоизменена у мутантов по передаче сигнала АБК, проявляющих гипо- или гиперчувствительность к АБК (Chen et al, 2006). Однако ингибирующий эффект экзогенной АБК был идентичен у изучаемых мутантов и у контрольных

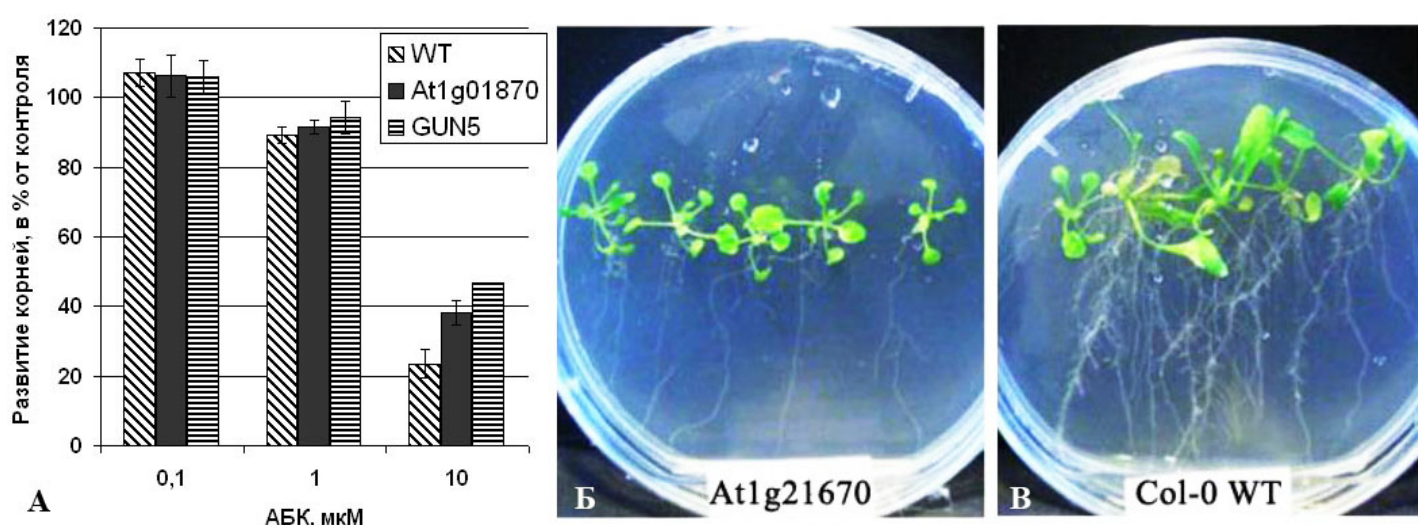
немодифицированных растений арабидопсис экотипа Columbia-0, и эти данные позволяют предполагать, что АБК регулируемые гомологи белка SIP2.1, возможно, не принимают участия в каноническом пути передачи сигнала АБК в семенах. Также нами не было обнаружено достоверных отличий от дикого типа по времени перехода к цветению, а также изменению сроков появления цветоносов и числа розеточных листьев в ответ на опрыскивание проростков абсцизовой кислотой в течение трех недель. Т.о., наши результаты позволяют предполагать, что мутация гена *At1g21670* не включена передачу сигнала АБК в автономном пути цветения, где участвует предполагаемый рецептор АБК – FCA (Razem et al., 2006).

Однако значительные фенотипические отличия были получены нами в опытах по дегидратации листьев и развитию корневой системы. Срезанные розетки линии *At1g21670* проявили повышенную устойчивость к дегидратации, тесту, характеризующему функционирование устьиц, и, подобно АБК-нечувствительному мутанту *Arabidopsis gun5*, практически не изменили скорость потери воды в ответ на предварительное опрыскивание интактных растений АБК (Рис.11). Но стоит отметить, что уровень потери воды у *gun5* соответствовал уровню потери воды диким типом в отсутствии АБК, тогда как для растений инсерционной линии *At1g21670* был характерен уровень потери воды диким типом в присутствии АБК.



**Рис. 11.** Тест на функционирование устьиц. Потеря воды срезанными розеточными листьями 7-недельных инсерционных мутантов *A. thaliana* на воде и после обработки АБК ( $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ).

В биологическом тесте, где рассматривалось влияние гормонов на удлинение корней, 7-дневные проростки *Arabidopsis* были перенесены на вертикально ориентированные агаровые пластины, содержавшие различные концентрации АБК, АЦК, транс-зеатина и ИУК. Через 3 дня роста корней вдоль поверхности агара измеряли величину их прироста. У мутанта по *At1g21670* была изменена чувствительность корней к экзогенной АБК, что подтверждается достоверным отличием от дикого типа по удлинению корней в присутствии АБК. Кроме того, даже в отсутствие фитогормонов у этого мутанта формировалось существенно меньше боковых корней, что также является признаком нарушения чувствительности к этому гормону (Рис. 12).



**Рис. 12.** (А) Влияние АБК на удлинение корней инсерционного мутанта *At1g21670* *A. thaliana*. (Б,В) Фото растений на вертикальных чашках без обработки гормонами.

Изучение инсерционного мутанта по гену-гомологу *CIP2.1* из *Arabidopsis thaliana* *At1g21670* показало, что мутация в этом гене изменяла реакцию растений на АБК. Фенотип мутанта *At1g21670* по состоянию устьиц и боковых корней в отсутствие гормона иммитировал ответ на АБК, характерный для растений дикого типа, что подчеркивает участие данного белка в АБК-сигналинге, возможно, в качестве негативного регулятора.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделен и охарактеризован неизвестный ранее АБК- и цитокинин-регулируемый ген (*CIP2.1*) из *Lupinus luteus*, который кодирует белок, состоящий из 647 аминокислот, не имеет интронов и наиболее активно экспрессируется на ранних этапах развития проростков.

Проведен биоинформационный анализ нуклеотидной последовательности гена *CIP2.1* и аминокислотной последовательности кодируемого им белка. Найдены его гомологи в 22 растительных геномах (как двудольных, так и однодольных). Показана консервативность структуры изучаемого белка *CIP2.1* и близких ему белков. Установлено наличие в их последовательностях функционально значимых аминокислотных повторов PD40-типа, составляющих основу для построения третичной бета-пропеллерной структуры, которая может выполнять функцию «белковой платформы» в образовании белковых комплексов.

Получена конструкция, экспрессирующая фрагмент гена размером 428 нуклеотидов (область 237--665 гена *CIP2.1*), которая кодирует белок размером 154 аминокислоты (включая 6xHis последовательность) – *cip154fr*. Рекомбинантный белок получен в *E. coli* и аффинно очищен. Получены кроличьи антитела к *cip154fr*. Выделена и аффинно очищена фракция IgG, высоко специфичная к *CIP2.1*, что позволило проводить анализ экспрессии на уровне белковых продуктов гена *CIP2.1* в *Lupinus luteus*, а также генов-гомологов в *Arabidopsis thaliana*.

Нозерн-блоттингом показана положительная регуляция содержания мРНК *CIP2.1* в растениях *Lupinus luteus* в ответ на обработку АБК. Накопление матричной РНК этого гена начиналось через несколько часов после обработки гормоном. Такая же динамика ответа на обработку АБК наблюдалась и у гомологов *CIP2.1* – генов *At4g01870* и *At1g21670 Arabidopsis thaliana*. Для *CIP2.1* и его гомологов из *Arabidopsis thaliana* показана положительная регуляция ответа на воздействие таких абиотических стрессов, как засоление и гипотермия, как на уровне мРНК, так и на уровне белковых продуктов.

Кроме того, в работах с инсерционным мутантом, в котором вставкой Т-ДНК был инактивирован гомолог гена *CIP2.1* показано, что фенотип мутанта по состоянию устьиц и боковых корней в отсутствие гормона имитировал ответ на АБК,

характерный для растений дикого типа. Инактивация этого гена-гомолога (*Atlg21670*) вызывала яркий фенотипический эффект – снижение количества боковых корней. Это отчасти имитирует эффект обработки абсцизовой кислотой растений дикого типа. В мутантах по этому же гену продемонстрирована динамика потери воды срезанными розеточными листьями без обработки АБК, которая характерна для растений дикого типа, обработанных АБК. Исходя из полученных данных, можно предположить функцию этого белка в качестве негативного регулятора ответа на АБК в рамках описанных реакций – в процессе закладки боковых корней и регуляции работы устьиц. Полученные результаты, вследствие высокого сходства по белковой последовательности, могут быть отнесены к гомологу в люпине желтом – CIP2.1.

Методами аффинной хроматографии и твердофазного ИФА было показано, что фрагмент белка CIP2.1 – cip154fr – способен связывать АБК, ковалентно сшитую с сефарозой, а также антиидиотипические антитела к АБК. Кроме того, специфичность взаимодействия фрагмента белка CIP2.1 была показана с использованием различных методик вытеснения на базе ИФА. Это доказывает принадлежность CIP2.1 к АБК-связывающим белкам, что является важным доводом в пользу его участия в сигналинге или метаболизме АБК

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что *CIP2.1* и гомологичные ему гены с большой вероятностью вовлечены в АБК-сигналинг, а также участвуют в ответе на стрессы, связанные с повышением содержания АБК в клетке, такие как гипотермия и засоление. Одной из предполагаемых функций продуктов изучаемой группы генов является негативная регуляция устьичных ответов и процесса закладки боковых корней.



## ВЫВОДЫ

1. Выделен и охарактеризован неизвестный ранее АБК- и цитокинин-регулируемый ген (*CIP2.1*) из *Lupinus luteus*, который кодирует белок, состоящий из 647 аминокислот, не имеет интронов и наиболее активно экспрессируется на ранних этапах развития проростков.
2. С помощью биоинформационного анализа показана высокая гомология *CIP2.1*-белка с белками из 22 видов растений. Показано наличие в этих белках повторов PD40-типа, составляющих основу бета-пропеллерной структуры, которая может выполнять функцию «белковой платформы» при сборке белковых комплексов.
3. Получена конструкция, экспрессирующая фрагмент гена размером 428 нуклеотидов (область 237-665 гена *CIP2.1*), которая кодирует белок размером 154 аминокислоты (включая 6xHis последовательность, кодируемую вектором) – *cip154fr*. Рекомбинантный белок получен в *E.coli* и аффинно очищен. К этому белку получены поликлональные кроличьи антитела. Выделена и аффинно очищена фракция IgG, высоко специфичная к *CIP2.1*.
4. Методами аффинной хроматографии и твердофазного ИФА доказаны АБК-связывающие свойства *cip154fr*. Это доказывает принадлежность белка *CIP2.1* к АБК-связывающим белкам, что является важным доводом в пользу его участия в сигналинге или метаболизме АБК.
5. Изучена экспрессия *CIP2.1* *Lupinus luteus* и его генов-гомологов из *Arabidopsis thaliana* (*At1g21670* и *At4g01870*) на уровне мРНК. С помощью полученных антител изучено изменение содержания белка *CIP2.1* под воздействием АБК и абиотических стрессов.
6. Мутация в генах *Arabidopsis thaliana* (*At1g21670* и *At4g01870*), гомологичных *CIP2.1* изменяла реакцию на АБК. Фенотип мутанта *At1g21670* по состоянию устьиц и боковых корней имитировал ответ на АБК в отсутствии гормона, что подчеркивает участие данного белка в АБК-сигналинге, возможно, в качестве негативного регулятора.
7. Суммируя все полученные результаты, можно заключить, что *CIP2.1* и гомологичные ему гены участвуют в АБК-сигналинге, а также в ответе на абиотические стрессы.



**По материалам диссертации опубликованы следующие работы:**

1. **Демиденко А.В.**, Черепнева Г.Н., Кулаева О.Н., Оельмюллер Р., Кузнецов В.В. Выяснение функциональной роли белка, кодируемого новым гормоно-регулируемым геном *cip 2.1* люпина желтого. Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда, 2005.
2. **Демиденко А.В.**, Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Изучение экспрессии генов-гомологов *A. thaliana* для выяснения функции гена *CIP 2.1* люпина желтого. Конференция «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии». Ростов-на-Дону, 2006 г.
3. **Демиденко А.В.**, Кудрякова Н.В., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Изучение влияния АБК на старение листьев и прорастание семян мутантов *Arabidopsis* с выключенными генами-гомологами гена *CIP2.1* люпина желтого для дальнейшего выяснения его функции. Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», часть 1. Сыктывкар, 2007 г.
4. Каравайко Н.Н., **Демиденко А.В.**, Кудрякова Н.В., Шевченко Г.В., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. АБК - связывающие свойства белка *CIP2.1* люпина желтого. Международная конференция «Физико-химические основы структурно функциональной организации растений», Екатеринбург, 2008 г.
5. **Демиденко А.В.**, Кудрякова Н.В., Каравайко Н.Н., Шевченко Г.В., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Измененные физиологические реакции растений *A. thaliana* с инактивированными генами гомологов. Международная конференция «Физико-химические основы структурно функциональной организации растений», Екатеринбург, 2008 г.
6. **Демиденко А.В.**, Кудрякова Н.В., Черепнева Г.Н., Оельмюллер Р., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Участие белков, содержащих WD40-like домены, в ответе растений на фитогормоны и стресс. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2008, № 4, стр.58-61.

7. **Демиденко А.В.**, Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В. Получение двойного мутанта *gun5\*at1g21670 Arabidopsis thaliana* и его фенотипическая характеристика. Международная конференция "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера", Апатиты, 2009 г.
8. Шевченко Г.В., Каравайко Н.Н., **Демиденко А.В.**, Селиванкина С.Ю., Зубкова Н.К., Куприянова Е.В., Лось Д.А., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Обнаружение АБК-связывающих белков в цианобактериях (*Synechocystis* sp. PCC 6803) Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2010. № 1. С. 13-19.