

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М.Г. ХОЛОДНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

КОЗЕКО ЛЮДМИЛА ЄВГЕНІВНА

УДК 581.134:575.21:581.14+17:58.02

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНИХ ШАПЕРОНІВ У ФЕНОТИПІЧНІЙ
ПЛАСТИЧНОСТІ РОСЛИН

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Л.Є. Козеко

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, член-
кореспондент НАН України Кордюм Єлизавета Львівна

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Козеко Л.Є. Роль молекулярних шаперонів у фенотипічній пластичності рослин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія). – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню функціонування молекулярних шаперонів / білків теплового шоку (HSP) на різних рівнях – молекулярному, клітинному і організмовому – у забезпеченні стабільності та пластичності формування фенотипу рослин як за оптимальних, так і несприятливих умов зовнішнього середовища. Для дослідження обрано родини шаперонів HSP70 і HSP90, які беруть участь у забезпеченні якості білка клітини на всьому діапазоні стійкості організмів. HSP70 вважаються головними серед родин HSP багатьох видів організмів. HSP90 характеризуються здатністю контролювати активність специфічного набору білків – компонентів різних сигнальних шляхів і регуляції важливих клітинних процесів.

Вперше в рамках комплексного дослідження проаналізовано та узагальнено різні напрями функціонування цих шаперонів – їх роль як системи неспецифічної стійкості за дії критичного рівня факторів довкілля, здатність цитозольних HSP90 регулювати експресію *HSP* і тим самим контролювати чисельність клітинного пулу шаперонів, а також участь HSP90 і HSP70 у забезпеченні стабільності та пластичності росту, розвитку і формотворення.

Зокрема, в серії експериментів перевірено основні положення і отримано нові дані щодо ролі цих білків у стійкості рослин до змін факторів середовища. У модельній рослини *Arabidopsis thaliana* за допомогою ЗТ-ПЛР-аналізу кінетики експресії генів *HSP70* і *HSP90*, що кодують білки

різної субклітинної локалізації, визначено специфічний внесок окремих членів родин у підтримання білкового гомеостазу за нормальних умов, а також за дії високої температури та водного дефіциту. Охарактеризовано особливості профілів генної експресії, які стосуються базового рівня і специфічних до чинника швидкості та ступеня змін. Визначено диференційний характер експресії індукцибельних генів. Зроблено висновок, що AtHSP70-4 є основним індукцибельним членом двох родин у даного виду, тоді як AtHSP70-5 і AtHSP90-1 – додатковим індукцибельним компонентом, важливим у захисті клітин за дії високої температури і слабо реагуючим на водний дефіцит. Значення додаткового індукцибельного компонента в забезпеченні стійкості рослинних клітин підтверджено за допомогою нокаут-мутантів *Athsp70-5* і *Athsp90-1*.

На прикладі двох генів *A. thaliana* продемонстровано, що експресія окремих *HSP* характеризується тканиною локалізацією, що вказує на певну специфічність функціонування відповідних шаперонів. Інтенсивну експресію *AtHSP70-10-GUS* виявлено в гідатодах і прилистках сім'ядоль і справжніх листків, клітинах кореневої шийки і центрального циліндру кореня проростків. Продукт гена цитозольного білка AtHSP90-2 детектували в усіх органах проростків, у значній кількості – в провідних пучках, паренхімі, гідатодах і прилистках сім'ядоль і справжніх листків. Для *AtHSP90-2-GUS* визначено варіабельність за інтенсивністю експресії між індивідуумами. За впливу високої температури і водного дефіциту визначено зміни в інтенсивності експресії цих генів при загальному збереженні її тканинної локалізації.

Для з'ясування особливостей реакції і адаптації у видів, різних за ареалом і адаптивним потенціалом, проведено вестерн-блот-аналіз кінетики синтезу цитозольних HSP70 за високої температури, ґрунтового затоплення і ґрунтової посухи. Модельний вид *A. thaliana* (*Brassicaceae*), який характеризується помірним діапазоном стійкості, порівнювали з високопластичними мезофітами *Malva silvestris* і *M. pulchella* (*Malvaceae*),

Sium sisaroides (*Apiaceae*) та гідрофітом *Trapa natans* (*Trapaceae*). Доведено імуноспорідненість цитозольних HSP70 у рослин різних таксонів. Показано, що на початку впливу чинника захист клітин здійснюється за рахунок функціонування існуючого пулу цитозольних HSP70, тоді як при збільшенні дози чинника відбувається активація синтезу конститутивних та індукційних білків. Відмічено, що синтез індукційного компонента починається через певний лаг-період після конститутивного, що вказує на існування дозового порогу. Вперше охарактеризовано видові особливості білкових профілів, які стосуються кількісних і часових показників кінетики HSP70, відповідають змінам фізіологічного стану рослин і пов'язані з їх діапазоном стійкості. В стрес-реакції на гостру дію чинника (високу температуру, затоплення) стійкіші види характеризувалися більш інтенсивним і тривалим синтезом конститутивних та індукційних HSP70. В експериментах із затопленням визначено системний характер відповіді на локалізовану дію чинника – активацію синтезу HSP70 в листках за умов кореневої гіпоксії. В експериментах з посухи доведено, що під час адаптації рослин до поступового посилення шкідливості фактора підтримка білкового гомеостазу клітин відбувається шляхом прогресивного накопичення HSP70. Визначено позитивну кореляцію базового рівня HSP70 (їх вмісту в клітинах листків за однакових нормальних умов) з адаптивним потенціалом рослин. Показано, що кінетика синтезу HSP70 є інформативним показником при вивченні молекулярних основ резистентності видів.

В експериментах з кореневого затоплення на прикладі двох контрастних за стійкістю видів продемонстровано взаємозв'язок між реакцією шаперонів і процесом специфічної метаболічної адаптації та визначено особливості цих процесів залежно від здатності рослин до морфологічної адаптації. Для цього проведено порівняльний аналіз *A. thaliana*, здатного переносити лише нетривале затоплення, і *S. sisaroides*, якій успішно адаптується до умов мілководдя. Доведено, що в адаптації *S. sisaroides* вирішальну роль відіграє генетична детермінованість комплексної відповіді на кореневу гіпоксію на

різних рівнях організації, яка включає високу інтенсивність синтезу HSP70 (компонента неспецифічної реакції) і алкогольдегідрогенази (АДГ, ферменту специфічної анаеробної адаптації) протягом періоду утворення системи аеренхімононих адвентивних коренів (морфологічної адаптації), а також кооперацію аеробних і анаеробних процесів у часі та просторі. Навпаки, здатність *A. thaliana* переносити лише нетривале перезволоження ґрунту пов'язана з помірною тимчасовою індукцією HSP70 і АДГ та нездатністю до утворення розвиненої аеренхіми. Такі результати вказують на необхідність збільшення клітинного пулу HSP70 для забезпечення протеостазу клітин під час зміни траєкторії розвитку рослинного організму під впливом кореневої гіпоксії за різниці в генетично запрограмованих шляхах анаеробної адаптації – наявності метаболічної та структурної адаптації у *S. sisaroides* і лише метаболічної адаптації у *A. thaliana*. Зроблено висновок про пристосування консервативної родини шаперонів HSP70 до адаптивних особливостей виду протягом філогенетичного розвитку.

Участь шаперонів у реакції рослин на незвичні для земних організмів фактори – гіпергравітацію і мікрогравітацію – вивчено в ряді наземних експериментів. Те, що формування фенотипу за відсутності гравітаційного стимулу характеризується значною континуальною варіабельністю просторового розташування органів, привело нас до висновку про відсутність генетично детермінованої програми відповіді на незвичні для рослин умови. З використанням вестерн-блот-аналізу показано, що відповідь рослинних клітин як на симульовану мікрогравітацію (горизонтальне кліноостатування, 2 об/хв), так і на збільшення гравітаційного навантаження (центрифугування) містить тимчасову послідовну активацію синтезу HSP70 і HSP90, що є індикатором стрес-реакції. У відповідь на гіпергравітацію ступінь і тривалість активації збільшувались із силою тяжіння та часом її дії. За результатами кількісної ЗТ-ПЛР тривале кліноостатування також спричиняє певну активацію генної експресії цитозольних HSP70 і HSP90. За допомогою ІФА в ефекті кліноостатування нами вперше відокремлено ефекти

«обертання» та «положення» стосовно цих HSP, і показано, що симульована мікрогравітація має невеликий, але статистично значущий вплив на рівень цих білків. Отримані дані свідчать про те, що за відсутності генетично детермінованої програми відповіді на змінену гравітацію адаптація рослинних клітин відбувається з використанням наявних у них молекулярних механізмів. Вперше показано, що тривале кліноштатування призводить до більш швидкої та потужної індукції генів цитозольних HSP70 і HSP90 в реакції теплового шоку протягом наступної теплової експозиції, а також до посилення термостійкості рослин. Такі дані свідчать про те, що кліноштатування може спричиняти виникнення в рослинах перехресної стійкості.

За результатами аналізу базової, індукованої та перехресної стійкості рослин зроблено висновок про динамічність діапазону стійкості організму і важливе значення індукції HSP, зокрема HSP70 і HSP90, у детермінації його меж.

Розроблено спосіб визначення стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин, що включає оцінку фізіологічного стану рослини та впливу на неї екологічних факторів за вмістом білків HSP70 у зразку рослинного матеріалу (листках). Проведено його перевірку шляхом тестування рослин 9 видів 6 родин за різних умов середовища.

З використанням інгібітору HSP90 гелданаміцину (ГДА) отримано докази існування авторегуляції синтезу HSP за принципом зворотного зв'язку і регуляції стійкості рослинних клітин білками HSP90. Показано, що обробка ГДА проростків *A. thaliana* викликає індукцію синтезу HSP70 і HSP90 за відсутності стресу. Вперше визначено, що обробка антибіотиком насіння призводить до підвищення базового рівня HSP70 і HSP90 в клітинах проростків, а також до посилення стресової індукції їх синтезу та стійкості рослинних клітин за впливу протеотоксичних чинників, зокрема високої температури та іонізуючої радіації. Отримані дані вказують на можливість

підвищення стійкості клітин шляхом модулювання функціональної активності HSP90 і, відповідно, регуляції ними експресії генів *HSP*.

Розглядаючи здатність шаперонів HSP90 здійснювати конформаційну регуляцію специфічного набору білків, які беруть участь у трансдукції сигналів і регуляції клітинних процесів, нами на основі аналізу літератури і електронної бази BioGRID складено список білків, функціонування яких залежить або може залежати від HSP90 у рослин. Підтверджено існуючі гіпотези щодо здатності HSP90 бути основою трьох молекулярних механізмів, важливих у визначенні фенотипічної варіабельності популяцій: 1) бути буфером стохастичного розвитку (основане на здатності HSP90 стабілізувати функціональні конформації метастабільних білків-клієнтів, що впливають на розвиток організму); 2) підтримувати пластичні реакції за змін умов середовища (основане на здатності HSP90 асистувати у функціонуванні білків-учасників сигнальних шляхів); 3) бути буфером генетичних змін, протидіючи їх фенотипічному прояву (основане на здатності HSP90 підтримувати білок, який несе генетичні зміни, у нормальній функціональній конформації).

Здатність шаперонів HSP90 бути буфером стохастичного розвитку вивчено на ізогенних лініях *A. thaliana* за нормальних умов з використанням інгібіторного аналізу (значення загальної активності пулу HSP90) і нокаут-мутантів *Athsp90-1* і *Athsp90-4* за цитозольними HSP90 (роль окремих членів родини). Обидва підходи показали подібні фенотипічні зміни: у проростків – десинхронізацію росту, збільшення частки проростків з морфологічними відхиленнями, посилення асиметрії парних органів і білатеральних ознак (флуктуюча асиметрія), виникнення суттєвих порушень формотворення; у дорослих рослин – дестабілізацію росту і розвитку та зниження ростової активності за кількома показниками, порушення нормального формотворення у невеликої частки рослин. Зроблено висновок про значення як загальної активності пулу шаперонів HSP90, так і окремих цитозольних членів для підтримання оптимальних темпів росту і розвитку та стабілізації

нормального формотворення рослин протягом онтогенезу за впливу мінорних флуктуацій внутрішнього і зовнішнього середовища.

Враховуючи тісну кооперацію функціонування HSP90 і HSP70, висловлено гіпотезу про те, що шаперони HSP70 також можуть впливати на стабільність ростових процесів і морфогенез, прямо чи опосередковано. Результати феномного аналізу нокаут-мутантів за цитозольними *AtHSP70-5* і *AtHSP70-14* підтвердили цю гіпотезу. Визначено збільшення варіабельності фенотипів за більшістю вивчених ознак як у ранньому розвитку, так і протягом онтогенезу, порівняно з диким типом, подібно до мутантів за генами *HSP90*.

Аналіз мутантних проростків із суттєвими фенотипічними змінами показав, що фенотипічні аномалії часто з'являються або корегуються на рівні окремого модуля. Такі дані свідчать про те, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися дискретно на рівні модуля.

Вперше показана участь окремих цитозольних HSP90 і HSP70 у підтриманні пластичних реакцій рослин на зовнішні чинники (власне фенотипічна пластичність). Визначено, що порушення експресії *AtHSP90-1*, *AtHSP90-4*, *AtHSP70-5* і *AtHSP70-14* призводить до дестабілізації ростових реакцій та в багатьох випадках до зсуву їх центральної тенденції за різних комбінацій змін світла і гравітації – факторів, що визначають напрям і ростову активність органів рослин. За спектром і ступенем фенотипічних змін кожна мутантна лінія мала особливості, що також вказує на певну специфічність функціонування відповідних HSP90 і HSP70.

Здатність шаперонів HSP90 протидіяти фенотипічному прояву генетичного поліморфізму вивчено за допомогою інгібіторного аналізу з використанням поліморфного насіння *A. thaliana* різного походження (насіння природних популяцій; насіння, опромінене УФ-В або γ -радіацією). Продемонстровано здатність HSP90 підтримувати гомеостаз та стабілізувати ріст і формотворення рослин після дії генотоксичних чинників.

На основі отриманих даних і аналізу літератури запропоновано гіпотетичну модель взаємодії різних функцій шаперонів HSP90.

Ключові слова: молекулярні шаперони, білки теплового шоку, HSP70, HSP90, фенотипічна пластичність рослин, стійкість розвитку, адаптація, стрес, високі температури, водний дефіцит, затоплення, змінена гравітація, експресія генів, синтез білка, регуляція реакції теплового шоку, біомаркер стану рослин.

Список публікацій здобувача

Статті у фахових і міжнародних журналах:

1. Kozeko L.Ye., Buy D.D., Pirko Ya.V., Blume Ya.B., Kordyum E.L. Clinorotation affects induction of the heat shock response in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Gravitational Space Res.*, 2018, 6 (1): 2-9. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту; разом з іншими співавторами – аналіз генної експресії, опрацювання і аналіз отриманих даних; написання статті*).

2. Козеко Л.Е. Участие цитозольных белков теплового шока HSP70 и HSP90 в адаптации к водному дефициту проростков *Arabidopsis thaliana*. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2018, 2 (44): 41-49. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті*).

3. Kordyum E., Kozeko L., Ovcharenko Y., Brykov V. Assessment of alcohol dehydrogenase synthesis and aerenchyma formation in the tolerance of *Sium* L. species (*Apiaceae*) to water-logging. *Aquatic Bot.*, 2017, 142: 71-77. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення лабораторного експерименту з *Sium sisaroides*, опрацювання і аналіз відповідних даних; разом з іншими співавторами – узагальнення результатів, участь у підготовці статті*).

4. Козеко Л.Є. Синтез білка теплового шоку HSP70 і алкогольдегідрогенази у листках *Arabidopsis thaliana* і *Sium sisaroides* у відповідь на затоплення ґрунту. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2017, 3 (42): 46-51. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

5. Козеко Л.Є. Шаперони HSP90 як стабілізатор росту і формотворення рослин: мікроеволюційний аспект. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2016, 18: 42-45. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих результатів, написання статті).

6. Козеко Л.Є., Рахметов Д.Б. Особливості динаміки синтезу білків теплового шоку HSP70 у *Malva silvestris* і *M. pulchella* (Malvaceae) у зв'язку зі стійкістю до високої температури, затоплення та посухи. Укр. Ботан. Журн., 2016, 73 (2): 194-203. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавтором – аналіз результатів, написання статті).

7. Kozecko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds. Life Sci. Space Res., 2015, 6: 51-58. (Особистий внесок здобувача: феномний аналіз і вестерн-блот-аналіз, написання статті; разом зі співавторами – планування і постановка експерименту, аналіз цілісності ДНК, аналіз отриманих даних).

8. Козеко Л.Є., Овчаренко Ю.В. Динаміка структурно-функціональної адаптації *Sium latifolium* (Apiaceae) до затоплення кореневої системи. Укр. Ботан. Журн., 2015, 72 (2): 172-179. (Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз білків, написання статті; разом зі співавтором – постановка експерименту, гістохімічний аналіз, аналіз отриманих даних).

9. Козеко Л.Є. Вплив радіціколу, інгібітору шаперонів HSP90, на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення насіння. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2015, 1 (34): 14-21. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

10. Козеко Л.Є. Изменения в синтезе белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином. Цитология, 2014, 56 (6): 419-426. (Kozeko L.Ye. Changes in heat-shock protein synthesis and thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings resulting from Hsp90 inhibition by geldanamycin. Cell Tissue Biology, 2014, 8 (5): 416-422.) (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

11. Kozeko L.E. Phenotypic variability of *Arabidopsis thaliana* seedlings as a result of inhibition of Hsp90 chaperones. Cytol. Genet., 2013, 47 (2): 75-87. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

12. Козеко Л.Є. Влияние гелданамицина на синтез белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana*. Доповіді НАН України, 2013, 2: 152-157. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

13. Kordyum Ye.L., Kozeko L.Ye., Ovcharenko Yu.V. Phenotypic plasticity of aerial-aquatic plants *Alisma plantago-aquatica* L. and *Sium latifolium* L.: structural and molecular aspects. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: біологія, 2012, 52 (3): 11-16. (Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавторами – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).

14. Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух Г.Я., Рахметов Д.Б., Мартинюк Г.М., Дідух Я.П., Кордюм Є.Л. Оцінка стану рослин при несприятливих змінах екологічних факторів з використанням білка теплового шоку 70 кДа (Hsp70). Укр. Ботан. Журн., 2011, 68 (6): 890-900. *(Особистий внесок здобувача: опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – планування експерименту, аналіз білків, аналіз отриманих результатів, написання статті).*

15. Козеко Л.Є. Білок теплового шока 90 кДа: різноманітність, структура і функції. Цитологія, 2010, 52 (11): 3-20. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, порівняння даних літератури з результатами власних досліджень, написання статті).*

16. Kozecko L., Kordyum E. Effect of hypergravity on the level of heat shock proteins 70 and 90 in pea seedlings. Microgravity Sci. Technology, 2009, 21 (1): 175-178. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

17. Козеко Л.Є. Количественные изменения белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в реакции проростков гороха на кратковременное действие гипергравитации. Доповіді НАН України, 2009, 1: 140-143. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

18. Kozecko L. Effects of simulated microgravity on thermotolerance of pea seedlings. J. Gravitational Physiol., 2008, 15 (1): 173-174. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

19. Kozecko L.Ye., Kordyum E.L. Heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings under clinorotation of different duration. J. Gravitational Physiol., 2007, 14 (1): 115-116. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

20. Kozeko L.Ye., Kordyum E.L. Altered gravity effect on the heat shock protein level in plants. J. Gravitational Physiol., 2006, 13(1): 117-118. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

21. Козеко Л.Е. Изменения в спектре растворимых белков и в содержании стрессовых белков БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха в ответ на клиностатирование. Біополімери і клітина, 2006, 22(2): 136-142. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

22. Kozeko L., Kordyum E. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response. Microgravity sci. technol., 2006, XVIII-3/4: 254-256. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

Статті в наукових збірниках і журналах:

23. Кордюм Є.Л., Дідух Я.П., Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух А.Я. Розробка та підготовка до впровадження методу оцінки стану рослин у несприятливих умовах зовнішнього середовища. Наука та інновації, 2011, 7 (5): 73-78. *(Особистий внесок здобувача: опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – планування експерименту, аналіз білків, аналіз отриманих результатів, написання статті).*

24. Козеко Л.Е. Влияние реальной и моделированной микрогравитации на генную экспрессию белков теплового шока. Космічна наука і технологія, 2007, 13 (2): 57-61. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, порівняння даних літератури з результатами власних досліджень, написання статті).*

25. Козеко Л.Е. Синтез Hsp70 при ингибировании Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana* (доказательство авторегуляции синтеза белков теплового шока). Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы

устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», 10-13 июня 2013, Иркутск, Россия. - Иркутск, 2013: 119-121. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті*).

26. Козеко Л.Е., Кордюм Е.Л. Белок теплового шока Hsp70 как индикатор состояния и резистентности растений. Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», 10-13 июня 2013, Иркутск, Россия. - Иркутск, 2013: 458-461. (*Особистий внесок здобувача: проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті*).

Патент на корисну модель:

27. Козеко Л.Є., Кордюм Є.Л., Дідух Я.П., Артеменко О.А., Дідух А.Я., Заславський В.А. Спосіб визначення стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин. Патент України на корисну модель № 65170, 25.11.2011, Бюл. №22. (*Особистий внесок здобувача: участь в патентному пошуку, проведені експериментальних досліджень та оформленні патенту*).

Тези:

28. Козеко Л.Є. Аналіз модульної природи морфозів у нокаут-мутантів *hsp Arabidopsis thaliana* // Міжнародна наукова конференція «Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках України», 25-27 лютого 2019, Київ, Україна, С. 173-174.

29. Kozeko L. HSP90 dependence of plasticity responses to clinorotation and light/darkness in *Arabidopsis* seedlings // 42nd COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2018, Pasadena, CA, USA, F1.1-0014-18, P. 1893.

30. Kozeko L. HSP90s and HSP70s stabilize root gravitropic response in *Arabidopsis* // 39th Annual ISGP Meeting & ESA Space meets Health initiative, 18-22 June 2018, Noordwijk, The Netherlands, P. 259.

31. Kozeko L. Simulated microgravity affects heat-shock response in *Arabidopsis thaliana* seedlings // ISPS-7 & ELGRA-25 Joint Conference, 2-6 October 2017, Juan-les-Pins, France, P. 100-101.

32. Козеко Л. Регуляція стійкості і пластичності розвитку рослин шаперонами HSP90 // IV Міжнародна конференція “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти”, 4–6 жовтня 2017, Львів, Україна / Біологічні студії, 2017, 11 (3-4), С. 67-68.

33. Козеко Л. Динаміка синтезу HSP70 у зв'язку з адаптивною здатністю видів рослин // IV Міжнародна конференція “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти”, 4–6 жовтня 2017, Львів, Україна / Біологічні студії, 2017, 11 (3-4), С. 25-26.

34. Козеко Л.Є., Буй Д.Д., Пірко Я.В., Блюм Я.Б., Кордюм Є.Л. Вплив кліностагування на експресію генів, що кодують цитозольні білки HSP70 і HSP90, та терmostійкість проростків *Arabidopsis thaliana* // 17-та Українська конференція з космічних досліджень, 22-27 серпня 2017, Одеса, С. 63.

35. Козеко Л.Є. Регуляція пластичності, каналізації розвитку та стійкості рослин шаперонами HSP90 // XIV з'їзд Українського ботанічного товариства, 25-26 квітня 2017, Київ, С. 152.

36. Kozeko L. Heat shock proteins as a protective system in seeds against space conditions // 16-та Українська конференція з космічних досліджень, 22-27 серпня 2016, Одеса, С. 49.

37. Kozeko L. Treatment of *Arabidopsis thaliana* seeds with an HSP90 inhibitor increases plant resistance // 41st COSPAR Scientific Assembly, 30 July - 7 August 2016, Istanbul, Turkey, F4.7-0008-16.

38. Kordyum E.L., Kozeko L.E. Cellular and molecular aspects of plant adaptation to microgravity // 41st COSPAR Scientific Assembly, 30 July - 7 August 2016, Istanbul, Turkey, F1.1-0013-16.

39. Kozeko L. Enhancement of *Arabidopsis thaliana* resistance by inhibition of HSP90 function // ELGRA Biennial Meeting “From Pythagoras to free fall”, 29 September – 1 October 2015, Corfu, Greece / ELGRA News, 2015, 29, P. 136.
40. Kozeko L., Ivanenko G., Kordyum E. Whole-mount GUS staining analysis of heat shock proteins HSP90 and HSP70 expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings // International Conference “Advances in Cell Biology and Biotechnology”, 11-13 October 2015, Lviv, Ukraine, P. 28.
41. Kozeko L. Dynamics of HSP70 synthesis as an indicator of plant tolerance: high temperature and flooding // 10th International Conference "Plant Functioning Under Environmental Stress", 16-19 September 2015, Cracow, Poland, P. 33.
42. Kozeko L., Ovcharenko Yu. Dynamics of adaptive responses in *Sium latifolium* subjected to soil flooding // 10th International Conference "Plant Functioning Under Environmental Stress" 16–19 September 2015, Cracow, Poland, P. 94.
43. Кордюм Є.Л., Бриков В.О., Козеко Л.Є. Клітинні та молекулярні аспекти пристосування рослин до умов мікрогравітації // 15-та Українська конференція з космічних досліджень, 24-28 серпня 2015, Одеса, С. 44.
44. Козеко Л. Вплив інгібіторів шаперонів HSP90 на резистентність *Arabidopsis thaliana* // 15-та Українська конференція з космічних досліджень, 24-28 серпня 2015, Одеса, С. 41.
45. Козеко Л.Є. Авторегуляція синтезу протеїнів теплового шоку протеїнами HSP90 у проростках *Arabidopsis thaliana* // XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014, Київ / The Ukrainian Biochem. J., 2014, 86, N 5 (Supplemental 1), С. 102-103.
46. Козеко Л. A role of HSP90 chaperones in regulation of plant stress response // 4-ий з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17-20 вересня 2014, Ужгород, С. 119.
47. Козеко Л., Талалаєв О., Неймаш В., Поварчук В. Вплив інгібіторів Hsp90 на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення

насіння // 14-та Українська конференція з космічних досліджень, 8-12 вересня 2014, Ужгород, С. 55.

48. Kozeko L.Ye. Regulation of heat shock protein synthesis and thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings by Hsp90 // Международная конференция по биологии и биотехнологии растений, 28-30 мая 2014, Алматы, Казахстан / Алматы: ИББР, 2014, С. 138.

49. Kordyum E.L., Kozeko L.E., Talalaiev A.S. Plant cell responses to microgravity as readjustment // ELGRA Biennial Meeting “In the spirit of discovery”, 11-14 September 2013, Rome, Italy / ELGRA News, 2013, 26, P. 56.

50. Kozeko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of Hsp90 chaperones in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds // ELGRA Biennial Meeting “In the spirit of discovery”, 11-14 September 2013, Rome, Italy / ELGRA News, 2013, 26, P. 190.

51. Кордюм Є., Козеко Л., Талалаєв О. Адаптивні реакції рослин на дію реальної та модельованої мікрогравітації // 13-та Українська конференція з космічних досліджень, 2-6 вересня 2013, Євпаторія, С. 87.

52. Козеко Л., Талалаєв А., Неймаш В., Поварчук В. Защитная роль шаперонов Hsp90 при облучении семян *Arabidopsis thaliana* гамма-радиацией // 13-та Українська конференція з космічних досліджень, 2-6 вересня 2013, Євпаторія, С. 86.

53. Kozeko L. Heat shock proteins 90 kDa conceal cryptic genetic variations in *Arabidopsis thaliana* generated by UV-B irradiation // 9th International Conference “Plant functioning under environmental stress”, 12-15 September 2012, Cracow, Poland, P. 56-57.

54. Козеко Л.Е., Талалаєв А.С., Неймаш В.Б. Роль белков Hsp90 в проявлении генетических нарушений, генерированных УФ-В и γ -радиацией в семенах *Arabidopsis thaliana* // 12-та Українська конференція з космічних досліджень, 3-7 вересня 2012, Євпаторія, С. 83.

55. Kozeko L. Hsp90 chaperones stabilize development of *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Biology Congress 2012, 29 July – 3 August 2012, Freiburg, Germany, P. 603.
56. Kozeko L., Kordyum E. Evaluation of the plant state in space flight using a stress biomarker // Plant Biology Congress 2012, 29 July – 3 August 2012, Freiburg, Germany, P. 212.
57. Kozeko L. Hsp90 chaperones are essential for maintaining of viability and morphogenesis of damaged plants // 39th COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2012, Mysore, India, 2012, F2.1-0015-12.
58. Kozeko L., Kordyum E. Evaluation of the plant state in space flight using a stress biomarker // 39th COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2012, Mysore, India, 2012, F4.4-0021-12.
59. Козеко Л.Є. Шаперони Hsp90 контролюють фенотипічне проявлення генетичного поліморфізму проростків *Arabidopsis thaliana* // 3-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16-20 травня 2012, Ялта, С. 158.
60. Козеко Л.Є. Шаперон Hsp90 контролює фенотипічне проявлення скритих генетических порушень, вызваних УФ-В // Космічний форум 2011, посвящений 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина «Пилотируемые полеты в космос. Биомедицина и жизнеобеспечение», 18-21 октября 2011, Москва, Россия / М.: ИМБП РАН, 2011, С. 171.
61. Kozeko L.Ye., Kordyum Ye.L. Evaluation of the plant state in space flight using a stress biomarker // 11-та Українська конференція з космічних досліджень, 29 серпня-2 вересня 2011, Євпаторія, С. 93.
62. Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Дідух А.Я., Заславський В.А., Кордюм Є.Л. Білок теплового шоку Hsp70 як молекулярний маркер стресового стану рослин // Всеукраїнська наукова конференція «Ботаніка та мікологія: проблеми і перспективи на 2011-2020 роки», 6-8 квітня 2011, Київ, С. 245-246.

63. Козеко Л.Е., Артеменко О.А., Дидух А.Я., Заславский В.А., Дидух Я.П., Кордюм Е.Л. Использование белка теплового шока 70 кДа для оценки негативного влияния факторов среды на растения // Всероссийский симпозиум «Растение и стресс», 9-12 ноября 2010, Москва, Россия, С. 188-189.
64. Козеко Л.Е. Модель для анализа генетических вариаций, фенотипическое проявление которых контролируется шапероном Hsp90 // 10-та Українська конференція з космічних досліджень, 30 серпня -3 вересня 2010, Евпатория, С. 39.
65. Kozeko L.E. A model for monitoring of Hsp90-buffered genetic variations / 38th COSPAR Scientific Assembly, 18-25 July 2010, Bremen, Germany, F44.
66. Kozeko L. Stress proteins Hsp70 and Hsp90 in adaptation of aerial-aquatic *Sium latifolium* species to different water environments // 8th International Conference "Eco-physiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors", 14-19 September 2009, Cracow, Poland, S-66.
67. Kozeko L. Molecular chaperone Hsp90 in the development of *Arabidopsis thaliana* seedlings under clinorotation // ELGRA Biennial Meeting, 1-4 September 2009, Bonn, Germany / ELGRA News, 2009, 26, P. 236.
68. Kozeko L. Expression of Hsp70 and Hsp90 in aerial-aquatic *Sium latifolium* L. plants under different water environments // Keystone Symposia "Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment", 11-16 January 2009, Big Sky, Montana, USA, #210, P. 59.
69. Kozeko L. Effects of simulated microgravity on thermotolerance of pea seedlings // 29th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 22-27 June 2008, Anger, France, P. 100.
70. Kozeko L. Hsp70 level in *Sium latifolium* leaves in different water environments // PISA Conference 2008 "Responses of plants to environmental stresses", 12-18 May 2008, Elena, Bulgaria, P. 43.

71. Kozeko L.Ye., Talalaev A.S., Kordyum E.L. Heat shock protein expression in response of pea seedlings to altered gravity // 23st Annual Meeting of American Society for Gravitational and Space Biology, 25-28 October 2007, Ames Research Park, Moffett Field, CA, USA / Gravitational and Space Biology Bulletin, 2007, #55, P 28.

72. Козеко Л.Є. Рівень Hsp90 у рослин в умовах зміненої гравітації // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології, 23-26 жовтня 2007, Київ, С. 247.

73. Kozeko L., Kordyum E. The level of heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings in response to altered gravity // ELGRA Biennial Meeting, 4-7 September 2007, Florence, Italy / ELGRA News, 2007, 25, P. 166.

74. Kozeko L., Kordyum E. Heat shock proteins HSP90 and HSP70 in pea seedlings under clinorotation of different duration // 28th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 8-13 April 2007, San Antonio, TX, USA, P. 119.

SUMMARY

Kozeko L.Ye. A role of molecular chaperones in the phenotypic plasticity of plants. - Manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Science in Biology, the speciality 03.00.11 – Cytology, Cell Biology, Histology (091 – Biology). M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis is devoted to the investigation of molecular chaperones / heat shock proteins (HSP) at molecular, cellular and organism levels in supporting stability and plasticity of forming a plant phenotype, both under optimal and unfavorable environmental conditions. The families HSP70 and HSP90, which function in the cellular protein quality control in the entire tolerance range of organisms, have been studied. HSP70s are considered to be the main HSP family in many species. A feature of HSP90s is their ability to control the activity of a specific set of proteins – components of various signal pathways and regulation of important cellular processes.

For the first time, various roles of these chaperones have been analyzed in a complex investigation: their function as a system of non-specific resistance at critical levels of environmental factors; the ability of cytosolic HSP90s to regulate the *HSP* expression and, thus, control the cellular pool of chaperones, as well as the participation of HSP90 and HSP70 in supporting the stability and plasticity of growth, development and morphogenesis.

In a series of experiments, the main positions on the functioning of these proteins in plant tolerance were checked and new data were obtained. RT-PCR analysis of the kinetics of expression of *HSP70* and *HSP90* genes in *Arabidopsis thaliana* under normal and stressful conditions (high temperature and water deficiency) revealed the specific contribution of different HSPs with different subcellular localization. Factor-specific patterns in the gene expression profiles

concerned to the basic levels as well as speed and range of changes. At that, differential expression of the inducible genes was determined. It was concluded that AtHSP70-4 is the main inductive member of two families in this species, and AtHSP70-5 and AtHSP90-1 are additional inducible components, which are important for cell protection at high temperature and weakly reactive to water deficiency. The significance of the additional inducible component in tolerance of plant cells was confirmed by the knockout mutants *Athsp70-5* and *Athsp90-1*.

For two HSPs of *A. thaliana*, it was demonstrated that their expression is tissue-specific, indicating a certain specificity of the functioning of the chaperones. Intensive expression of *AtHSP70-10-GUS* was detected in the hydathodes and stipules of cotyledons and true leaves as well as the root-shoot junction and root central cylinder. Expression of *AtHSP90-2-GUS* was detected in all organs, at high levels – in the vasculature, parenchyma, hydathodes, and stipules of cotyledons and true leaves. Differences in the intensity of the *AtHSP90-2-GUS* expression between individuals were revealed. Under the influence of high temperature and water deficit, changes in the intensity of expression of these genes with keeping the tissue-specificity were determined.

To estimate distinctive features of the stress-reaction and adaptation in species, different in their adaptive potential and area of natural distribution, western-blot analysis of kinetics of cytosolic HSP70 synthesis under high temperature, soil flooding and drought was carried out. The model species *A. thaliana* (*Brassicaceae*) characterized by the moderate tolerance was compared with plastic mesophytes *Malva silvestris* and *M. pulchella* (*Malvaceae*), *Sium sisaroides* (*Apiaceae*) and hydrophyte *Trapa natans* (*Trapaceae*). The immunosimilarity of cytosolic HSP70s in plants of different taxa was revealed. It was shown that the beginning of cell response was due to the functioning of the existing pool of cytosolic HSP70s, whereas increasing the agent dose resulted in an activation of synthesis of constitutive and inducible proteins. Synthesis of the inducible component began after a certain lag-period indicating the existence of a dose threshold. Observed differences in the kinetics of HSP70 synthesis between

the species were related to quantitative and temporal characteristics, which corresponded to the changes in the physiological state of plants and their tolerance. In stress-response to the acute impact of a stressor (high temperature, flooding), the more tolerant species were characterized by more intense and long synthesis of constitutive and inducible HSP70s. In the experiments with soil flooding, the systemic response to the localized action of the factor – activation of HSP70 synthesis in leaves under root hypoxia – was determined. Supporting the protein homeostasis during the plant adaptation to gradual increasing water deficit occurred by progressive accumulation of HSP70. Moreover, the basic HSP70 level (HSP70 content in leaves under the same normal conditions) was found to be positively correlated to the adaptive potential of the plant species. It was concluded that the kinetics of HSP70 synthesis was an informative characteristic to estimate the molecular bases of resistance of plant species.

In the experiments with flooding, the relationship between the reaction of HSP70 and the process of specific metabolic adaptation in two species, different in tolerance to root hypoxia, was found. To do this, comparative analysis of *A. thaliana*, capable of carrying only short-term flooding, and *Sium sisaroidium*, which successfully adapts to water-logging, was carried out. In adaptation of *S. sisaroidium*, the genetically determined complex response to root hypoxia plays a decisive role at different levels of the organization, including high intensity of HSP70 synthesis (a component of the nonspecific reaction) and alcohol dehydrogenase (ADH, an enzyme of the specific anaerobic adaptation) during development of new aerenchymatous adventitious roots (morphological adaptation), as well as cooperation of the aerobic and anaerobic processes in time and space. On the contrary, the ability of *A. thaliana* to sustain only a brief water-logging was associated with a moderate temporal induction of HSP70 and ADH and its inability to form developed aerenchyma. These results indicate that the increase in the cellular HSP70 pool is needed to protect protein homeostasis during the change in the developmental trajectory of plant organisms with different genetically programmed pathways of anaerobic adaptation - the metabolic and

structural adaptation in *S. sisaroides*, and only the metabolic adaptation in *A. thaliana*. In addition, a conclusion about adaptation of the conservative chaperone family HSP70 to adaptive possibilities of the species during their phylogenetic development was made.

Participation of chaperones in the reaction of plants to factors unusual for terrestrial organisms, such as hypergravity and microgravity, was studied in a number of terrestrial experiments. The fact that the formation of a phenotype at the absence of a gravitational stimulus is characterized by a significant continual variability of the spatial arrangement of organs, led us to the conclusion that plant organisms do not have a canalized response to these unusual conditions. It was determined using western-blot analysis that the response of plant cells to both simulated microgravity (horizontal clinorotation, 2 rpm) and hypergravity (centrifugation) contained a temporary sequential activation of HSP70 and HSP90 synthesis, indicating a stress-reaction. In response to hypergravity, the degree and duration of the activation increased with the force of gravity and the time of its action. Based on the results of quantitative RT-PCR, long-term clinorotation also led to a minor increase in the level of cytosolic HSP70 and HSP90. Moreover, we differentiated the effects of «rotation» and «position» in the effect of clinorotation using by ELISA and showed that simulated microgravity has a small, but statistically significant effect on the level of these proteins. It was concluded that plant cells use the existing molecular mechanisms to adapt to unusual conditions at absence of genetically determined program of a plastic response. For the first time was shown that long-term clinorotation caused a faster onset and enhancement of induction of these genes during the heat shock response. In addition, seedlings grown under clinorotation were determined to withstand heat treatment better than seedlings grown under the stationary conditions. The obtained data support the assumption that clinorotation may provide cross-protection of plants against fluctuations in the environmental conditions.

Our results on the basic, induced and cross tolerance showed that the limits of tolerance within which an organism can survive are dynamic, as well as the

induction of *HSPs*, in particular *HSP70* and *HSP90*, is important in defining these limits.

A method for estimating the state of plants in natural populations and introduced plants using *HSP70* as a biomarker was developed. It includes the assessment of the physiological state of the plant and the influence of environmental factors on the plant by the level of *HSP70* proteins in a sample of plant material (leaves).

The evidence for negative feedback autoregulation of *HSP* synthesis and regulation of plant cell resistance by *HSP90* proteins was obtained using *HSP90* inhibition by geldanamycin (GDA). GDA treatment of *A. thaliana* seedlings was shown to induce synthesis of *HSP70* and *HSP90* in the absence of stress. For the first time was determined that GDA treatment of seeds resulted in an increase in the *HSP70* and *HSP90* basic level in seedlings, as well as an intensification of their stress induction and cell resistance under the influence of proteotoxic factors (high temperature and ionizing radiation). The obtained data indicate the possibility of increasing cellular tolerance by modulating the functional activity of *HSP90* and, accordingly, regulating *HSP* expression.

Considering the ability of chaperones *HSP90* to carry out conformational regulation of a specific set of proteins involved in diverse signal transduction and regulation pathways, a list of such proteins in plants was composed based on the literature analysis and the electronic database BioGRID.

We verified the hypotheses concerning three *HSP90*-dependent molecular mechanisms, which are important for phenotypic variability of populations: 1) buffering stochastic development (based on the ability of *HSP90* to stabilize functional conformations of metastable client proteins involved in diverse pathways, which affect the plant development); 2) supporting plastic responses to environmental changes (based on the ability of *HSP90* to assist in the functioning of signal proteins); 3) buffering genetic variations, counteracting their phenotypic display (based on the ability of *HSP90* to support a protein with genetic changes in a normal functional conformation).

The ability of chaperones HSP90 to be a buffer of stochastic development was studied in isogenic lines of *A. thaliana* under normal conditions using the inhibitory analysis (significance of the total activity of the cellular HSP90 pool) and knockout mutants *Athsp90-1* and *Athsp90-4* (a role of individual cytosolic HSP90s).

Both approaches showed similar effects: in seedlings – desynchronization of growth, increase in the percentage of seedlings with morphological deviations, increase in the asymmetry of binate organs and bilateral traits (fluctuating asymmetry), and appearance of abnormal phenotypes; in adult plants – destabilization of growth and development as well as reduction of growth activity by several traits, and violation of normal morphogenesis in a small part of plants. It was concluded about the importance of the general activity of the pool of HSP90, as well as individual cytosolic members to support the optimum rates of growth and development and stabilize the normal morphogenesis under minor fluctuations of the internal and external environment.

Taking into account the close cooperation of HSP90 and HSP70 in their functioning, we hypothesized that the HSP70 chaperones may also affect the stability of growth and morphogenesis, directly or indirectly. The results of phenomic analysis of knockout mutants *Athsp70-5* and *Athsp70-14* approved our assumption for the cytosolic HSP70s. An increase in the variability of most of the studied phenotypic traits was determined both in early development and whole ontogenesis, as compared with wild type. These changes were similar to the changes in the HSP90 mutants.

Analysis of the mutant seedlings with strongly altered phenotypes showed that morphological anomalies often appeared and could be corrected at a level of modular subunits of plants. Such data show that the effect of HSP90 and HSP70 on the determination of the morphogenetic program can occur discretely at the modular level.

The participation of individual cytosolic HSP90s and HSP70s in the supporting plastic responses of plants to external stimulus (phenotypic plasticity

sensu stricto) was shown for the first time. It has been determined that the knockout mutations of *AtHSP90-1*, *AtHSP90-4*, *AtHSP70-5* and *AtHSP70-14* caused destabilization of growth reactions and, in many cases, deviations of their central tendency under various combinations of light and gravity – factors that determine the direction and growth activity of plant organs. The spectrum and degree of phenotypic alterations showed that each mutant line had particularities, indicating functional specificity of the corresponding HSP90s and HSP70s.

The ability of HSP90 to counteract the phenotypic manifestation of genetic polymorphism was studied using inhibitory analysis of polymorphic *A. thaliana* material of different origins (seeds from natural populations; seeds of ecotypes irradiated by UV-B or γ -rays). The ability of HSP90 to support homeostasis and stabilize the plant growth and development after genotoxic impacts was shown.

Based on the obtained data and literature analysis, a hypothetical model of the interaction of various functions of chaperones HSP90 was developed.

Key words: molecular chaperones, heat shock proteins, HSP70, HSP90, phenotypic plasticity of plants, developmental stability, adaptation, stress, high temperature, water deficiency, flooding, altered gravity, gene expression, protein synthesis, regulation of heat shock reaction, biomarker of a plant state.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	34
ВСТУП.....	36
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	46
РОЗДІЛ 1. Стабільність і пластичність росту і розвитку рослинного організму.....	46
1.1. Фенотипічна пластичність рослин.....	46
1.2. Стрес і адаптація рослин до несприятливих змін середовища.....	52
1.2.1. Стрес-реакція і адаптація: теоретичні положення	52
1.2.2. Клітинні механізми відповіді рослин на окремі абіотичні чинники.....	58
РОЗДІЛ 2. Молекулярні шаперони/ білки теплового шоку (HSP) як система контролю якості білка рослинних клітин.....	70
2.1. Клітинний протеостаз.....	70
2.2. Шаперони / HSP як системи контролю якості білка.....	73
2.2.1. Родина HSP70.....	77
2.2.2. Родина HSP90.....	84
2.3. HSP у відповіді рослинних клітин на зовнішні чинники	93
2.4. Базовий рівень HSP.....	101
2.5. Участь шаперонів у формуванні фенотипу рослин.....	102
2.5.1. HSP90 у стабілізації нормального формотворення.....	102
2.5.2. HSP90 у фенотипічній пластичності.....	106
2.5.3. HSP90 у стабілізації формотворення при генетичних змінах.....	107
2.5.4. HSP70 у стабілізації ростових процесів.....	109
2.6. Регуляція реакції теплового шоку і роль HSP90.....	110
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	116
3.1. Рослинний матеріал.....	116
3.2. Відбір зразків для тестування стану рослин.....	117
3.3. Вирощування рослин.....	118

3.3.1. Вирощування рослин в умовах стерильної культури.....	118
3.3.2. Вирощування рослин в ґрунті.....	119
3.4. Проведення експериментів.....	120
3.4.1. Обробка інгібіторами.....	120
3.4.2. Експерименти з феномного аналізу ізогенних ліній <i>A. thaliana</i> при інгібуванні HSP90.....	121
3.4.3. Експерименти з феномного аналізу поліморфного матеріалу <i>A. thaliana</i> при інгібуванні HSP90.....	121
3.4.4. Експеримент з вивчення впливу інгібування HSP90 на ріст і розвиток рослин <i>A. thaliana</i>	122
3.4.5. Експерименти з феномного аналізу мутантів <i>hsp A. thaliana</i> в онтогенезі.....	123
3.4.6. Експерименти з впливу високої температури в умовах агаризованої культури.....	123
3.4.7. Експерименти з моделювання прогресуючого водного дефіциту в умовах агаризованої культури.....	124
3.4.8. Експерименти з впливу зміненої гравітації.....	125
3.4.8.1. Експерименти з впливу зміненої гравітації і світла в умовах агаризованої культури.....	125
3.4.8.2. Експерименти з впливу кліноостатування.....	127
3.4.8.3. Експерименти з моделювання гіпергравітації.....	128
3.4.9. Експерименти з вивчення кінетики синтезу HSP у зв'язку з адаптаційною здатністю видів.....	128
3.5. Визначення показників фізіологічного стану рослин.....	130
3.6. Феномний аналіз <i>A. thaliana</i>	130
3.6.1. Феномний аналіз проростків.....	130
3.6.2. Феномний аналіз рослин протягом онтогенезу.....	132
3.7. Біохімічні методи.....	132
3.7.1. Виділення білка.....	132
3.7.2. Електрофоретичний розподіл білка в ПААГ.....	133

3.7.3. Вестерн-блот-аналіз.....	133
3.7.4. Нативний електрофорез та гістохімічне забарвлення АДГ в гелі	134
3.7.5. Гістохімічне забарвлення АДГ в коренях.....	135
3.7.6. Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA).....	135
3.8. Молекулярно-біологічні методи.....	136
3.8.1. Аналіз фрагментації ДНК індивідуальних клітин методом гелі- мікроелектрофорезу (метод ДНК-комет).....	136
3.8.2. Виділення загальної ДНК.....	137
3.8.3. Виділення загальної РНК.....	138
3.8.4. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.....	138
3.8.5. Електрофорез РНК в агарозному гелі.....	139
3.8.6. Конструювання праймерів для аналізу експресії генів.....	139
3.8.7. Зворотна транскрипція.....	142
3.8.8. Полімеразна ланцюгова реакція після зворотної транскрипції.....	142
3.8.9. Рестрикційний аналіз ампліфікованої кДНК.....	143
3.8.10. Полімеразна ланцюгова реакція після зворотної транскрипції у режимі реального часу (кількісна ЗТ-ПЛР).....	144
3.8.11. Ідентифікація вставки Т-ДНК, відбір гомозиготних інсерційних мутантів і перевірка експресії генів.....	145
3.8.12. Ідентифікація вставки Ds у трансгенних ліній	150
3.8.13. Цитохімічне забарвлення β -глюкуронідази (GUS).....	150
3.9. Статистична обробка результатів експериментів.....	151
РОЗДІЛ 4. РОЛЬ HSP70 І HSP90 У СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ЗМІН НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	
4.1. Кінетика експресії <i>HSP</i> в проростках <i>A. thaliana</i> за впливу несприятливих чинників.....	153
4.1.1. Експресія <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i> за впливу високої температури.....	154
4.1.2. Експресія <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i> за впливу водного дефіциту.....	164
4.2. Участь окремих <i>HSP90</i> і <i>HSP70</i> у забезпеченні стійкості рослин	172
4.2.1. Стійкість нокаут-мутантів <i>hsp A. thaliana</i> до високої температури....	174

4.2.2. Стійкість нокаут-мутантів <i>hsp A. thaliana</i> до водного дефіциту.....	177
4.3. Тканиноспецифічність експресії генів <i>HSP</i>	182
4.4. Особливості кінетики синтезу <i>HSP70</i> у зв'язку з діапазоном стійкості рослин	193
4.4.1. Кінетика синтезу <i>HSP70</i> у зв'язку з теплостійкістю рослин.....	195
4.4.2. Кінетика синтезу <i>HSP70</i> у зв'язку з стійкістю рослин до затоплення.....	203
4.4.3. Кінетика синтезу <i>HSP70</i> у зв'язку з посухостійкістю рослин.....	214
4.4.4. Базовий рівень <i>HSP70</i>	219
4.5. Участь <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i> в стрес-реакції і адаптації рослинних клітин до змін гравітаційного навантаження.....	223
4.5.1. Синтез <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i> за впливу гіпергравітації	223
4.5.2. Синтез <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i> за впливу кліноостатування	226
4.5.3. Вплив кліноостатування на стресову індукцію <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i> та теплостійкість рослинних клітин.....	236
4.6. <i>HSP70</i> як біомаркер стану рослин.....	243
Висновки до розділу 4.....	252
РОЗДІЛ 5. РЕГУЛЯЦІЯ ГЕННОЇ ЕКСПРЕСІЇ HSP І СТІЙКОСТІ РОСЛИН ЦИТОЗОЛЬНИМИ HSP90.....	
5.1. Вплив інгібуванні <i>HSP90</i> на синтез <i>HSP70</i> і <i>HSP90</i>	257
5.2. Вплив інгібування <i>HSP90</i> на термостійкість рослин.....	262
5.3. Вплив інгібування <i>HSP90</i> на синтез <i>HSP70</i> після γ -опромінення.....	265
Висновки до розділу 5.....	268
РОЗДІЛ 6. РОЛЬ HSP90 І HSP70 У ФЕНОТИПІЧНІЙ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ РОСЛИН.....	
6.1. Значення загальної функціональної активності клітинного пулу <i>HSP90</i> для стабілізації росту і морфогенезу рослин.....	273
6.1.1. Вплив інгібування <i>HSP90</i> на ріст і морфогенез ізогенної лінії <i>A. thaliana</i> за нормальних умов середовища.....	273
6.1.1.1. Вплив інгібування <i>HSP90</i> на ріст проростків.....	273
6.1.1.2 Вплив інгібування <i>HSP90</i> на ріст рослин.....	278

6.1.2. Вплив інгібування HSP90 на ріст і морфогенез проростків <i>A. thaliana</i> з поліморфного насінневого матеріалу.....	281
6.1.2.1. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків з насіння природних популяцій.....	282
6.1.2.2. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків після опромінення насіння УФ-В.....	285
6.1.2.3. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків після опромінення насіння γ -радіацією.....	287
6.1.2.4. Порівняння впливу інгібування HSP90 на поліморфний матеріал різного походження.....	296
6.2. Роль окремих <i>HSP90</i> і <i>HSP70</i> у рості та розвитку рослин.....	299
6.2.1. Роль окремих <i>HSP90</i> і <i>HSP70</i> у рості та морфогенезі проростків <i>A. thaliana</i>	298
6.2.2. Роль окремих <i>HSP90</i> і <i>HSP70</i> у рості та розвитку рослин <i>A. thaliana</i>	309
6.2.3. Роль окремих <i>HSP90</i> і <i>HSP70</i> у пластичних реакціях проростків <i>A. thaliana</i>	319
6.2.3.1. Ріст проростків нокаут-мутантів <i>hsp</i> за нормальних умов.....	320
6.2.3.2. Ріст проростків нокаут-мутантів <i>hsp</i> при кліноостатуванні.....	322
6.2.3.3. Ріст проростків нокаут-мутантів <i>hsp</i> за стаціонарних умов у темряві.....	323
6.2.3.4. Ріст проростків нокаут-мутантів <i>hsp</i> при кліноостатуванні у темряві.....	325
6.2.3.5. Ріст проростків нокаут-мутантів <i>hsp</i> при кліноостатуванні з точковим джерелом світла низької інтенсивності.....	326
6.2.3.6. Гравітропічна реакція нокаут-мутантів <i>hsp</i>	328
Висновки до розділу 6.....	334
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	
7.1. Характеристика генної експресії HSP70 і HSP90 за різних умов зовнішнього середовища та її зв'язок зі стійкістю рослин.....	338

7.2. Регуляція генної експресії HSP та стійкості рослин шаперонами	
HSP90.....	348
7.3. Роль HSP90 і HSP70 у фенотипічній варіабельності рослин.....	349
7.4. Модель взаємодії різних функцій HSP90.....	359
ВИСНОВКИ.....	364
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	369
Додаток А.....	405
Додаток Б.....	411
Додаток В.....	416
Додаток Г.....	420
Додаток Д.....	425
Додаток Е.....	427
Додаток Ж.....	429

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АБК – абсцизова кислота
- АДГ – алкогольдегідрогеназа
- а.з. – амінокислотні залишки
- АФК – активні форми кисню
- БР – брасиностероїди
- ГДА – гелданаміцин
- ДДС-На – додецилсульфат натрію
- ДТТ – дитіотреїтол
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- ЕР – ендоплазматичний ретикулюм
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- ЗТ – зворотна транскрипція
- ЗТ- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція після зворотної транскрипції
- ІФА – імуноферментний аналіз
- кДНК – комплементарна ДНК
- кДа – кілодальтон
- кол/хв – коливання за хвилину
- МС – комплекс мінеральних солей Мурасіге та Скуга
- мол. м. – молекулярна маса
- н. у. - нормальні умови
- НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид
- об/хв – оберти за хвилину
- ПААГ – поліакриламідний гель
- ПЕГ – поліетиленгліколь
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- п. н. – пара нуклеотидів
- РНК – рибонуклеїнова кислота
- РІ – рекомбінантна інбредна (лінія)

ТББ – трис-боратний буфер

ТХО – трихлороцтова кислота

УФ – ультрафіолет

ФМСФ – фенілметилсульфоніл фторид

ФС – фотосистема

ФСБ – фосфатно-сольовий буфер

ЦТАБ – цетилтриметиламоній бромід

Col – екотип Columbia

CV – коефіцієнт варіації

2D і 3D – дво- і тривимірне (кліноштатування)

HSE – елемент теплового шоку, heat shock element

HSF – фактор теплового шоку, heat shock factor

HSP – білок теплового шоку, heat shock protein

sHSP – низькомолекулярний білок теплового шоку, small heat shock protein

GUS – сигнальний ген *uidA*, який кодує β-глюкуронідазу

LEA-білки – білки пізнього ембріогенезу

Ler – екотип Landsberg *erecta*

M – середнє значення

Me - медіана

NASC – Nottingham Arabidopsis Stock Center

NCBI - Американський Національний Центр Біотехнологічної Інформації

NEF – фактор нуклеотидного обміну

QTLs – локуси кількісних ознак

RNAi – РНК-інтерференція з використанням дволанцюгової РНК

SE – стандартна помилка

SD – стандартне (середнє квадратичне) відхилення

ВСТУП

Актуальність теми. Проблема адапційного потенціалу рослин і шляхів їх пристосування до несприятливих змін зовнішнього середовища є важливою в сьогоденні умовах посилення антропогенного тиску та прогнозів глобальних змін клімату (IPCC, 2012). У зв'язку з цим особливої актуальності набуває пізнання механізмів стабільності та пластичності розвитку рослин, межі якого визначаються діапазоном стійкості виду. Вибір онтогенетичної траєкторії (морфогенетичної програми експресії) генотипу відбувається під впливом зовнішніх стимулів в рамках норми реакції (Bradshaw, 1965; Кордюм и др., 2003; de Kroon et al., 2005). Водночас, каналізований за обраною траєкторією розвиток характеризується стійкістю до флуктуацій середовища і поодиноких генетичних змін (Waddington, 1942; Шмальгаузен, 1946; Kitano, 2004) та певним рівнем внутрішньої нестабільності (Lajus et al., 2003; Forde, 2009). Діапазон стійкості кожного виду включає зону оптимальних значень факторів і близьку до неї зону нормальної життєдіяльності, у межах яких формується стандартний фенотип, а також зони критичних значень, близьких до екологічних мінімуму і максимуму (Shelford, 1913; Одум, 1986). Відхилення фактора від діапазону нормальних значень у бік несприятливих (сублетальних) викликає стрес і за наявності генетично детермінованої адаптації – зміну онтогенетичної траєкторії та встановлення нового фізіологічного стану, в іншому випадку – пригнічення росту і загибель організму (Lichtenthaler, 1998; Кордюм и др., 2003). Отже, пластичність розвитку нерозривно пов'язана з такими характеристиками онтогенезу як діапазон стійкості виду, стабільність і пластичність каналізованого росту і формотворення, а також стрес і адаптація як форми відповіді на зовнішні зміни. Механізми їх детермінації та регуляції є предметом пильної уваги біологів.

Провідною ланкою реалізації генетичної інформації у фенотипі є білки. У підтриманні якості білкового компонента ключову роль відіграють

молекулярні шаперони / білки теплового шоку (heat shock proteins, HSP). За нормальних умов вони асистують іншим білкам у набутті функціональної конформації. За несприятливих змін факторів середовища активація синтезу HSP є найважливішою складовою стресової реакції клітин і служить захисту та відновленню протеостазу, що характеризує ці білки як систему неспецифічної стійкості. З п'яти родин шаперонів / HSP для дослідження нами обрано родини HSP70 і HSP90. Представники цих родин функціонують на всьому діапазоні стійкості, необхідні для життєздатності рослин та відіграють важливу роль при стресі. Однак, недостатньо вивченими залишаються особливості функціонування окремих членів цих багаточленних білкових родин у рослин як за нормальних, так і за критичних умов середовища. Одним з перспективних напрямів є визначення взаємозв'язку динаміки синтезу HSP з адаптивними властивостями видів. Особливий інтерес представляє участь шаперонів у реакції на незвичні для рослин фактори – гіпер- і мікрогравітацію.

Останнім часом, крім більш традиційного напрямку дослідження шаперонів як системи неспецифічної стійкості, значна увага приділяється з'ясуванню їх ролі у забезпеченні стабільності та пластичності онтогенезу рослин. Зокрема, субстратна специфічність шаперонів родини HSP90 дозволяє розглядати їх як важливу регуляторну систему різноманітних клітинних процесів. Субстратами цих HSP є низка метастабільних білків, яка включає учасників різних шляхів трансдукції сигналів, регуляції клітинного циклу, стресової реакції тощо (Picard, 2002; Zhao et al., 2005). Вважається, що HSP90, завдяки їх здатності контролювати конформацію і функціонування залежних від них регуляторних білків, можуть забезпечувати авторегуляцію системи шаперонів (Ali et al., 1998; Morimoto, 1998; Zou et al., 1998), а також бути буфером стохастичних клітинних процесів, впливати на пластичні реакції та запобігати прояву генетичних змін (Rutherford, Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007). Такі функції дозволяють припускати суттєвий багатогранний вплив цих шаперонів на становлення фенотипу. Проте

залежність цих процесів від загальної активності HSP90 та функціонування окремих ізоформ у рослин залишається не до кінця вивченою.

Крім того, відомо, що HSP90 функціонують у тісній кооперації з HSP70 (Grad, Picard, 2007; Noël et al., 2007; Clement et al., 2011; Karagöz, Rüdiger, 2015). У багатьох видів родина HSP70 вважається головною серед HSP (Sørensen et al., 2003). Шаперони HSP70 характеризуються високою чутливістю до змін середовища та ранньою індукцією при стресі. Однак питання їх впливу на формування фенотипу досі залишається нез'ясованим.

У зв'язку із зазначеним актуальним є комплексне дослідження різних напрямів функціонування білків HSP70 і HSP90 у забезпеченні меж і шляхів формування фенотипу рослин, їх ролі у стабільності та пластичності розвитку у видів з різним адаптаційним потенціалом, а також за змін зовнішніх факторів різної природи. Вирішення цих питань сприятиме суттєвому доповненню та поглибленню існуючих уявлень щодо особливостей функціонування системи шаперонів у забезпеченні онтогенезу рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за держбюджетними темами: «Стабільність та пластичність морфогенезу рослин та клітинної організації при змінах водного режиму в природних умовах» (№ ДР 0106U000558, 2006-2009 рр.), «Фенотипічна та генетична пластичність в процесі адаптації рослин до змін навколишнього середовища» (№ ДР 0107U000515, 2007-2011 рр.), «Розробка та підготовка до впровадження методу оцінки стану рослин у несприятливих умовах зовнішнього середовища» (№ ДР 0110U004030, 2010 р.), «Пластичність онтогенезу рослин при змінах водного режиму екотопів: клітинні та молекулярні аспекти» (№ ДР 0110U000087, 2010-2014 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті»

(№ ДР 0112U000059, 2012-2016 рр.), за держконтрактом з НКАУ «Проведення фундаментальних і прикладних досліджень з космічної біології, медицини та біотехнології» (№ ДР 0208U005235, 2001-2007 рр.), «Проведення перспективних наукових досліджень з клітинної біології та мікрогравітації» (№ ДР 0108U009552, 2008-2012 рр.), «Роль шаперонів Hsp90 у прояві генетичних порушень, генерованих космічним середовищем (екзобіологічний експеримент з насінням *Arabidopsis thaliana*)» (№ ДР 0112U004174, 2012 р., дисертантка – керівник і виконавець) та під час стажування у Центрі молекулярної біології рослин університету м. Тюбінген (Німеччина, 2018 р.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати особливості функціонування шаперонів родин HSP70 і HSP90 на молекулярному, клітинному і організмовому рівнях у забезпеченні стабільності та пластичності розвитку рослин.

Згідно з поставленою метою до завдань роботи входило:

1. Проаналізувати кінетику експресії генів родин HSP70 і HSP90, що кодують білки різної субклітинної локалізації, в реакції клітин *A. thaliana* на дію високої температури та водного дефіциту.
2. Оцінити залежність стійкості рослин *A. thaliana* від експресії окремих конститутивних та індукцибельних HSP70 і HSP90.
3. З'ясувати питання тканинної специфічності експресії генів HSP70 і HSP90 на прикладі окремих представників цих родин в проростках *A. thaliana* за нормальних умов і за впливу несприятливих факторів, зокрема високої температури і водного дефіциту.
4. Провести оцінку конститутивного рівня цитозольних HSP70 і особливостей кінетики їх синтезу за впливу високої температури, затоплення і водного дефіциту у видів рослин, різних за діапазоном стійкості.

5. Визначити можливість використання HSP70 як біомаркера стану рослин шляхом його імунодетекції у рослин природних популяцій за контрастних умов середовища.
6. Дослідити експресію генів і синтез цитозольних HSP70 і HSP90 у відповіді рослинних клітин на симульовану мікрогравітацію (кліноостатування) та гіпергравітацію, оцінити вплив кліноостатування на теплостійкість рослин.
7. Здійснити експериментальну перевірку можливості регулювання експресії генів *HSP* і стійкості рослин шаперонами HSP90 за допомогою інгібіторів цих шаперонів.
8. Перевірити здатність шаперонів HSP90 стабілізувати ріст і формотворення рослин за дії стохастичних процесів і наявності генетичного поліморфізму шляхом інгібіторного аналізу генетично мономорфного і поліморфного матеріалу.
9. Оцінити вплив конститутивних та індукційних цитозольних HSP90 і HSP70 на ріст і розвиток рослин за нормальних умов, пластичні реакції на зовнішні зміни, а також участь у забезпеченні стійкості до високої температури і водного дефіциту з використанням нокаут-мутантів *A. thaliana*.

Об'єкт дослідження: участь молекулярних шаперонів / білків теплового шоку у формуванні фенотипу рослин.

Предмет дослідження: особливості генної експресії та синтезу шаперонів / білків теплового шоку родин HSP70 і HSP90, їх участь у забезпеченні стабільності та пластичності росту, розвитку і формотворення рослин.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (виділення і електрофоретичний аналіз ДНК і РНК, отримання кДНК, зворотна транскрипція і ПЛР-ампліфікація у режимі реального часу, рестрикційний аналіз, метод ДНК-комет), біохімічні (нативний і денатуруючий електрофорез, вестерн-блотинг, імуноферментний аналіз), гістохімічні та

мікроскопічні, біоінформатичні (робота з базами даних, комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей), феномний аналіз, методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше в рамках одного дослідження продемонстровано різні напрями функціонування шаперонів: їх роль як системи неспецифічної стійкості до змін факторів середовища; здатність цитозольних HSP90 регулювати генну експресію HSP і тим самим контролювати чисельність клітинного пулу шаперонів; а також роль HSP90 і HSP70 у забезпеченні стабільності та пластичності росту і розвитку рослин.

Охарактеризовано динаміку експресії більшості генів *HSP70* і всіх *HSP90 A. thaliana* у відповідь на підвищення температури і водний дефіцит. Відзначено диференційну активацію індукцйбельних членів цих родин. Вперше визначено тканинну специфічність експресії *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2* в проростках *A. thaliana* та показано зміни інтенсивності експресії цих генів за впливу високої температури і водного дефіциту при збереженні її локалізації.

На основі виявлених відмінностей в кінетиці синтезу імуноспоріднених цитозольних HSP70 у видів рослин із різним адаптаційним потенціалом за впливу високої температури, затоплення і водного дефіциту зроблено висновок про пристосування консервативної системи шаперонів до адаптаційних особливостей видів протягом філогенетичного розвитку.

На прикладі HSP70 і HSP90 доведено, що система шаперонів бере участь у стрес-реакції клітин на незвичні для них чинники – гіпергравітацію та кліноостатування та в адаптації до тривалого кліноостатування за відсутності генетично детермінованої пластичної відповіді. В реакції цих шаперонів на кліноостатування вперше визначено ефект власно симульованої мікрогравітації. Вперше продемонстровано, що кліноостатування призводить до виникнення перехресної стійкості рослин до високої температури.

Підтверджено існування негативної регуляції експресії генів HSP шаперонами HSP90 в рослинних клітинах. Вперше встановлено, що обробка насіння інгібітором HSP90 впливає на стійкість, ріст і розвиток рослин.

Отримано нові докази здатності шаперонів HSP90 стабілізувати формотворення рослин за нормальних умов, а також підтримувати пластичні реакції за змін факторів довкілля. Сформульовано та експериментально доведено гіпотезу щодо подібної ролі у цитозольних HSP70. На основі вивчення нокаут-мутантів *A. thaliana* за AtHSP70-5 і AtHSP90-1 зроблено висновок, що індукцйбельні HSP впливають на ростову активність і стабільність формотворення за нормальних умов. Вперше показано, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми розвитку може відбуватися дискретно на рівні модуля (міжвузля з асоційованим листям).

В результаті теоретичного узагальнення експериментальних досліджень запропоновано модель взаємодії різних функцій шаперонів HSP90.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи суттєво розширюють та узагальнюють існуючі уявлення щодо особливостей функціонування шаперонів у рослин, що може бути використано в навчальних курсах з біохімії, молекулярної біології, клітинної біології та фізіології рослин в контексті механізмів стресової реакції та адаптації рослин до змін умов довкілля, молекулярних основ пластичності та стабільності онтогенезу, а також адаптивних властивостей видів різних екологічних груп.

Розроблено метод визначення стану рослин природних фітоценозів та інтродукованих рослин, що включає оцінку фізіологічного стану рослини та оцінку впливу на неї екологічних факторів шляхом визначення вмісту HSP70 за допомогою імунодетекції.

Отримані результати щодо регуляції синтезу HSP шляхом інгібування HSP90 закладають основи для подальшої розробки технології управління стійкістю рослин. Запропоновано обробку інгібіторами HSP90 насіння, що

підвищує ефективність використання світлочутливих високовартісних антибіотиків, порівняно з їх внесенням в середовище вирощування або обробкою рослин. Інкубація насіння з інгібіторами HSP90 після дії іонізуючої радіації може бути рекомендована для виявлення на рівні фенотипу залежних від шаперона генетичних змін і відбраковування дефектних організмів.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною особистою науковою працею, виконаною на підставі власних теоретичних і практичних напрацювань. Автором дисертаційної роботи самостійно розроблено її концепцію та структуру, здійснено аналіз літературних джерел, визначено експериментальні завдання, проведено аналіз отриманих результатів, зроблено рисунки і таблиці, сформульовано висновки та положення, викладені у дисертації. Основна частина результатів експериментальних досліджень, представлених у дисертації, отримана автором особисто. Дисертанткою сформульовано та підтверджено експериментально гіпотезу про «участь HSP70 у підтриманні стабільності процесів росту, розвитку і формотворення рослин за нормальних умов та їх пластичних реакцій на зовнішні стимули», а також запропоновано модель функціонування шаперонів HSP90. До дисертації включено дані експериментів, проведених разом з науковими співробітниками відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Розроблення способу визначення стану рослин проводилось автором у складі міжінститутського колективу дослідників. В обговоренні результатів та написанні статей брали участь співавтори відповідних публікацій. Під час обговорення мети та завдань дослідження, отриманих даних і всієї роботи здобувач користувалась консультаціями члена-кореспондента НАН України, професора, д.б.н. Є.Л. Кордюм. В цілому, у проведенні досліджень, їх аналізі та узагальненні частка автора складає близько 85%.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи представлено на 37 всеукраїнських і міжнародних наукових форумах, в т.ч. Annual International Gravitational Physiology Meeting (San Antonio, TX, USA,

2007; Anger, France, 2008), ELGRA Biennial Meeting (Florence, Italy, 2007; Bonn, Germany, 2009; Rome, Italy, 2013; Corfu, Greece, 2015), з'їздах Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007; Ялта, 2012), 23rd Annual Meeting of American Society for Gravitational and Space Biology (Ames Research Park, CA, USA, 2007), PISA Conference 2008 «Responses of plants to environmental stresses» (Elena, Bulgaria, 2008), Keystone Symposia «Plant sensing, response and adaptation to the environment» (Big Sky, MT, USA, 2009), 8th International Conference «Eco-physiological aspects of plant responses to stress factors» (Cracow, Poland, 2009), COSPAR Scientific Assembly (Bremen, Germany, 2010; Mysore, India, 2012; Istanbul, Turkey, 2016; Pasadena, CA, USA, 2018), Українська конференція з космічних досліджень (Евпаторія, 2010, 2011, 2012, 2013; Ужгород, 2014; Одеса, 2015, 2016, 2017), Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (Москва, Россия, 2010), Всеукраїнська наукова конференція «Ботаніка та мікологія: проблеми і перспективи на 2011-2020 роки» (Київ, 2011), Космический форум «Пилотируемые полеты в космос. Биомедицина и жизнеобеспечение» (Москва, Россия, 2011), Plant Biology Congress 2012 (Freiburg, Germany, 2012), International Conference «Plant functioning under environmental stress», (Cracow, Poland, 2012, 2015), Plant Biology and Biotechnology International Conference (Almaty, Kazakhstan, 2014), XI Український біохімічний конгрес (Київ, 2014), International Conference «Advances in cell biology and biotechnology» (Lviv, Ukraine, 2015), XIV з'їзд Українського ботанічного товариства (Київ, 2017), IV Міжнародна конференція «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти» (Львів, Україна, 2017), ISPS-7 & ELGRA-25 Joint Conference (Juan-les-Pins, France, 2017), 39th Annual ISGP Meeting & ESA Space meets Health initiative (Noordwijk, The Netherlands, 2018), Міжнародна наукова конференція «Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках України» (Київ, Україна, 2019).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та

їх обговорення, аналізу та узагальненню результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури і семи додатків. Список використаних джерел містить 491 найменувань. Обсяг основного тексту дисертації складає 347 сторінок друкованого тексту. Робота містить 23 таблиці та 118 рисунків.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

СТАБІЛЬНІСТЬ І ПЛАСТИЧНІСТЬ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИННОГО ОРГАНІЗМУ

1.1. Фенотипічна пластичність рослин

Розвиток багатоклітинних організмів, в тому числі і рослинних, відбувається за онтогенетичною траєкторією у межах *діапазону стійкості* та характеризується стабільністю і пластичністю. Ці взаємопов'язані фундаментальні властивості онтогенезу визначають видове біорізноманіття живого світу. Відібрані в ході еволюції стійкі траєкторії розвитку здійснюються за принципом «стабільного потоку», тобто є *каналізованими* (Waddington, 1942). *Стабільність* розвитку виражається в його стійкості до поодиноких генетичних змін і незначних флуктуацій середовища та в спрямованості до утворення оптимального для конкретних умов кінцевого продукту при збереженні видової індивідуальності (Waddington, 1942; Шмальгаузен, 1946; Maiklejohn, Hartl, 2002; Slack, 2002; Hall et al., 2007; Rutherford et al., 2007). Згідно концепції І.І. Шмальгаузена, стабільність розвитку є однією з головних характеристик онтогенетичного процесу та імперативом еволюції онтогенезу (Шмальгаузен, 1946).

Інша фундаментальна властивість розвитку організмів – *фенотипічна пластичність* визначає здатність генотипу змінювати свою експресію та формувати фенотип за одним з можливих (тобто генетично детермінованих) альтернативних шляхів онтогенезу (Bradshaw, 1965; Кордюм, 2001; Кордюм и др., 2003). Межі, в яких може змінюватись фенотипічний прояв генотипу, визначають як *норму реакції* (Schlichting, Pigliucci, 1998). Враховуючи каналізований характер розвитку, норму реакції можна представити, як ряд фенотипів, які можуть бути генеровані одним генотипом відповідно до

градієнта зовнішніх факторів. Вибір конкретної траєкторії розвитку відбувається під впливом зовнішніх стимулів. Пластичність розвитку є адаптивною, тобто дозволяє рослинному організму максимально пристосуватися до простору, в якому він зростає (Bradshaw, 1965; Кордюм и др., 2003; de Kroon et al., 2005). A.D. Bradshaw, з робіт якого почалося активне вивчення явища фенотипічної пластичності, до механізмів пластичності відносив зміни розмірів і форми організму, кількості, розмірів і форми окремих органів, особливості процесів життєдіяльності. Яскравим прикладом високої пластичності рослин та її адаптивної сутності може бути значна варіабельність морфологічних, анатомічних і фізіологічних ознак в індивідуумів одного виду за контрастних умов середовища (Кордюм и др., 2003; Недуха, 2011).

Пластичність і стабільність розвитку знаходяться під генетичним контролем, який здійснюється не на загальному рівні цілого організму, а є специфічним для окремих ознак та їх відношення до зовнішніх сигналів (Bradshaw, 1965; Кордюм и др., 2003). Рівень стабільності ознаки позитивно корелює з її значенням для виживаності та здійснення основних функцій організму.

Висока пластичність розвитку рослин обумовлена такими його властивостями, як неперервний ріст протягом всього онтогенезу, що забезпечується постійним функціонуванням меристем, і модульна будова. Згідно з модульною концепцією фенотипічної пластичності (de Kroon et al., 2005), пластичні відповіді на зовнішні впливи здійснюються на рівні окремих модулів. Основу модульного росту складає циклічне повторювання однієї і тієї ж каналізованої послідовності морфогенетичних процесів, в результаті яких утворюються однотипні конструктивні елементи (Harper, 1977, 1980; Марфенин, 1999, 2008). Модулі бувають кількох морфологічних варіантів – вегетативних і генеративних. В рослин модулями можуть вважатися цілі стебла (рамети), гілки, міжвузля з асоційованим листям і бруньками або генеративними органами (Harper, 1980). Ініціація модулів та їх кількість

регулюються локальними зовнішніми умовами, що забезпечує відповідність форми конструкції особливостям займаного простору. Вибір типу модуля (зокрема, вегетативного чи генеративного) відбувається на початку його утворення (de Kroon et al., 2005). Форма і кінцеві розміри модулів та їх органів знаходяться під генетичним контролем і, разом з тим, можуть модифікуватися в певних межах відповідно до умов середовища (Johnson, Lenhard, 2011). Разом це дає функціонально важливе поєднання генетично детермінованого консерватизму морфології окремих частин з варіабельністю форми та розмірів всього тіла і може вважатися основою високої пластичності рослинного організму при збереженні видової ідентичності.

Проблема механізмів пластичності розглядається на різних рівнях організації та детально описана в ряді оглядових робіт (Кордюм и др., 2003; Trewavas et al., 2003; Kelly et al., 2012; Nicoglou, 2014). Дослідження генетичних основ пластичності призвели до виникнення ряду концепцій. Зокрема, М. Pigliucci (2001) визначив «гени пластичності» як регуляторні локуси, які безпосередньо реагують на конкретний зовнішній стимул, запускаючи певну серію морфогенетичних перетворень. При цьому особлива увага приділяється детекторам змін середовища. Відповідно до Н. Smith (1990), перетворення зовнішнього сигналу в специфічні ростові реакції здійснюється шляхом диференційної регуляції експресії мультигенних родин, задіяних у фенотипічній пластичності. За концепцією Е.Л. Кордюм (Кордюм и др., 2003), фенотипічна пластичність здійснюється у межах норми реакції на основі метаболічної та гормональної регуляції генної експресії (Кордюм, 2001; Кордюм и др., 2003).

Отже, стабільне формотворення, що забезпечує формування стандартного фенотипу виду, є результатом морфогенетичної програми виду за конкретних умов довкілля. Проте така стабільність не є абсолютною. Іншою невід'ємною властивістю всіх систем, що розвиваються являється, як це не суперечливо звучить, *внутрішня нестабільність розвитку*, обумовлена стохастичними процесами («білий шум») (Gärtner, 1990; Lajus et al., 2003;

Hall et al., 2007; Forde, 2009). Дослідження багатоклітинних організмів показують, що генетично ідентичні особини (клони одного організму, ізогенні лінії) навіть за жорсткої стандартизації умов дають суттєві варіації форми і розмірів в рамках нормального фенотипу, які графічно можна представити у вигляді кривої нормального розподілу (Gärtner, 1990). Це явище особливо актуально для рослин у зв'язку з безперервним зростанням протягом усього онтогенезу, варіабельністю кількості, розмірів, темпів утворення та взаємного розташування модулів і складових їх елементів (Lajus et al., 2003; Forde, 2009). Вважається, що нестабільність розвитку контролюється і використовується клітиною. Певна внутрішня нестабільність дає організму перевагу при флуктуаціях зовнішнього середовища, тобто є адаптивною (Shahrezaei, Swain, 2008).

Розглядають два джерела стохастичності розвитку: зовнішній – випадкові локальні флуктуації середовища та внутрішній – імовірнісний характер подій на всіх рівнях організації біологічної системи (Gärtner, 1990; Shahrezaei, Swain, 2008). Внутрішня стохастичність обумовлена такими явищами, як теплові флуктуації структури молекул, хаотичність дифузії, випадковий характер змін концентрації молекул і молекулярних взаємодій у часі та просторі, флуктуації мембранного потенціалу і ко-адаптованих метаболічних шляхів тощо. До внутрішніх процесів можна також віднести стохастичність генної експресії (Ribeiro et al., 2009) і окремих молекулярних подій біохімічних процесів (Shahrezaei, Swain, 2008), динамічний характер білок-білкових взаємодій (Zou et al., 1998), конформаційні флуктуації білкових молекул (Sigworth, 1985).

Концепція каналізованості/стабільності розвитку включає гіпотетичне припущення про існування *буферних систем*, здатних стабілізувати процеси росту і морфогенезу за дії внутрішніх і зовнішніх дестабілізуючих факторів. Згідно теоретичним уявленням, флуктуації зовнішніх факторів нижче певного порогу гасяться буферними системами клітини, і розвиток йде відповідно до обраної траєкторії (Waddington, 1942; Slack, 2002). Зміна

фактора(-ів), що перевищує поріг сприйняття, викликає адекватну відповідь чутливих до сигналу компонентів клітин і адаптивні зміни (зміни метаболічних шляхів, пластичні реакції, утворення тканин і органів). Таким чином, вибір траєкторії розвитку організму в певний момент часу визначається перебуванням відповідної сигнальної системи конкретних клітин в стані готовності до рецепції зовнішнього сигналу вище порогового рівня. Вважається, що функціонування такої гіпотетичної буферної системи може бути виявлене через підвищення чутливості до пертурбацій середовища та нестабільності розвитку при зниженні її активності – природної або вимушеної. При цьому показниками нестабільності можуть бути різноманітні якісні та кількісні ознаки, такі як підвищення фенотипічної варіабельності, поява морфозів, десинхронізація росту і розвитку особин, зниження точності формування повторюваних структурних елементів, асиметрія білатеральних ознак, збільшення коефіцієнта варіації кількісних морфологічних ознак і фізіологічних відповідей тощо (Queitsch et al., 2002; Hall et al., 2007).

Окремо слід зазначити, що при аналізі фенотипічних відмінностей між окремими генотипами в різних екологічних умовах за наявності *генетичного поліморфізму* говорять про взаємодію *генотип* × *середовище* (Silvertown, Charlesworth, 2001). Фенотипічні прояви генетичного поліморфізму не відносяться до явища фенотипічної пластичності як такого, проте цей феномен слід враховувати при вивченні варіабельності фенотипів популяції. Крім того, як зазначено вище, стійкість формотворення до генетичних змін також відноситься до проблеми каналізування розвитку. Вважається, що фенотип зазвичай є досить стійким до невеликої (нижче певного порогу) кількості генетичних змін (Kitano, 2004). При цьому зміни можуть перебувати у мовчазному стані та не впливати на формотворення за одних умов, проте проявлятися на рівні фенотипу за інших умов (Kimura, 1983). Запропоновано кілька генетичних моделей, які пояснюють фенотипічну варіабельність як результат взаємодії генотипу і середовища. Згідно однієї з таких моделей, алельні варіанти локусу можуть прямо сприяти коливанню

фенотипічних ознак, тобто альтернативні алелі локусів є провідними за різних зовнішніх умов (Scheiner, Lyman, 1991; Silvertown, Charlesworth, 2001). Проте більшість онтогенетичних ознак залежить від багатьох генів і одиничні зміни можуть на них не впливати. Інша модель, згадана вище, розглядає можливість існування гіпотетичних регуляторних генів (генів пластичності), індукція яких специфічним зовнішнім сигналом може запускати певну адаптаційну програму (Waddington, 1942; Schlichting, Pigliucci 1998; Pigliucci, 2001). Якщо генетичні зміни відносяться до такого гена, імовірність їх прояву на рівні фенотипу різко збільшується. Слід також враховувати, що регуляторні гени часто є плейотропними і можуть продукувати множинні фенотипи. Крім того, розглядається існування буферного молекулярного механізму, здатного тимчасово приховувати певні генетичні зміни, підтримуючи у функціональній конформації молекулу білка, яка несе зміни в первинній структурі (Waddington, 1942; Rutherford et al., 2007; Mason et al., 2018; Zabinsky et al., 2018). Цей механізм описаний нами далі у п. 2.5.3.

Таким чином, явище фенотипічної пластичності нерозривно пов'язано з такими характеристиками процесу формування фенотипу як стабільність і пластичність розвитку, норма реакції та діапазон стійкості організму. Крім того, необхідно враховувати, що різноманітність фенотипів в популяції є результатом не тільки фенотипічної пластичності кожного генотипу, а ще і таких явищ, як внутрішня нестабільність, яка є невід'ємною складовою будь-яких живих систем, та генетичний поліморфізм. В літературі обговорюється можливість існування єдиного механізму, здатного підтримувати стабільність формотворення: 1) під час пластичних реакцій; 2) за дії стохастичних процесів; 3) за наявності генетичних змін (Maiklejoh, Hartl, 2002). На роль такої буферної системи розглядаються шаперони HSP90 (Rutherford, Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2004; Rutherford et al., 2007; Samakovli et al., 2007), що більш детально описано нами в п. 2.5.

Оскільки акт прояву пластичності починається з втрати гомеостазу під впливом змін фактора(-ів) середовища, далі нами розглянуто основні закономірності відповіді рослин на зовнішні зміни шляхом стресової реакції та адаптації.

1.2. Стрес і адаптація рослин до несприятливих змін середовища

1.2.1. Стрес-реакція і адаптація: теоретичні положення

Згідно закону толерантності Шелфорда кожний вид характеризується екологічним оптимумом, який сприяє максимальній продуктивності, а також межами витривалості або стійкості, за якими існування організму неможливе (Shelford, 1913; Одум, 1986; Руденко та ін., 2009) (рис. 1.1). Варіації факторів середовища в певному діапазоні значень навколо оптимальних визначають як зону нормальної життєдіяльності або нормальні умови, за яких рослина нормально росте і розвивається, продукуючи стандартний фенотип. До варіацій умов середовища в зазначеному діапазоні організм швидко аклімується шляхом настроювання метаболічної і ростової активності клітин та певних змін експресії генів у рамках існуючої морфогенетичної програми розвитку (Хочачка, Сомеро, 1977; Lichtenthaler, 1998). Умови, відмінні від нормальних (у межах стійкості), потребують адаптації на біохімічному, фізіологічному та структурному рівнях, що пов'язане зі зміною морфогенетичної програми і призводить до формування фенотипу, відмінного від стандартного (в рамках норми реакції) (Lichtenthaler, 1998; Кордюм и др., 2003).

За стабільних умов середовища, як близьких до оптимальних, так і несприятливих, фізіологічний стан організму характеризується певним рівнем клітинного гомеостазу, тоді як гострі суттєві відхилення екологічних факторів спричиняють порушення гомеостазу і викликають стрес.

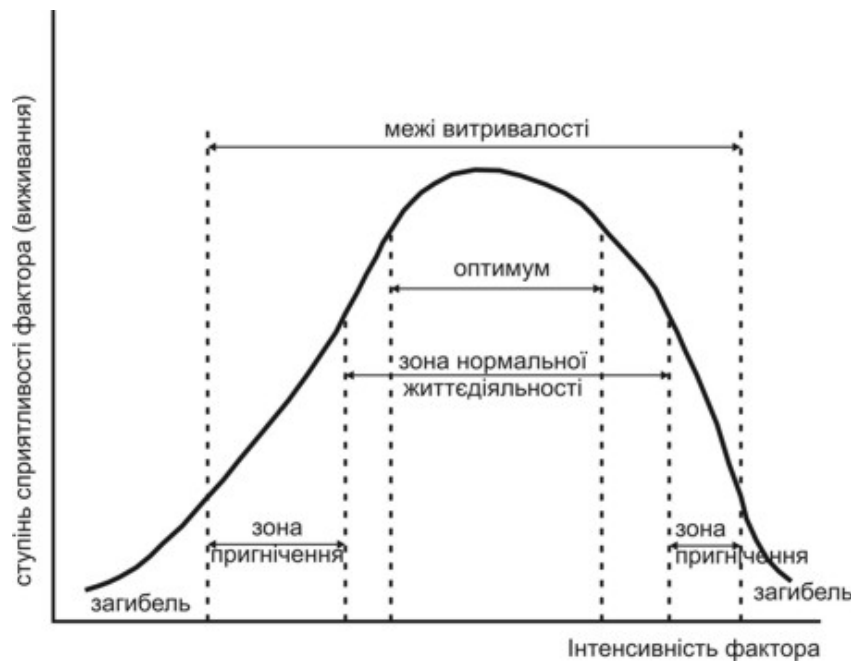


Рис. 1.1. Крива толерантності популяції за Шелфордом (Shelford, 1913).

Концепція *стресу* введена Гансом Сельє. Згідно з цією концепцією, стрес визначається як неспецифічна системна реакція тваринного організму на гостру дію шкідливих агентів різної (фізичної, хімічної, психологічної) природи (Selye, 1936, 1946, 1950). Агенти або фактори, що викликають стрес, Сельє назвав стресорами (Selye, 1974). В стресі виділено три стадії – тривоги ("alarm stage", первинна відповідь), резистентності ("resistance stage", коли організм набуває стійкості до дії фактору) та виснаження ("exhaustion stage", коли опірність організму різко знижується). Стадії тривоги та резистентності спрямовані на відновлення гомеостазу і адаптацію організму до нових умов, тоді як виснаження настає за надмірних доз стресора і веде до загибелі. Сукупність змін, що виникають в організмі в стані стресу, названі також *загальним адаптаційним синдромом* (Selye, 1936). Вони включають порушення гомеостазу та неспецифічні захисні реакції. Однак, специфічні особливості стресора можуть модифікувати хід цих процесів (Selye, 1950).

Визначення стресу з тих пір отримало безліч інтерпретацій, часто суперечливих (див. Веселовский и др., 1993; Lichtenthaler, 1998; Кордюм и др., 2003; Косаківська, 2003; Sørensen et al., 2003; Колупаев, Карпец, 2010; Kranner et al., 2010). В багатьох роботах поняття «стрес» використовується

замість поняття «стресор», що призводить до певних складнощів. Враховуючи це, в даній роботі автор притримується оригінального визначення цього поняття у більш загальному його варіанті: «Стрес – це неспецифічна відповідь організму на будь-яку пред'явлену йому вимогу» (Selye, 1974). При цьому приймається положення про те, що стресова доза фактора є такою, що здатна суттєво порушувати гомеостаз організму: «Все, що викликає стрес, загрожує життю, якщо не зустрінє адекватної відповіді; і навпаки, все, що загрожує життю, викликає стрес і адаптивну відповідь» (Selye, 1950).

Концепція стресу успішно застосовується і отримала широкий розвиток в біології рослин (Larcher, 1987; Кузнецов, 1992, 2001, 2002; Веселовский и др., 1993; Leshem et al., 1998; Lichtenthaler, 1998; Таран, 2001; Кордюм и др., 2003; Косаківська, 2003; Таран та ін., 2004; Колупаев, Карпец, 2010). Стресорами для рослин можуть виступати несприятливі зміни будь-яких зовнішніх факторів:

- природних (температура, водозабезпечення, радіація, мінеральне живлення, механічні, хімічні і біотичні чинники);
- антропогенних (озон і реактивні форми кисню, важкі метали, передозування добрив, гербіциди, пестициди і фунгіциди, зміна рН середовища, УФ-радіація і підвищена концентрація CO₂ внаслідок глобальних змін клімату тощо) (Lichtenthaler, 1998; Кордюм и др., 2003).

Слід також враховувати те, що за природних умов рослинний організм зазвичай відчуває одночасний вплив комплексу несприятливих чинників.

Відповідно до сучасних уявлень, до загального адаптаційного синдрому відносяться: посилення проникності та деполаризація мембран; порушення редокс-гомеостазу клітин; зміна рН клітинних компартментів; вихід Ca²⁺ в цитозоль; зростання вмісту активних форм кисню (АФК); активація пероксидного окиснення ліпідів; втрата білками функціональної конформації (денатурація); загальне зниження інтенсивності біосинтетичних процесів; підвищення активності гідролітичних ферментів і посилення катаболічних

процесів; синтез NO та його похідних; активація сигнальних шляхів за участю АФК, NO та фізіологічно активних продуктів катаболізму; синтез гормонів стресу – абсцизової кислоти (АБК), етилену, жасмонової та саліцилової кислот і активація залежних від них регуляторних шляхів; переключення експресії генів з програми нормального метаболізму на програму стресової відповіді, що включає активацію експресії генів, які кодують білки захисту молекулярних і клітинних структур (зокрема білки теплового шоку, які забезпечують відновлення протеостазу; антиоксидантні ферменти, що відповідають за детоксикацію АФК; білки, що беруть участь у регуляції стабільності мембран через зміни їх ліпідного складу; ферменти біосинтезу осмопротекторів); порушення ритмічності метаболізму; зниження активності ростових процесів (Leshem et al., 1998; Кузнецов, Шевякова, 1999; Тарчевский, 2002; Кордюм и др., 2003; Leone et al., 2003; Таран та ін., 2004; Касперська, 2004; Колупаев, Карпец, 2010; Красиленко и др., 2010).

Для виділення фаз стрес-реакції у рослин широко застосовується уніфікована концепція стресу Н. Lichtenthaler, згідно з якою три канонічні фази стресу доповнюються фазою регенерації (Lichtenthaler, 1998) (рис. 1.2):

1) Фаза відповіді (реакція тривоги, початок стресу) характеризується відхиленням від фізіологічної норми, порушенням клітинного гомеостазу, зниженням активності анаболічних і активацією катаболічних процесів.

2) Фаза відновлення (стадія спротиву або резистентності, продовження стресу) включає репарацію пошкоджень, адаптацію до нових умов і загартування, що призводить до посилення стійкості та встановлення нового фізіологічного стану, який відповідає максимальній стійкості організму та є оптимальним за нових умов.

3) Кінцева фаза (стадія виснаження), коли доза стресора занадто висока і перевищує адаптивні здатності організму, що спричиняє сильні ушкодження, прискорення старіння і, врешті, загибель.

4) Фаза регенерації (альтернатива кінцевій фазі) включає часткову або повну регенерацію фізіологічної функції після припинення дії стресора, якщо ушкодження не було занадто сильним.

Адаптація – процес пристосування живого організму до умов середовища, спрямований на встановлення фізіологічного гомеостазу. В ході еволюційного розвитку види пристосувались до певних еконіш завдяки виникненню адаптивних механізмів на всіх рівнях організації, включаючи генетичний, молекулярно-біологічний, фізіологічний і структурний. Адаптивний потенціал рослин є генетично детермінованим, значно варіює між видами та по відношенню до різних чинників і напряму пов'язаний з багатоваріантністю онтогенетичних шляхів і пластичністю розвитку.

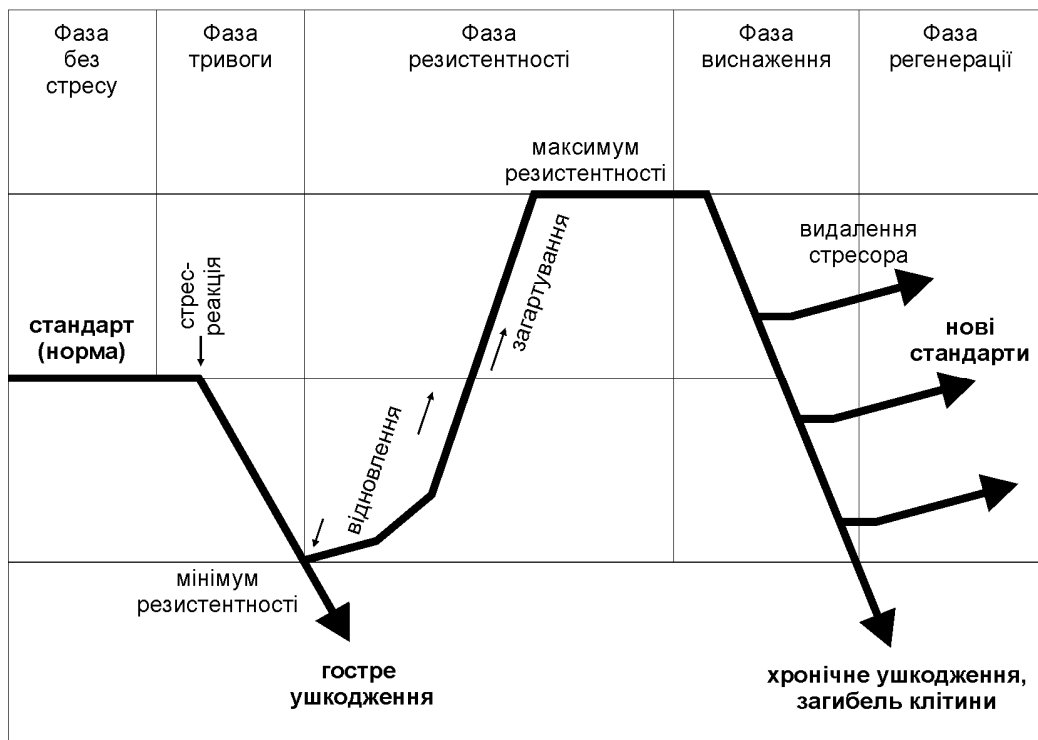


Рис. 1.2. Схема уніфікованої концепції стресу рослин: послідовність фаз, починаючи з достресового стану, що показують зміни рівня резистентності (за Lichtenthaler, 1998; Кордюм и др., 2003).

Важливими є наступні положення. Відповідь на дію стресового чинника містить як неспецифічні реакції (власне, стрес), так і реакції специфічної

адаптації (Кузнецов, 1992, 2001, 2002; Кузнецов, Шевякова, 1999; Кордюм и др., 2003). Водночас, процеси неспецифічної відповіді мають певні відмінності залежно від типу стресора та характеру його дії. Рівень стресової відповіді залежить від дози фактора. Під дозою розуміють добуток величини (інтенсивності) фактора і тривалості його дії.

Наголошується, що стрес є тимчасовим інструментом, призначеним лише для відновлення клітинного гомеостазу. Висловлюється гіпотеза, стосовно якої формування стрес-реакції в ході еволюції проходило по типу тимчасової відповіді зі швидким запуском, точним рівнем активації відповідно до ступеню дисфункції, спрямованим на забезпечення найбільш ефективного відновлення нормального функціонування клітин (Lamesch, Haynes, 2015). В той же час, пристосування організму до хронічного впливу несприятливого чинника або його поступового наближення до межі стійкості слід розглядати як адаптацію, а участь в цьому процесі систем загального захисту – як неспецифічну адаптацію.

Особлива увага приділяється механізмам сприйняття стресорних сигналів сенсорними системами клітини, природі цих систем, шляхам трансдукції сигналів і реалізації у відповідних реакціях (Колупаев, Карпец, 2010; Зорина и др., 2011).

Відзначається, що відповідь живих об'єктів на збільшення дози фактора, як правило, не є монотонною: кінетика відповіді описується нелінійною функцією (Веселовский и др., 1993; Руденко та ін., 2009). За умов, коли доза фактора не перевищує адаптивний потенціал організму, первинна стресова реакція виводить системи стійкості на підвищений рівень, необхідний для подолання ушкоджень. Певне підвищення стійкості зберігається деякий час після закінчення дії стресора, що є основою таких явищ, як індукована стійкість і перехресна стійкість. *Індукована* стійкість – це посилення стійкості клітин і організму до летальних доз фактора в результаті попередньої обробки його сублетальною дозою (Larkindale et al., 2005; Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013). *Перехресна* стійкість (крос-

толерантність) представляє посилення стійкості організму до одного чинника в результаті адаптації до іншого (Banti et al., 2008; Montero-Barrientos et al., 2010; Salgado et al., 2014). Явище посилення загальної стійкості організму в результаті попередніх обробок помірною дозою стресового чинника також визначають як *загартування* (Sørensen et al., 2003).

Виходячи з зазначеного, можна говорити, що клітинам і організмам притаманна *базова* або *конститутивна* стійкість, яка визначає їх здатність виживати за раптової зміни фактора середовища, та *індукована* стійкість, яка виникає в результаті попередньої обробки сублетальною дозою фактора і сприяє виживанню при дозах, які без цього були б летальними. Таке підвищення стійкості є тимчасовим (Larkindale et al., 2005; Карпец, Колупаев, 2009; Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013). Відмічається, що рівень конститутивної стійкості організму має суттєвий вплив на розвиток адаптивного процесу (Кузнецов, 1992, 2002). Чим вище рівень неспецифічних захисних клітинних механізмів, тим вище темпи комплексної адаптації до будь-яких змін умов довкілля (Leone et al., 2003).

На підставі досліджень тваринних систем запропоновано розглядати стрес як механізм модифікації видових онтогенетичних програм (Новиков, Мошкин, 2009).

1.2.2. Клітинні механізми відповіді рослин на окремі абіотичні чинники

Забезпечення водою і температурні умови відносяться до головних екологічних факторів, що впливають на активність практично всіх процесів в рослинах (фотосинтез, дихання, водний обмін, поділ і диференціювання клітин та ін.). Їх значні відхилення від норми в рамках діапазону стійкості викликають пригнічення стану організму і зниження продуктивності. Виходячи з цього, в дослідженні механізмів пластичності рослин ми використовували високу температуру, водний дефіцит і ґрунтове затоплення. Крім того, вивчали відповідь рослинних клітин на змінену гравітацію –

фактор, незвичний для рослин, оскільки їх еволюція, як і всіх земних організмів, проходила в умовах постійного гравітаційного поля 1 g. В даному підрозділі наведено окремі характеристики процесів, що відбуваються в рослинних клітинах у відповідь на дію цих чинників і є важливими для даної роботи. При цьому, особливу увагу приділяли порушенню клітинного протеостазу і відповідним системам захисту.

Відповідь на високу температуру. Специфіка впливу температури на рослинний організм обумовлена відсутністю для нього клітинних бар'єрів (Альтергот, 1981). Висока температура викликає енергетично-залежні порушення на молекулярному і клітинному рівнях (Tomanek, Zuzow, 2010). До основних первинних загроз відносять зміни текучості мембран і порушення протеостазу внаслідок денатурації білків (Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013). Швидко починається потужна генерація АФК (Volkov et al., 2006; Kolupaev et al., 2013), що також може спричинити порушення конформації білків.

Розглядають кілька можливих сенсорів температурних змін: сенсори денатурованих білків (unfolded protein sensors); зміни стану плазмалеми і локалізованих в ній сенсорів; кальцієві канали плазматичної мембрани, які регулюють вхід Ca^{2+} з апопласту до цитозолу; та гістонові сенсори у ядрі (Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013).

Відповідь на накопичення білків з порушеною структурою (unfolded protein response, UPR) відбувається в цитозолі та ендоплазматичному ретикулюмі (ER) (Lamech, Haynes, 2015). В цитозолі ця реакція відома як реакція теплового шоку і є основним шляхом відновлення протеостазу (описана нами у п. 2.3 і 2.6). Реакція ER потребує кальцієвого сигналу від плазматичної мембрани та може відбуватися без теплового шоку (Saidi et al., 2009). Інші сенсорні системи та відповідні регуляторні шляхи можуть забезпечувати тонке налаштування системи контролю якості білка, як це показано для гістонових сенсорів (Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013).

Комплексна реакція рослинних клітин на високу температуру містить репресію генів нормального метаболізму і активацію експресії в 2 рази і більше близько 5% генів (Larkindale, Vierling, 2008; Qin et al., 2008). У захисті білкового гомеостазу беруть участь шаперони/HSP, дегідрини і білки пізнього ембріогенезу (late embryogenesis abundant, LEA), які підтримують структуру білкового компоненту, а також убіквітини, які відповідають за деградацію відпрацьованих молекул (Mittler et al., 2012). Дегідрини завдяки їх унікальному амінокислотному складу здатні зв'язувати значну кількість води і асоціюватися з білками та ліпідами, запобігаючи їх пошкодженню та підтримуючи фізіологічну цілісність клітин (Hanin et al., 2011). LEA-білки характеризуються великою кількістю полярних залишків і, відповідно, високою гідрофільністю, завдяки чому задіяні в хелатуванні іонів, зв'язуванні води та підтриманні структури білків (Cuming, 1999; Umezawa et al., 2006). В антиоксидантному захисті основну роль відіграють тіоредоксин, глутатіон-S-трансфераза, дегідроаскорбат редуктаза, цитозольна Cu/Zn-супероксиддисмутаза та Mn-пероксидаза. В осмопротекції важлива роль належить ряду амінокислот, амін-вмісним метаболітам (β -аланін, γ -аміномасляна кислота, путресцин), розчинним цукрам (сахароза, рафіноза, мальтоза) і поліолам (галактинол, міо-інозитол). Накопичення цих сумісних осмолітів служить для підтримки тургору клітин, захисту від вільних радикалів, стабілізації мембран і білків, що дозволяє розглядати їх як «хімічні шаперони» (Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013).

Відмінність між базовою та індукованою теплостійкістю продемонстрована на пшениці, в якій генна експресія при потенційно летальній температурі з попередньої обробкою сублетальною температурою та без неї розрізнялась на 1314 транскриптів (Qin et al., 2008). Більшість білків, відповідних до цих транскриптів, відноситься до родин HSP, ферментів антиоксидантного захисту та метаболітів, які беруть участь у відновленні рН і редокс-потенціалу клітин, а також зниженні активності фотосинтезу і транспірації, що надає рослині здатність успішно переносити

потенційно летальну дозу протягом кількох годин (Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013). За оцінками, підвищена теплостійкість тримається кілька діб (Charng et al., 2007; Карпец, Колупаев, 2009). Найбільш ефективною для її індукції є температура, при якій відбувається максимальний синтез компонентів неспецифічного захисту.

Відповідь на водний дефіцит. Водний дефіцит спричиняє зменшення кількості вільної та зв'язаної води в клітинах, порушення гідратних оболонок білків, їх денатурацію і втрату ферментативної активності, порушення структури мембран (Arakawa et al., 1991; Billi, Potts, 2002; Bray, 2002; Белявская, 2003). В результаті дисбалансу між поглинанням світла та його утилізацією в хлоропластах листків (Foyer, Noctor, 2000) посилюється розсіювання надмірної кількості світлової енергії і генеруються АФК, які ушкоджують мембрани і макромолекули (Zhu, 2001; Жук, 2011).

Вважається, що детекція дефіциту води в ґрунті здійснюється коренями, а саме зоною розтягнення (Conlet et al., 1997). У результаті генеруються хімічний і гідравлічний сигнали, які транспортуються ксилемою та формують специфічні й неспецифічні реакції на всіх рівнях організації організму (Жук, 2011; Кудоярова и др., 2013). Хімічний сигнал складається зі змін рН, неорганічних іонів (у першу чергу, Ca^{2+}), органічних кислот, пептидів, низькомолекулярних сполук, NO, фітогормонів (у першу чергу, АБК). Гідравлічний сигнал формується у вигляді градієнта водного потенціалу в системі ґрунт–корінь–пагін–атмосфера і регулює надходження та використання води рослиною.

Перебудова анаболічних і катаболічних шляхів метаболізму і активація систем захисту за впливу посухи здійснюються через перепрограмування генної експресії, в якому беруть участь щонайменше чотири сигнальні шляхи: два залежні від АБК і два незалежні (Bray, 2002; Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Включається осмотичне регулювання за участю моно- і олігоцукрів, низькомолекулярних заряджених молекул та іонів. Для захисту від надмірної кількості АФК формується антиоксидантна система,

яка складається з ферментного компоненту (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, пероксидаза, каталаза, дигидроаскорбатредуктаза, глутотіонредуктаза), що утилізує окиснені сполуки, і неферментного компоненту (пігменти-ксантофіли), який розсіює надмірну кількість світлової енергії (Бараненко, 2003; Жук, 2011). У захисті молекулярних і клітинних структур беруть участь шаперони, убіквітин, інгібітори протеаз, дегідрини, LEA-білки, осмопротектори та ін. Сумісні осмоліти, зокрема, амінокислоти (перш за все, пролін), бетаїни, цукри, цукроспирти, поліюли, олігосахариди забезпечують протекторний, осморегуляторний і антиоксидантний ефекти. Їх висока концентрація в клітині змінює мікрооточення білкових молекул завдяки «переважному виключенню» цих речовин з поверхні білків, що дозволяє підтримувати останні у гідратованому термодинамічно вигідному стані, запобігаючи їх агрегації (Araoka et al., 1991). Накопичення цих молекул співпадає із значним посиленням посухостійкості клітин (Кузнецов, Шевякова, 1999; Белявская, 2003; Жук, 2011).

Відмічається суттєва різниця у відповіді рослин на гострий водний дефіцит і на поступове посилення посухи (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Бобровницький, 2012). Окремо розглядається адаптація до довготривалого водного дефіциту або постійне існування за таких умов (Кордюм и др., 2003). Адаптація рослин до хронічного водного дефіциту спрямована на підтримання водного балансу шляхом економного витрачання води, гальмування росту молодих листків, скидання частини листків для зменшення площі поверхні випаровування, збільшення співвідношення корінь/пагін, формування кореневої системи з гетерогенним за глибиною і розмірами корінням. Результати низки робіт свідчать про те, що в адаптації до хронічної нестачі води беруть участь неспецифічні системи стійкості. Наприклад, у суходільних рослин *Alisma plantago-aquatica*, які знаходились в умовах водного дефіциту, рівень АФК, перекісного окиснення ліпідів і антиоксидантного захисту виявився вищим, порівняно з рослинами того ж виду на мілководді (Бараненко, 2003).

Активация адаптивных реакций протязом розвитку посухи відбувається послідовно у строгій залежності від водного потенціалу клітин. Наприклад, у проростків *A. thaliana* на початку розвитку водного дефіциту відмічали активацію росту кореня і утворення розгалужених кореневих волосків, тоді як при зниженні вмісту води нижче певного рівня – падіння проліферативної активності кореневих меристем, гальмування росту головного кореня та припинення утворення кореневих волосків (Kranner et al., 2010; Бобровницький, 2012, 2016). Одночасно зі зниженням активності ростових процесів відбувалась індукція генів АБК-залежного шляху (Бобровницький, 2012).

Відповідь на ґрунтове затоплення. Головною причиною негативного впливу затоплення на рослину є те, що перезволоження ґрунту викликає різке зменшення кількості кисню, доступного кореневій системі (Jackson, Ricard, 2003; Jackson, 2006). Дефіцит кисню спричиняє порушення редокс-гомеостазу клітинних процесів, підвищує кислотність цитоплазми та концентрацію АФК, що може викликати ушкодження макромолекул. Зниження концентрації кисню нижче критичного рівня пригнічує дихання клітин. Розпад полісом і накопичення моносом свідчать про зміни трансляційної активності (Сцик-Миранда и др., 2003).

Вживання рослин при затопленні визначається їх здатністю до біохімічної та структурної адаптації до кореневої гіпоксії. Розглядають дві стратегії адаптації до анаеробіозу (Вартапетян, 2005). Істинну толерантність пов'язують з перебудовами енергетичного метаболізму. Стратегія «уникнення» (уявна толерантність) реалізується на рівні цілого організму завдяки транспортуванню кисню повітря до гіпоксичних органів.

Згідно метаболічної теорії стійкості до затоплення R. Crawford, метаболічна адаптація клітин до гіпоксії полягає в переключенні енергетичного метаболізму з окислювального фосфорилування на анаеробну ферментацію: молочнокисле і спиртове бродіння (McManmon, Crawford, 1971; Альмейда и др., 2003; Вартапетян, 2005). За концепцією рН-стату

критичне зниження концентрації кисню запускає молочнокисле бродіння, що призводить до підкислення цитоплазми і активації етанольного бродіння (Вартапетян, 2005). Спиртове бродіння починається з декарбоксілювання пірувату, кінцевого продукту гліколізу, до ацетальдегіду за допомогою ферменту піруватдекарбоксилази; далі алкогольдегідрогеназа (алкоголь:НАД-оксидоредуктаза, АДГ, К.Ф. 1.1.1.1) каталізує реакцію перетворення ацетальдегіду до етанолу. Відповідно до цього, стійкість до затоплення пов'язується з активними процесами анаеробної ферментації, що доведено з використанням нуль-мутантів *adh1* (Ellis et al., 1999; Dennis et al., 2000) і антисенс-конструкцій (Rahman et al., 2001). В коренях *A. thaliana* фермент виявлявся переважно в апексах (Porterfield et al., 1997). Індукція синтезу АДГ у відповідь на затоплення має певну динаміку. Так, експресія *ADH1* в кінчиках коренів *Coix lacryma-jobi* досягала максимуму через 4 год після занурення у воду, після чого поступово знижувалась до 12-ої год; максимальну активність ферменту визначали на 6-ту год (Daqing-chen et al., 2012). Індукція *ADH* у чутливого до дефіциту кисню *A. thaliana* відбувалась у перші 0,5 год аноксії та досягала максимуму через 4 год (Banti et al., 2008). Отже, АДГ є ключовим ферментом анаеробної ферментації і може використовуватись як її біомаркер.

Показано, що виживаність кореневих апексів за умов нестачі кисню обмежується кількома годинами або днями (Рикар, 2003), тому існування рослин протягом тривалого затоплення потребує транспортування кисню до клітин коренів. Це забезпечується завдяки видовженню органів стеблової системи та утворенню аеренхіми – системи міжклітинних порожнин у корі коренів, стеблі та листках, що забезпечує надходження кисню від листків до коренів та газообмін із зовнішнім повітрям. Наявність розвиненої аеренхіми є характерною рисою видів перезволожених і затоплених ґрунтів (Seago et al., 2005).

Показано, що відповідь рослин на нестачу кисню відбувається шляхом загального адаптаційного синдрому (Вартапетян, 2003). Однак, особливості

функціонування систем неспецифічної адаптації та їх взаємодія з процесами специфічної адаптації у зв'язку зі стійкістю до затоплення до кінця не з'ясовано. Слід також враховувати, що затоплення ґрунту створює гіпоксичні умови безпосередньо для кореневої системи, тоді як надводна частина дефіциту кисню не відчуває. Разом з тим, відомо, що стеблова система за таких умов також зазнає суттєвих метаболічних і структурних змін (Кордюм и др., 2003; Jackson, 2006; Mühlenbock et al., 2007; Недуха, 2011; Pires et al., 2018). Проте швидка відповідь надводної частини рослин залишається мало дослідженою.

Відповідь на змінену гравітацію. Еволюційний розвиток земних організмів проходить за постійної величини вектору гравітації. З початком космічних місій перед біологами постало питання впливу на життєдіяльність організмів гравітаційних навантажень і невагомості. В численних космічних експериментах доведено, що в таких умовах рослини здатні рости і розвиватися, проходити повний життєвий цикл і продукувати потомство за інших нормальних фізіологічних умов (Musgrave et al., 2000; Levinskikh et al., 2000; Korodyum, 2014). Водночас отримано численні дані про різномірні відхилення від норми, на підставі чого зроблено відкриття гравічутливості рослинних клітин – як спеціалізованих до рецепції гравітації (статоцити), так і неспеціалізованих (Korodyum, Guikema, 2001; Korodyum, 2014). Сприйняття гравітаційного стимулу статоцитами є первинною ланкою процесу нормальної орієнтації росту рослинного організму відносно вектора гравітації, тоді як гравічутливість забезпечує метаболічну і структурну стабільність неспеціалізованих до цього клітин.

Для моделювання ефектів гіпергравітації в наземних експериментах використовують центрифуги з великим радіусом; для часткової симуляції ефектів мікрогравітації – зонди, параболічні польоти, вільне падіння, 2D- і 3D-кліноостатування (Beysens et al., 2011). При кліноостатуванні рослина позбавлена можливості сприймати вплив гравітаційного стимулу і орієнтувати відповідно до нього свій ріст (гравітропізм) і формотворення

(гравіморфізм). В ефекті кліноостатування виділяють два ефекти - ефект «обертання» і ефект «положення», обумовлений просторовою орієнтацією об'єкта (Brown et al., 1976).

За результатами космічних і наземних експериментів визначено, що при відсутності стимулу гравітації розвиток організму відбувається відповідно до генетично детермінованої програми виду: диференціація клітин, органо- і гістогенез в основному проходять нормально (Kordyum, 2014). Зокрема, в корені формуються клітини кореневого чохла та ростових зон власне кореня, проте апарат гравірецепції за відсутності гравітаційного стимулу залишається функціонально ненавантаженим (Тарасенко, 1985; Volkman et al., 1986; Sievers, 2000; Perbal, 2009; Kordyum, 2014; Булавін, 2015). Це призводить до дезорієнтації росту і морфологічної варіабельності органів рослин. Наприклад, ріст кореня *Lepidium* в умовах космічного польоту відрізнявся від 1g-контролю варіабельністю напрямку (Antonsen, Johnsson, 1998). Як в польотних, так і в кліноостатних експериментах відмічається викривлення осі корінь-стебло, зниження апікального домінування кореня та посилене утворення латеральних і адвентивних коренів (Kordyum, 1997; Aarrouf et al., 1999; Millar et al., 2011). Доведено, що відсутність регуляторного сигналу гравітації може певною мірою корегуватися завдяки орієнтуючій ролі інших факторів, в першу чергу, світла (Molas, Kiss, 2009; Kiss, 2014).

Відносно неспеціалізованих до гравірецепції клітин знайдено, що в умовах космічного польоту та симульованої мікрогравітації їх поділ і диференціація відбуваються без суттєвих порушень, але з певними змінами структурної і функціональної організації, які залежать від тривалості експозиції, фази росту та стану рослин і особливостей дизайну експерименту (Кордюм та ін., 1994; Nedukha, 1996; Kordyum, 1997, 2003; Merkys, Darginaviciene, 1997; Таирбеков, 2002; Klymchuk et al., 2003; Popova, 2003; Kochubey et al., 2004; Stutte et al., 2006; Matia et al., 2005, 2010; Kordyum, 2014).

На порушення клітинного гомеостазу під впливом зміненої гравітації вказує наступне. До швидких реакцій на гіпергравітацію відносять збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , АФК, активацію окислювальних процесів (Барабой, Жадько, 1992; Medina et al., 2011). Зміни генної експресії за таких умов стосуються посилення катаболічних процесів і вторинного метаболізму (Martzivanou, Hampp, 2003). Центрифугування культури клітин *A. thaliana* при 8 g призводило до змін вмісту стресових білків, компонентів детоксикації АФК і сигналінгу (Barjaktović et al., 2007). Рання реакція на мікрогравітацію, як реальну, так і симульовану, також полягає в збільшенні цитозольної концентрації Ca^{2+} , H_2O_2 та супероксид-радикалів (Бараненко, 2003; Kordyum, 2003; Hausmann et al., 2014). Виявлено швидку реакцію аденілатциклазної системи, яка бере участь у формуванні стійкості рослин (Яворська, Драговоз, 2005).

Аналіз даних літератури щодо впливу мікрогравітації на генну експресію свідчить про залежність ефектів від тривалості дії фактора. Так, зміни генної експресії в культурі клітин *Arabidopsis* після 5 діб мікрогравітації під час космічного польоту були значно меншими, порівняно з короткими періодами мікрогравітації (хвилини і секунди) в експериментах із зондом та в параболічному польоті (Fengler et al., 2015). Після 26 діб космічного польоту в рослин ячменю виявлено суттєві зміни експресії 500 генів, включаючи гени HSP і антиоксидантних ферментів (Shagimardanova et al., 2010). В культурі клітин *A. thaliana* після гравітаційного навантаження під час зльоту і 12 діб росту в умовах польоту визначали активацію генів, що кодують компоненти систем неспецифічного захисту (Paul et al., 2012).

Результати вивчення змін протеому також показали певну динаміку. Зміни у фосфорилуванні білків визначали через 20 с гіпергравітації (1,8 g) і через 22 с мікрогравітації під час параболічного польоту, причому ці зміни були специфічними до чинників (Hausmann et al., 2014). Коротка (до 6 хв) дія мікрогравітації викликала зміни в білковому обміні, які стосувалися в основному пост-трансляційної модифікації білків (де/фосфорилування) та

ініціації сигнальних каскадів (Hampp et al., 1997). Після 30 хв симульованої мікрогравітації культури клітин *A. thaliana* спостерігали кількісні зміни білків – скавенджерів АФК, компонентів головних шляхів сигналіngu, трансляції, протеолізу, іонного гомеостазу (Varjaktović et al., 2009). Після 8 год кліностаування виявлено значні зміни у вмісті 18 білків, 7 з яких є компонентами стресової відповіді, 4 – ключові ферменти вуглеводного і ліпідного обміну та метаболізму клітинної стінки (Wang et al., 2006). В цілому, такі дані показують, що реакція протеому починається з пост-трансляційних модифікацій білків, запуску сигнальних шляхів, активації систем неспецифічного захисту, після чого зміни торкаються білків основного метаболізму.

Описані процеси – накопичення АФК, активація антиоксидантного захисту, зміни концентрації Ca^{2+} , зміни генної експресії, білкового синтезу, метаболічних процесів, синтез стресових білків – є індикаторами порушення клітинного гомеостазу і активації систем захисту. Shagimardanova et al. (2010) розглядають активацію експресії генів стресових білків як загальну стресову відповідь і мобілізацію організму, а не як специфічну відповідь на фактори космічного польоту. Paul et al. (2012) вважають, що особливості генної експресії рослинних клітин за умов космічного польоту скоріше відображають довготермінову адаптивну відповідь, ніж стресову реакцію. Разом з тим, в літературі можна знайти і кардинально протилежну точку зору. Наприклад, у *Triticum aestivum* після 21 доби росту в умовах космічного польоту відмінності в генній експресії порівняно з наземним контролем виявились незначними (Stutte et al., 2005, 2006). На підставі цього зроблено висновок, що мікрогравітація *per se* не є суттєвим стресором для рослин.

Загалом, результати вивчення динаміки структурно-функціональних змін і особливостей генної експресії вказують на те, що рослини здатні адаптуватися до відсутності гравітації (Kordyum, 2014). При цьому адаптація здійснюється за принципом саморегульованих систем у межах фізіологічної відповіді (Kordyum, 1997). Важливим є висновок про те, що відсутність

сприйняття гравітаційного стимулу впливає на базові клітинні функції, які прямо не залежать від гравірецепції і здебільшого відносяться до загальних систем стійкості (Medina, Harranz, 2010; Shagimardanova et al., 2010; Paul et al., 2012; Kordyum, 2014). Зміни в рості та розвитку рослин за впливу мікрогравітації пропонується розглядати як прояв фенотипічної пластичності, що дозволяє їм адаптуватися до незвичного середовища (Kordyum, 2014).

Отже, аналіз даних літератури показує, що результати вивчення ефектів зміненої гравітації у рослин часто є неоднозначними, зокрема, що стосується стресорності цих незвичних для рослин чинників і особливостей їх впливу на системи неспецифічної стійкості та пластичність розвитку.

РОЗДІЛ 2

МОЛЕКУЛЯРНІ ШАПЕРОНИ/ БІЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКУ (HSP) ЯК СИСТЕМА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ БІЛКА РОСЛИННИХ КЛІТИН

2.1. Клітинний протеостаз

Провідною ланкою реалізації генетичної інформації у фенотипі є білки. Контроль якості білка клітини (білковий гомеостаз, протеостаз) підтримується шляхом регуляції синтезу білка, його фолдингу, модифікацій та деградації. Система контролю якості білка є фундаментальною основою життєздатності клітини та її нормального функціонування (Saibil, 2013).

Фолдинг білка полягає у набутті функціональної або нативної конформації шляхом згортання поліпептидного ланцюга в унікальну тривимірну структуру. Згідно з концепцією спонтанної самоорганізації білка, спосіб, у який відбувається його згортання, визначається амінокислотою послідовністю (Anfinsen et al., 1961). За сучасною моделлю енергетичних поверхонь, перехід від розгорнутого до унікального нативного стану білка визначається залежністю вільної енергії макромолекули від усіх координат, що визначають стан системи – зокрема, температури, рН, концентрації солей та концентрації білків в клітині (Miernyk, 1999; Кузнецова и др., 2005; Jahn, Radford, 2005; Туроверов и др., 2009).

Ознакою нативності білка є здатність виконувати притаманну йому функцію (Туроверов и др., 2009). За ступенем структурованості нативні білки поділяють на *глобулярні* та *нативно неструктуровані*, що чітко пов'язано з особливостями їх функціонування і чутливості до змін факторів середовища. Глобулярні білки характеризуються компактною, строго детермінованою структурою, стійкою до змін факторів середовища. Визначальну роль в утворенні такої структури відіграють сильні гідрофобні взаємодії всередині молекули та S–S-зв'язки між певними амінокислотними залишками.

Нативно неструктуровані білки (natively unfolded, Uversky, 2002a, b; інші назви: внутрішньо неупорядковані, *intrinsically disordered proteins*, Dunker et al., 2005; нативні частково або повністю неупорядковані, Туроверов и др., 2009) розрізняються за ступенем впорядкованості та є метастабільними. Основою їх функціональної активності є конформаційна лабільність поліпептидного ланцюга, яка обумовлена низьким вмістом гідрофобних амінокислотних залишків і великим сумарним (некомпенсованим) зарядом і необхідна для виконання ними широкого спектру функцій: взаємодії з різними партнерами, передачі сигналів, контролю та регуляції внутрішньоклітинних процесів (Uversky et al., 2005). Взаємодія таких білків з партнерами (лігандами, іншими білками, нуклеїновими кислотами) призводить до зміни ступеня компактності їх молекул (Pazos et al., 2013).

До нативно неструктурованих білків відносяться вузлові регулятори, які займають центральну позицію в складних клітинних процесах і отримали назву «хаб» (hub - мережевий концентратор) (Dunker et al., 2005; Uversky et al., 2005). За оцінками, до нативно неструктурованих відноситься майже третина білків еукаріотів, в тому числі до 70% білків сигналінгу (Pazos et al., 2013). Оскільки нативно неструктуровані білки і особливо хаби відіграють ключову роль у регулюванні різних сигнальних процесів та їх координуванні, мінімальні порушення структури можуть призводити до суттєвих змін в їх функціонуванні та активності залежних від них шляхів (Uversky et al., 2005; Singh et al., 2007).

Вважається, що еволюція білків проходила таким чином, щоб вони мали відносно невеликий запас стійкості (Tartaglia et al., 2007). Незначні зміни фізико-хімічних параметрів клітини можуть дестабілізувати білкову структуру та викликати агрегацію білкових молекул. Важливо відмітити, що будь-який фактор середовища при значному відхиленні від оптимальних значень і наближенні до меж толерантності стає несприятливим для організму і порушує його гомеостаз. Головною ознакою порушення протеостазу вважається збільшення концентрації ненативних білків у клітині

(Ananthan et al., 1986; Zou et al., 1998; Åkerfelt et al., 2010; Scharf et al., 2012; Lamech, Haynes, 2015). Порушення функціональної конформації білків під впливом денатуруючих агентів або внаслідок змін амінокислотної послідовності призводить до виходу на поверхню молекул гідрофобних ділянок і утворення білкових агрегатів (Александров, 1985; Liberek et al., 2008; Tyedmers et al., 2010; Saibil, 2013). До денатуруючих агентів належать перш за все протеотоксичні чинники, такі як висока температура та іонізуюча радіація, які привносять надлишкову енергію в систему; важки метали, які призводять до порушення S–S-зв'язків та, відповідно, третинної структури; а також інші екологічні фактори, які можуть впливати на протеостаз прямо чи опосередковано (через зміни рН, збільшення концентрації АФК і NO, кількості відпрацьованих білків тощо).

Зміна температури веде до зміни кінетичної енергії атомів і атомних угруповань. Для розриву певних слабких зв'язків у молекулі білка достатньо флуктуацій температури у фізіологічних межах (Александров, 1985). Значна конформаційна рухливість нативно неструктурованих білків відбувається у діапазоні температур від 3 до 30-50°C. Зокрема, підвищення температури у фізіологічному діапазоні може викликати оборотне утворення вторинних структур, що, без сумніву, істотно впливатиме на взаємодію цих білків з партнерами. Ступінь їх структурованості значно змінюється у залежності від рН та концентрації іонів (Uversky, 2002).

Збільшення концентрації АФК може спричиняти окиснення макромолекул, зокрема білків (Kranner et al., 2010; Bokszczanin, Fragkostefanakis, 2013). Вважається, що білки є скавенжерами 50-75% реактивних радикалів (Davies et al., 1999). АФК можуть порушувати пептидні зв'язки, окиснювати карбонільні та сульфгідрильні групи і Fe–S кластери. Окиснена група P–SOH може відновлюватись, тоді як подальше її окиснення до сульфінової (P-SO₂H) та сульфонової (P-SO₃H) груп є незворотним (Kranner et al., 2010). NO, синтез якого також індукується за несприятливих умов, може викликати S-нітрозилювання SH-груп амінокислотних залишків.

Пероксинітрит ONOO^- , який утворюється в результаті взаємодії NO і синглетного кисню, може призводити до окиснення білків, нітрування тирозину, виштовхування Fe з Fe-S -білків (Kranner et al., 2010). Незворотні модифікації білкових залишків у результаті реакції з АФК і NO можуть спричиняти окисну конденсацію залишків Tyr з утворенням дитирозину, непродуктивних білок-білкових взаємодій, корбонілювання Lys і Arg , і в результаті, зміни четвертинної структури, втрати функцій та накопичення ушкоджених білків або їх деградації (Colville, Kranner, 2010).

Неструктуровані, неправильно структуровані та денатуровані білки схильні до агрегації, якщо їх концентрація перевищує певну межу (340 мг/мл в *Escherichia coli*) (Zimmerman, Trach, 1991). Агрегація білків, викликана зовнішніми чинниками або генетичними порушеннями, несе загрозу протеотоксичних ефектів і загибелі клітин і організму (Tyedmers et al., 2010).

Надзвичайно важливою властивістю білків є те, що їх денатурація і агрегація можуть бути оборотними. Оскільки первинна структура білка містить інформацію, достатню для відновлення структури вищих порядків, білкові молекули після денатурації можуть піддаватись рефолдингу. Молекули, що не підлягають відновленню, спрямовуються на протеоліз за убіквітин-протеосомним шляхом або за допомогою протеаз (Mathew, Morimoto, 1998; Tyedmers et al., 2010).

2.2. Шаперони / HSP як система контролю якості білка

Згідно з концепцією самоорганізації білків за участі асистентів, у згортанні білка *in vivo*, яке відбувається спонтанно на основі вільної енергії амінокислотних залишків, бере участь набір «асистентів» - шаперонів і ферментів, останні відповідають за цис-транс-ізомеризацію та утворення дисульфідних зв'язків (Ellis, 1987; Bader, Bardwell, 2002; Schmid, 2002). *Молекулярні шаперони* (далі «шаперони») - це білки, які нековалентно взаємодіють з іншими білками у неструктурованому стані, щоб допомогти їм

в коректному збиранні/розбиранні та запобігти непродуктивним взаємодіям і агрегації, і при цьому залишаються тимчасовим компонентом цих структур і до кінцевого продукту не входять (Ellis, 1987). За визначенням J. Rassow et al. (1997), шаперони тимчасово зв'язують і стабілізують нестабільні конформації інших білків і шляхом контрольованого зв'язування/вивільнення останніх сприяють правильному вибору їх подальшої долі – фолдингу, організації в олігомери, транспортуванню до відповідного субклітинного компартменту чи деградації. P. Csermely (1997) описує шаперони як «розумні білкові машини», які асистують іншим білкам і РНК у набуванні тривимірної функціональної структури.

Характерною особливістю молекул шаперонів вважається наявність в них нативно неструктурованих ділянок. Припускається, що такі ділянки потрібні для впізнавання та афінного зв'язування денатурованих структур інших білків та можуть бути елементами передачі ентропії під час фолдингу (Uversky et al., 2005).

Значну частину шаперонів складають білки теплового шоку (heat shock proteins, HSP) (Ellis et al., 1989; Becker, Craig, 1994), відкриті як продукти генів теплового шоку, експресія яких активується при підвищенні температури (Ritossa, 1962; Tissieres et al., 1974). Ці білки знайдені практично у всіх живих організмів, що свідчить про їх виникнення на ранніх стадіях еволюції – ще до розходження архей, бактерій і еукаріотів (Csermely, 1997). Водночас в рослин у зв'язку з прикріпленим способом життя і постійною необхідністю відповідати на зміни навколишнього середовища ця група білків набула особливого значення. За розміром, гомологією і шаперонними функціями виділяють п'ять основних родин HSP – sHSP, HSP60, HSP70, HSP90 і HSP100. Родини HSP в рослин відрізняються більшою численністю, порівняно з іншими організмами. Гени *HSP* мають ядерну локалізацію, тоді як окремі ізоформи функціонують в цитозолі/ядрі, пластидах, мітохондріях і ЕР. Шаперони HSP60, HSP70, HSP90 і HSP100 для виконання шаперонних функцій використовують енергію АТФ, тоді як функціонування sHSP від

АТФ не залежить. Члени цих родин характеризуються диференційною експресією. Гени, транскрипція яких відбувається на високому рівні за нормальних умов і помірно активується, або не активується при стресі, умовно називають конститутивними (часто – heat shock cognate genes, *HSC*). Гени, які, навпаки, за нормальних умов не експресуються, або експресуються на низькому рівні, проте значно активуються при стресі, називають індукцибельними. Індукцибельний компонент відіграє важливу роль у захисті протеостазу і виживання клітин за впливу несприятливих чинників (Vierling, 1991; Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000; Sørensen et al., 2003; Wang et al., 2004).

За нормальних умов система шаперонів здійснює котрансляційне підтримання і фолдинг новосинтезованих білків, прискорює перехід білка від проміжного до нативного стану, підтримує розгорнуті поліпептидні ланцюги під час транспортування між клітинними компартментами, збирання олігомерів і ремоделювання білкових комплексів, спрямовує до протеолізу, забезпечуючи протеостаз клітини (Hendrick, Hartl, 1993; Becker, Craig, 1994; Маргулис, Гужова, 2000; Frydman, 2001; Morimoto, 2002; Wang et al., 2004; Liberek et al., 2008). В цих процесах беруть участь конститутивні члени родин HSP70, HSP60 і HSP90 разом з їх ко-шаперонами. Так, система HSP70 невідбирково зв'язує невеликі гідрофобні ділянки поліпептидного ланцюга під час або після трансляції та в інших процесах. Вважається, що фолдинг невеликих білків може здійснюватись або шапероном HSP70, або відбуватись самостійно після вивільнення від нього, тоді як для мультидоменних білків потрібна допомога HSP60 і HSP90. Шаперони HSP60 асистують фолдингу білків, синтезованих *de novo*, та після їх транспортування до хлоропластів і мітохондрій, а також у рефолдингу денатурованих білків (Hill, Hemmingsen, 2001; Wang et al., 2004). Шаперони HSP90 специфічно зв'язують окремі метастабільні білки у близькому до нативного або нативному стані. За оцінками, приблизно 10–20% загальної кількості білків еукаріотів можуть набувати нативної конформації за допомогою HSP70, 10–15% білків

потребують участі HSP60 (описано для еубактерій, Liberek et al., 2008), і до 20% білків – участі HSP90 (описано для дріжжів, Zhao et al., 2005).

При денатурації білків за впливу несприятливих факторів шаперони зв'язують гідрофобні ділянки амінокислотних послідовностей на поверхні білкових молекул, підтримують ненативні білки, запобігаючи їх агрегації та вивільняючи із утворених агрегатів, і визначають подальшу долю денатурованих білків, піддаючи їх рефолдингу або спрямовуючи на деградацію до протеасом (Vierling, 1991; Mathew, Morimoto, 1998; Höhfeld et al., 2001; Wang et al., 2004; Taipale et al., 2010). За таких умов клітинний пул шаперонів, який складається з конститутивних HSP70, HSP90 і HSP60, підсилюється індукцйбельними членами цих родин, а також HSP100 і sHSP. Шаперони HSP70, HSP90 і sHSP зв'язують денатуровані білки. Зокрема, sHSP є потужним фактором запобігання незворотній агрегації та значно підвищують ефективність дезагрегації в подальшому (Liberek et al., 2008; Hilton et al., 2012; Waters, 2013). Солюбілізація агрегатів і рефолдинг білків здійснюється шаперонами HSP100 у складі бішаперонної системи HSP70-HSP100/ClpB (Lee et al., 2006; Singh, Grover, 2010). Якщо ушкоджений білок відновленню не підлягає, він спрямовується на деградацію: в цитозолі – за допомогою убіквітину і 26S-протеасом, в хлоропластах і мітохондріях – за допомогою HSP100/ClpC і протеази ClpP (Mathew, Morimoto, 1998; Liberek et al., 2008; Tyedmers et al., 2010; Saibil, 2013).

На підставі того, що шаперони HSP70 і HSP90 присутні в клітинах у значних кількостях як за нормальних, так і за несприятливих умов (тобто на всьому діапазоні стійкості організму), необхідні для життєздатності, нормального росту і розвитку рослин, функціонують у тісній кооперації між собою, а також відіграють власні специфічні ролі при стресі, ці родини обрано нами для дослідження.

2.2.1. Родина HSP70

Шаперони HSP70 є однією з найбільш консервативних білкових родин, представників якої знайдено практично у всіх організмів (Gupta, Golding, 1993; Boorstein et al., 1994). Найбільш вивченою є канонічна система HSP70 *Escherichia coli*, що складається з шаперона DnaK, ко-шаперона DnaJ і GrpE - фактора обміну нуклеотида (nucleotide exchange factor, NEF) (Rassow et al., 1997; Schumann, 2001). DnaK на ~ 50% ідентичний HSP70 еукаріотів (Wang et al., 2004). У багатьох організмів HSP70 вважається головною родиною шаперонів, яка містить конститутивні, конститутивні / індукційні та виключно індукційні члени (Sørensen et al., 2003).

Таблиця 2.1

Родина HSP70 *Arabidopsis thaliana*

Блок	Інші назви	Ген	Клітинна локалізація	Мол. м., кДа / PI
Підродина DnaK				
AtHSP70-1	HSC70-1	AT5G02500	Цитоплазма	71,36 / 5,03
AtHSP70-2	HSC70-2	AT5G02490	Цитоплазма	71,39 / 5,03
AtHSP70-3	HSC70-3	AT3G09440	Цитоплазма	71,15 / 4,97
AtHSP70-4	HSP70	AT3G12580	Цитоплазма	71,10 / 5,14
AtHSP70-5	HSP70b	AT1G16030	Цитоплазма	70,92 / 5,30
AtHSP70-6	cpHSP70-1	AT4G24280	Пластиди	76,51 / 5,07
AtHSP70-7	cpHSP70-2	AT5G49910	Пластиди	77,00 / 5,17
AtHSP70-8	HSP70t-2	AT2G32120	Пластиди	60,99 / 5,46
AtHSP70-9	mtHSC70-1	AT4G37910	Мітохондрії	73,08 / 5,51
AtHSP70-10	mtHSC70-2, HSC70-5	AT5G09590	Мітохондрії	72,99 / 5,63
AtHSP70-11	BiP-1, AtBP1	AT5G28540	ЕР	73,63 / 5,08
AtHSP70-12	BiP-2, AtBP2	AT5G42020	ЕР	73,56 / 5,11
AtHSP70-13	BiP-3	AT1G09080	ЕР	75,15 / 4,95
AtHSP70-18	HSP70t-1	AT1G56410	Цитоплазма	68,36 / 5,22
Підродина HSP110/SSE				
AtHSP70-14	HSP91	AT1G79930	Цитоплазма	91,75 / 5,15
AtHSP70-15		AT1G79920	Цитоплазма	91,68 / 5,09
AtHSP70-16		AT1G11660	Цитоплазма	85,22 / 5,50
AtHSP70-17		AT4G16660	ЕР	96,73 / 5,86

Примітка. Клітинна локалізація білка за (Lin et al., 2001); мол. м. і PI за «Plant Proteom Database» (<http://ppdb.tc.cornell.edu>).

У рослин родина HSP70 поділяється на 2 підродини – DnaK і HSP110/SSE та відрізняється від інших груп організмів множинністю членів. Наприклад, у *Spinacia* визначено щонайменше 12 членів HSP70 (Guo, Li,

1998), у *Physcomitrella patens* – 21 (Tang et al., 2016), у *Populus* – 34 (Yer et al., 2016), в *Oryza sativa* – 32 (24 DnaK і 8 HSP110) (Sarkar et al., 2013). Генوم *A. thaliana* містить 18 членів (14 DnaK і 4 HSP110, табл. 2.1) (Lin et al., 2001). До складу родини входять ізоформи з локалізацією в цитоплазмі/ядрі, хлоропластах, мітохондріях і ER, причому кожний компартмент містить декілька ізоформ. Серед цитозольних HSP70 *A. thaliana* наявні два індукцибельних члени – AtHSP70-4 і AtHSP70-5.

Важливою властивістю генів цитозольних HSP70 підродина DnaK є відсутність (в AtHSP70-5) або мала кількість інтронів (по 1 в AtHSP70-2, -3, -4 та 1 або 2 в AtHSP70-1). Один інтрон з двома варіантами сплайсингу міститься також в AtHSP70-8, який кодує білок хлоропластів. Гени інших членів родини містять від 4 до 9 інтронів (<https://apps.araport.org/thalemine>).

Функціональна структура HSP70. Молекула HSP70 має два функціональних домени – АТФазний домен в N-термінальній частині молекули та домен зв'язування субстрату в С-термінальній частині, між якими знаходиться чутлива до протеаз лінкерна ділянка (рис. 2.1) (Nollen, Morimoto, 2002; Kampinga, Craig, 2010; Saibil, 2013).

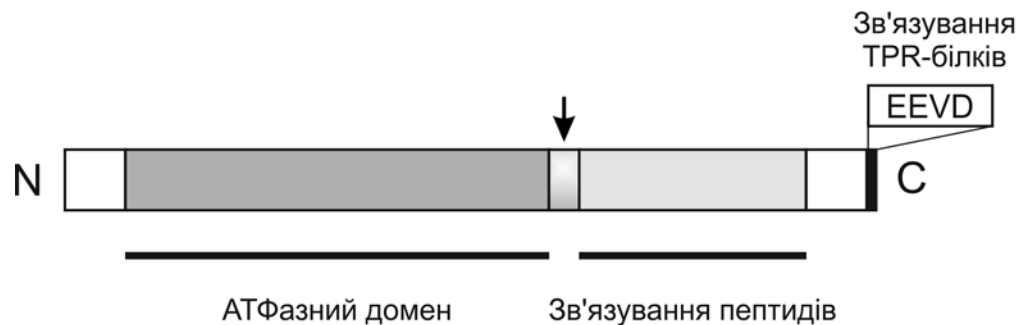


Рис. 2.1. Доменна організація HSP70: N-термінальній АТФазний домен; С-термінальній домен зв'язування пептидів; стрілкою вказано чутливу до протеаз ділянку, EEVD – сайт зв'язування ко-шаперонів TPR (за Lin et al., 2001; Nollen, Morimoto, 2002).

АТФазний домен складається з ~ 370 а.з. (45 кДа) і є найбільш консервативною частиною молекули, який в *A. thaliana* має до 95% гомології у цитозольних членів і більш ніж 64% - у більшості білків органел (Lin et al., 2001). Домен зв'язування субстрату, який складається з ~ 210 - 260 а.з. (25 кДа), є більш варіабельним за амінокислотним складом. У функціональному стані він містить щілину, яка закривається рухливою α -спіральною кришкою (Kampinga, Craig, 2010; Saibil, 2013) (рис. 2.2).

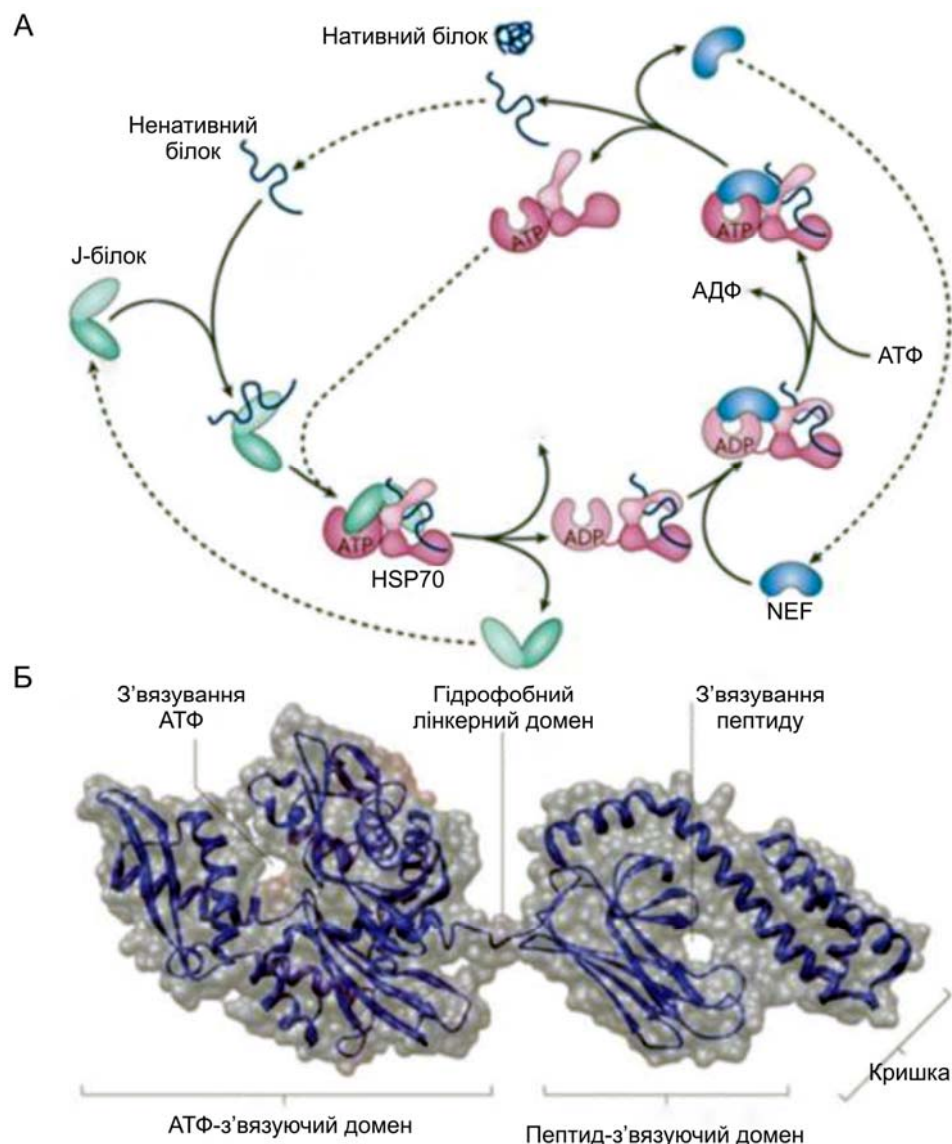


Рис. 2.2. (А) Канонічна модель функціонування HSP70 у фолдингу білка. J-білок – ко-шаперон (HSP40), NEF – фактор нуклеотидного обміну. (Б) Структура молекули HSP70 (за Kampinga, Craig, 2010).

Активність шаперона залежить від динамічної роботи цих двох доменів та їх взаємодії з ко-шаперонами, такими як HSP40 (J-білок, аналог DnaJ *E. coli*), і ко-факторами, такими як NEF, які служать регуляторами його АТФазної і шаперонної активності.

Асоціація і вивільнення поліпептидів шаперонами регулюється через взаємодію та гідроліз АТФ (Kampinga, Craig, 2010). АДФ-форма молекули HSP70 тримає пептид-зв'язуючий домен з відкритими щілиною та кришкою і характеризується високою афінністю до субстратів, тоді як АТФ-форма має закритий пептид-зв'язувальний домен, низьку спорідненість до субстратів і високу швидкість їх обміну. Вважається, що шаперон зв'язує короткі гідрофобні пептидні сегменти, подібні до тих, що містяться в новосинтезованих поліпептидних ланцюгах (Mayer, Bukau, 2005). Крім того, показано, що HSP70 також здатні функціонувати як цис-транс-ізомерази пептидних зв'язків (Schiene-Fischer et al., 2002).

Хоча члени підродин DnaK і HSP110/SSE структурно гомологічні між собою, останні менш динамічні. Припускається, що HSP110/SSE можуть служити нуклеотидним обмінником (NEF) для HSP70/DnaK і є важливими для правильного фолдингу білків цитозолу (Jungkunz et al., 2011; Saibil, 2013).

Функції HSP70. За нормальних умов конститутивні HSP70 в кооперації з ко-шаперонами беруть участь у процесах трансляції (Nelson et al., 1992), підтримують новосинтезовані білки, запобігають їх непродуктивній агрегації та сприяють правильному фолдингу, який може відбуватися спонтанно або за допомогою інших шаперонів (Sheffield et al., 1990; Nelson et al., 1992; Feldman, Frydman, 2000; Sung et al., 2001a; Kampinga, Craig, 2010). Крім того, вони супроводжують розгорнуті білкові ланцюги під час транспортування між клітинними компартментами (Sheffield et al., 1990; Brodsky, 1996; Matouschek et al., 2000; Feldman, Frydman, 2000; Jackson-Constan et al., 2001; Sung et al., 2001a) та між клітинами по плазмодесмах (Aoki et al., 2002). X. Zhang і E. Glaser (2002) запропонували модель взаємодії HSP70 з

попередниками білків мітохондрій і хлоропластів з використанням певних сигнальних послідовностей. За їх даними, 97,0% попередників білків мітохондрій і 82,5% попередників білків хлоропластів містять сигнальний пептид зв'язування з шапероном. Згідно з цією моделлю, цитозольні HSP70 за допомогою інших шаперонів (наприклад, білків 14-3-3) підтримують синтезований у цитозолі поліпептидний ланцюг у стані готовності до імпорту. Припускається, що HSP70 може служити «мотором» для проштовхування поліпептидного ланцюга через мембрану. Як тільки такий ланцюг потрапляє до матриксу або строми, HSP70 відповідно мітохондрій або хлоропластів його приймають і підтримують під час видалення сигнального пептиду пептидазою, після чого відбувається фолдинг (Zhang, Glaser, 2002). Ще однією важливою функцією HSP70 є участь у контролі деградації пошкоджених білків (Sung et al., 2001a; Mayer, Bukau, 2005; Lee et al., 2009).

Під час стресу функції HSP70 полягають, перш за все, у захисті структур ядра і запобіганні агрегації та рефолдингу денатурованих білків (Pelham, 1986; Glover, Lindquist, 1998; Goloubinoff et al., 1999; Sung et al., 2001a). Крім того, спільно з шаперонами HSP100 вони забезпечують солюбілізацію і відновлення структури агрегованих білків (Mayer, Bukau, 2005; Saibil, 2013). Молекулярні механізми захисту клітин шаперонами HSP70 активно вивчаються в різних системах, проте розкриті лише частково. Чітко доведено, що рівень експресії генів *HSP70* позитивно корелює з рівнем теплостійкості (Lee, Schöffl, 1996; Nollen et al., 1999). Надекспресія цитозольних членів призводить до підвищення стійкості клітин, зокрема, до високої та низької температури, високих концентрацій солей і посухи (Nollen et al., 1999; Sung, Guu, 2003; Takabe et al., 2008). Взаємодія шаперона з окремими ферментами посилює їх стабільність (Anwar et al., 2002).

Активацію генної експресії та накопичення HSP70 показано не тільки за дії високої температури (наприклад, Sung et al., 2001a; Majoul et al., 2004; Wong et al., 2005; Swindell et al., 2007; Гамбург и др., 2011; San et al., 2015;

Liu et al., 2018), але і низької температури (Guy, Li, 1998; Sung et al., 2001; Wong et al., 2005; Swindell et al., 2007; Liu et al., 2018), водного дефіциту (Guy, Li, 1998; Bray, 2002; Wong et al., 2005; ShuiFeng et al., 2012; Jia et al., 2015; Ye et al., 2015; Tang et al., 2016; Liu et al., 2018), глибокого зневоднення (Wang et al., 2009), затоплення і анаеробіозу (Banti et al., 2008; Chen et al., 2014; Ye et al., 2015), осмотичного тиску (Ireland et al., 2004; Swindell et al., 2007; Zou et al., 2009), високих концентрацій солей (Ireland et al., 2004; Swindell et al., 2007; Zou et al., 2009; Liu et al., 2018), високої інтенсивності світла (Nam et al., 2003), опромінення УФ-В (Swindell et al., 2007), поранення (Guy, Li, 1998; Swindell et al., 2007), дії важких металів (Neumann et al., 1994; Ireland et al., 2004) і патогенів (Swindell et al., 2007; Piterkova et al., 2010) тощо. Це свідчить про важливу роль цієї родини шаперонів у забезпеченні загального рівня стійкості та крос-толерантності організмів.

Разом з HSP90 цитозольні HSP70 негативно регулюють транскрипційні фактори HSF, які контролюють значну частину стресової реакції (Lee, Schöffl, 1996; Schöffl et al., 1998; Shi et al., 1998; Zou et al., 1998). Є дані, що HSP70 беруть участь у регуляції концентрації АФК в клітині (Li et al., 2018).

Захищеність білкового компонента клітинних компартментів залежить від кількості молекул HSP70 відповідної локалізації. Так, надекспресія ВіР, конститутивного гомолога HSP70 в ЕР, пом'якшувала ЕР-стрес у протопластах тютюну, викликаний обробкою інгібітором глікозилування білків тунаміцином (Leborgne-Castel et al., 1999) і посилювала стійкість до посухи (Alvim et al., 2001). Рівень експресії гена, що кодує HSP70В (AtHSP70-5) хлоропластів, перенесеного з *A. thaliana* до *Chlamydomonas reinhardtii*, позитивно корелював з інтенсивністю реактивації ФСII після фотоінгібування в останнього (Schroda et al., 1999).

Експресія кожного члена родини HSP70 диференційно регулюється не тільки в ході стрес-реакції, але й в онтогенезі, а також характеризується певною органоспецифічністю (Vierling, 1991; Lin et al., 2001; Sung et al., 2001; eFP browser: <http://bar.utoronto.ca>). Про це свідчить, наприклад, активна

експресія *AtHSP70-1* за нормальних умов у корені, стеблі та квітах *A. thaliana*, та її відсутність у стручках (Wu et al., 1994). Конститутивні *AtHSP70-14* і *AtHSP70-15* у значній кількості синтезуються в листках, на високому рівні – у продихах (Jungkunz et al., 2011). Значне накопичення індубельних HSP70 притаманне періоду формування і дозрівання насіння, що забезпечує стійкість клітин до висушування, тоді як їх швидкий гідроліз протягом проростання насіння супроводжується посиленням чутливості до несприятливих чинників (Vierling, 1991; Sung et al., 2001).

Розглядається питання, чи виконують окремі HSP70 одного субклітинного компартменту особливі функції, чи вони є надлишковими та забезпечують певний рівень надійності системи контролю якості білка. З одного боку, припускається, що стійкість рослинних клітин скоріше визначається загальним рівнем активності цитозольних HSP70, ніж певним якісним складом ізоформ. На це, зокрема, вказує той факт, що порушення експресії кількох *HSP70* за допомогою антисенс-конструкції значно знижувало термостійкість рослин (Lee, Schöffl, 1996), тоді як дефіцит за окремими цитозольними ізоформами очевидних змін у стресовій реакції не викликав (Noël et al., 2007; Lee et al., 2009).

З іншого боку, існують дані про важливість певного рівня окремих HSP70. Наприклад, порушення експресії *AtHSP70-1*, що кодує один з основних конститутивних білків цитозолу, спричиняло втрату життєздатності рослин *A. thaliana*, і разом з тим, його надекспресія також викликала зниження життєздатності (лінія *AtHSP70-1 OE*) (Sung, Guy, 2003).

У зв'язку з участю HSP70 у відповіді на дію стресових чинників різної природи ці шаперони можна розглядати як універсальний показник стану організмів. Подібне положення висловлювалося для тваринних об'єктів у роботах із токсикології та моніторингу забруднення середовища важкими металами, пестицидами та іншими шкідливими сполуками (Sanders, 1993; Werner, Hinton, 1999; Mukhopadhyay et al., 2003; Тимофеев и др., 2008). Також HSP70 розглядався як біомаркер стресу водних рослин *Fucus serratus* і

Letna minor за дії температурного, сольового, осмотичного чинників і важких металів (Ireland et al., 2004). На зелених водоростях показано, що білок хлоропластів HSP70В може бути раннім маркером окисного стресу (Юрина, 2010). Проте методичних підходів до широкого використання HSP70 як індикатора стану рослин не розроблено.

2.2.2. Родина HSP90

HSP90 – високо консервативна родина, представників якої знайдено як в прокариотів, так і еукаріотів. У багатоклітинних організмів за нормальних умов вміст HSP90 становить до 1-2% розчинних білків клітини (Lai et al., 1984; Nollen, Morimoto, 2002). На підставі цього HSP90 відносять до білків основного метаболізму (“housekeeping functions”). Разом з тим, синтез HSP90 в деякій мірі збільшується за впливу несприятливих факторів. Активація експресії генів *HSP90* відмічалась за дії високої (Majoul et al., 2004; Swindell et al., 2007) і низької (Bae et al., 2003) температури, водного дефіциту (Bray, 2002; Taylor et al., 2005; ShuiFeng et al., 2012; Ambrosone et al., 2013), високої інтенсивності світла (Nam et al., 2003), УФ-В (Swindell et al., 2007), дефіциту K^+ (Kang et al., 2004), під впливом патогенів (Swindell et al., 2007) тощо.

Родина HSP90 має ізоформи в цитоплазмі/ядрі, пластидах, мітохондріях і ЕР. Так, в геномі *A. thaliana* знайдено 7 членів: 4 з них локалізовані в цитозолі/ядрі, по одному – в пластидах, мітохондріях і ЕР (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Родина HSP90 *Arabidopsis thaliana*

Білок	Попередні назви	Ген	Клітинна локалізація*	Мол. м., кДа / PI
AtHSP90-1	HSP81.1	AT5G52640	Цитоплазма	81,2 / 4,95
AtHSP90-2	HSP81.2	AT5G56030	Цитоплазма	80,07 / 4,95
AtHSP90-3	HSP81.3	AT5G56010	Цитоплазма	80,05 / 4,95
AtHSP90-4	HSP81.4	AT5G56000	Цитоплазма	80,14 / 4,96
AtHSP90-5	HSP88.1	AT2G04030	Пластиди	88,66 / 4,93
AtHSP90-6	HSP89.1	AT3G07770	Мітохондрії	90,57 / 5,26
AtHSP90-7	SHEPHERD (SHD)	AT4G24190	ЕР	94,21 / 4,94

Примітка. Клітинна локалізація білка за (Krishna, Gloor, 2001); мол. м. і PI за «Plant Proteome Database» (<http://ppdb.tc.cornell.edu>).

Цитозольні AtHSP90-2, AtHSP90-3 і AtHSP90-4 високо гомологічні (96-97%), їх синтез підтримується в клітинах на високому рівні за нормальних умов і може посилюватися при стресі. Ступінь їх гомології з AtHSP90-1, який є індукцибельним, становить 85-88% (Krishna, Gloor, 2001). У порівнянні з дріжджами і тваринами, які, як правило, мають по 1-2 цитозольних HSP90, наявність більшого числа цитозольних ізоформ в *A. thaliana* вказує на їх важливість для рослинних клітин.

Ступінь гомології HSP90 одного клітинного компартменту у різних видів, як правило, істотно вище, ніж у білків одного виду з різною внутрішньоклітинною локалізацією. Ступінь ідентичності цитозольних HSP90 у видів рослин лежить в інтервалі 85-93%; пластидні гомологи жита і *A. thaliana* ідентичні між собою на 76%, мітохондріальні – на 64% (Krishna, Gloor, 2001). Нижчим є рівень гомології в HSP90 ER різних видів організмів (~ 50%) (Gupta, 1995). В *A. thaliana* гени цитозольних HSP90 містять по 2-3 інтрони, гени пластидного і мітохондріального білків – 18-19 (Milioni, Natzopoulos, 1997).

Цитозольні HSP90 є суттєвими для життєздатності та стійкості еукаріотів, тоді як ізоформи органел швидше за все виконують спеціалізовані функції. Про останнє, зокрема, свідчить той факт, що у *Saccharomyces cerevisiae* і одноклітинних еукаріотів HSP90 органел не виявлено (Lee, 2001; Picard, 2002).

Функціональна структура HSP90. Білки родини HSP90 мають мол. м. 80-90 кДа і загальний структурний план: високо консервативні N-термінальний (~200 а.з., ~25 кДа) і C-термінальний (~100 а.з., ~12 кДа) домени, між якими – короткий заряджений і середній домени (~35 кДа) (Buchner, 1999; Pearl, Prodromou, 2000; Krishna, Gloor, 2001; Picard, 2002) (рис. 2.3). Характерною рисою цитозольних HSP90 еукаріотів є пентапептид MEEVD на C-кінці для зв'язування TPR-залежних ко-шаперонів.

Цитозольні HSP90 функціонують у формі димеру. Субодиниці в димері протилежно спрямовані, їх первинна димеризація відбувається шляхом

взаємодії С-термінального домену кожної з субодиниць з середнім доменом іншої, за рахунок чого утворюється молекулярний «затискач» (Nemoto et al., 1995) (рис. 2.4).



Рис. 2.3. Доменна організація HSP90: N – N-термінальний домен, M – середній домен, C – C-термінальний домен, МЕЕVD – сайт зв'язування кошаперонів TPR (за Picard, 2002).

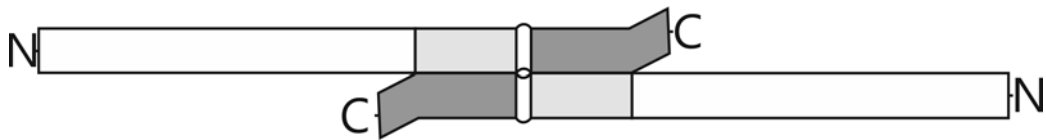


Рис. 2.4. Структура гомодимеру HSP90: дві ділянки С-термінальної половини (світло- і темно-сірого кольору) взаємодіють одна з одною; короткий сегмент між ними утворює рухливий шарнір (за Nemoto et al., 1995).

Вирішальну роль у функціонуванні HSP90 відіграє АТФазний цикл. Зв'язування та гідроліз АТФ керують відкриванням і закриванням молекулярного «затискача» (Prodromou et al., 2000; Richter et al., 2001). Сайт зв'язування АТФ/АДФ міститься в N-термінальному домені. На відміну від інших АТФ-залежних шаперонів і кіназ, HSP90 зв'язує АТФ аденозином вниз до дна, а γ -фосфатом – до поверхні глибокої "кишені", утвореної N-термінальним доменом (Pearl, Prodromou, 2000). Зв'язування АТФ ініціює контакт між АТФ-зв'язуючими сайтами двох субодиниць димеру (Dutta, Inouye, 2000). В результаті формується тимчасовий вторинний N-

термінальний димер, що призводить до його скручування і компактизації. З сайтом зв'язування АТФ/АДФ взаємодіють антибіотики гелданаміцин, радицикол і новобіоцин, блокуючи АТФазний цикл, що дозволяє використовувати їх як специфічні інгібітори HSP90 (Prodromou et al., 1997; Obermann et al., 1998). Середній домен необхідний для гідролізу АТФ (Pearl, Prodromou, 2006). Заряджений домен надає шаперону високу афінність до ненативних білків (Scheibel et al., 1999) і потрібний для рефолдингу (Johnson et al., 2000).

За даними літератури, щонайменше два домени молекули HSP90 мають шаперонну активність: як N-, так і C-домени здатні запобігати агрегації білків і підтримувати певні субстрати в стані готовності до фолдингу (Young et al., 1997; Scheibel et al., 1999; Minami et al., 2001). Проте на тваринах і дріжджових клітинах показано, що цитозольні HSP90 функціонують у кооперації з іншими шаперонами, ко-шаперонами і регуляторними факторами (Buchner, 1999; Pearl, Prodromou, 2000; Young et al., 2001; Picard, 2002). Система HSP90 характеризується наявністю великого набору ко-шаперонів, які регулюють його АТФазну і шаперонну активність, впливають на взаємодію з іншими (ко-)шаперонами, асистують у виборі та утриманні субстратів і визначають особливості функціонування. Наприклад, через ко-шаперони FKBP, які містять сайти зв'язування кальцій-зв'язувального білка кальмодуліну, на активність шаперона може впливати Ca^{2+} (Saidi et al., 2011; Рихванов и др., 2014). У рослин ідентифіковано гомологи ко-шаперонів Нор, імунофілінів і p23 (Reddy et al., 1998; Krishna, Gloor, 2001; Dwivedi et al., 2003). Активність шаперона також регулюється посттрансляційними модифікаціями – фосфорилуванням, ацетилюванням і S-нітрозилуванням (Picard, 2002; Martínez-Ruiz et al., 2005; Wandinger et al., 2008).

Шаперонні функції HSP90. У фолдинзі новосинтезованих білків у еукаріотів цитозольні HSP90 кооперуються з HSP70, приймаючи від нього білок на останніх стадіях дозрівання або вже у нативній конформації та сприяють набуттю цим білком активного стану (Karagöz, Rüdiger, 2015).

Разом з тим, у еукаріотів фолдинг не є головною функцією даної родини за нормальних умов. Здатність HSP90 утворювати асоціати з певним набором білків призвела до розуміння субстратної специфічності цих шаперонів, що більш детально описано далі.

Крім того, в експериментах *in vitro* показана спроможність HSP90 самотійно запобігати агрегації білків з незрілою або порушеною структурою (Wiech et al., 1992). Це привело до уявлення, що порушення протеостазу може перемикати HSP90 на зв'язування денатурованих білків (Ali et al., 1998; Zou et al., 1998; Nollen, Morimoto, 2002; Rutherford et al., 2007). Далі шаперон може спрямовувати ці білки на рефолдинг або деградацію (Mathew, Morimoto, 1998; Höhfeld et al., 2001). З іншого боку, така зміна вектору активності HSP90 послаблює його контроль над специфічними субстратами.

Механізми дії шаперонного комплексу HSP90. Запропоновано динамічні моделі функціонування шаперонної системи HSP90 у конформаційній регуляції білків-субстратів (Smith, 1993; Pratt, Toft, 1997; Маргуліс, Гужова, 2000; Pratt et al, 2001; Young et al., 2001; Grad, Picard, 2007; Pratt et al., 2008). Найбільш вивчений механізм його функціонування зі стероїдним рецептором як субстратом, представлено на схемі (рис. 2.5), складеної нами на основі вивчення даних літератури, докладне пояснення до якої можна знайти в роботі (Козеко, 2010).

Подібний шлях регуляції зв'язування білка з лігандом можна припустити і для інших ліганд-залежних субстратів HSP90. Однак є безліч доказів того, що функціонування комплексу HSP90 є різноманітним і не вкладається в одну модель. Його роль може полягати в стабілізації неактивної конформації білка, виведенні білка з неактивного стану та переведенні в стан готовності до фосфорилування, або у підтримці в активному фосфорильованому стані тощо (Sato et al., 2000; Nollen, Morimoto, 2002; Picard, 2002).

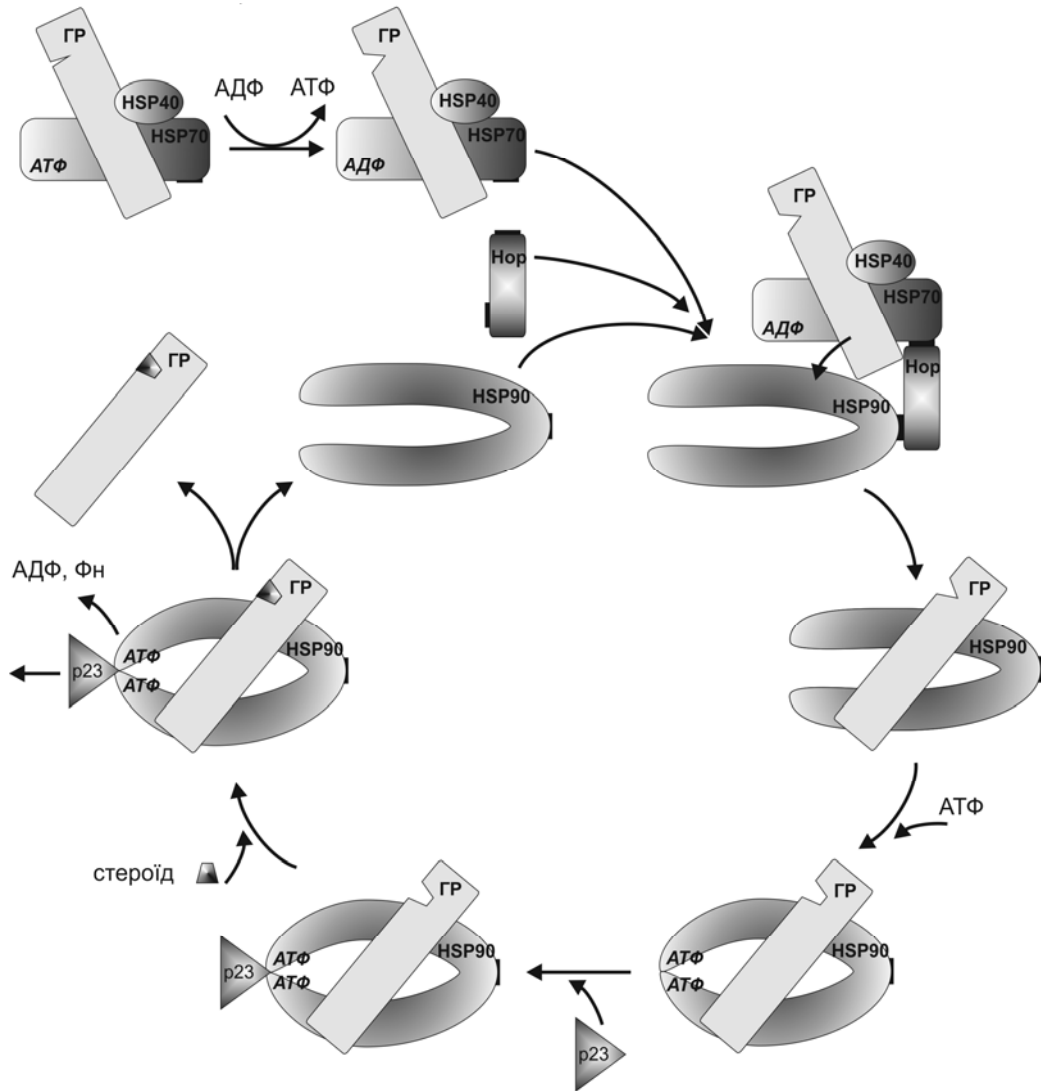


Рис. 2.5. Конформаційна регуляція глюкокортикоїдного рецептора (ГР) гетерокомплексом HSP90. ГР у складі початкового комплексу з HSP40 і HSP70 набуває конформації з низькою афінністю до гормону; комплекс ГР-HSP70 зв'язується з HSP90 за допомогою ко-шаперону Hop, і ГР переноситься на HSP90; після вивільнення HSP70 і Hop взаємодія HSP90 з АТФ призводить до його N-димеризації, що сприяє набуттю ГР конформації з високою афінністю до гормону; HSP90 в АТФ-зв'язаному стані стабілізується ко-шапероном p23; після взаємодії з гормоном комплекс ГР-HSP90 транспортується до ядра за допомогою ко-шаперона імунофіліну; гідроліз АТФ призводить до дисоціації N-димеру і повернення HSP90 у початковий стан (Козеко, 2010).

Субстрати HSP90 і залежні від них процеси. До субстратів HSP90 відносять білки, дозрівання, стабілізація і конформаційна регуляція яких потребують участі шаперона. Масштабний аналіз протеому і геному дріжджів показав, що до 20% білків можуть прямо або опосередковано залежати в своєму функціонуванні від HSP90 (Zhao et al., 2005; Jarosz, Lindquist, 2010; Taipale et al., 2010; Prodromou, 2017). У найбільш вивчених дріжджових і тваринних систем значну частину субстратів HSP90 складають білки з різними шляхами трансдукції сигналів, регуляції клітинного циклу, генної експресії та ін., у тому числі певні рецептори, транскрипційні фактори, протеїнкінази, протеїнфосфатази, гістони, G-білки, NO-синтаза, цитохром P450, епігенетичні фактори (Picard, 2002; Zhao et al., 2005; Taipale et al., 2010). Особливе місце в цьому ряду займають транскрипційні фактори теплового шоку, що обговорюється в п. 2.6.

Від HSP90 також залежить стабілізація компонентів, збірка і функціонування ряду складних білкових комплексів, в тому числі 26S-протеасоми (Imai et al., 2003), актин-організуючого білка N-WASP (Park et al., 2005), теломерази (Holt et al., 1999), кінетохора, мякРНК (snoRNA), комплексу RISC (RNA-induced silencing complex) (Makhnevych, Houry, 2012), субодиниці рибосом 40S (Kim et al., 2006), а також комплексу NELF (negative elongation factor complex), який відповідає за підтримання транскрипційної паузи РНК-полімерази II (Sawarkar et al., 2012).

Субстрати HSP90 відносяться до нативно неструктурованих білків – високомолекулярних мультидоменних білків, характерною особливістю яких є наявність конформаційно динамічних ділянок. Як згадувалось вище, структурна лабільність таких білків необхідна для виконання ними широкого спектру функцій, взаємодії з різними партнерами, передачі сигналів, регуляції внутрішньоклітинних процесів (Uversky et al., 2005). Як правило, такі білки є короткоживучими (Nollen, Morimoto, 2002). Асоціація з HSP90 призводить до їх стабілізації, захисту від деградації та набуття компетентності до сприйняття сигналу шляхом зв'язування ліганду (стероїдні

гормони, АТФ, цикліни, геми, Ca^{2+} -кальмодулін тощо) та/або взаємодії з іншими білками-партнерами (Picard, 2002; Taipale et al., 2010).

Сприяючи дозріванню та здійснюючи конформаційну регуляцію білків-клієнтів, HSP90 бере участь у регуляції безлічі процесів, таких як трансдукція сигналів, ремоделювання хроматину, транскрипція, трансляція, внутрішньоклітинний транспорт, поділ клітин, метаморфоз, стресова реакція, репарація пошкоджених молекул, протеоліз, старіння, імунна відповідь тощо (Picard, 2002; Rutherford et al., 2007; Taipale et al., 2010; Prodromou, 2017). В результаті, шаперон стає «регулювальником на перехресті» шляхів різних процесів росту і розвитку організму, або, як його ще називають, «хабом хабів» (Zabinsky et al., 2018).

Список білків-клієнтів HSP90 у рослин на даний момент значно коротший, очевидно, внаслідок менших зусиль рослинних біологів в цьому напрямку. Проте, він вже містить цілий ряд метастабільних білків, що відіграють важливу роль в життєдіяльності рослинної клітини і організму. Їх перелік, складений нами на основі даних літератури та електронної бази BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) наведено в додатку А. Аналіз таблиці показує, що білки-клієнти шаперонів HSP90 у рослин задіяні в регуляції стресової реакції, переході меристематичних клітин до диференціювання, процесингу мРНК, епігенетичних механізмах, внутрішньоклітинному транспорті, модуляції активності білків і ферментів, протеасомного шляху деградації білків клітинного циклу і циркадних ритмів, біогенезу мембран, метаболізму полісахаридів і жирних кислот, гормональної регуляції, сприйняття та передачі сигналу патогенів. Порушення роботи більшості білків-клієнтів призводить до значних фенотипічних змін (див. додаток А). Отже, стає очевидним, що зниження функціональної активності HSP90 повинно призводити до порушення значного числа регуляторних шляхів і відповідних процесів росту, розвитку і резистентності. Розглянемо декілька прикладів.

Шаперон AtHSP90-7 (GRP94, SHD), локалізований в ЕР, є необхідним для функціонування рецепторного комплексу з кіназною активністю CLV1/CLV2/CLV3, де CLV1/CLV2 – трансмембранні білки з позаклітинними доменами, CLV3 – секретований ліганд (Ishiguro et al., 2002). Беручи участь в міжклітинних комунікаціях, комплекс відіграє важливу роль у визначенні ідентичності меристематичних клітин апекса стебла і визначенні часу цвітіння (Miwa et al., 2009; You et al., 2017). Мутації за відповідними генами призводять до морфологічних дефектів стебла і кореня, розростання флоральної меристеми і множинних порушень будови квіток (зокрема, зміна кількості органів окремих частин квітки). Подібні порушення спостерігали також при мутації за геном шаперона *shd* (Ishiguro et al., 2002). На гомеостаз стеблової меристеми можуть також впливати цитозольні HSP90 (з кошапероном SQN) через взаємодію з ARGONAUTE1 (AGO1) (Smith et al., 2009; Sun, Ito, 2015). Контролюючи активність AGO1, HSP90-SQN бере участь в епігенетичній регуляції морфогенезу (Earley, Poethig, 2011). Ще одним прикладом епігенетичного механізму, залежного від HSP90, є комплекс RISC (Smith et al., 2009; Iki et al., 2010).

Отримано докази участі HSP90 в трансдукції гормональних сигналів брасиностероїдів (БР), ауксину і жасмонової кислоти. Так, від шаперона залежить внутрішньоклітинна локалізація і активність кінази BIN2 і транскрипційного фактора BES1 – ключових компонентів регуляторного шляху БР (Yin et al., 2002; Lachowiec et al., 2012; Samakovli et al., 2014; Shigeta et al., 2014). Порушення БР-регуляції призводить до суттєвих фенотипічних змін – карликовості рослин, зміни форми, розмірів і кольору листків, зміни реакції на червоне світло і темряву (Yin et al., 2002; Clouse, 2011). Показово, що зміни фенотипу, подібні до змін у мутантів *bin2* і *bes1*, зустрічалися у рослин, дефіцитних за окремими цитозольними HSP90 (Samakovli et al., 2007, 2014; Sangster et al., 2007) та при інгібуванні шаперона за допомогою антибіотиків (Queitsch et al., 2002).

Нещодавно отримані результати досліджень залежних від ауксину процесів показали, що HSP90-SGT1 стабілізує ко-рецептор ауксину TIR1 (Wang et al., 2016; Watanabe et al., 2016, 2017). Рецепторний комплекс TIR1/AFB2 після зв'язування гормону запускає руйнування репресорів транскрипції ауксин-залежних генів Aux/IAA. Інгібування шаперона запобігає ядерній локалізації TIR1, призводить до його деградації і порушення ростової відповіді. Подібний механізм за участю шаперонного комплексу HSP70-HSP90-SGT1b передбачається і для рецептора жасмонової кислоти COI1 (Zhang et al., 2015).

Від HSP90 залежать збірка і активність деяких компонентів убіквітин-протеасомного шляху протеолізу (Imai et al., 2003; Kim et al., 2011, 2014). Відомо, що убіквітин залучений до багатьох процесів метаболізму, трансляції, внутрішньоклітинного транспорту, передачі сигналів, стресової та імунної відповідей. Наприклад, мутації по генах убіквітин-протеасомного механізму в *A. thaliana* блокують розвиток, циркадні ритми, фотоморфогенез, флоральний гомеозис, гормональні реакції та старіння (Craig et al, 2009).

До субстратів HSP90 відносяться і білки 14-3-3, які вважаються новим типом шаперонів і також задіяні у моделюванні різних сигнальних шляхів (Wang et al., 2004). Взаємодія з такими білками може значно розширювати спектр процесів, залежних від HSP90.

2.3. HSP у відповіді рослинних клітин на зовнішні чинники

Температура. Білки теплового шоку HSP відкриті, як згадувалось вище, в результаті вивчення відповіді тваринних клітин на високу температуру (реакція теплового шоку) (Ritossa, 1962; Tissieres et al., 1974). З тих пір реакція клітин різних організмів, включаючи рослини, на високу температуру стала основною моделлю у вивченні закономірностей функціонування системи шаперонів/HSP. Розширення таких досліджень на весь діапазон температур у межах витривалості організму виявило закономірності

функціонування шаперонів як у зоні нормальних (близьких до оптимуму) температур, так і за значних відхилень в обидва боки температурного діапазону, що викликає стрес і потребує адаптації. Ці дослідження розширили уявлення щодо прямого впливу температури на функціональний стан білків, а також довели фундаментальну роль системи шаперонів у забезпеченні білкового гомеостазу.

Як відмічалось вище, відповідь клітин на високі температури, які спричиняють денатурацію білків, одночасно включає репресію багатьох генів нормального метаболізму, не суттєвих для виживання клітини, і активацію генної програми стресової відповіді, важливу частину якої складають HSP (Lindquist, 1986; Vierling, 1991; Schöffl et al., 1998; Lamech, Haynes, 2015). Запуск цієї реакції відбувається при збільшенні концентрації денатурованих і неправильно структурованих білків у цитозолі та ядрі вище певного порогу (Ananthan et al., 1986; Zou et al., 1998; Åkerfelt et al., 2010; Scharf et al., 2012; Lamech, Haynes, 2015). Відмічається, що поріг індукції цих генів у різних видів є різним. Так, у термофільних видів тварин цей рівень вище порівняно з видами, адаптованими до помірних температур (Evgen'ev et al., 2007).

Важливими рисами стресової реакції є швидка активація до рівня, який точно відповідає ступеню ушкоджень, її тимчасовий характер та здатність до авторегуляції, зокрема, при завершенні (Lamech, Haynes, 2015). Важливою передумовою швидкої активації генів цитозольних HSP під час стресу є мала кількість або відсутність інтронів. Така особливість структури цих генів забезпечує мінімальний контроль їх експресії механізмом сплайсингу, який є одним з найбільш тривалих етапів експресії генів, а система сплайсингу – однією з найуразливіших білкових систем (Yost et al., 1990).

Стресова індукція різних *HSP* регулюється диференційно (DeRocher, Vierling, 1995; Sung et al., 2001). Ступінь індукції цих генів визначається, з одного боку, рівнем їх конститутивного синтезу, з іншого, темпами активації при стресі. Тимчасовий характер реакції теплового шоку полягає в тому, що навіть якщо клітини залишаються при високій температурі тривалий час,

активація синтезу HSP змінюється на його послаблення до рівня, трохи вищого за початковий (Schumann, 2001). Запропоновано концепцію, відповідно до якої стресові гени, зокрема HSP, експресуються лише на початку стрес-реакції (стадія аклімації) (Senthil-Kumar et al., 2007).

Синтез додаткової кількості HSP в результаті реакції теплового шоку забезпечує виживання клітин за потенційно летальних температур, в той час як за межами температурного діапазону їх синтез не відбувається. Температура, при якій експресія індукцибельних HSP максимальна, є найбільш ефективною для індукції теплостійкості. Так, для *A. thaliana* такою температурою є 37°C (Клюева, Самохвалов, 1990). Експозиція рослин цього виду при 37°C викликала активний синтез HSP70, HSP101 і HSP17.6 і посилювала виживаність клітин при 50°C. Проте, підвищення температури до 39°C пригнічувало синтез цих білків та індукцію теплостійкості (Рихванов и др., 2014). Разом з тим слід відмітити, що хоча теплостійкість є ознакою кількісною (тобто контролюється локусами кількісних ознак, QTLs) (Ottaviano et al., 1991), порушення експресії навіть одного гена *HSP* може призвести до суттєвих змін її рівня. Так, нокаут-мутація за індукцибельним *hsp101* в *A. thaliana* (Hong, Vierling, 2000, 2001) і *Zea mays* (Nieto-Sotelo et al., 2002) викликала послаблення теплостійкості.

Важливо відмітити, що HSP також беруть участь у реакції рослинних клітин на низьку температуру, при цьому характер їх синтезу значно відрізняється від реакції теплового шоку. Так, диференційна активація експресії *HSP70* протягом 48 год при 4°C визначена в *A. thaliana* (Sung et al., 2001). В *A. thaliana* і *Thellungiella salsuginea* експозиція при 4°C призводила до накопичення HSP70, HSP60, HSP101, що супроводжувалось підвищенням їх холодостійкості (Gao et al., 2009; Гамбург и др., 2014). Введення в геном *A. thaliana* гена *ThHSC70* з *T. salsuginea*, який кодує білок, схожий на *AtHSP70-1*, також посилювало стійкість до низьких температур (Zhang et al., 2004). Показана участь HSP у забезпеченні стійкості рослинних клітин до заморозків (Гамбург и др., 2014).

Різницю в реакції клітин на високу і низьку температуру продемонстровано на прикладі експресії 10 генів *HSP70* шпинату (Li et al., 1999). При 37°C індукція всіх генів відбувалась протягом 1-ої год, після чого інтенсивність транскрипції починала знижуватись і досягала достресового рівня через 4 год. Реакція на холод (5°C) була менш однозначною: лише окремі гени активувались протягом 48-168 год.

Водний дефіцит. Оскільки HSP здатні протидіяти агрегації денатурованих білків та відновлювати їх функціональну структуру при регідратації, їх вважають важливим компонентом захисту протеому при низькому вмісті води в клітині (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Jacob et al., 2017). Спроможність шаперонів запобігати дезактивації ферментів за денатуруючих умов продемонстрована *in vitro* (Liu et al. 2017). Про значення HSP для стійкості рослинних клітин до зневоднення може свідчити їх накопичення в зародку насіння та пилку в період дозрівання. Відмічається диференційна участь окремих HSP в цих процесах (Sung et al., 2001; Prasinós et al., 2005).

Показано, що стійкість рослин до водного дефіциту підвищується в результаті надекспресії *HSP* (Alvim et al., 2001; Sung, Guy, 2003; Sato, Yokooya, 2008; Cazalé et al., 2009). Зокрема, надекспресія *HSP70* призводила до посилення посухостійкості при перенесенні гена з *Chrysanthemum* до *A. thaliana* (Song et al., 2014) і з *Erianthus arundinaceus* до *Saccharum* (Augustine et al., 2015a). В *Nicotiana tabacum* надмірна експресія *BiP*, що кодує *HSP70 ER*, посилювала стійкість до посухи та тунаміцину – інгібітору глікозилювання, який індукує накопичення денатурованих білків в *ER*, що також відбувається при посузі (Alvim et al., 2001).

Активація синтезу HSP за впливу водного дефіциту показана у видів з різною посухостійкістю. Так, підвищений вміст конститутивного та індукційного *HSP70* детектували в листках злаку *Cynodon dactylon* після двотижневого висихання ґрунту (Ye et al., 2015). Накопичення *HSP70* за посушливих умов виявляли у повітряно-водного виду *Alternanthera*

philoxerides (Jia et al., 2015). Активацію синтезу HSP70 цитозолу і ER визначали у *Physcomitrella patens* при глибокому зневодненні (Wang et al., 2009). Однак, для виявлення зв'язку функціонування HSP з посухостійкістю у видів різної екології потрібне їх порівняльне дослідження за однакових експериментальних умов.

Для моделювання гострого водного дефіциту часто використовують високоосмотичні розчини. Втім, отримані таким шляхом результати також мають суттєві розбіжності у різних експериментах. Так, водний дефіцит, створений за допомогою розчину поліетиленгліколю (ПЕГ), викликав у проростків рису активацію генної експресії представників усіх родин HSP. При цьому активація експресії відбувалась через 24 год дії фактору (ShuiFeng et al., 2012). Проте в культурі клітин *Solanum tuberosum* індукцію HSP90 (HSP83) детектували вже через 15 хв інкубації з ПЕГ (Ambrosone et al., 2013). Ряд авторів відмічають значну різницю в генній експресії між реакцією рослинних клітин на гострий водний дефіцит і адаптацією до тривалого водного дефіциту (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Бобровницький, 2011, 2012).

Показано диференційний характер експресії окремих HSP за посушливих умов, відмінний від реакції теплового шоку. Наприклад, у *Nicotiana tabacum* два HSP70, що індукувались за теплового шоку, на посуху реагували по-різному: *NtHSP70-1* відповідав на висихання субстрату значною активацією транскрипції, тоді як рівень експресії *NtHSP70-3* не змінювався (Cho, Hong, 2004). Диференційна експресія трьох HSP70 і трьох HSP90 у відповідь на обробку ПЕГ визначена у рисі (Zou et al., 2009). Індукція HSP90 в культурі клітин *S. tuberosum* відбувалась при інкубації в 5% ПЕГ, тоді як індукція HSP20.2 – лише в 20% ПЕГ (Ambrosone et al., 2013). Проте, відомості про особливості реакції окремих ізоформ на зневоднення клітин залишаються обмеженими, значення чого посилюється з огляду на велику кількість членів родин HSP у рослин. У *A. thaliana* аналіз транскриптів через 6-7 діб після припинення поливу виявив значну (в 4 рази і більше) активацію

генної експресії ряду HSP, в першу чергу, AtHSP70-4 – головного індукцибельного HSP70 при тепловому шоці (Rizhsky et al., 2004). Разом з тим, про характер генної експресії індукцибельних AtHSP70-5 і AtHSP90-1 не повідомлялося. Питання їхньої участі в адаптації до посушливих умов, як і участі конститутивних HSP, що не показали значної активації, залишається відкритим.

Затоплення. Активацію синтезу HSP при анаеробіозі вперше було визначено у кукурудзи, хоча тоді ці білки описувались як «анаеробні поліпептиди, формально схожі на білки теплового шоку тварин» (Sachs et al., 1980). З тих пір участь HSP у захисті клітин від нестачі кисню показана у різних видів рослин. Так, індукцію експресії генів HSP, зокрема, великої групи sHSP, після 6 год аноксії визначали в проростках *A. thaliana*. Крім того, стійкість проростків до аноксії посилювалась в результаті попередньої обробки сублетальною температурою, яка індукує HSP (явище крос-толерантності) (Loreti et al., 2005). В іншій роботі на проростках *A. thaliana* протягом 6 год аноксії показана активація експресії генів білків цитозолу (AtHSP17.4-CIII), пластид (AtHSP70-8 і AtHSP25.3-P) та ER (AtHSP22-ER). При цьому кінетика їх експресії дещо відрізнялась від кінетики активації гена ферменту анаеробної адаптації АДГ (Banti et al., 2008). Відмічається, що анаеробна індукція HSP значно посилюється в присутності екзогенної сахарози, яка, ймовірно, може бути джерелом додаткової енергії для синтезу стресових білків (Loreti et al., 2005; Banti et al., 2008). Дослідження протеому листків кукурудзи виявило поступову активацію експресії HSP70 протягом 4 діб затоплення (Chen et al., 2014).

В ряді робіт підкреслюється різниця у рівні анаеробної реакції кореневої і стеблової систем. Наприклад, у *A. thaliana* вміст транскриптів AtHSP25.3-P за умов аноксії виявився значно більшим у стебловій частині проростка, ніж у корені (Banti et al., 2008). У проростків сої серед 73 білків коренів і 28 білків сім'ядоль, синтез яких активувався протягом 2 діб повного затоплення, лише HSP70 виявився спільним для обох органів, при цьому його вміст був

вищим в сім'ядолях. Разом з тим відмічалось зменшення вмісту двох інших HSP70, що вказує на диференційну регуляцію генів цієї родини за умов затоплення (Komatsu et al., 2013).

Однак, переважна більшість таких досліджень проводиться з використанням модельних рослин або окремих видів сільськогосподарського призначення. При цьому особливості функціонування HSP та їх кореляція з процесами специфічної адаптації у рослин із різним адаптивним потенціалом до затоплення залишаються мало з'ясованими. Слід також зазначити, що в описаних роботах анаеробні умови створювались для всієї рослини, тоді як участь шаперонів у системній реакції рослин на кореневу гіпоксію майже не вивчалась.

Змінена гравітація. Результати космічних біологічних експериментів показують, що фактори космічного польоту, до яких відносяться гіпер- і мікрогравітація, впливають на синтез HSP та їх посттрансляційні модифікації. Яскравим прикладом швидкої реакції шаперонів на зміни гравітаційного впливу може бути зниження фосфорилювання молекул AtHSP70-3 в культурі клітин *Arabidopsis* після 20 с гіпергравітації (1,8 g) та його посилення через 22 с мікрогравітації під час параболічного польоту (Hausmann et al., 2014).

Системні дослідження транскриптому рослин виявили активацію експресії генів HSP за впливу факторів космічного польоту (Paul et al., 2005, 2012; Shagimardanova et al., 2010; Correll et al., 2013; Zupanska et al., 2013; Kwon et al., 2015; Johnson et al., 2017; Li et al., 2017; Choi et al., 2019). Так, підвищений вміст транскриптів HSP визначено в зелених проростках *A. thaliana* після їх перебування в космічному польоті за оптимальних умов (Paul et al., 2005; Choi et al., 2019). Порівняння транскриптому проростків чотирьох екотипів *A. thaliana*, що росли в умовах космічного польоту, показало підвищений рівень експресії індукцибельних членів родин HSP70, HSP90, HSP101 і sHSP, та водночас – виявило суттєві відмінності в ступені їх активації між екотипами (Choi et al., 2019).

Проте не всі результати польотних експериментів є однозначними. Наприклад, порівняльне дослідження етіолованих проростків і культури клітин *A. thaliana* після зльоту і 12 діб польоту виявило активацію експресії ряду генів *HSP* у недиференційованих клітин, тоді як у проростків такі зміни не визначались (Paul et al., 2012). При цьому в клітинах калюсу визначено підвищений рівень транскриптів цитозольних HSP70, HSP90, HSP101 і шести sHSP, а також факторів теплового шоку AtHSFA2 і AtHSFA7A. Особливо значні зміни стосувалися індукбельних HSP70 (AtHSP70-4), HSP70b (AtHSP70-5), AtHSP90-1, AtHSP17.4 і AtHSP17.6.

Активацію експресії *AtHSP101* і *AtHSP17.6A* визначали в культурі клітин як за умов космічного польоту, так і при клінонстатуванні, тоді як короткі періоди гіпер- і мікрогравітації під час параболічного польоту таких змін не викликали (Zuranska et al., 2013). На підставі цього зроблено висновок про специфічну активацію експресії зазначених *HSP* в недиференційованих клітинах у відповідь на пролонговану мікрогравітацію. Однак, в іншій роботі в культурі клітин *A. thaliana* після 5 діб впливу реальної мікрогравітації активацію експресії *HSP* не виявлено. При цьому фактор мікрогравітації було відокремлено від інших чинників за допомогою бортової центрифуги 1 g (Fengler et al., 2015). В ячменю під час космічного польоту кількість транскриптів *HSP70* і *HSP90* виявилась відповідно у 2,5 і 2 рази вище за наземний контроль, тоді як рівень транскрипції *HSP17*, *HSP18* і *HSP26* не змінювався (Shagimardanova et al., 2010). Відсутність змін в транскрипції і трансляції sHSP різної клітинної локалізації показана також за умов клінонстатування у проростків гороху (Talalaiev, 2006; Talalaiev, Kordyum, 2014).

Отже, існуючі дані в цілому підтверджують уявлення про участь системи шаперонів в реакції клітин на мікрогравітацію, і разом з тим певні розбіжності можуть залежати від об'єкта дослідження (вид рослин, інтактний організм, недиференційовані клітини, вік і фізіологічний стан організмів) і

експериментальних підходів (мікрогравітація в космічному і параболічному польоті, кліностакування, тривалість експозиції тощо).

Результати вивчення реакції шаперонів на гіпергравітацію також неоднозначні. Різке збільшення кількості транскриптів *HSP90* і *HSP60* реєстрували в культурі клітин *Arabidopsis* після центрифугування при 7 g протягом 1 год (Martzivanov, Hampp, 2003). В іншому експерименті з цим об'єктом, навпаки, показано зниження експресії *AtHSP101* і *AtHSP17.6A* після дії 3 g протягом 8 хв та 16 g протягом 20 хв (Zupanska et al., 2013). У проростків гороху також не було виявлено транскриптів sHSP цитозоллю і органел після 1-годинного центрифугування при 3-14 g (Талалаєв, 2013).

Отже, неоднозначність існуючих результатів вказує на необхідність подальшого ретельного вивчення участі системи шаперонів в стрес-реакції та адаптації рослин до незвичних для них умов зміненої гравітації.

2.4. Базовий рівень HSP

При вивченні молекулярних основ стійкості рослин переважна більшість робіт розглядає рівень індукції експресії того чи іншого *HSP* за змін зовнішніх чинників, порівнюючи його з контрольним (конститутивним/ базовим) рівнем його експресії. Водночас, з огляду на індивідуальні особливості синтезу окремих HSP за нормальних умов, можна припускати, що рівень базового синтезу також має суттєвий вплив на стійкість рослинних клітин. Крім того, вміст HSP може впливати на розвиток живих організмів, тривалість їх життя і чисельність потомства (Rutherford, Lindquist, 1998).

Різницю між видами в конститутивному синтезі HSP за однакових умов відмічали у різних груп організмів (Evgen'ev et al., 2007; Смуров и др., 2010; Tomanek, Zuzow, 2010; Shatilina et al., 2011). Наприклад, теплостійкі види тварин, як правило, характеризуються досить високим вмістом HSP у клітинах за нормальних температур та більш високим порогом їх індукції (Evgen'ev et al., 2007). Конститутивний рівень HSP70 у інфузорій корелював

зі ступенем їх солестійкості (Смуров и др., 2010). Відмічається, що у різних родин HSP взаємозв'язок зі стійкістю може бути різним. Так, у тваринних об'єктів – видів амфіпод з різною адаптивною здатністю – позитивну кореляцію з термостійкістю виявляли для базового синтезу цитозольних HSP70, тоді як вміст sHSP був варіабельним і строгої кореляції зі стійкістю не показував (Shatilina et al., 2011). Припускають, що базовий рівень HSP визначається умовами ніші, до якої організм пристосувався під час як філогенетичного, так і онтогенетичного розвитку (Evgen'ev et al., 2007; Смуров и др., 2010; Shatilina et al., 2011).

На рослинних об'єктах показано, що стійкіші генотипи відрізняються більш високим рівнем синтезу HSP всіх родин (Senthil-Kumar et al., 2007). При цьому, як правило, вивчаються генотипи одного або споріднених видів. Наприклад, рівень конститутивного синтезу HSP70 в *A. thaliana* виявився нижчим порівняно з іншим видом родини *Brassicaceae* – високо резистентним *Thellungiella salsuginea* (Гамбург и др., 2014). Проте порівняння видів рослин віддаленої таксономічної приналежності, різної екології та контрастних за адаптивними здатностями майже не проводилось.

На *A. thaliana* показано, що в діапазоні температур 12-27°C, які не викликають стресу, гени стресової реакції, в тому числі й *HSP*, майже не реагують на температурні зміни, що забезпечує сталий базовий рівень відповідних білків (Kumar, Wigge, 2010). Виключенням став *AtHSP70-4*, який кодує основний стрес-індуцибельний HSP70 і на низькому рівні транскрибується за нормальних умов. Експресія цього гена не визначалась при 12°C і поступово посилювалась у відповідь на підвищення температури від 17°C до 27°C. Очевидно, така теплочутливість одного з HSP70 дозволяє певною мірою змінювати базовий рівень цих шаперонів, що може бути інструментом тонкого налаштування чисельності пулу шаперонів в діапазоні нормальних температур.

2.5. Участь шаперонів у формуванні фенотипу рослин

2.5.1. HSP90 у стабілізації нормального формотворення

В контексті проблеми механізмів підтримання стабільності формотворення рослин важливою особливістю шаперонів HSP90 виявилась їх здатність стабілізувати структуру певних метастабільних білків, що дозволило розглядати їх як буферну систему, яка обмежує вплив слабких варіацій зовнішнього і внутрішнього середовища і тим самим стабілізує процеси росту і розвитку (Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2007). Така роль HSP90 може бути виявлена через підвищення нестабільності росту та його чутливості до пертурбацій середовища при зниженні активності шаперонів – природної або вимушеної. Мірою нестабільності при цьому можуть служити різні якісні та кількісні ознаки, такі, як підвищення фенотипічної варіабельності, поява морфозів, десинхронізація росту і розвитку, зниження точності формування повторюваних і симетричних структурних елементів, збільшення коефіцієнта варіації (CV) кількісних морфологічних ознак та ін. Дослідження цих процесів у рослин в основному проводиться на модельному об'єкті *A. thaliana* з використанням інгібіторного аналізу та генетичних підходів. Обробка інгібіторами дає можливість зниження загальної функціональної активності пулу HSP90 клітини. Так, внесення інгібіторів HSP90 в середовище для вирощування призводило до появи у ізогенних ліній *A. thaliana* поряд з нормальними фенотипами деякої частки проростків зі значними морфологічними відхиленнями, які стосувалися форми, розмірів, взаємного розташування і кольору органів (Queitsch et al., 2002). Однак, враховуючи швидку дезактивацію антибіотиків під впливом світла, цей підхід зазвичай застосовується для феномного аналізу рослин на ранніх стадіях росту.

Для вивчення ролі шаперона протягом усього онтогенезу використовуються RNAi-лінії, а також мутанти з порушенням експресії

окремих генів *HSP90*. Оскільки у *A. thaliana* гени цитозольних HSP90 високо гомологічні між собою, RNAi дає можливість зменшити синтез декількох ізоформ у клітині (Sangster et al., 2007, 2008 a, b). При цьому RNAi з різним ступенем ідентичності до різних *HSP90* знижували рівень їх експресії в 1,5-2 рази. Характерно, що спроби отримати трансформанти з максимальною інтерференцією RNAi до всіх 4 генів цитозольних ізоформ виявились невдалими (Sangster et al., 2007). Ймовірно, жорстке пригнічення синтезу всіх цитозольних HSP90 призводить до втрати життєздатності рослинного організму, що узгоджується з уявленням щодо важливості HSP90 для життєздатності еукаріотів. Так, гомозиготні мутації за обома *HSP82* у *S. cerevisiae* або єдиному *HSP83* у *Drosophila* виявились летальними (Borkovich et al., 1989; Vandura et al., 2013).

Трансгенні Т-ДНК-лінії (інсерційні мутанти) з порушенням функціонування 1 з 4 цитозольних HSP90 в цілому зберігають життєздатність. Разом з тим відзначено збільшення частки непророслого насіння та значні порушення морфології зародків (Samakovli et al., 2007). Проросле насіння всіх RNAi- та Т-ДНК-ліній в основному продукувало здорові проростки з фенотипом дикого типу. Водночас частина проростків мала порушення від слабких до значних (Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2007). Порівняння двох типів ліній виявило загальні для обох зміни (Sangster et al., 2007). Разом з тим, спектр фенотипів і частота їх появи мали певну специфіку у різних ліній. У мутантних ліній *Athsp90-2* і *Athsp90-3* з'являлись проростки з уповільненим ростом і вузькими листками, в *Athsp90-4* – з дефектами коренів. Змінені фенотипи *Athsp90-1* характеризувалися широким розмаїттям відхилень без переваги будь-яких з них.

Аналіз RNAi- і Т-ДНК-рослин протягом онтогенезу показав, що від HSP90 залежать різні процеси формотворення. Зниження наповненості клітинного пулу HSP90 у RNAi-ліній призводило до певної затримки цвітіння та зниження насінневої продуктивності, зміни кількості листків розетки, їх розмірів, висоти рослин, кількості стручків та інших кількісних

ознак (Sangster et al., 2007, 2008 b). Практично половина рослин мала порушення апікального домінування. У невеликої частки особин формувалися квітконоси, зрощені в нижній частині.

Феномний аналіз мутанта *Athsp90.2-3* з точковою мутацією в сайті зв'язування АТФ виявив збільшення кількості листків розетки та появу квіток з більшою кількістю чашолистків, порівняно з диким типом (Smith et al., 2009). В роботі Samakovli et al. (2007) у дорослих фенотипів Т-ДНК-ліній виділено кілька класів відхилень у розвитку і морфогенезі. Примітно, що у мутантів *hsp90* за різними генами спостерігали як схожі змінені фенотипи, так і особливі. Аналіз кількох поколінь Т-ДНК-ліній показав, що виділені в окремі класи фенотипічні зміни не закріплювалися генетично. З насіння, зібраного з рослин різних класів, отримували весь спектр фенотипів, характерних в цілому для даної лінії.

Вивчення HSP90 органел також продемонструвало їх вплив на ріст і морфогенез рослин, очевидно, через їх взаємодію з локальними субстратами. Зокрема, гомозиготний нокаут-мутант *Athsp90-5* за геном, який кодує білок пластид, характеризувався порушенням ембріогенезу та втратою життєздатності насіння. Косупресія цього гена, не впливаючи на закладку органів, викликала зменшення розмірів листової розетки, зміну метаболізму крохмалю, порушення формування хлоропластів (Oh et al., 2014). Показано, що AtHSP90-7, локалізований в ЕР, впливає на визначення розміру меристеми та її організацію, бере участь у біогенезі мембран і різних біосинтетичних процесах (див. додаток А). Мутація *shepherd* по цьому HSP викликала значні порушення кореневої, стеблової та флоральної меристем, а також втрату фертильності пилку (Ishiguro et al., 2002).

Особливо слід відмітити, що фенотипічні відхилення, подібні до тих, які спостерігалися при інгібуванні HSP90, з'являлись у проростків дикого типу *A. thaliana* при 27°C, тобто за помірного підвищення температури, яка не викликає індукції HSP (Queitsch et al., 2002). Крім того, експозиція проростків дикого типу при 27°C і 32°C різної тривалості призводила до

утворення різноманітних морфологічних змін у дорослих рослин, подібних змінам у нокаут-мутантів *hsp90* (Samakovli et al., 2007). Показово, що у Т-ДНК- і RNAi-лінії *hsp90* частка змінених фенотипів при м'якому підвищенні температури була значно більшою, порівняно з диким типом (Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2007). На підставі цього зроблено висновок, що невелике підвищення температури може викликати формування HSP90-залежних фенотипів. Припускається, що при цьому може відбуватися перемикання HSP90 з обслуговування специфічних субстратів на зв'язування денатурованих білків, які починають накопичуватися в клітині за помірного підвищення температури.

Таким чином, зниження активності HSP90, генетично або за допомогою інгібіторів, викликає у практично ізогенних ліній за оптимальних умов збільшення фенотипічної варіабельності аж до істотних відхилень від стандартного фенотипу протягом онтогенезу, що вказує на їх участь у визначенні морфогенетичної програми розвитку і здатності протидіяти стохастичним процесам. Разом з тим, недостатньо вивченою залишається здатність HSP90 підтримувати стабільність темпів росту і морфогенезу. Не з'ясовано питання віддалених у часі ефектів світлочутливих антибіотиків на ріст і розвиток рослин.

2.5.2. HSP90 у фенотипічній пластичності

Уявлення про те, що шаперони HSP90 асистують цілій низці білків різних сигнальних шляхів і можуть визначати компетентність останніх до сприйняття і передачі сигналу, призвело до припущення, що дана родина може опосередковувати вплив середовища на ріст і розвиток рослинного організму. Виходячи з цього, зниження кількості/активності HSP90 повинно призводити до системних змін залежних шляхів трансдукції клітинних сигналів і експресії відповідних генетичних програм, і в результаті, до зміни фізіологічних і морфогенетичних реакцій. Широкомасштабний аналіз транскриптів RNAi- та Т-ДНК-ліній *A. thaliana* підтвердив таке припущення,

показавши, що у рослин зі зниженим рівнем HSP90 переважно змінюється експресія генів, які забезпечують відповіді на зовнішні стимули (Sangster et al., 2007). Зокрема, визначено збільшення кількості транскриптів, що беруть участь в реакції рослин на водний дефіцит, механізмах дії АБК, біосинтезі жасмонової кислоти, і разом з тим ослаблення експресії генів біосинтезу саліцилової кислоти. При цьому в RNAi-лініях зі зниженим рівнем експресії генів цитозольних HSP90 зміни були суттєвішими порівняно з нокаут-мутантами за окремими з цих генів. Аналіз локусів кількісних ознак (QTLs) у RNAi-ліній зі зниженим на третину вмістом цитозольних HSP90 також виявив залежні від шаперона локуси (Sangster et al., 2008). У мутанта *cr88*, дефіцитного по AtHSP90-5 пластид, спостерігали зниження рівня експресії генів, що кодують ряд білків фотосинтезу (Lin, Cheng, 1997).

Вивчення фізіологічних відповідей *A. thaliana* на зовнішні стимули при зниженні активності HSP90 продемонструвало важливість шаперона для таких адаптивних пластичних реакцій, як ріст гіпокотилу і кореня в темряві, гравітропічна реакція кореня, позеленіння сім'ядоль після перенесення етіюльованих проростків на світло (Queitsch et al., 2002). Наприклад, обробка інгібітором HSP90 сприяла сповільненню росту гіпокотилу у темряві та зміні величини або навіть напрямку гравітропічного вигину кореня. Формування довгого гіпокотилу при червоному світлі у *cr88* з порушеним синтезом шаперона пластид свідчить про його важливість для фотоморфогенезу (Сао et al., 2000). Такі дані в цілому показують, що, контролюючи різні регуляторні шляхи, HSP90 беруть участь в регуляції пластичних реакцій рослин на зовнішні стимули. Разом з тим, залишається не з'ясованою роль окремих членів родини у цих реакціях.

2.5.3. HSP90 у стабілізації формотворення при генетичних змінах

Як вже згадувалося вище, генетичні зміни можуть перебувати в прихованому стані та проявлятися у фенотипі за певних умов (Kimura, 1983). Один з можливих механізмів цього пов'язується з гіпотетичною буферною

системою. Відповідно до гіпотези Rutherford і Lindquist (1998), у випадку генетичної мінливості існує можливість, що HSP90, взаємодіючи з білком-клієнтом з частково зміненою амінокислотною послідовністю, буде підтримувати його в нормальній функціональній конформації і таким чином сприяти формуванню нормального фенотипу. Така гіпотетична здатність шаперона представляє молекулярний механізм приховування і накопичення генетичних змін. Перші докази існування подібного механізму в *Drosophila* показали, що генетичні зміни можуть залишатися в мовчазному стані при нормальному функціонуванні HSP83 і проявлятися при зниженні його активності у разі або гетерозиготної мутації (гомозиготи летальні), або при інгібуванні (Rutherford, Lindquist, 1998). Згодом здатність HSP90 протидіяти прояву генетичного поліморфізму була виявлена у різних організмів, включаючи рослини. Порівняння екотипів *A. thaliana* і створених на їх основі рекомбінантних інбредних (PI) ліній підтвердило генетичну детермінованість спектра залежних від HSP90 морфологічних змін у рослин (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2008 a, b). Так, екотипи та PI-лінії відрізнялися один від одного за спектром HSP90-залежних фенотипів та часткою окремих фенотипів (Queitsch et al., 2002). Діапазон пов'язаної з шапероном фенотипічної варіабельності у PI-лінії виявився ширшим, ніж у батьківських ліній. Нові комбінації генотипів давали поряд з батьківськими нові HSP90-залежні фенотипічні ознаки та більш широкий, ніж у батьків, діапазон фізіологічних реакцій. Аналіз видовження гіпокотила в темряві у PI-лінії при обробці ГДА показав, що поліморфізм за полігенною кількісною ознакою також може залежати від HSP90 (Sangster et al., 2008 a). На підставі отриманих даних зроблено висновок про те, що залежні від HSP90 алелі не є рідкісними в природних популяціях і можуть робити істотний внесок в їх фенотипічну різноманітність. Нещодавно продемонстровано, що генетичне зниження рівня експресії цитозольних HSP90 сприяє фенотипічному прояву новоутворених мутацій (Mason et al., 2018; Zabinsky et al., 2018).

Крім того, з'явилося кілька робіт, в яких з використанням мутантів *A. thaliana* за білками-клієнтами отримано прямі докази здатності шаперонів HSP90 сприяти накопиченню генетичних змін. Так, з двох компонентів БР-сигналіngu акумуляція несинонімічної мутації була вище у залежного від шаперона BES1, ніж у незалежного BZR1 (Lachowiec et al., 2013). Продемонстрована також здатність шаперона маскувати точкову мутацію у рецептора ауксину TIR1 і підтримувати нормальну ауксинову реакцію (Watanabe et al., 2016). Пропонується використовувати інгібування HSP90 для прискорення ідентифікації генетичних змін (Queitsch et al., 2002).

У зв'язку з цим треба зазначити, що генетичний поліморфізм природних популяцій з антропогенним навантаженням або створений з використанням генотоксичних чинників може нести ризики як для нормального формотворення, так і для життєздатності організму. Експериментальна перевірка залежності прояву такого поліморфізму від активності HSP90 може бути корисною для більш глибокого розуміння механізмів стабілізації генетичного компонента фенотипічної варіабельності природних популяцій.

2.5.4. HSP70 у стабілізації ростових процесів

В існуючих публікаціях здатність стабілізувати ростові процеси пов'язують з шаперонами HSP90. Однак, HSP90 функціонує у тісній кооперації з HSP70 (Dittmar et al., 1997; Grad, Picard, 2007; Noël et al., 2007; Козеко, 2010; Clément et al., 2011; Karagöz, Rüdiger, 2015), що склалося протягом їх коеволюції (Travers, Fares, 2007). Високо координована взаємодія шаперонів двох родин дозволяє припускати щонайменше опосередкований вплив HSP70 на стабільність ростових і морфогенетичних процесів.

У зв'язку з цим особливого значення набувають поки що нечисленні дані стосовно впливу HSP70 на регуляторні процеси і, в результаті, на ріст і морфогенез рослин. Так, в *A. thaliana* надекспресія AtHSP70-1 викликала карликовість проростків, вкорочення і посилене галуження кореневої системи внаслідок пригнічення активності меристем кореня і стебла (Sung,

Guy, 2003; Cazalé et al., 2009). Причому такий ефект виявився специфічним для *AtHSP70-1* OE, оскільки надекспресія *BiP-2 (AtHSP70-12)* (Sung, Guy, 2003) і *HSP101* (Queitsch et al., 2002) змін фенотипу не викликала. Крім того, підвищення рівня конститутивної експресії *AtHSP70-1* посилювало стійкість до солей кадмію і миш'яку, проте не впливало на реакції, викликані УФ-С, фосфатним голодуванням та деетіоляцією проростків. Такі факти свідчать про певну специфічність функціонування шаперона відносно зовнішніх чинників і фізіологічних процесів (Cazalé et al., 2009). Також надекспресія *AtHSP70-1* призводила до порушення АБК-залежного закриття продихів (Clément et al., 2011). Важливо, що подібний ефект спостерігали і у випадку домінантної негативної форми *HSP90*.

Деякі результати досліджень стосовно HSP70 суперечливі. Так, за Larkindale і Vierling (2008), нокаут-мутація по *AtHSP70-15*, цитозольному білку підродино SP110/SSE, лише посилювала чутливість до високої температури і знижувала індуковану теплостійкість, проте на ріст проростків за нормальних умов не впливала. За даними Jungkuntz et al. (2011) дефіцит за цим білком викликав затримку росту, зміни форми листків, впливав на здатність продихів закриватися за нормальних умов і під впливом АБК, проте не впливав на АБК-залежне інгібування проростання насіння. Нокаут-мутанти *Athsp70-15* мали значні системні зміни генної експресії, найбільші в генів стрес-реакції і відповідей на біотичні та абіотичні стимули, а також білкового метаболізму, транскрипції та процесів розвитку. На відміну від цього, нокаут-мутанти за іншим членом підродино SP110/SSE - *AtHSP70-14* мали фенотип дикого типу і незначні відхилення в загальному характері генної експресії (Jungkuntz et al., 2011). Отже, з огляду на обмеженість існуючих даних, участь шаперонів HSP70 у стабілізації процесів росту і формотворення потребує ретельного вивчення.

2.6. Регуляція реакції теплового шоку і роль HSP90

Регуляція стресової індукції генів HSP або реакції теплового шоку здійснюється на рівні транскрипції і визначається двома ключовими елементами.

Елемент теплового шоку (heat shock element, HSE) – цис-елемент промоторної ділянки генів HSP, консервативна послідовність з інвертованим повтором nGAAnnTTCnnGAAn (Barros et al., 1992; Fernandes et al., 1994). Транскрипція *HSP* може регулюватися одним чи кількома HSE, які можуть мати класичну послідовність, або деякі відмінності. Кількість і особливості розташування регуляторних елементів визначають різницю в експресії генів.

Транскрипційний фактор теплового шоку (heat shock factor, HSF), який специфічно зв'язується з HSE (Nover et al., 2001; Åkerfelt et al., 2010). Родина HSF у рослин характеризується великою чисельністю, значно більшою в порівнянні з дріжджами і тваринами, які мають від одного до кількох гомологів: у *Ricinus* знайдено 19 HSF, у *A. thaliana* - 21, у *Solanum lycopersicum* - 27, у *Glycine max* - 53. Виходячи з особливостей доменної структури, HSF рослин розділені на 3 підродини або класи А, В і С (Nover et al., 2001; von Koskull-Döring et al., 2007). Різні HSF синтезуються конститутивно і/або індуються при стресі, мають відмінності в олігомеризації, функціях в системі HSF, взаємодії з іншими білками і характеризуються певною специфікою до стресорів (Scharf et al., 2012). Очевидно, все це забезпечує підвищений запас міцності і тонку багаторівневу настройку функціонування системи.

На основі вивчення тваринних клітин запропоновано гіпотетичний механізм регуляції реакції теплового шоку цитозольними HSP90 за принципом зворотного зв'язку (Ali et al., 1998; Morimoto, 1998; Zou et al., 1998). За цим механізмом, підтримання HSF1, який відповідає за ініціацію реакції, у неактивному стані за нормальних умов забезпечується асоціацією його мономерів з цитозольними HSP90. При стресі перемикання шаперонів

на зв'язування збільшеної кількості ненативних білків призводить до вивільнення HSF1, їх тримеризації, транспортування до ядра, зв'язування з HSE та ініціації транскрипції різних *HSP*, в тому числі, й *HSP90*. При цьому основним сигналом, що запускає синтез HSP, є накопичення денатурованих білків вище певного порогового рівня (stress sensing system / cytosolic protein response) (Ananthan et al., 1986; Zou et al., 1998; Scharf et al., 2012). Відновлення білкового гомеостазу зростаючою кількістю HSP призводить до вивільнення HSP90 та їх реасоціації з HSF1.

У рослин регуляція експресії *HSP* відбувається за такими ж основними принципами (Schöffl et al., 1998) і, крім того, з'являється все більше доказів його регуляції шаперонами HSP90. Так, трансген *ProHSP90.1:GUS A. thaliana* за індукцйбельним геном відповідав на інгібування HSP90 індукцією GUS (Yabe et al., 1991; Yamada et al., 2007). Експресію *AtHSP90-1* визначали також у мутанта по конститутивному *AtHSP90-2* (Sangster et al., 2007). У рослин, які експресують домінуючу негативну форму *AtHSP90-2*, виявляли підвищений рівень HSP70 (Yamada et al., 2007). Інгібітор HSP90 моноцилін I (monocillin I) викликав активацію синтезу HSP101 і HSP70 (McLellan et al., 2007).

Важливим моментом є те, що інгібітори HSP90 ГДА і РАД викликали активацію 157 генів - не тільки *HSP70*, *HSP90*, *HSP101* і *sHSP*, а й інших, експресія яких індукується високою температурою (Yamada et al., 2007). Аналіз послідовностей промоторів цих генів показав, що 115 з них містять щонайменше один мотив HSE3, тобто можуть активуватися HSF. Цей ефект не пригнічувався інгібітором трансляції циклогексимідом. Це вказує на індукцію генів завдяки активації конститутивних HSF, у нормі репресованих HSP90. Показана асоціація конститутивних HSP90 і HSF в цитоплазмі та ядрі рослинних клітин, а також їх дисоціація при інгібуванні шаперона (Yamada et al., 2007). Накопичення денатурованих білків викликало зниження специфічної активності шаперона, що доводить залежність комплексу HSP90-HSF від концентрації ненативних білків в клітині. Крім того,

блокування HSP90 підвищувало теплостійкість рослин (McLellan et al., 2007; Yamada et al., 2007).

В цілому, наведені дані підтверджують існування в рослинних клітинах механізму авторегуляції генної експресії HSP цитозольними HSP90, що не виключає існування незалежних від HSP90 регуляторних шляхів. Разом з тим, цей механізм і роль HSP90 в ньому у рослин мають свої особливості, перш за все, завдяки більшій кількості членів родин HSP і HSF та їх функціональній різноманітності. HSF рослин розрізняються за спеціалізацією по відношенню до різних сигналів і роллю в процесі розвитку стресової реакції. Вважається, що індукція HSP у відповідь на високу температуру здійснюється транскрипційними факторами HsfA1, HsfA2, HsfA3 і HsfB1 (Scharf et al., 2012). При цьому головними індукторами є члени підродини HsfA1, тоді як HsfB1 модулює їх активність. Синтез HsfA2 і HsfA3 активується протягом розвитку стрес-реакції та забезпечує її посилення (von Koskull-Döring et al., 2007; Scharf et al., 2012). Знайдено, що HsfA1 і HsfB1 за нормальних умов асоційовані з комплексом HSP90/HSP70. В ході стрес-реакції шаперони переключаються на зв'язування ненативних білків і вивільняють HsfA1 і HsfB1, які запускають експресію *HSP* і ряду *HSF*. Припинення їх експресії здійснюється шляхом асоціації HsfA1 з HSP70 і HsfB1 з HSP90. В результаті, HsfA1 переходить в неактивну форму, а HsfB1 направляється на деградацію.

Індукований HsfA2 формує з HsfA1 суперактивний гетероолігомерний комплекс, що забезпечує посилення стресової реакції в умовах тривалої або повторної дії чинника. Частина молекул HsfA2 і синтезованих *de novo* HSP70 і HSP17 резервуються у вигляді високомолекулярних агрегатів - гранул теплового шоку, призначених, ймовірно, для відновлення білкового гомеостазу після дії стресора. Отримано докази зв'язування AtHsfA2 з індукцибельним AtHSP90-1 (Meiri, Breiman, 2009). Розбирання гранул теплового шоку також здійснюється за участю комплексу HSP90/HSP70 (Hahn et al., 2011; Scharf et al., 2012).

Синтез HsfA3 запускається при високій температурі та водному дефіциті, що контролюється транскрипційним фактором DREB2A. Мутація, яка порушує експресію *AtHsfA3*, запобігала індукції *HSP101* і *sHSP*, необхідних для протидії агрегації денатурованих білків і виживання клітин (Schramm et al., 2008). Показано, що *AtDREB2A* і *AtHsfA3* індукуються при інгібуванні HSP90 (Yamada et al., 2007).

Наведені факти свідчать, що шаперони HSP90 не тільки контролюють стресову індукцію *HSP*, але і беруть участь у регуляції її розвитку за дії високих доз стресора та завершення при нормалізації ситуації. З огляду на те, що інгібування HSP90 запускало транскрипцію не тільки HSP, а й інших HSF-залежних генів (Yamada et al., 2007), можна розглядати цитозольні HSP90 як регулятор реакції теплового шоку в більш широкому сенсі.

Таким чином, фенотипічна пластичність рослин є здатністю генотипу змінювати морфогенетичну програму експресії і реалізовуватись в різних фенотипах за різних умов середовища. Відповідь організму на зовнішні пертурбації складається із стрес-реакції і адаптації. Пластичність розвитку нерозривно пов'язана з такими характеристиками онтогенезу як діапазон стійкості виду, норма реакції, каналізованість і стабільність формотворення. Результати досліджень шаперонів/HSP показують або дозволяють припускати участь цих білків у забезпеченні зазначених ознак онтогенезу.

Дана робота спрямована на вивчення різних аспектів функціонування шаперонів у забезпеченні стабільності та пластичності росту і розвитку рослин. При цьому увага зосереджена на родинях HSP70 і HSP90, які відіграють важливу роль на всьому діапазоні від оптимальних до критичних умов середовища. Шаперони HSP90 завдяки їх субстратній специфічності розглядаються як буферна система, яка здатна обмежувати вплив стохастичних процесів і генетичного поліморфізму на стабільність росту і формотворення та підтримувати пластичні реакції. Іншою важливою їх функцією є здатність контролювати експресію генів *HSP*. Вивчення окремих

напрямків функціонування HSP90 в рослин і поєднання їх в рамках єдиного механізму є вкрай актуальним.

Аналіз даних літератури також показав, що HSP70 займають центральне положення в системі шаперонів, функціонують в кооперації з HSP90 та відіграють ключову роль у відновленні якості білка клітин під час стресу. Однак здатності HSP70 впливати на ріст і розвиток за нормальних умов досі приділялось мало уваги.

Оскільки HSP вважаються системою неспецифічної стійкості, важливим є питання специфічності функціонування окремих членів родин HSP як за нормальних, так і за стресових умов. Актуальним є вивчення особливостей функціонування шаперонів у рослин з різним діапазоном стійкості та рослин природних популяцій.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Рослинний матеріал

Більша частина досліджень проведена з використанням *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*Brassicaceae*). Вибір цього виду обумовлений розшифрованим геномом, малим розміром насіння, зручністю культивування рослин у стерильних умовах, розробленою методологією визначення стадій росту і феномного аналізу. Екотипи Columbia (Col-0, лабораторна лінія) і Landsberg *erecta* (Ler) використовували для аналізу генної експресії і синтезу білків за стресових умов. Ці екотипи та рослини, вирощені з насіння природних популяцій *A. thaliana* п'яти місцезростань м. Києва і Київської обл., використовували для феномного аналізу за впливу інгібіторів HSP90.

Для оцінки участі окремих HSP90 і HSP70 у стабілізації росту, розвитку, формотворення, пластичних реакцій та стійкості рослин використовували зроблені на основі екотипу Col-0 нокаут-мутанти з інсерцією T-ДНК: SALK_007612 для *AtHSP90-1*, SALK_147967 для *AtHSP90-4*, SAIL_839_A08C1 для *AtHSP70-5* і SALK_082815C для *AtHSP70-14*. Для аналізу тканиноспецифічності експресії генів використовували трансгенні лінії, що містять сигнальний ген *uidA*, який кодує фермент β-глюкуронідазу (GUS): GT_3_103910 для *AtHSP90-2* та GT_5_106091 для *AtHSP70-10*. Насіння Ler, мутантних і трансгенних ліній отримано з Європейського центру насіння *A. thaliana* (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC, Великобританія).

Для аналізу впливу зміненої гравітації на синтез HSP використовували *Pisum sativum* L. (сорти Дамір та Інтенсивний).

Для аналізу зв'язку кінетики синтезу HSP з адаптаційним потенціалом виду крім *A. thaliana* (Col-0) використовували:

- види родини *Malvaceae* – *Malva sylvestris* L. (мальва лісова, сорт Красавка) і *M. pulchella* Bernh. (мальва пульхелла, ранньостиглий сорт Сильва, створений методом багаторічного добору, автор Д.Б. Рахметов); насіння отримано від д.б.н. Д.Б. Рахметова;
- повітряно-водний вид *Sium sisaroides* DC. (вех сизаровидний, *Apiaceae*); насіння збирали з рослин природної популяції на березі р. Псьол біля смт. Велика Багачка (Полтавська обл.);
- водна рослина *Trapa natans* L. (водяний горіх, *Trapaceae*). Для аналізу брали рослини з Русанівського каналу м. Києва.

Тестування стану рослин за допомогою біомаркера проводили із *Salix purpurea* L. (*Salicaceae*), *Malva pulchella* Bernh. сорт Сильва і *M. sylvestris* L. сорт Красавка (*Malvaceae*), *Epipremnum aureum* Linden & André (*Araceae*), *Sium latifolium* L. і *S. sisaroides* (*Apiaceae*), *Hydrocotyle verticillata* Thunb. (*Apiaceae*), *Pistia stratiotes* L. (*Araceae*), *Trapa natans* L. (*Trapaceae*). Використовували рослини *S. latifolium* і *S. sisaroides* з природних популяцій на березі р. Псьол біля смт. Велика Багачка; рослини відкритого ґрунту *M. sylvestris* і *M. pulchella* з Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України; рослини відкритого ґрунту *S. purpurea* і *T. natans* та оранжерейні рослини *E. aureum*, *H. verticillata* і *P. stratiotes* з ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

3.2. Відбір зразків для тестування стану рослин

Для аналізу використовували зелені листки рослин, що зазнавали впливу високої температури, посухи і затоплення в природних умовах або в експерименті. Відбір зразків гетерофільних листків повітряно-водних рослин *S. latifolium* здійснювали у вегетаційну фазу розвитку (травень): відбирали зразки підводних листків, листків з черешками у воді та надводною пластинкою та повітряні листки. Для порівняння рослин природних

популяцій двох видів *Sium* використовували рослини *S. latifolium* прибережної водної смуги і суходолу і суходільні рослини *S. sisaroides*; відбирали повітряні листки 3-го ярусу в фазу цвітіння-плодоношення (липень); відбір зразків проводили при температурі повітря 24°C після дощів, а також при температурі 41°C за відсутності атмосферних осадків протягом тривалого часу. Інші зразки відбирали у серпні 2010 р. Обрані для тестування рослини *S. purpurea* зростали за умов помірної та високої вологості ґрунту при температурі повітря 17°C. Рослини *M. pulchella* і *M. sylvestris* знаходились в умовах тривалої посухи при середній денній температурі повітря 41°C та в умовах помірної вологості при температурі 17°C. Рослини *E. aureum* піддавались впливу посухи (тиждень без поливу), затоплення кореневої системи протягом тижня при 20°C та експозиції при 40°C протягом 2 год. Для тестування *H. verticillata* використовували рослини, які росли у воді при температурі води під час відбору зразків 21°C, на суші при температурі повітря 20°C та водні рослини після експонування при 40°C протягом 2 год. Листки *P. stratiotes* відбирали з водних рослин при температурі води 21°C та суходільних рослин при температурі повітря 20°C. Листки *T. natans* збирали з рослин природної водойми при температурі води 20°C, а також після експонування при 40°C протягом 2 год та при 37°C від 2 год до 2 діб. Зразки заморожували і зберігали при -70°C до аналізу. HSP70 і HSP90 визначали за допомогою методу вестерн-блотингу. Паралельно з відбором зразків для аналізу білків визначали вміст води у ґрунті, на якому росли рослини.

3.3. Вирощування рослин

3.3.1. Вирощування рослин в умовах стерильної культури

В умовах стерильної культури експерименти проводили з *A. thaliana*. Насіння стерилізували з поверхні 70% етанолом протягом 2 хв і розчином гіпохлориту (3% Cl) протягом 10 хв та відмивали стерильною дистильованою

водою 5 разів по 5 хв. Далі всі маніпуляції з насінням проводили за стерильних умов. Для синхронізації проростання насіння витримували у вологих умовах при 4°C протягом 2 діб. За необхідності на цьому етапі набрякле насіння піддавали обробкам високою температурою, УФ-В та/або інкубували з антибіотиками.

У всіх експериментах крім експериментів з моделювання водного дефіциту підготовлене таким чином насіння висаджували у чашки Петрі на середовище, яке містило 0,5 МС, 1 % цукрози, 0,8 % агару, розподіляючи рівномірно по площині (115 насінин на квадратну чашку 12×12 см) або щільно. Чашки з насінням тримали при 21-24 С і фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) при інтенсивності світла 100-110 мкмоль/м²с. Для освітлення використовували люмінесцентні лампи денного світла.

3.3.2. Вирощування рослин в ґрунті

Для вирощування рослин в ґрунті використовували торф'яний субстрат «Універсальний», який містив органо-мінеральне добриво довготривалої дії. Склад: високоякісний торф, вапнякове борошно, перліт, річковий пісок, органо-мінеральні добрива з мікроелементами пролонгованої дії. Агротехнічні характеристики: рН 5,5-6,5; азот загальний (NH₄+NO₃) - 80-140 мг/л; фосфор (P₂O₅) – 100-150 мг/л; калій (K₂O) – 140-180 мг/л; мікроелементи – В, Сu, Fe, Mn, Mg, Мо, Zn. У горщик діаметром 8 см поміщали 75 г ґрунту з вологістю ~70% (від сухої маси). На ґрунт поміщали підготовлене насіння або проростки. Рослини вирощували при 21-24°C і 16/8 год (світло/темрява) при інтенсивності світла 75-100 мкмоль/м²с. Перший тиждень росту горщики покривали непроникною для вологи плівкою для запобігання швидкого висихання ґрунту, далі вологість ґрунту підтримували на рівні 60-90% (від сухої маси) шляхом поливу через піддон або на ґрунт.

3.4. Проведення експериментів

3.4.1. Обробка інгібіторами

Для інгібування HSP90 використовували антибіотики гелданаміцин (ГДА, geldanamycin, $C_{29}H_{40}N_2O_9$, мол. м. 560,64 г/моль, макроциклічний полікетид, константа дисоціації комплексу з HSP90 $K_d = 1,2$ мкМ (Roe et al., 1999), Sigma) і радицикол (РАД, radicicol, макролактон, природний макроциклічний антибіотик, $C_{18}H_{17}ClO_6$, мол. м. 364,8 г/моль, $K_d = 19$ нМ (Roe et al., 1999), Sigma) (рис. 3.1). Маточні розчини антибіотиків готували у диметилсульфоксиді (ДМСО) в концентрації 1 мг/мл, які далі використовували для приготування водних розчинів потрібної концентрації.

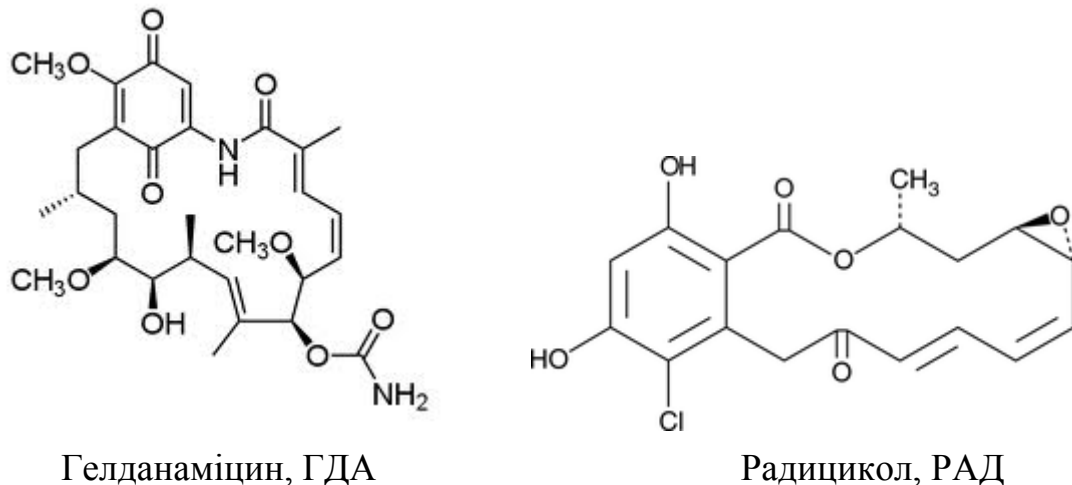


Рис. 3.1. Структурні формули гелданаміцину і радициколу.

Стерилізоване, набухле у воді протягом 2 діб насіння *A. thaliana* інкубували з 0,5 мл розчину антибіотика необхідної концентрації (вказано в кожному експерименті) в мікропробірках у стерильних умовах при кімнатній температурі у темряві протягом 24 год. У контролі насіння витримували у водному розчині розчинника ДМСО еквівалентної концентрації або у стерильній дистильованій воді. Оброблене насіння висаджували на стерильне середовище.

Обробку проростків проводили шляхом інкубації їх в 1, 10 і 100 мкМ ГДА протягом 6 год у темряві за кімнатної температури. Після обробки проростки просушували, заморожували і зберігали до аналізу при -70°C .

3.4.2. Експерименти з феномного аналізу ізогенних ліній *A. thaliana* при інгібуванні HSP90

Як ізогенний матеріал використовували лабораторні лінії Col-0 і Ler. Стерилізоване, стратифіковане насіння інкубували з розчином антибіотика. ГДА використовували в концентраціях 10^{-7} ; 5×10^{-7} ; 10^{-6} ; 5×10^{-6} ; 10^{-5} ; 5×10^{-5} М, РАД – в концентраціях 10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} М. Пророщування насіння і ріст проростків здійснювалось в умовах стерильної агаризованої культури. Аналіз фенотипів проводили на 12 добу росту проростків. Реєстрували схожість насіння, стадії росту проростків і морфологічні зміни стеблової частини. В кожному варіанті проаналізовано не менше 100 проростків.

3.4.3. Експерименти з феномного аналізу поліморфного матеріалу *A. thaliana* при інгібуванні HSP90

Поліморфний матеріал отримано трьома шляхами:

1. *Насіння рослин природних популяцій.* Стерилізоване і стратифіковане насіння інкубували з 2 мкМ ГДА. Контролем служило насіння Col-0.

2. *Опромінення ультрафіолетом В (УФ-В) насіння Col-0.* Набухле стратифіковане насіння на вологому фільтрувальному папері опромінювали УФ-В за допомогою лампи Philips TL20W при інтенсивності $2,35 \text{ Вт/м}^2$. Дози опромінення, обрані згідно з літературними відомостями (Данильченко, 2005; Гродзинський та ін., 2007), складали 0,017; 1,7; 4,1 кДж/м². Опромінення проводили в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Після опромінення насіння інкубували з 5 мкМ ГДА. Контролем служило неопромінене насіння Col-0.

3. *Опромінення гамма-променями насіння Col-0 і Ler.* Сухе насіння опромінювали гамма-променями від радіоактивного джерела ^{60}Co у дозах 0,1,

0,25, 0,5, 0,75 і 1 кГр при потужності 0,15 Гр/с. Дози опромінення обирали згідно з літературними відомостями (Гродзинский, 1989). Опромінення проводили в Інституті фізики НАН України. Опромінене насіння стерилізували, стратифікували, обробляли антибіотиком: 5 мкМ ГДА і 10 мкМ РАД. Контролем служило неопромінене насіння відповідних екотипів.

Пророщування насіння і ріст проростків проводили в умовах стерильної агаризованої культури. На 11-12 добу росту реєстрували схожість насіння, стадії росту проростків і морфологічні зміни стеблової частини, на 21 або 24 добу - частку квітучих рослин і сиру біомасу, зважуючи по 20 або 25 рослин. Експерименти проводили у трьох біологічних повторностях.

3.4.4. Експеримент з вивчення впливу інгібування HSP90 на ріст і розвиток рослин *A. thaliana*

Стерилізоване насіння *A. thaliana* (Col-0) витримували у воді протягом 2 діб при 4°C, після чого інкубували з 50 мкМ ГДА у темряві за кімнатної температури протягом 24 год; у контролі – з розчинником ДМСО в еквівалентній концентрації 2,8%. Далі насіння висаджували в горщики з ґрунтом – 10 насінин на горщик, 14 горщиків на варіант. Горщики ставили у піддон і накривали прозорою пластиковою кришкою для підтримки вологості у період проростання насіння і перший тиждень росту проростків. Піддони поміщали у ростову камеру з температурою $22 \pm 1^\circ\text{C}$ і фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) при інтенсивності світла $75 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. Через тиждень у кожному горщику залишали по одному проростку, вибираючи при цьому найближчий до центру нормально розвинений проросток. Для рандомізації умов мікросередовища кожні 2 доби проводили перестановку горщиків випадковим чином. Проведено чотири незалежних експерименти.

Аналіз фенотипів здійснювали під час переходу рослин до генеративної фази розвитку (коли перший квітконос досягав 1 см) (Sangster et al., 2007). Реєстрували вік рослин, кількість листків розетки та її діаметр, визначали

коефіцієнт кореляції між віком рослин і кількістю листків розетки за методом Пірсона.

3.4.5. Експерименти з феноного аналізу мутантів *hsp* *A. thaliana* в онтогенезі

Для аналізу впливу окремих HSP70 і HSP90 на ріст і розвиток рослин насіння ліній інсерційних мутантів *hsp* і дикого типу (Col-0) *A. thaliana* витримували на вологому фільтрувальному папері при 4°C протягом 2 діб, після чого переносили на ґрунт по 10-20 насінин на горщик, накривали плівкою для запобігання висихання у перші доби і тримали при $22 \pm 2^\circ\text{C}$, фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) та інтенсивності світла $100 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. Для освітлення використовували люмінесцентні лампи денного світла. Через 10 діб плівку знімали і залишали по 4-5 рослин на горщик. На кожну лінію приходилось по 8 горщиків. Для рандомізації умов мікросередовища кожні 2 доби проводили перестановку горщиків випадковим чином. Протягом онтогенезу проводили аналіз фенотипів. Проведено два незалежних експерименти.

3.4.6. Експерименти з впливу високої температури в умовах агаризованої культури

У роботі вивчали дію сублетальних і потенційно летальних (на межі з летальними) доз високих температур, які підбирали за даними літератури та власними підготовчими експериментами.

Для оцінки теплостійкості насіння *A. thaliana* стерилізоване набрякле насіння інкубували на водяній бані при 48°C протягом 20-60 хв. Після висаджування на середовище щодня реєстрували виживаність насіння, яку визначали за прокльовуванням зародкового кореня (Silva-Correia et al., 2014).

Для оцінки базової теплостійкості проростків *A. thaliana* в умовах стерильної культури чашки з проростками віком 5 або 12 діб піддавали дії 45°C у термостаті при освітленні протягом 30-60 хв. Для аналізу індукованої

теплостійкості проростків індукцію теплостійкості здійснювали шляхом їх інкубації при 37°C протягом 1-2 год і реадаптації при 22-24°C протягом 1-2 год, після чого піддавали дії 45°C протягом 45 хв-2,5 год. Як критерії теплостійкості використовували виживаність (за кількістю зелених проростків) і різницю в масі проростків.

Для біохімічного і молекулярно-біологічного аналізу ефектів високої температури проростки *A. thaliana* віком 5-12 діб інкубували у термостаті при сублетальній температурі 37°C, потенційно летальній температурі 45°C, а також 45°C після передобробки при 37°C і реадаптації при 22-24°C. Тривалість обробок вказується в описі результатів експериментів.

3.4.7. Експерименти з моделювання прогресуючого водного дефіциту в умовах агаризованої культури

Моделювання прогресуючого водного дефіциту в умовах стерильної культури на агаризованому середовищі проводили з *A. thaliana*, як описано Vobrownyzky (2006). Стерильне насіння висаджували у квадратні пластикові чашки Петрі (12 × 12 см) на середовище I (МС, 4,5% цукрози, 1% агару, рН 5,7). На цьому середовищі проростки вирощували протягом 6 діб до розвинення сім'ядоль і переходу рослин до автотрофного живлення. Інші умови відповідали описаному в п. 3.3.1. 6-добові проростки переносили на середовище II (0,25 МС; 80 мл на чашку), залите під кутом 0,72°, що створювало градієнт висихання зверху вниз. Проростки розміщували на одній горизонтальній лінії з однаковою товщиною середовища (2 см від верхнього краю), що в подальшому забезпечувало однакові зміни водного градієнту. Чашки з проростками закривали целофановою плівкою (Sigma), проникною для водяної пари та розміщували вертикально. У контролі проростки переносились у чашки з середовища II (40 мл) рівної товщини і закривали пластиковими кришками. Після пересадки рослини вирощували протягом 5 діб. Щодня протягом періоду посилення водного дефіциту

вимірювали довжину головного кореня і відбирали зразки проростків для аналізу генної експресії.

3.4.8. Експерименти з впливу зміненої гравітації

3.4.8.1. Експерименти з впливу зміненої гравітації і світла в умовах агаризованої культури

Вивчення впливу HSP90 у пластичних реакціях рослин на кліноостатування і гравістимуляцію проводили в умовах стерильної культури на агаризованому середовищі з *A. thaliana* дикого типу і нокаут-мутантами *hsp*. Оскільки орієнтація росту рослин у просторі регулюється двома головними факторами – гравітацією і світлом, та за даними літератури вплив HSP90 виявлявся в реакціях рослин на обидва фактори (Queitsch et al., 2002). В цій серії експериментів симуляцію окремих ефектів мікрогравітації за допомогою обертання рослин на горизонтальному кліноостаті (2 об/хв) доповнювали змінами умов освітлення. Стерильне насіння висаджували в чашки Петрі на однаковій відстані в одну лінію (по 10-25 насінин на чашку), закривали кришкою і витримували ~2 год на світлі для ініціації проростання, після чого поміщали на 6 діб в умови одного з варіантів:

1. Стационарний ріст при освітленні (контроль): чашки розміщували вертикально стационарно так, щоб насіння знаходилося на горизонтальній лінії, та витримували при освітленні 100 мкмоль/м²с.
2. Кліноостатування при освітленні: чашки прикріплювали до горизонтального кліноостату так, щоб центр чашки знаходився на осі обертання, та кліноостатували при освітленні 100 мкмоль/м²с.
3. Стационарний ріст у темряві: чашки загортали у два шари фольги та розміщували стационарно вертикально так, щоб насіння знаходилося на горизонтальній лінії.
4. Кліноостатування у темряві: чашки загортали у два шари фольги та кліноостатували.

5. Кліноостатування з точковим джерелом світла: чашки загортали у два шари фольги, у фользі з одного боку чашки робили отвір діаметром 5 мм для проникнення світла (рис. 3.2) та кліноостатували. Оскільки розміри отвору значно менше відстані між ним і проростками, це дозволяло вважати його точковим джерелом, що, за розрахунками, забезпечує потік світла $\sim 0,05$ мкмоль/с (0,07 лм).

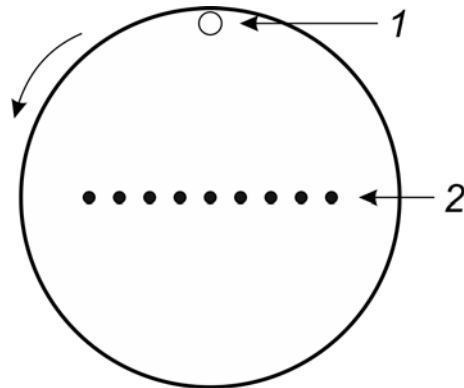


Рис. 3.2. Схема кліноостатування з точковим джерелом світла: 1 – отвір діаметром 5 мм у фользі, якою обгорнута чашка; 2 – насіння.

Наприкінці експериментів проростки фотографували, визначали довжину кореня та гіпокотилія шляхом прямого вимірювання або за допомогою програми Fiji (<https://imagej.net/Fiji>; Schindelin et al., 2012).

6. Для аналізу гравітропічної реакції квадратні чашки Петрі (12×12 см), загорнуті у фольгу, розміщували вертикально так, щоб насіння знаходилося на горизонтальній лінії. Після 4 діб росту за стаціонарних умов відмічали місцезнаходження апексу кореня та повертали чашки на 90° . Через 2 доби проростки фотографували. На дигіталізованих зображеннях визначали кут відхилення апексу кореня від напрямку росту до початку гравістимуляції з використанням програми CorelDRAW X6. Відхилення за напрямком вектору гравітації (вниз) вважали позитивним, відхилення вгору – негативним.

3.4.8.2. Експерименти з впливу кліноостатування

Експерименти з *P. sativum*. Насіння (сорти Дамір та Інтенсивний) стерилізували 0,5 % розчином NaOCl протягом 10 хв і промивали проточною трубопровідною водою 1 год. Далі насіння загортали у трубочки з вологого фільтрувального паперу, орієнтуючи мікропіле вниз, поміщали в пластиковий стакан і пророщували в темряві при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ за стаціонарних умов (контроль) або при обертанні на горизонтальному кліноостаті (2 об/хв). В експерименті з вивчення впливу кліноостатування на проростки від початку проростання відбирали зразки сухого насіння та 1-, 2-, 3-, 5- і 7-добових проростків. Перед відбором зародкових осей з сухого насіння його витримували у воді при 4°C протягом 30 хв. Зародкові вісі та проростки відділяли від сім'ядоль на холоді. Для відокремлення «ефекту положення» (ефекту симульованої мікрогравітації) від «ефекту обертання» порівнювали ефекти горизонтального і вертикального кліноостатування (2 об/хв). В експерименті з вивчення ефектів короткотермінового кліноостатування на кліноостат поміщали 3-добові проростки, зразки відбирали через 2, 4, 6, 16 і 24 год.

Для вивчення впливу кліноостатування на реакцію теплового шоку етіюльовані 5-добові проростки *P. sativum*, вирощені стаціонарно (контроль) і при кліноостатуванні, піддавали дії високої температури: 38°C (1,5 год); 40°C (1 і 2 год); 45°C (2 год); 45°C (2 год) після передобробки 38°C (1,5 год) і реадаптації при 21°C (2 год). Температурним контролем служили проростки, вирощені стаціонарно і при кліноостатуванні при $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Зразки по 100 мг заморожували і зберігали при -70°C до аналізу білків.

Експерименти з *A. thaliana*. Насіння Col-0 в чашках Петрі в умовах стерильної культури на агаризованому середовищі прикріплювали до горизонтального кліноостату так, щоб центр чашки знаходився на осі обертання, та кліноостатували при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) при інтенсивності світла $110 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$. У контролі проростки росли за стаціонарних умов. 12-добові проростки піддавали дії

37°C протягом 0,5, 1 і 2 год. Після теплової експозиції зразки проростків по 80 мг заморожували і зберігали при -70°C до аналізу генної експресії.

Для аналізу терmostійкості проростків 5- і 12-добові проростки, що росли за стаціонарних умов і при кліноостатуванні, піддавали дії 45°C протягом 45 хв. Після обробки чашки з проростками переносили в стаціонарні умови і реєстрували виживаність протягом 6 діб.

3.4.8.3. Експерименти з моделювання гіпергравітації

5-добові проростки *P. sativum* (с. Інтенсивний), вирощені в темряві при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (інше див. вище), піддавали центрифугуванню з прискоренням 3, 7, 10 і 14 g протягом 15 хв і 1 год, використовуючи центрифугу з бакет-ротором радіусом 0,65 м. Частину проростків заморожували в рідкому азоті відразу після центрифугування, іншу частину - після реадаптації. Тривалість реадаптації складала 1,5 год після 15-хвилинного центрифугування та 1,5 год і 24 год – після 1-годинного центрифугування. Контролем служили проростки, що росли стаціонарно при 1 g.

3.4.9. Експерименти з вивчення кінетики синтезу HSP у зв'язку з адаптаційною здатністю видів

Насіння *A. thaliana* (Col-0), *M. sylvestris*, *M. pulchella* і *S. sisaroides* стерилізували з поверхні послідовно 2 хв у 70% етанолі та 10 хв у розчині гіпохлориту (3 % Cl), після чого промивали проточною водопровідною водою 30 хв. Насіння мальви пророщували на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі при 22°C, проростки висаджували в ґрунт. Насіння *A. thaliana* витримували у вологих стерильних умовах у темряві при 4°C протягом 2 діб, після чого висаджували в ґрунт. Насіння *S. sisaroides* стратифікували при 4°C протягом 2 місяців, після чого пророщували на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі при 22°C, проростки висаджували в ґрунт, рослини вирощували як суходільні. Для експериментів

використовували 3-тижневі рослини *A. thaliana* на стадії розетки та 4-тижневі ювенільні рослини *M. silvestris*, *M. pulchella* і *S. sisaroides*.

Рослини піддавали впливу високої температури, затоплення і посухи. Для теплової обробки горщики з рослинами інкубували в термостаті при 37°C різні періоди часу до 48 год зі збереженням режиму освітлення. В експериментах з затопленням рослини поміщали у велику посудину з відстояною водопровідною водою так, щоб ґрунт був занурений у воду. Посуху створювали шляхом поступового підсихання ґрунту після припинення поливу. Зразки листків відбирали через певні проміжки часу від початку експерименту: при тепловій експозиції – до 48 год, при затопленні – до 10 діб, при водному дефіциті – рівномірно протягом всього періоду до стійкого в'янення листків. Зразки листків по 250-300 мг використовували для аналізу HSP, в експериментах з затоплення – ще для аналізу АДГ. В експерименті з затоплення *S. sisaroides* для аналізу АДГ також відбирали зразки коренів. Зразки заморожували і зберігали при -70°C до аналізу. В експериментах з водного дефіциту паралельно відбирали зразки ґрунту і листків для визначення вологості.

Теплостійкість рослин визначали за їх фізіологічним станом через 2 доби реадаптації при 22°C після теплової експозиції. Стійкість до затоплення визначали як період часу від початку затоплення, за який гинуло 50% рослин. Стійкість до посухи визначали за вологістю ґрунту, при якій відбувалось в'янення рослин. Для цього паралельно з відбором зразків для аналізу білків проводили визначення вмісту вологи в листках і ґрунті. В експериментах з мальвою додатковим показником стану рослин служив відсоток живих листків.

Рослини *T. natans* збирали у природі, на Русанівському каналі м. Києва у липні при температурі повітря 23°C і температурі води 20°C. Цілі рослини поміщали в посудину з річною водою для транспортування. У лабораторії рослини переносили у відстояну водопровідну воду та витримували кілька годин при температурі води 20°C. Після цього частину з них інкубували у

термостаті при 37°C, зразки пластинок плаваючих листків відбирали через різні проміжки часу протягом 24 год.

3.5. Визначення показників фізіологічного стану рослин

Визначення вмісту води в листках і ґрунті. Наважку листкових пластинок зважували і поміщали в бюкси з попередньо визначеною масою, висушували в сушильній шафі при 90°C до сталого значення. Вміст води розраховували у відсотках до сирої біомаси.

Для визначення вмісту води в ґрунті наважки ґрунту поміщали в бюкси з попередньо визначеною масою, висушували в сушильній шафі при 100°C до сталого значення. Вагову вологість ґрунту (w) – відносний ваговий вміст води в ґрунті визначали як відношення маси води в ґрунті (m_w) до маси твердої фази ґрунту (m_{sk}), виражене у відсотках або у г води на 100 г абсолютно сухого ґрунту: $w = (m_w / m_{sk}) 100$.

Визначення маси проростків як характеристики ростової активності. Для визначення маси проростків *A. thaliana*, враховуючи їх малу масу, відбирали по 10 або 25 проростків. При цьому проростки, що росли у чашці в агаризованій культурі, відбирали послідовно – зліва-направо та зверху-вниз. Такий підхід дозволяв об'єктивно оцінити центральну тенденцію та різницю між варіантами, хоча певною мірою згладжував варіабельність індивідуальних показників.

3.6. Феномний аналіз *A. thaliana*

3.6.1. Феномний аналіз проростків

Аналіз фенотипів проводили з проростками *A. thaliana*, що росли на агаризованому середовищі за стерильних умов протягом 10-12 діб. В нормі проростки такого віку мають сформовані сім'ядолі та 1-2 пари листків

розетки. В кожному варіанті проаналізовано 100-350 проростків. Для аналізу використовували кількісні та якісні ознаки.

Кількісні показники:

- відсоток пророслого насіння;
- стадії росту проростків за методикою Boyes et al. (2001) (табл. 3.1):

Частка проростків з морфологічними відхиленнями:

- відсутність/додаткова кількість органів;
- зміни форми і кольору сім'ядоль;
- зміни форми і кольору листків розетки;
- затримка розвитку (наступні листки не видно);
- порушення морфології гіпокотилія;
- ненормальна орієнтація проростка;
- порушення морфології всього проростка.

Таблиця 3.1

Стадії росту проростків *A. thaliana* (Boyes et al., 2001)

Коди	Опис
0	Насіння
0.1	Поява зародкового кореня
0.5	Ріст зародкового кореня
0.7	Поява гіпокотилія і сім'ядоль
1.00	Повне розкриття сім'ядоль
1.01	1-й листок розетки > 1 мм
1.02	2 листка розетки > 1 мм
1.03	3 листка розетки > 1 мм
1.04	4 листка розетки > 1 мм
1.05	5 листків розетки > 1 мм
1.06	6 листків розетки > 1 мм
1.07	7 листків розетки > 1 мм

3.6.2. Феномний аналіз рослин протягом онтогенезу

Рослини ліній інсерційних мутантів *hsp* і дикого типу (Col-0) *A. thaliana* вирощували в ґрунті. Для аналізу використовували кількісні морфологічні ознаки на двох фазах розвитку.

1. Перехід до генеративної стадії розвитку, коли перший квітконос досягав 1 см (Sangster et al., 2007):
 - тривалість вегетативної фази росту;
 - діаметр розетки;
 - кількість листків розетки;
 - розміри найдовшого листка (довжина і ширина листової пластинки, довжина черешка, співвідношення довжин пластинки і черешка);
2. Кінець цвітіння першого квітконосу:
 - вік рослини;
 - висота першого квітконосу;
 - кількість квіток на першому квітконосі;
 - кількість бокових гілок на першому квітконосі;
 - кількість квітконосів розетки;
 - середня довжина стебла (міжвузля) між першими 5 стручками першого квітконосу, коефіцієнт варіації (CV) цього показника як ознака індивідуального шуму розвитку.

3.7. Біохімічні методи

3.7.1. Виділення білка

Для електрофоретичного розподілу і вестерн-блотингу розчинні білки екстрагували за (Krishna, Kanelakis, 2003). Заморожені зразки гомогенізували в охолодженій порцеляновій ступці з буфером для екстракції, який містив 25 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 20 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 1 мМ протеопротектор фенілметилсульфоніл фторид (ФМСФ), у співвідношенні 200 мкл на 100 мкг рослинного матеріалу. Гомогенат центрифугували 15 хв при 12000 g и 4°C.

Частину супернатанту використовували для визначення концентрації білка за методом Bradford (1976). До аліквот супернатанту додавали буфер 0,125 М Трис-НСІ (рН 6,8), 4% додецилсульфат натрію (ДДС-На), 20% гліцерин и 5% β -меркаптоетанол у співвідношенні 1:1.

При виділенні білка з проростків *P. sativum* буфер для екстракції містив 60 мМ Трис-НСІ (рН 8,0), 60 мМ дитіотреїтол, 2% ДДС-На, 15% цукрозу і 2 мМ ФМСФ. Гомогенат прогрівали 3 хв на киплячій водяній бані та центрифугували 10 хв при 12000 g і 4°C. Білкові екстракти використовували для аналізу свіжими або заморожували до аналізу при -20°C або -70°C.

Для ІФА білки екстрагували у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ, рН 7,4).

3.7.2. Електрофоретичний розподіл білка в ПААГ

Перед аналізом зразки білка прогрівали 2 хв при 90°C. Електрофоретичний розподіл білків проводили у 10% або градієнтному 10-15% вертикальному поліакриламідному гелі (ПААГ) за денатуруючих умов (Laemmli, 1970) з використанням Mini Dual Gel (Sigma) або Hoeffer Studier II (Amersham). Аліквоти, що наносили на гель, містили однакову кількість сумарного білка, в різних аналізах – від 10 до 50 мкг, у залежності від розмірів гелю. Електрофоретичний буфер містив 25 мМ Трис, 250 мМ Gly, 0,1% ДДС-На, рН 8,3. Після електрофорезу гелі або забарвлювали Кумасі G-250, або використовували для імуноблотингу. Для визначення молекулярної маси білків використовували набори маркерів 6,5-116 кДа (Sigma) або 10-170 кДа (Fermentas).

3.7.3. Вестерн-блот-аналіз

Перенос білка з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану (Amersham) здійснювали в камері Wet Blotter (Sigma), заповненої трис-гліциновим буфером для переносу (47,9 мМ Трис-НСІ, 38,6 мМ Gly, 0,0385 % ДДС-На), при 300 мА протягом 1 год. Якість переносу оцінювали шляхом зворотного

забарвлення білків на мембрані розчином PSS (2% Ponceau S, 30% ТХО, 30% сульфосаліцилова кислота). Мембрану фотографували і переносили в буфер для блокування (3% бичачий сироватковий альбумін (БСА) або 5% сухе молоко у стандартному фосфатно-сольовому буфері (ФСБ), рН 7,4) при 4°C протягом ночі. Для імунодетекції використовували моноклональні мишачі антитіла проти HSP70 (H5147, Sigma) і HSP90 (H1775, Sigma), що здатні зв'язувати як конститутивні, так і індукцйбельні цитозольні ізоформи. Імунохімічну реакцію проводили протягом 2 год при кімнатній температурі, антитіла використовували в оптимальних концентраціях. Вторинними антитілами були анти-мишачі IgG, зв'язані з біотином, у розведенні 1:10000 (Sigma). Антитіла розводили в ФСБ, що містив 1% сухого молока. Після кожної інкубації з антитілами мембрану тричі промивали в ФСБ, який містив 1% сухого молока і 0,1% Tween 20. Вторинні антитіла візуалізували за допомогою екстравідин-пероксидазної системи. Активність пероксидази виявляли шляхом інкубації мембрани в розчині 0,02% тетрагідрохлориду 3,3'-діамінобензидину (Sigma) і 0,02% перекису водню в цитрат-фосфатному буфері (рН 5,0). Контроль за однаковою кількістю сумарного білка у пробах, нанесених на гель, здійснювали одним з трьох способів: шляхом паралельної імунодетекції актину; за білковими треками, забарвленими Кумасі в ПААГ; за білковими треками, забарвленими Ponceau S на мембрані. Аналіз зразків кожного варіанта проводили щонайменше в 3-кратній повторності.

3.7.4. Нативний електрофорез та гістохімічне забарвлення АДГ в гелі

Для аналізу алкогольдегідрогенази (алкоголь:НАД-оксидоредуктаза, АДГ, К.Ф. 1.1.1.1) 0,3 г листової пластинки розтирали з 0,5 мл розчину для гомогенізації в охолодженій порцеляновій ступці з макогоном. Розчин містив 0,1 М Трис-НСl (рН 7,0), 10% гліцерин, 0,5% ДТТ, 1% Тритон X100, центрифугували протягом 5 хв при 5000 об/хв і 4°C. Загальний вміст білка в супернатанті вимірювали за методом Bradford (1976). На гель наносили

10 мкг сумарного білка кожного зразка. Нативний електрофоретичний розподіл сумарних розчинних білків проводили в 6%-ному ПААГ. Для виявлення ферментативної активності в гелі за (Сантос и др., 2003) використовували гістохімічне забарвлення з розчином, який містив 10 мМ НАД, 10 мМ нітросиній тетразолій, 10 мМ феназинметасульфат і 0,6% етанол у 1 М Трис Трис-НСІ буфері, рН 8,0.

Білкові та ізоферментні спектри аналізували за допомогою програм ImageMaster Total.Lab version 2.00 (Amersham) та GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>).

3.7.5. Гістохімічне забарвлення АДГ в коренях

Для визначення локалізації АДГ в коренях використовували гістохімічне забарвлення за (Porterfield et al., 1997). Кінчики коренів завдовжки 1–3 см інкубували в мікропробірках у розчині, що містив 3 мМ MgCl₂, 1% цукрозу, 0,6 мМ нітросиній тетразолій, 1 мМ феназинметасульфат, 0,5 мМ НАД, 2% полівінілпіролідон, 0,01% Твін 20, 0,5 мМ етанол в 20 мМ какодилатному буфері (рН 7,4). Забарвлення проводили при температурі 40°C у темряві протягом 40 хв. Забарвлені корені фотографували за допомогою світлового мікроскопу Stemi SV6 (Zeiss). У кожному варіанті аналізували 7–10 коренів.

3.7.6. Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA)

Для ІФА HSP70 і HSP90 використовували екстракти білка у ФСБ (рН 7,4). В підготовчому експерименті методом послідовних розведень білкового екстракту визначено найбільш ефективну концентрацію сумарного білка 15,6 мкг/мл. На основі цього на планшет наносили аліквоти білка по 15,6 мкг в 4 аналітичних повторностях. Для детекції HSP70 і HSP90 використовували моноклональні антитіла (див. п. 3.7.3) у ФСБ при розведенні 1:5000 і 1:400, відповідно. Вторинними антитілами служили антимишачі IgG, кон'юговані з пероксидазою (Sigma). Виявлення активності пероксидази проводили за допомогою субстрату 2,2-азино-біс(3-

етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) (ABES, Sigma). Оптичну щільність реєстрували з використанням імуноферментного аналізатора (Bio-Rad) при довжині хвилі 405 нм.

3.8. Молекулярно-біологічні методи

3.8.1. Аналіз фрагментації ДНК індивідуальних клітин методом геле-мікроелектрофорезу (метод ДНК-комет)

Аналіз проводили згідно з (Cerda et al., 1997; Menke et al., 2001; Khan et al., 2002). Приготування суспензії ядер проводили у темній кімнаті з червоним світлом. 100-150 мг насіння обережно роздавлювали у порцеляновій ступці, додавали 1 мл охолодженого ФСБ (160 мМ NaCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 4 мМ NaH₂PO₄, рН 7,0). Гомогенат переносили в склянку та колювали (~500 кол/хв) у льоді 5-7 хв. Далі суспензію фільтрували через нейлонові фільтрувальні сітки з розмірами пор 200 і 100 мкм. Мікропробірки з фільтратом поміщали на лід на 30 хв для осідання крохмалю і фрагментів тканин. 100 мкл надосадової суспензії змішували з 200 мкл теплої (42°C) легкоплавкої 0,8% агарози (Sigma), дві краплі цієї суміші по 80 мкл наносили на предметне скло, заздалегідь покрите плівкою 1%-ї тугоплавкої агарози, і накривали покривним скельцем. Для застигання агарози предметне скло зі зразками витримували при 4°C протягом 15 хв, після чого обережно знімали покривні скельця. Для лізису клітин предметне скло із залитим в гель матеріалом на 30 хв поміщали в трис-боратний буфер (ТББ) (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA, рН 8,4), що містив 2,5% ДДС-Na. Після лізису скло витримували в ТББ протягом 5 хв для видалення ДДС-Na і поміщали в електрофоретичну камеру з ТББ. Електрофорез проводили при 30 В (1 В/см), 15 мА протягом 4 хв. Після електрофорезу гелі на склі зневоднювали послідовно у 70% і 96% етанолі по 5 хв і висушували при 30°C. На сухі агарозні гелі наносили по 40 мкл водного розчину бромистого етидію (5 мкг/мл) для забарвлення ДНК і покривали покривним скельцем. Зйомку

ДНК-комет проводили за допомогою конфокального флуоресцентного мікроскопу LSM 5 PASCAL (ZEISS, Німеччина) при збільшенні $\times 400$. Дигітальні зображення комет аналізували за допомогою комп'ютерної програми CometScore (TriTek CometScore Freeware 1.6.1.13), визначали довжину хвоста комети і % ДНК у хвості комети (сумарна інтенсивність забарвлення хвоста комети / сумарна інтенсивність забарвлення всієї комети) (рис. 3.3). В кожному варіанті визначали $M \pm SE$ і SD з трьох незалежних експериментів, в кожному з яких вимірювали 100-125 ядер з 4 гелів.

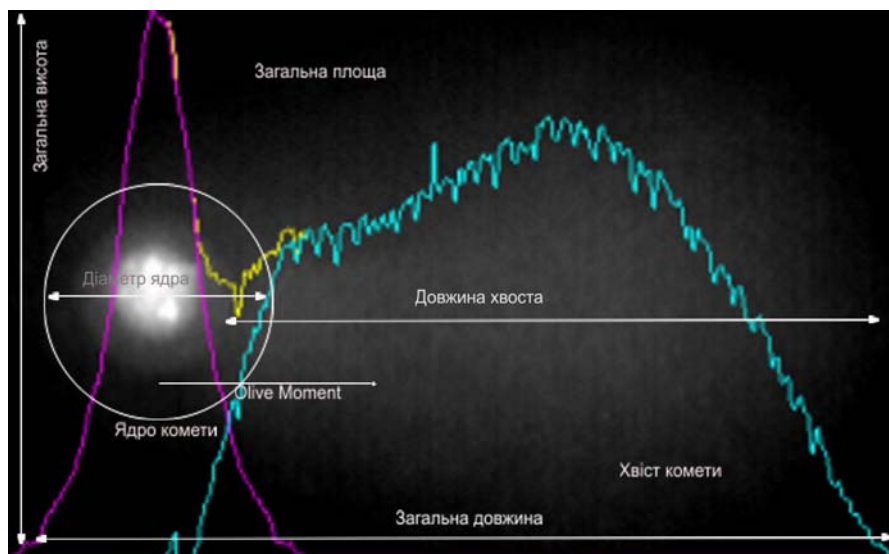


Рис. 3.3. Діаграма комети з показниками, які використовувалися для аналізу в програмі CometScore.

3.8.2. Виділення загальної ДНК

Загальну ДНК виділяли ЦТАБ-методом з деякими модифікаціями (Weigel, Glazebrook, 2002). Наважку рослинної тканини (~ 100 мг) розтирали у мікропробірці з 500 мкл ЦТАБ-буферу (2% ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 100 мМ трис-НСl, рН 8,0). Гомогенат інкубували при 65°C протягом 30 хв, після цього охолоджували до кімнатної температури і додавали 500 мкл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1), перемішували 1 хв і центрифугували 4 хв при 13500 об/хв. Водну фазу переносили у чисту пробірку, додавали 0,7 об'єму ізопропанолу для осадження ДНК,

перемішували, інкубували 10 хв при кімнатній температурі та центрифугували 15 хв при 13500 об/хв. Осад ДНК промивали 500 мкл 70% етанолу, центрифугували при 10000 об/хв протягом 1 хв, супернатант видаляли, ДНК підсушували і розчиняли у 50 мкл буферу TE (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА). Проби зберігали при -70°C .

Концентрацію ДНК вимірювали спектрофотометрично за оптичною щільністю (E) при довжині хвилі 260 та 280 нм на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ Спектр) за стандартною методикою. При $E_{260}/E_{280} \sim 1,8$ проба ДНК вважалась достатньо чистою.

3.8.3. Виділення загальної РНК

Для запобігання деградації РНК робочі поверхні попередньо обробляли RNaseZap (Thermo Scientific). Наважку рослинного матеріалу (~ 100 мг) заморожували у рідкому азоті та гомогенізували у порцеляновій ступці. Загальну РНК екстрагували з використанням unniPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena) відповідно до інструкції виробника. РНК розчиняли у деіонізованій воді, вільної від РНКаз. Проби зберігали при -70°C .

Якість виділеної РНК перевіряли спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Оптичну щільність препарату РНК вимірювали на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ Спектр). При $E_{260}/E_{280} \geq 2,0$ проба РНК вважалась достатньо чистою. Концентрацію РНК розраховували на основі спектрофотометричних даних за стандартною методикою.

3.8.4. Електрофорез ДНК в агарозному гелі

Електрофоретичний розподіл ДНК проводили за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 1,5% агарозному гелі в буфері 1x TAE (40 мМ трис-ацетат, 2 мМ ЕДТА, рН 7,5). Для візуалізації фрагментів ДНК до гелю додавали бромистий етидій до концентрації 0,5 мкг/мл. Для нанесення на гель аліквоту ДНК змішували з 6x буфером для нанесення ДНК (Fermentas, Литва). Для визначення розмірів фрагментів використовували

маркер молекулярної маси FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific). Електрофорез проводили при напрузі 5 В/см протягом 1 год. Зображення електрофореграм отримували в УФ за допомогою цифрової системи DNA Analyzer та комп'ютерної програми ULEAD Video Studio.

3.8.5. Електрофорез РНК в агарозному гелі

Для визначення якості виділеної РНК проводили денатуруючий електрофорез в 1% агарозному гелі, що містив 2,2 М формальдегіду в буфері I (20 мМ MOPS, 10 мМ ацетат натрію, 1 мМ ЕДТА, рН 7,0). Перед нанесенням на гель 3 мкл зразку РНК змішували з 7 мкл суміші для завантаження (0,2 мкл 50х буферу I, 1,75 мкл 37% формальдегіду, 5 мкл формаміду, 0,01 мкл бромистого етидію), інкубували при 65°C протягом 10 хв, після чого додавали 1 мкл буферу для нанесення РНК на гель (50% гліцерин, 1 мМ ЕДТА, 0,1% бромфеноловий синій, 0,1% ксиленціанол). Електрофорез проводили при напрузі 5 В/см протягом 40-60 хв.

3.8.6. Конструювання праймерів для аналізу експресії генів

Нуклеотидні послідовності генів *HSP70* і *HSP90 A. thaliana* брали у базі даних Американського Національного Центру Біотехнологічної Інформації NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Пари праймерів конструювали за допомогою комп'ютерної програми IDT PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Враховуючі високу гомологію генів цитозольних HSP90, кількість транскриптів трьох (*AtHSP90-2*, -3, -4) або чотирьох (*AtHSP90-1*, -2, -3, -4) аналізували сумарно за допомогою однієї пари праймерів.

Температуру відпалу праймерів (T_a) на ДНК розраховували за формулою:

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C},$$

де T_m – температура плавлення праймеру, яку розраховували за допомогою

Олігонуклеотидні праймери для ЗТ-ПЛР

Ген	Код AGI	Послідовність нуклеотидів (від 5' до 3')	T _a , °C
<i>AtHSP70-1</i>	At5g02500	F: TGCCTACGGTCTTGACAA R: ACCTGGATCAACACACCG	56
<i>AtHSP70-2</i>	At5g02490	F: TGGCCTTTCACATATCATC R: TAGAAGTCAGCTCCACCA	52
<i>AtHSP70-3</i>	At3g09440	F: CCCTTCACGCTCAAATCT R: TCCTCCAGCGGTTTCAAG	55
<i>AtHSP70-4</i>	At3g12580	F: TCAAGCGGATAAGAGTCACT R: CTCGTCCGGGTTAATGCT	56
<i>AtHSP70-5</i>	At1g16030	F: TGTCGGAGTTTGGATGAAT R: CTGTCTCAAGTCCAAGGCTA	54
<i>AtHSP70-6</i>	At4g24280	F: AGTGCCTTCTTCGGTACA R: GGACACTCAAGCTTAACATTATT	55
<i>AtHSP70-7</i>	At5g49910	F: GGTGATCCTTGTTGGTGG R: ATCTCAACGCTTGTCTGTC	55
<i>AtHSP70-9</i>	At4g37910	F: GCTGCTGCACTATCATATGG R: CACGGAGGATACCACCTT	55
<i>AtHSP70-10</i>	At5g09590	F: CGTTTCTCTCCTTCTCA R: TTTGGCTAGGTCTATTCCC	54
<i>AtHSP70-11</i>	At5g28540	F: ACTAAGATGAAGGAGACAGCT R: ACTTGGTGCTGACTACTTAGA	56
<i>AtHSP70-12</i>	At5g42020	F: ACTAAGATGAAGGAGACAGCC R: TTGGTGCTGACTGCTTAGA	56
<i>AtHSP70-14</i>	AT1G79930	F: AGAGCCAGAGCCAATAACCTC R: TATCAAATACTTGGGAGCCCC	55
<i>AtHSP90-1</i>	At5g52640	F: GTTACCCTATCTACCTTTGGACCG R: CTGCTTGTTGATGAGTTCCCAC	58
<i>AtHSP90-2+</i> <i>AtHSP90-3+</i> <i>AtHSP90-4</i>	At5g56030 At5g56010 At5g56000	F: GCTACCCAATCTCTCTGGATT R: GACTCCTCCTTGTTGATCTCCTC	58
<i>AtHSP90-5</i>	At2g04030	F: GTCACAAGGAGGTGTTTCTC R: GCTAGTTCCCAATCCCAATAC	55
<i>AtHSP90-6</i>	At3g07770	F: GAGACAAGAACGAGGAGAAAG R: AGTGCTGCGTCATACATAAG	55
<i>AtHSP90-7</i>	At4g24190	F: CTGGTGAGAACGATGAGAAG R: CTGGGTCTGTGAAGAAGATG	55
<i>AtHSP90c</i> (<i>AtHSP90-1+</i> <i>AtHSP90-2+</i> <i>AtHSP90-3+</i> <i>AtHSP90-4</i>)	Див. вище	F: GCTTCCAAGCTGAGAT R: ACTTCCTCCATCTTGCT	52
<i>AtUBQ5</i>	AT3G62250	F: AACCTTGAGGTTGAATCATCC R: GTCCTTCTTTCTGGTAAACGT	55

Примітка. T_a – температура відпалу праймерів.

програми Thermo Scientific Web Tools. Нуклеотидні послідовності праймерів для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) після зворотної транскрипції (ЗТ) наведені у таблиці 3.2.

Головними вимогами до праймерів для ЗТ-ПЛР у реальному часі були відсутність неспецифічного продукту ПЛР, невелика довжина амплікону, близька T_m між праймерами пари, відсутність вторинних структур, наявність при електрофоретичному аналізі продукту ПЛР очікуваного розміру і виражений пік його плавлення (Real time PCR handbook, Applied Biosystems, http://www.ffclrp.usp.br/divulgacao/emu/real_time/manuais/Apostila%20qPCR-Handbook.pdf). Нуклеотидні послідовності праймерів для ЗТ-ПЛР у реальному часі наведено у таблиці 3.3. Специфічність кожної пари праймерів контролювали за допомогою аналізу кривої плавлення та електрофорезу в агарозному гелі.

Таблиця 3.3

Олігонуклеотидні праймери для ЗТ-ПЛР у реальному часі

Ген	Послідовність нуклеотидів (від 5' до 3')	Довжина амплікону, п.н.	T_a , °C
<i>AtHSP70-1</i>	F: AAACCCTAGCCGCCTTATTC R: GATAGCTGGTCCTTCTCCTTTAC	104	57
<i>AtHSP70-2</i>	F: AGCTTGTGAGAGAGCAAAGAG R: ACGGGTGATTGGAGAATAGA	103	57
<i>AtHSP70-3</i>	F: GACATTAGTGGAAACCCGAGAG R: GTCTGAGCCGTAGATGACAAAG	86	57
<i>AtHSP70-4</i>	F: AGGGCACGAACAAAGGACAACAAC R: TCAGCCGACACATTCAGGATACCA	124	57
<i>AtHSP70-5</i>	F: GGAGCTATCTCTGGGCTTAATG R: GGCCTTCGTACCCTTCTTATC	93	57
<i>AtHSP90-1</i>	F: GTTACCSTATCTACSTTTGGACCG R: CTGCTTGTTGATGAGTCCCAC	188	60
<i>AtHSP90-2 + AtHSP90-3 + AtHSP90-4</i>	F: GCTACCCAATCTCTCTCTGGATT R: GТАCTCCTCCTTGTTGATCTCCTC	232	59
<i>AtUBQ5</i>	F: AACCCSTTGAGGTTGAATCATCC R: GTCCTTCTTTCTGGTAAACGT	426	55

Примітка. Коди AGI як в таблиці 3.2; T_a – температура відпалу праймерів.

Синтез всіх праймерів, використаних у роботі, здійснювався компанією «Metabion International AG» (Німеччина) за посередництва «Біолабтех» (Україна).

3.8.7. Зворотна транскрипція

Загальну РНК кожного зразку використовували для синтезу кДНК за допомогою RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific) і праймеру oligo(dT)₁₈ відповідно до інструкції виробника. Суміш 1 мкг РНК і 1 мкл праймеру в загальному об'ємі 12 мкл денатурували при 65°C протягом 5 хв, після чого переносили на лід, додавали 4 мкл 5x реакційного буферу, 1 мкл інгібітору рибонуклеаз RiboLock RNase Inhibitor (20 е.а./мкл), 2 мкл суміші 10 мМ дНТФ, 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid M-MLV Reverse Transcriptase (200 е.а./мкл). Суміш інкубували при 42°C протягом 1 год, реакцію зупиняли нагріванням до 70°C протягом 10 хв. Синтез кДНК проводили за допомогою ампліфікатора Терцик (ДНК-Технологія, Росія). Отриману кДНК використовували як матрицю для ПЛР або ПЛР у реальному часі.

3.8.8. Полімеразна ланцюгова реакція після зворотної транскрипції

Матрицею для ПЛР служила кДНК, отримана в результаті ЗТ. Реакцію проводили з використанням набору реагентів PCR Master Mix (Thermo Scientific) і ген-специфічних праймерів (табл. 3.2) відповідно до інструкції виробника. Реакційна суміш, загальним об'ємом 25 мкл на пробу, містила 1 мкл кДНК, по 0,5 мкл 10 мкМ розчину прямого і зворотного ген-специфічних праймерів і 12,5 мкл PCR Master Mix. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора Терцик згідно з наступним протоколом:

1. Первинна денатурація при 95°C, 2 хв;
25 циклів (стадії 2-4):
2. Вторинна денатурація при 95°C, 30 с;

3. Відпал праймерів, температура обиралась у залежності від температури плавлення праймерів – від 52°C до 58°C (табл. 3.2), час відпалу – 45 с;
4. Елонгація при 72°C, 90 с;
5. Фінальна елонгація при 72°C, 5 хв;
6. Зберігання при 4°C до кількох годин.

Кількість транскриптів кожного гена вимірювали в трьох незалежних біологічних зразках з двома-трьома аналітичними повторами.

Для аналізу сумарної кількості транскриптів цитозольних HSP90 за (Yamada et al., 2007), враховуючи великий розмір ампліконів (2072-2075 п.н.), ПЛР проводили з використанням праймерів *AtHSP90c* згідно з наступним протоколом:

1. Первинна денатурація при 95°C, 2 хв;
- 25 циклів (стадії 2-4):
2. Вторинна денатурація при 95°C, 30 с;
 3. Відпал праймерів при 50°C, 45 с;
 4. Елонгація при 72°C, 210 с;
 5. Фінальна елонгація при 72°C, 15 хв;
 6. Зберігання при 4°C до кількох годин.

AtUBQ5 служив референтним геном. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в агарозному гелі, візуалізували за допомогою бромистого етидію в УФ і фотографували. Оцінку кількості ДНК в кожній смузі проводили шляхом сканування дигітального зображення електрофореграм за допомогою програми GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>).

3.8.9. Рестрикційний аналіз ампліфікованої кДНК

Ампліфіковані фрагменти кДНК чотирьох цитозольних генів HSP90, синтезовані методом ЗТ-ПЛР з використанням праймерів *AtHSP90c*, різали рестриктазами Eco147I (StuI), XhoI і Bsu15I (ClaI) (ThermoScientific) відповідно до інструкції виробника:

- Eco147I (E, StuI) – сайт рестрикції AGG[^]CCT.

- XhoI (X) – сайт рестрикції C[^]TCGAG.
- Bsu15I (B, ClaI) – сайт рестрикції AT[^]CGAT.

10 мкл кДНК інкубували з одним з ферментів при 37°C протягом 5 хв. Фрагменти кДНК після реакції розділяли в агарозному гелі та візуалізували за допомогою бромистого етидію в УФ. Кількість транскриптів вимірювали в двох незалежних біологічних зразках з двома аналітичними повторами.

3.8.10. Полімеразна ланцюгова реакція після зворотної транскрипції у режимі реального часу (кількісна ЗТ-ПЛР)

Матрицею для кількісної ПЛР була кДНК, отримана у результаті ЗТ. Реакцію проводили з використанням ген-специфічних праймерів (табл. 3.3) і набору реагентів Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific) за інструкцією виробника. Реакційна суміш загальним об'ємом 10 мкл на пробу містила 0,5 мкл кДНК, 5 мкл Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix і по 0,5 мкл прямого і зворотного ген-специфічних праймерів (10 пМ). ПЛР у режимі реального часу проводили з використанням ампліфікатора iQ5 (Bio-Rad) згідно з наступним протоколом:

1. Первинна денатурація при 95°C, 2 хв;
40 циклів (стадії 2-4):
2. Вторинна денатурація при 95°C, 20 с;
3. Відпал праймерів при 60°C, 30 с;
4. Елонгація при 72°C, 40 с;
5. Фінальна елонгація при 72°C, 4 хв;
6. Режим кривої плавлення: 95°C, 1 хв; 55°C, 1 хв; 40 циклів по 30 хв з підйомом температури на 0,5°C у кожному циклі.

Рівень флюоресценції вимірювали на етапі синтезу ампліконів. Після ампліфікації якість отриманого продукту перевіряли за допомогою вивчення кривої плавлення (рис. 3.4), а також електрофорезу в агарозному гелі. Кількість транскриптів кожного гена вимірювали в трьох незалежних біологічних зразках з трьома аналітичними повторами. Експресію *AtUBQ5*

використовували як внутрішній контроль для нормалізації кількості транскриптів кожного зразка. Відносний рівень експресії генів розраховували методом $\Delta\Delta C_t$ відносно рівня транскриптів у контрольному варіанті.

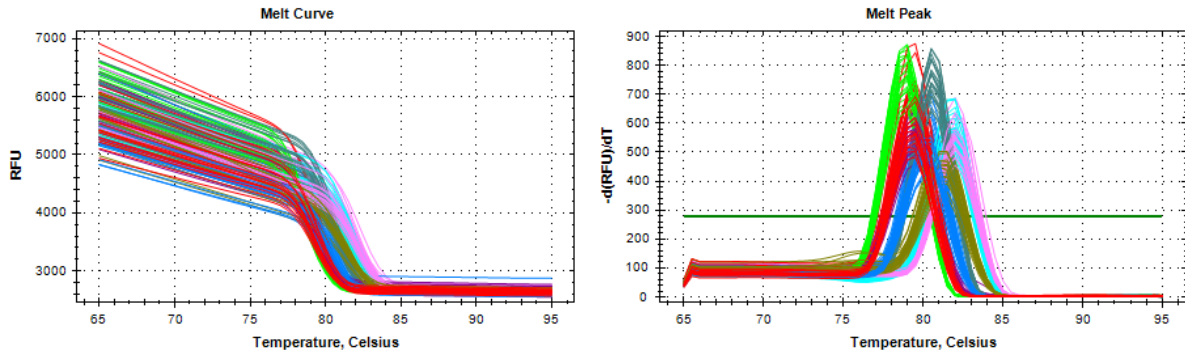


Рис. 3.4. Приклад кривих плавлення продуктів кількісної ЗТ-ПЛР.

3.8.11. Ідентифікація вставки Т-ДНК, відбір гомозиготних інсерційних мутантів і перевірка експресії генів

Відбір гомозиготних ліній Т-ДНК-мутантів *A. thaliana* по окремих генах *HSP70* і *HSP90* з колекцій SALK і SAIL (NASC) (табл. 3.4) проводили методом ПЛР.

Таблиця 3.4

Праймери для генотипування мутантів *A. thaliana* з Т-ДНК-вставкою

Ген	Код AGI	ABRC N (NASC N)	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'
<i>AtHSP90-1</i>	AT5G52640	SALK_007612 (N507614)	LP: TCAGACCCAACCTCAACATCC RP: TGACCAATGACTGGGAAGATC
<i>AtHSP90-4</i>	AT5G56000	SALK_147967 (N647967)	LP: CTGGAATTTGCATCTTTTTGC RP: GAGTATGGCTGGACTGCAAAC
<i>AtHSP70-5</i>	AT1G16030	SAIL_839_A08C1 (N867277)	LP: AACATTGATTTGAGGAACCCC RP: AGTCGCTGAGGCTTTCTTAGG
<i>AtHSP70-14</i>	AT1G79930	SALK_082815C (N663129)	LP: AGAGCCAGAGCCAATAACCTC RP: TATCAAATACTTGGGAGCCCC
Праймер, специфічний до Т-ДНК (SALK)			LBb1.3: ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
Праймер, специфічний до Т-ДНК (SAIL)			LB3: TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCT CGATACAC

Для реакції використовували специфічні до Т-ДНК праймери LBb1.3 (SALK) і LB3 (SAIL) та ген-специфічні праймери, що фланкують місце вставки Т-ДНК. Схема розташування праймерів представлена на рисунку 3.5. Для їх конструювання використовували SALK site iSect tool (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

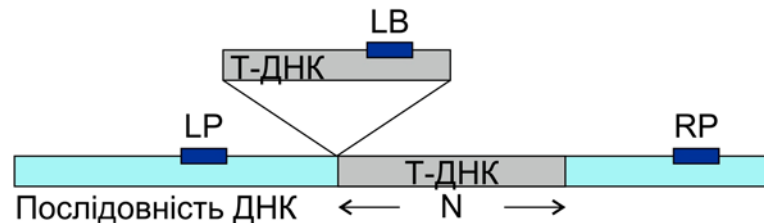


Рис. 3.5. Схема розташування послідовностей, гомологічних праймерам: LB – праймер, специфічний до Т-ДНК, LP і RP – ген-специфічні праймери.

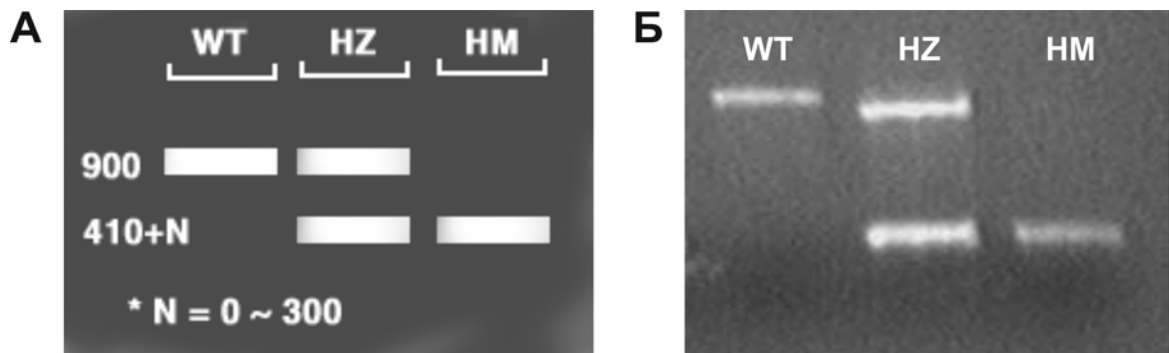


Рис. 3.6. Система ідентифікації вставки Т-ДНК з трьома праймерами LB+LP+RP (див. рис. 3.5). Схема (А) і фрагмент електрофореграми (Б) з продуктами ПЛР у гелі: WT – дикий тип, HZ - гетерозигота, HM – гомозигота.

Для ідентифікації гомозигот за вставкою проводили ПЛР з трьома праймерами (LB+LP+RP) (рис. 3.6) або праймерами попарно. Реакційна суміш містила 1 мкл ДНК (0,1-1 мкг), по 0,5 мкл 10 мкМ праймерів і 12,5 мкл Master Mix (Thermo Scientific) у загальному об'ємі 25 мкл. ПЛР проводили в ампліфікаторі Терцик згідно з наступним протоколом:

1. Первинна денатурація при 95°C, 2 хв;
35 циклів (стадії 2-4):
2. Вторинна денатурація при 95°C, 30 с;
3. Відпал праймерів, температура варіювала у залежності від температури плавлення праймерів від 55°C до 58°C, час відпалу – 45 с;
4. Елонгація при 72°C, 1 хв;
5. Фінальна елонгація при 72°C, 5 хв;
6. Зберігання при 4°C до кількох годин.

Контролем служили рослини *A. thaliana* екотипу Col-0, на основі якого створені ці Т-ДНК-мутанти.

Відповідність розмірів продуктів ПЛР для кожного мутанта теоретично очікуваним перевіряли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (рис. 3.7-3.10, А). Відсутність транскриптів *HSP* додатково підтверджено методом ЗТ-ПЛР на кДНК, отриманої на РНК з 10-12 проростків мутантів і дикого типу (рис. 3.7-3.10, Б). Для перевірки транскрипції індукцибельних генів *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5* частину проростків піддавали 37°C протягом 1 год для їх індукції.

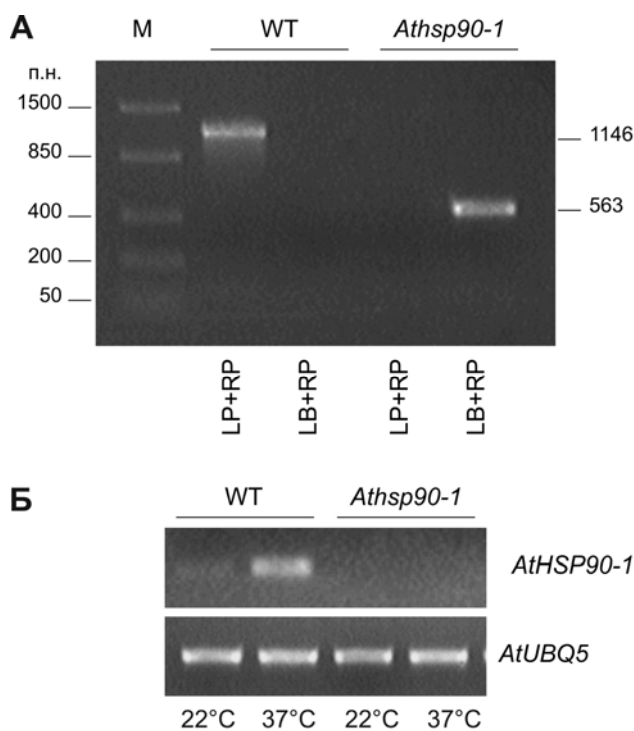


Рис. 3.7. Ідентифікація гомозиготної лінії нокаут-мутанта *Athsp90-1*: (А) ПЛР з праймером LB, специфічним до Т-ДНК, і ген-специфічними праймерами LP і RP; (Б) ЗТ-ПЛР *AtHSP90-1*.

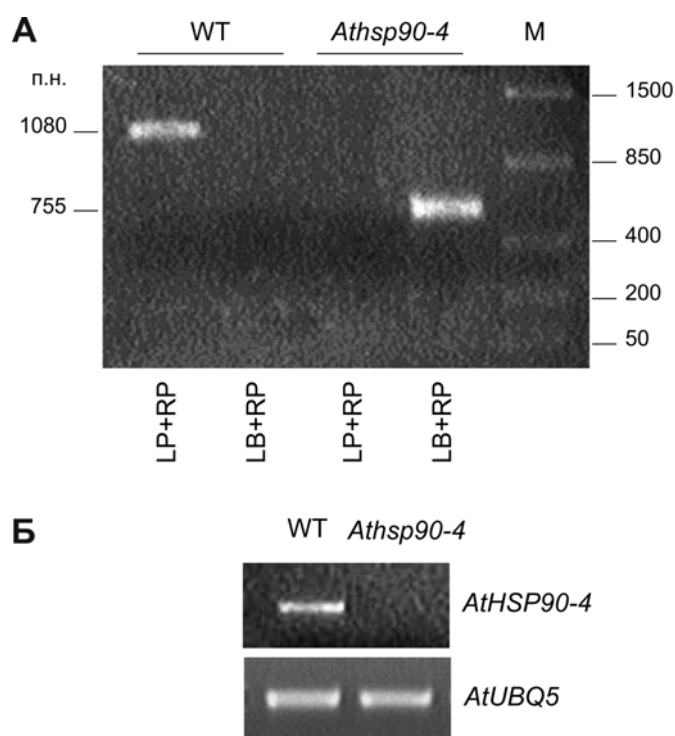


Рис. 3.8. Ідентифікація гомозиготної лінії нокаут-мутанта *Athsp90-4*: (А) ПЛР з праймером LB, специфічним до Т-ДНК, і ген-специфічними праймерами LP і RP; (Б) ЗТ-ПЛР *AtHSP90-4*.

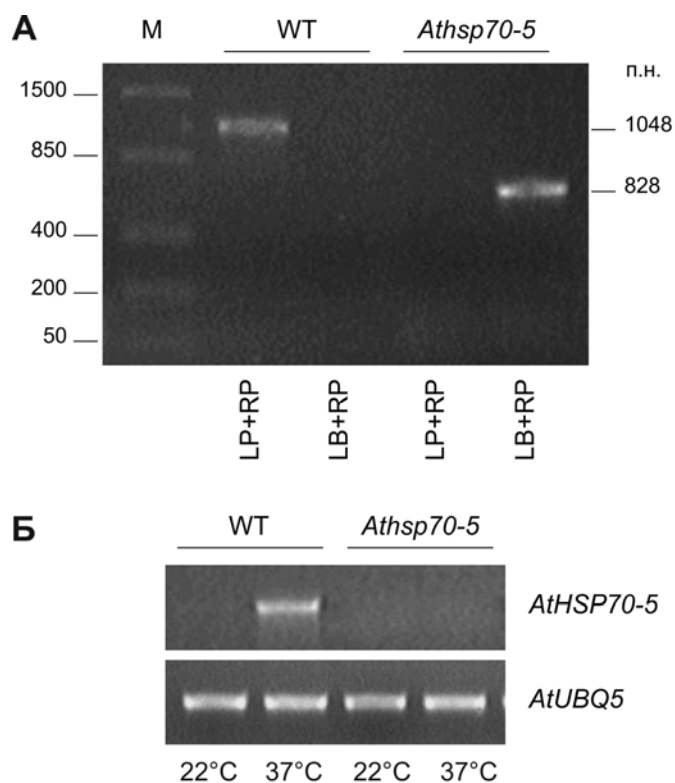


Рис. 3.9. Ідентифікація гомозиготної лінії нокаут-мутанта *Athsp70-5*: (А) ПЛР з праймером LB, специфічним до Т-ДНК, і ген-специфічними праймерами LP і RP; (Б) ЗТ-ПЛР *AtHSP70-5*.

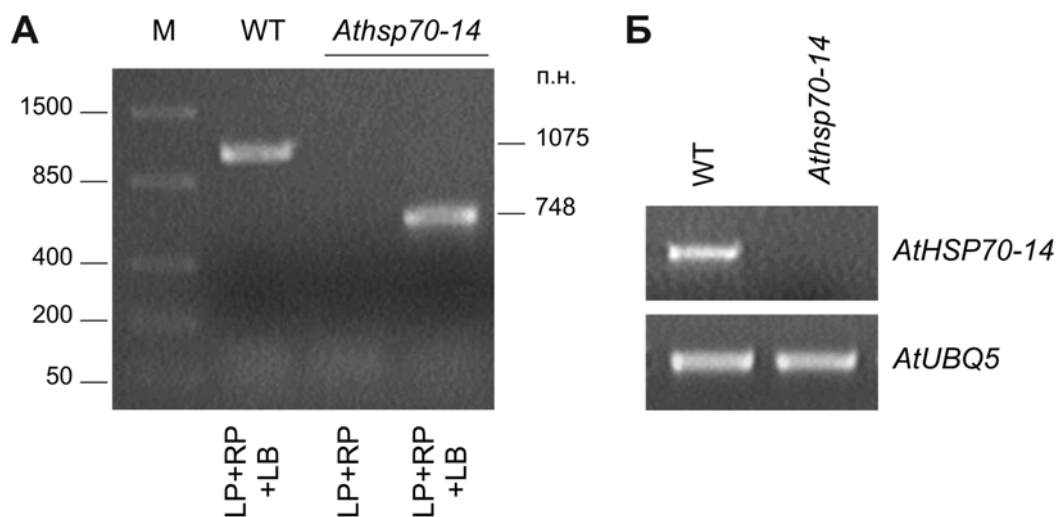


Рис. 3.10. Ідентифікація гомозиготної лінії нокаут-мутанта *Athsp70-14*: (А) ПЛР з праймером LB, специфічним до Т-ДНК, і ген-специфічними праймерами LP і RP; (Б) ЗТ-ПЛР *AtHSP70-14*.

3.8.12. Ідентифікація вставки Ds у трансгенних ліній

За схемою, аналогічною схемі визначення T-ДНК, проводили ідентифікацію вставки транспозону gene-Trap Ds із сигнальним геном *uidA*, що кодує β-глюкуронідазу (GUS), під контролем промоторів генів *AtHSP90-2* і *AtHSP70-10* у трансгенних ліній *A. thaliana* з колекції JIC Gene Trap (GT) (NASC). Для ПЛР використовували праймер Spm32c, специфічний до Ds-вставки, і два ген-специфічні праймери (табл. 3.5). Конструювання праймерів проводили за протоколом John Innes Centre Genome Laboratory (<http://signal.salk.edu/database/T-DNA/SM.435.pdf>).

Таблиця 3.5

Праймери для ідентифікації транспозонної вставки ДНК у трансгенних ліній *A. thaliana*

Ген	Код AGI	ABRC N (NASC N)	Нуклеотидна послідовність, 5'–3'
<i>AtHSP90-2</i>	AT5G56030	GT_3_103910 (N166718)	SMF: ACTTGCACTAACGCCAAGTTC SMR: TGTCTTGTAACCGGCGAATAC
<i>AtHSP70-10</i>	AT5G09590	GT_5_106091 (N168513)	SMF: ATTTATCACAGCCGATGCATC SMR: TGATCTCGTTGAGATCATCC
Праймер, специфічний до Ds-вставки (GT)			Spm32c: TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAG

Контролем служили рослини екотипу *Ler*, на основі якого створено ці трансгени. Візуалізацію продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофоретичного розподілу в агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм.

3.8.13. Цитохімічне забарвлення β-глюкуронідази (GUS)

Аналіз проводили за (Weigel, Glazebrook, 2002) з модифікаціями. Проростки трансгенних ліній *A. thaliana* GT_5_106091 і GT_3_103910 фіксували у фіксаторі (4% формальдегід у 0,1 М фосфатному буфері рН 7,0) протягом 30 хв на холоді, після чого кілька разів промивали у буфері та інкубували з субстратним розчином (0,05 М фосфатний буфер, 1 мМ $K_4Fe(CN)_6$, 1 мМ $K_3Fe(CN)_6$, 0,05% 5-бромо-4-хлоро-3-індоліл-β-D-

глюкуронід (X-Gluc) у темряві при кімнатній температурі протягом ночі. Після забарвлення проростки промивали дистильованою водою. Хлорофіл з тканин відмивали 70% етанолом. Проростки фотографували за допомогою камери Canon 700D з макрооб'єктивом Canon EF 100 мм та мікроскопа Axio Vision Zeiss (Німеччина). В кожному варіанті обстежували 10-20 проростків.

3.9. Статистична обробка результатів експериментів

Статистичний аналіз даних здійснено згідно з (Реброва, 2002) з використанням пакета Statistica 6.0. Кількісні дані представлені у вигляді середнього значення (M), його стандартної помилки (SE) та стандартного (середньо квадратичного) відхилення (SD). Останнє приводили за необхідності показати розсіяння елементів вибірки навкруги середнього значення. Щоб охарактеризувати центральну тенденцію, розкид значень у вибірці та асиметрію їх розподілу, представляли медіану (Me), нижню та верхню квартилі [25 і 75%] та мінімум-максимум.

Для порівняння мінливості ознак використовували коефіцієнт варіації (CV), який дорівнює відношенню стандартного відхилення (SD) до середнього значення (M) у відсотках.

Для порівняння двох незалежних вибірок за кількісною ознакою використовували: *t*-критерій Ст'юдента, якщо дані вибірки мали нормальний розподіл; в іншому випадку використовували *U*-критерій Мана-Уїтні. При цьому статистичну гіпотезу про рівність дисперсій визначали за тестом Левена ($\alpha = 0,05$).

Для виявлення лінійного взаємозв'язку між кількісними показниками визначали коефіцієнт кореляції за методом Пірсона. Порівняння двох коефіцієнтів кореляції для встановлення, чи є різниця невипадковою, тобто такою, що має біологічне значення, проводили з використанням Statistica 6.0 за (Реброва, 2002).

Частки проростків з морфологічними відхиленнями представлені у вигляді відносних і абсолютних величин. В цьому випадку статистичну значущість різниці між варіантами визначали за допомогою довірчого інтервалу за (Реброва, 2002).

Однофакторний дисперсійний аналіз (One-way ANOVA) використовували для визначення достовірності різниці між трьома і більше групами за однією ознакою. Двофакторний дисперсійний аналіз (Two-way ANOVA) використовували для визначення достовірності різниць між трьома і більше групами за двома ознаками.

Достовірність різниць розраховували на рівні значущості $p < 0,05$, якщо не вказане інше.

РОЗДІЛ 4

РОЛЬ HSP70 І HSP90 У СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ЗМІН НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Суттєві відхилення факторів середовища від оптимальних значень у бік меж діапазону стійкості організму прямо чи опосередковано призводять до порушення білкового гомеостазу клітин (Александров, 1985; Ananthan et al., 1986; Liberek et al., 2008; Saibil, 2013). Одним з ключових компонентів стресової реакції, що забезпечує захист і відновлення якості білка, є індукція синтезу HSP (Hendrick, Hartl, 1993; Becker, Craig, 1994; Маргулис, Гужова, 2000; Frydman, 2001; Morimoto, 2002; Wang et al., 2004; Liberek et al., 2008). Підвищення їх вмісту в клітинах сприяє посиленню стійкості організму до несприятливих змін факторів середовища. Проте, не дивлячись на велику кількість літератури щодо досліджень генної експресії HSP, не вистачає системних досліджень відповіді багаточленних родин HSP рослин у забезпеченні діапазону стійкості за дії різних чинників та у видів рослин з різними адаптивними властивостями, в тому числі, у рослин природних популяцій.

4.1. Кінетика експресії *HSP* в проростках *A. thaliana* за впливу несприятливих чинників

Геном *A. thaliana* містить 18 членів родини HSP70 (Lin et al., 2001) і 7 членів родини HSP90 (Krishna, Gloor, 2001). В кожній з родин є білки з різною субклітинною локалізацією - цитозолу/ядра, пластид, мітохондрій і ER. Дані літератури свідчать про суттєву різницю в реакції окремих *HSP* на вплив несприятливих факторів (перш за все температурних змін) на транскрипційному і трансляційному рівнях (Sung et al., 2001; Prasinós et al., 2005; Charng et al., 2007; Banti et al., 2008). Однак, такі дослідження частіше є обмеженими у часі, тобто представляють лише початок стрес-реакції або

стосуються одного-двох строків. Коректно побудувати системну картину за результатами різних досліджень зазвичай складно через аналіз лише окремих членів родин і розбіжності в експериментальному дизайні, зокрема, природі та дозах стресових чинників і строках відбору зразків. Для з'ясування особливостей функціонування окремих HSP у захисті білкового гомеостазу клітин при поступовому наближенні фактора середовища до межі витривалості виду проведено аналіз кінетики генної експресії 12 *HSP70* і всіх 9 *HSP90* *A. thaliana*. Досліджено вплив найважливіших для рослин факторів – температури і вологості, зокрема, високої температури і водного дефіциту.

Методом ЗТ-ПЛР визначали експресію:

- Генів *HSP70*, що кодують цитозольні AtHSP70-1, AtHSP70-2, AtHSP70-3, AtHSP70-4, AtHSP70-5 і AtHSP70-14, пластидні AtHSP70-6 і AtHSP70-7, мітохондріальні AtHSP70-9 і AtHSP70-10 та локалізовані в ЕР AtHSP70-11 і AtHSP70-12.
- Генів *HSP90*: 4 гени, що кодують цитозольні AtHSP90-1, AtHSP90-2, AtHSP90-3 і AtHSP90-4, пластидний AtHSP90-5, мітохондріальний AtHSP90-6 і AtHSP90-7, локалізований в ЕР.

4.1.1. Експресія *HSP70* і *HSP90* за впливу високої температури

Зміна програми генної експресії в *A. thaliana* за поступового підйому температури починається вище 31°C, і вже при 34°C детектується синтез HSP, який досягає максимального рівня при 37°C (Клюева, Самохвалов, 1990). Крім того, попередня інкубація проростків даного виду при 37°C сприяла максимальній індукції їх теплостійкості (Silva-Correia et al., 2014). Виходячи з цього, температура 37°C була обрана для нашого дослідження як така, що відповідає максимальним адаптаційним здатностям *A. thaliana*. Для визначення потенційно летальної дози цієї температури для 12-добових проростків екотипу Col-0 їх експонували при 37°C різні періоди часу. Високотемпературна експозиція протягом 24 год призводила до загибелі проростків у 4 наступні доби за нормальних умов, тоді як після коротших

експозицій проростки залишались життєздатними (рис. 4.1). На підставі цього, експозиція при 37°C протягом 24 год в наших експериментах визначена дозою, близькою до межі стійкості проростків цього виду. Кінетику експресії генів *HSP70* і *HSP90* аналізували у діапазоні 0,5-24 год теплової експозиції.

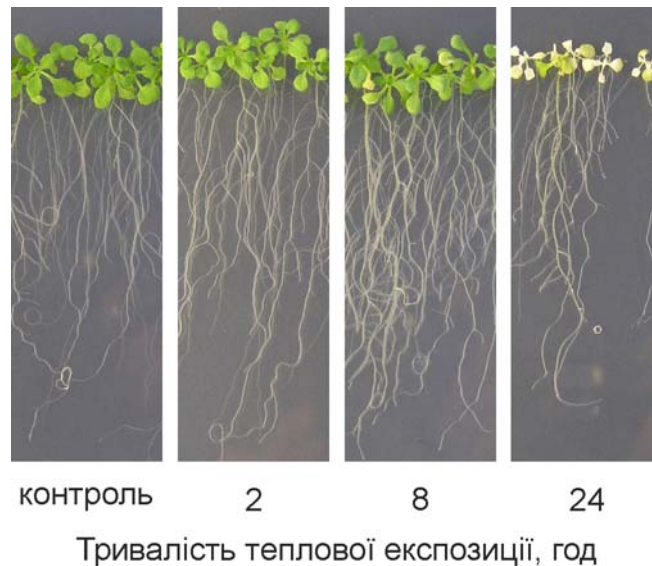


Рис. 4.1. Проростки *A. thaliana* (Col-0) через 4 доби після теплової експозиції різної тривалості.

ЗТ-ПЛР-аналіз виявив певний рівень експресії всіх *HSP70* за нормальних умов, окрім *AtHSP70-5*, транскрипти якого при 23°C не детектувалися (рис. 4.2, 4.3). Отримані дані показують різний внесок окремих членів родин у функціонування системи шаперонів за нормальних умов та у конститутивну стійкість клітин. Переключення температури на 37°C призводило до швидкої індукції більшості генів у перші 30 хв, посилення їх транскрипції протягом 1-2 год і зниження в подальшому. Водночас профіль експресії кожного гена мав свої особливості. Експресія генів цитозольних білків зазнавала найбільших змін протягом теплової експозиції та мала найбільші ген-специфічні відмінності.

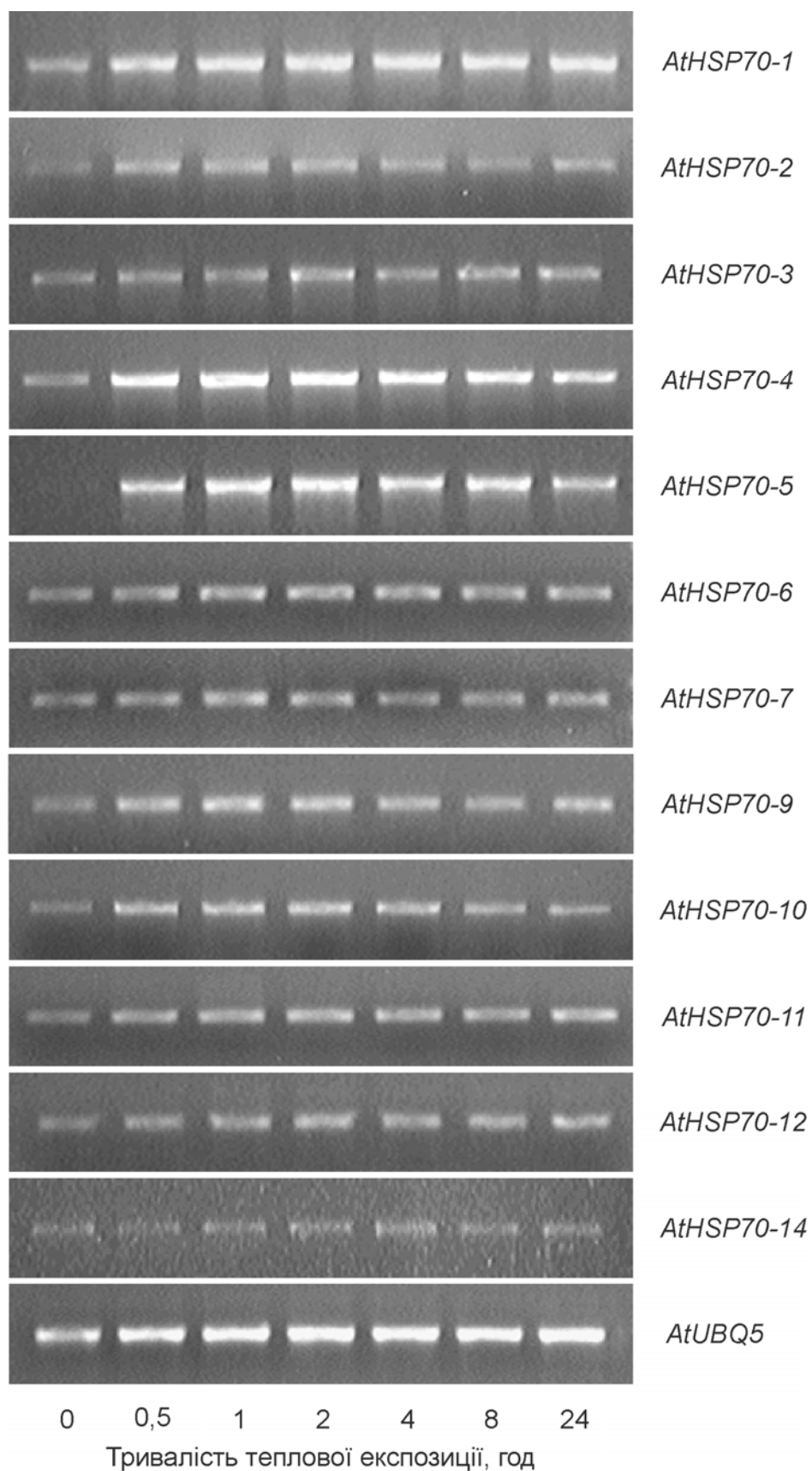


Рис. 4.2. Аналіз експресії генів родини *HSP70* методом ЗТ-ПЛР в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C. Контроль - проростки, що зростали при 23°C (0 год).

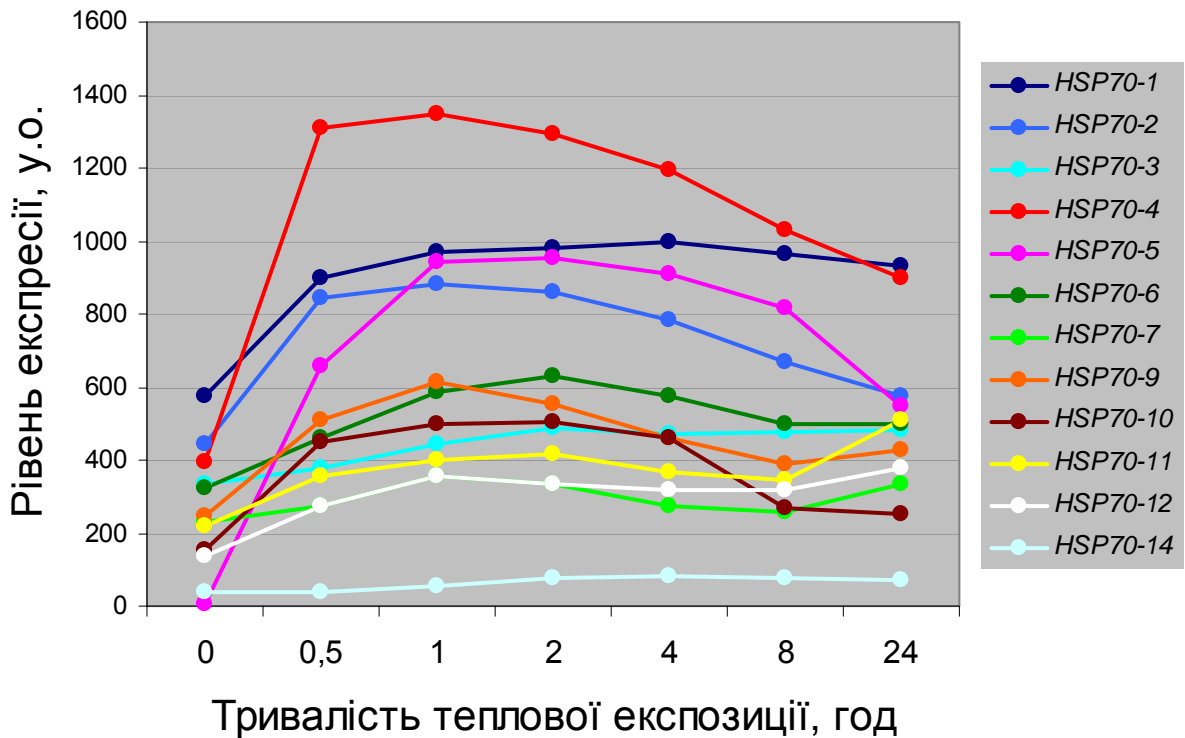


Рис. 4.3. Графічне представлення результатів аналізу кінетики експресії генів родини *HSP70* в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C (середні значення двох незалежних експериментів). Різниця між максимальним і контрольним (0 год) значеннями кожного профілю статистично значуща для всіх генів, крім *AtHSP70-14* (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Характер експресії конститутивного *AtHSP70-1* свідчить про його певну активацію і підтримку на високому рівні протягом 24 год. Потужна швидка індукція показана у конститутивного *AtHSP70-2*, проте з часом кількість його мРНК помітно знижувалась. Активація транскрипції *AtHSP70-3* виявилася поступовою і більш помірною. В *AtHSP70-14* відзначали лише тенденцію до активації. Найбільший ступінь індукції та найбільш виражений максимум спостерігали в індукцибельних *AtHSP70-4* і *AtHSP70-5*. Їх індукція відбувалась послідовно з невеликим розривом у часі. Так, транскрипти *AtHSP70-4* у малій кількості детектувалися за нормальних умов і досягали вмісту, близького до

максимального, протягом перших 30 хв. Експресію *AtHSP70-5* за нормальних умов не виявляли, а максимальну його індукцію відмічали через 1 год. Серед генів, що кодують білки органел, більш чутливими до високої температури виявились гени *AtHSP70-9* і *AtHSP70-10* мітохондріальних ізоформ. У генів *AtHSP70-11* і *AtHSP70-12*, що кодують ізоформи ЕР, відмічали помірне поступове збільшення мРНК з певним посиленням наприкінці досліджуваного періоду.

Подібні профілі експресії *HSP70 A. thaliana* у перші 2 год експозиції при 40°C отримано іншими дослідниками (Sung et al., 2001). Автори відмічали швидку індукцію більшості *AtHSP70* і певні відмінності в подальшій кінетиці. Також показано, що різке збільшення рівня мРНК визначається вже через 5-10 хв після підйому температури (Sung et al., 2001; Sung, Guy, 2003). Проте активація генів *AtHSP70-6* і *AtHSP70-9* цими дослідниками не спостерігалась (Sung et al., 2001), на відміну від наших результатів, які показали невеликий, але статистично значущий підйом експресії цих генів у перші 1-2 год.

Аналіз родини *HSP90* також продемонстрував ген-специфічні профілі експресії (рис. 4.4, 4.5). Враховуючі високу гомологію цитозольних *HSP90*, експресію трьох генів *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* аналізували сумарно за допомогою однієї пари праймерів. Перш за все треба відмітити, що транскрипти всіх *HSP90* виявлялись за нормальних умов, але *AtHSP90-1* і *AtHSP90-6* – у малій кількості. У відповідь на високу температуру відбувалась потужна індукція гену *AtHSP90-1*, яка досягала максимуму через 2 год, після цього знижувалась, залишаючись на високому рівні до кінця експозиції. Раніше Nagalampidis et al. (2002) повідомляли про відсутність експресії *AtHSP90-1* в проростках у нормі та його індукцію при 37°C протягом 1 год. Сумарна кількість мРНК трьох конститутивних цитозольних ізоформ також посилювалася при стресі, але меншою мірою. З генів білків органел суттєву активацію протягом 30 хв показував *AtHSP90-6*, що кодує мітохондріальний білок. Транскрипція генів білків пластид і ЕР

підтримувалась на високому рівні та зазнавала менш значних змін. Важливо також відмітити, що кількість мРНК генів, які кодують білки органел, зростала з наближенням дози фактору до потенційно летального значення.

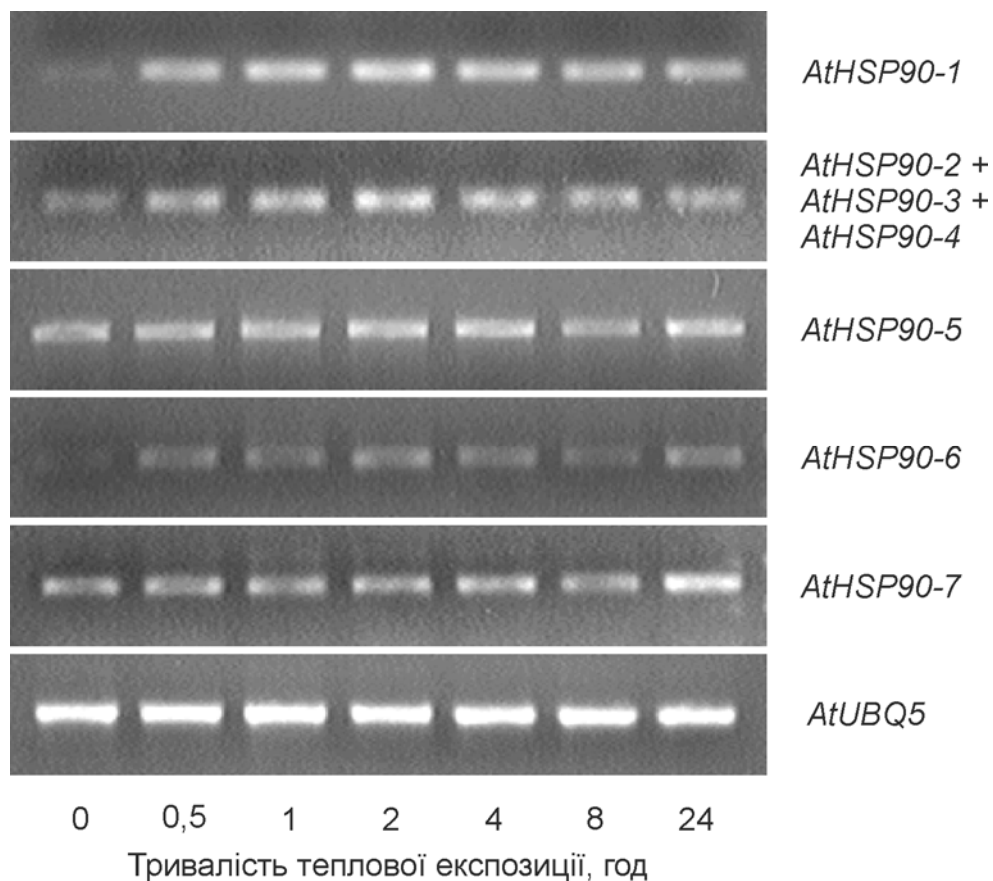


Рис. 4.4. Аналіз експресії генів родини *HSP90* методом ЗТ-ПЛР в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C. Експресію *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* аналізували сумарно. Контроль - проростки, що зростали при 23°C (0 год).

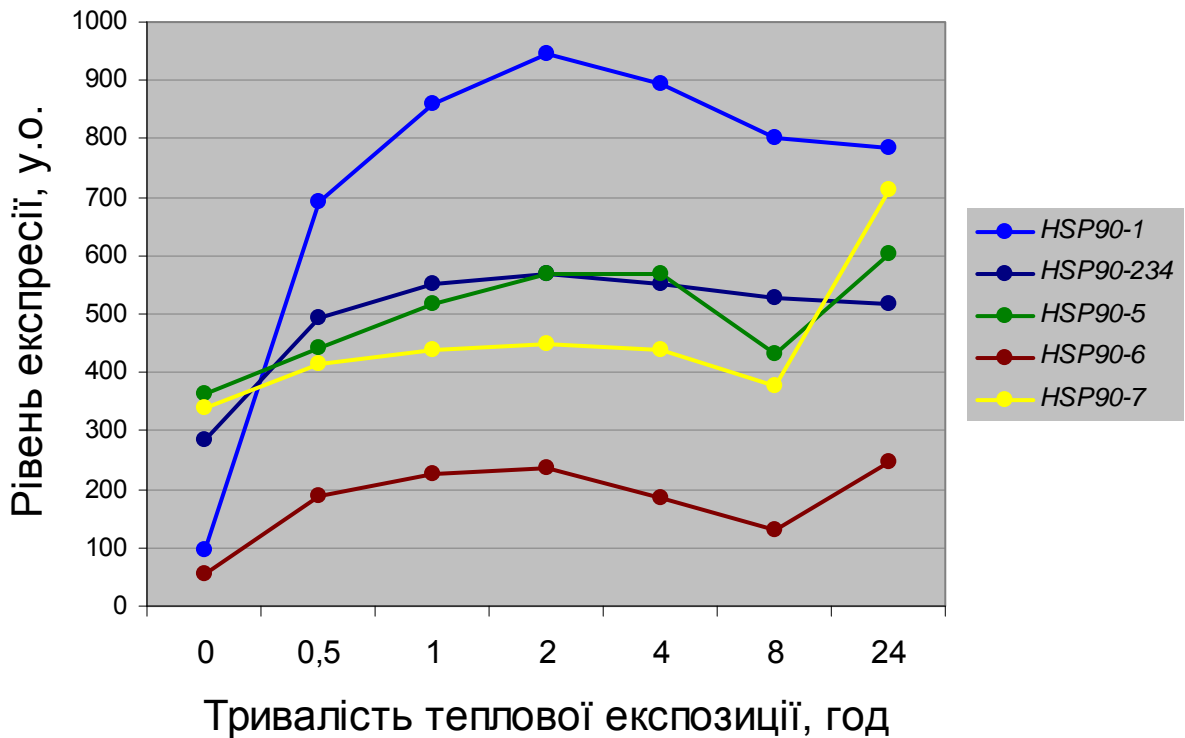


Рис. 4.5. Графічне представлення результатів аналізу експресії генів родини *HSP90* в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C (середні значення двох незалежних експериментів). HSP90-234 – сумарний рівень мРНК *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4*. Різниця між максимальним і контрольним (0 год) значеннями кожного профілю статистично значуща для всіх генів (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Для визначення рівня транскриптів цитозольних *HSP90* використано рестрикційний аналіз за (Yamada et al., 2007). Кількість транскриптів чотирьох генів (*AtHSP90-1*, -2, -3, -4), які кодують цитозольні ізоформи, визначали сумарно за допомогою однієї пари праймерів (рис. 4.6). Отриману кДНК піддавали рестрикції за схемою (рис. 4.7). Зміни у рівні продуктів рестрикції, які відповідають *AtHSP90-1* (рис. 4.8, А), підтвердили його значну індукцію, як це визначено нами за допомогою ген-специфічних праймерів і представлено вище (рис. 4.4). Аналіз експресії трьох конститутивних генів також показав їх активацію під впливом високої температури. Максимальний рівень мРНК *AtHSP90-2* детектували через 0,5 год дії фактору, після чого він

поступово спадав (рис. 4.8, Б). В *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* максимум визначали через 2 год експозиції (рис. 4.8, В).

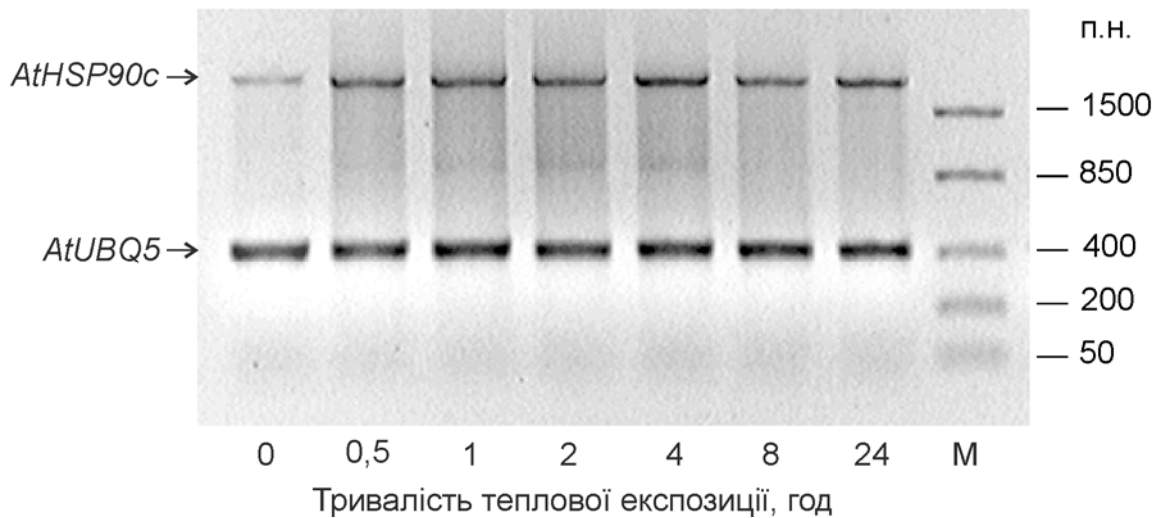


Рис. 4.6. ЗТ-ПЛР-аналіз сумарної експресії генів *HSP90c* цитозольних білків HSP90 в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C. Контроль - проростки, що зростали при 23°C (0 год). М – маркер молекулярної маси ДНК.

В цілому, результати аналізу реакції теплового шоку повністю відповідають уявленням про те, що стресова індукція *HSP70* і *HSP90* спрямована на захист і відновлення білкового гомеостазу клітин при збільшенні кількості денатурованих білків (Hendrick, Hartl, 1993; Becker, Craig, 1994; Маргулис, Гужова, 2000; Fridman, 2001; Morimoto, 2002; Wang et al., 2004; Liberek et al., 2008). Разом з тим, профілі експресії генів цих родин показують, що кожен з них відіграє специфічну роль у розвитку реакції клітин на високу температуру – від початку стресу до наближення дози фактора до межі стійкості. Так, високий рівень транскрипції *AtHSP70-1* за нормальної температури відповідає уявленням про нього як головного конститутивного HSP70 (Cazalé et al., 2009). Водночас нами показане певне посилення його транскрипції вже у перші 30 хв теплового шоку. Швидка

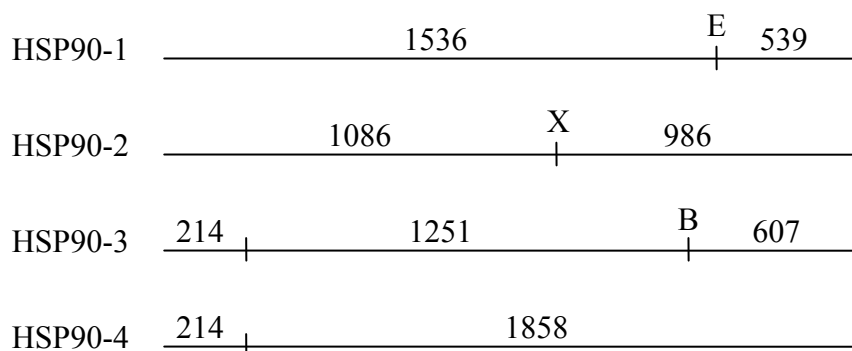


Рис. 4.7. Схема рестрикції кДНК чотирьох генів цитозольних HSP90 (за Yamada et al., 2007). Числа вказують кількість п.н. у кожному фрагменті. E – сайт рестрикції для *Eco147I*, X - сайт рестрикції для *XhoI*, B - сайт рестрикції для *Bsu15I*.

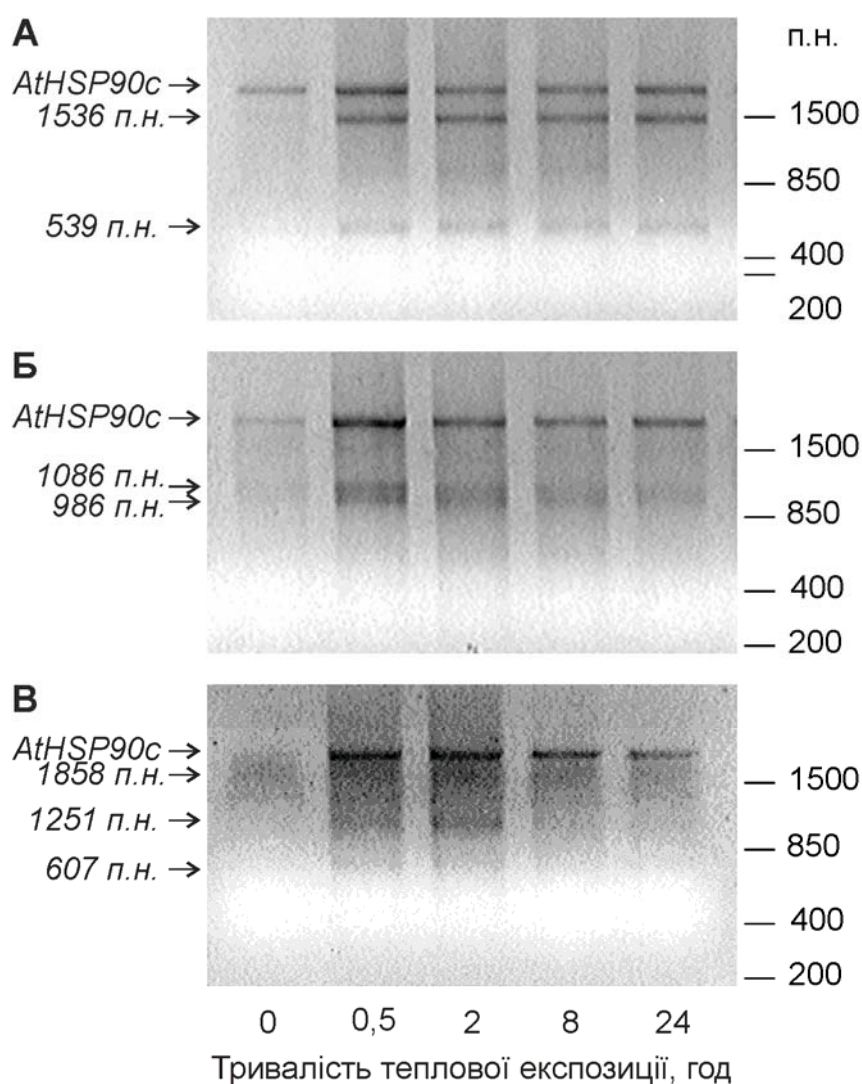


Рис. 4.8. Експресія генів цитозольних HSP90 в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C. Аналіз проводили шляхом рестрикції сумарного продукту ЗТ-ПЛР мРНК цитозольних HSP90. Рівні об'єми кДНК обробляли рестриктазами: (А) *Eco147I* (для *AtHSP90-1*), (Б) *XhoI* (для *AtHSP90-2*), (В) *BSU15I* (для *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4*).

активація та високий рівень на початку експозиції конститутивних *AtHSP70-2* і *AtHSP90-2* вказують на те, що вони виконують роль додаткового конститутивного компонента в ранній реакції. Слідом за ними активувалась транскрипція *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4*. Експресія ж *AtHSP70-3* і *AtHSP70-14* посилювалась за високої дози фактора (в останнього на рівні тенденції). Активація у перші години стресу генів білків органел обох родин і повторна активація кількох з них наприкінці теплової експозиції показує особливості функціонування відповідних HSP у захисті білкового компонента органел. Слід відмітити, що більш чутливими з них виявилися гени мітохондріальних білків.

Вочевидь, диференційна експресія конститутивних генів сумарно посилює загальну активність пулу шаперонів протягом всього періоду дії високої температури аж до межі стійкості. Разом з тим, особливим інструментом реакції клітин на різке підвищення температури, яке викликає денатурацію білків, є індукцйбельні HSP (Sørensen et al., 2003). Нами відмічено потужну індукцію трьох генів: більш швидко в *AtHSP70-4*, рівень транскриптів якого наближався до максимуму в перші 30 хв, і далі – запуск експресії *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1*.

Також важливо відзначити, що через 24 год теплової експозиції, яка виявилася летальною, вміст мРНК як *HSP70*, так і *HSP90* в клітинах зберігався на високому рівні. Можна припустити, що загибель проростків після такої обробки обумовлена перш за все порушенням певних найчутливіших метаболічних шляхів. З іншого боку, існує можливість того, що наявної мРНК, а також клітинного потенціалу для її синтезу *de novo*, за критичних доз чинника стає недостатньо для забезпечення загального рівня активності системи шаперонів, необхідного для зв'язування та рефолдингу наростаючої кількості денатурованих білків, що веде до протеотоксичних наслідків і загибелі.

4.1.2. Експресія *HSP70* і *HSP90* за впливу водного дефіциту

Для аналізу генної експресії в проростках *A. thaliana* за посушливих умов використовували створену у відділі модель імітації прогресуючого водного дефіциту в стерильному агаризованому середовищі, що наближає її до динамічних флуктуацій вмісту води в ґрунті в природних умовах (Bobrownyszky, 2006; Бобровницький, 2016). Згідно з цією моделлю, 6-добові проростки переносяться на нове середовище з меншою концентрацією живильних речовин (див. методику п. 3.4.7 і рис. 4.9), після чого поступове висихання субстрату протягом 5 діб призводить до зниження його водного потенціалу з $-0,034$ МПа до $-0,743$ МПа і, як результат, зниження водного потенціалу проростків від $-0,12$ МПа до $-0,22$ МПа (Бобровницький, 2013). Подальше зневоднення субстрату спричиняє загибель проростків на 6-ту добу.

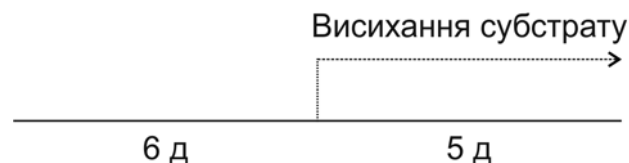


Рис. 4.9. Схема експерименту з моделювання водного дефіциту в агаризованому середовищі.

ЗТ-ПЛР аналіз експресії генів *HSP70* протягом 5 діб розвитку водного дефіциту виявив специфічні для кожного члена зміни (рис. 4.10, 4.11). Гени *AtHSP70-1* і *AtHSP70-3*, що кодують конститутивні цитозольні білки, показували помірне зростання кількості транскриптів протягом всього періоду, при цьому *AtHSP70-1* – на високому рівні. Гени двох інших конститутивних цитозольних членів – *AtHSP70-2* і *AtHSP70-14* – виявляли слабкий рівень експресії в перші 2 доби експерименту і певне посилення, починаючи з 3-ої доби. Також на 3-ю добу розвитку водного дефіциту запускала транскрипція індукбельного *AtHSP70-4*, яка досягала високого рівня на 4-5-ту добу. Експресія іншого індукбельного гена *AtHSP70-5* практично не реєструвалася у перші 2 доби та індукувалася на низькому

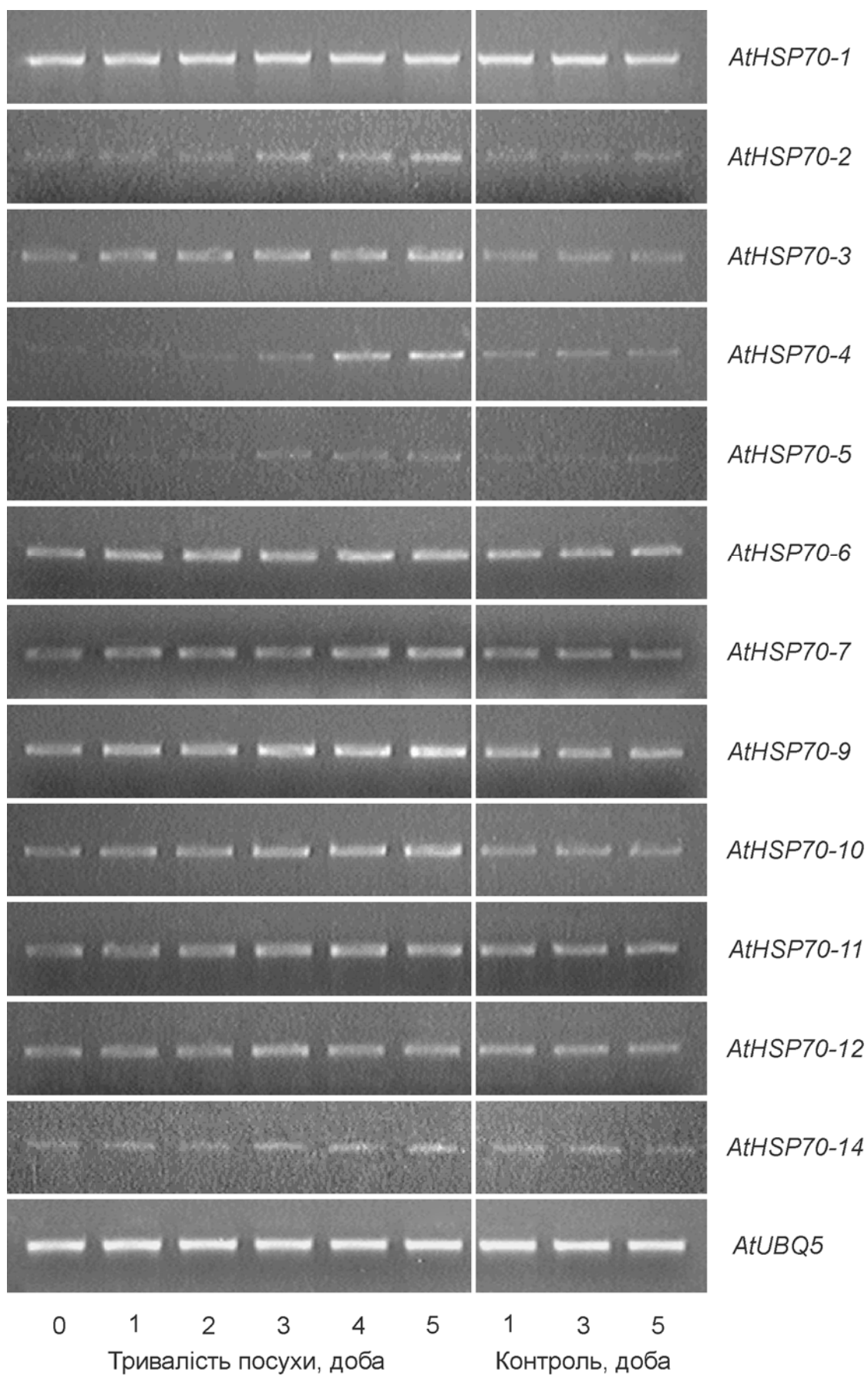


Рис. 4.10. ЗТ-ПЛР-аналіз експресії генів родини *HSP70* в проростках *A. thaliana* (Col-0) за умов посилення водного дефіциту. Контроль - проростки за нормальної вологості середовища.

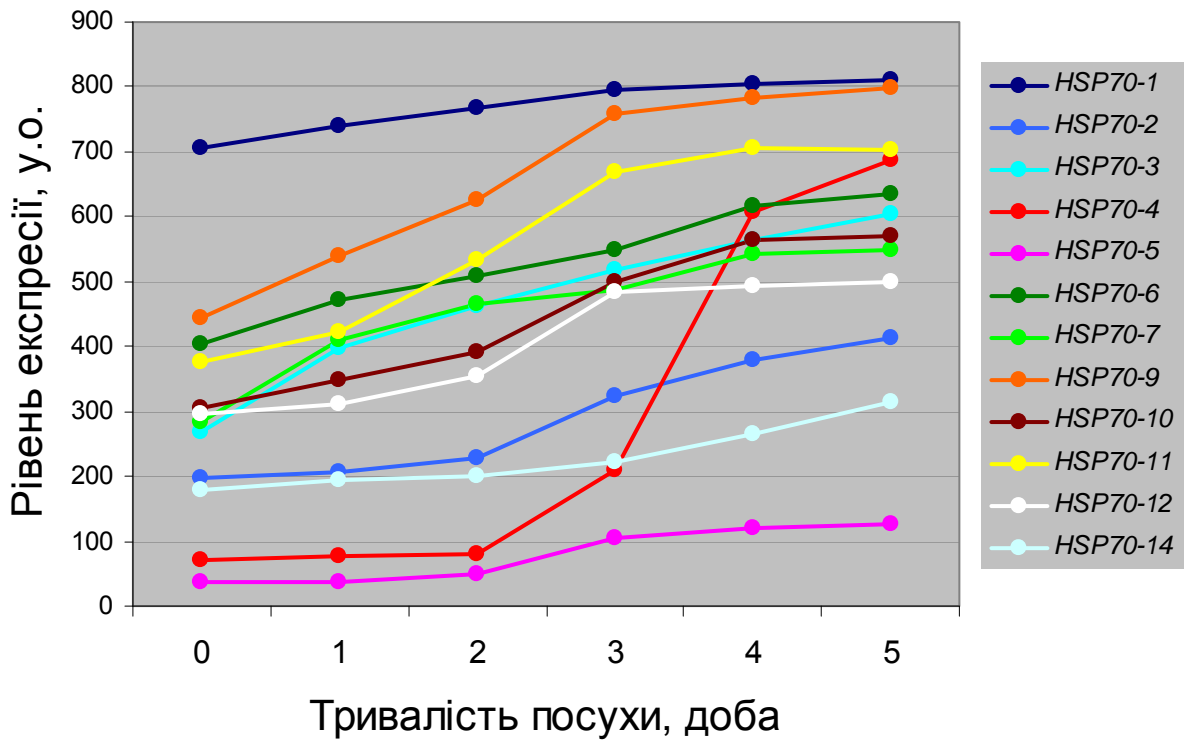


Рис. 4.11. Графічне представлення результатів аналізу експресії генів родини *HSP70* в проростках *A. thaliana* (Col-0) за прогресуючого водного дефіциту (середні значення двох незалежних експериментів). Різниця між максимальним і контрольним (0 діб) значеннями кожного профілю статистично значуща для всіх генів (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

рівні, починаючи з 3-ої доби. Гени *HSP70*, що кодують білки органел, характеризувалися помірною активацією експресії. Серед них найбільших змін зазнавала експресія генів мітохондріальних *AtHSP70-9* і *AtHSP70-10* і білка ER *AtHSP70-11*.

Гени родини *HSP90* також реагували на підсихання субстрату. Сумарна кількість транскриптів конститутивних *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* виявлялась у значній кількості за нормальних умов і певною мірою зростала протягом підсихання середовища (рис. 4.12, 4.13). Подібний характер експресії показували також гени білків органел. Водночас рівень мРНК *AtHSP90-7* після суттєвого зростання протягом 4 діб знижувався за максимального водного дефіциту наприкінці експерименту. На відміну від

генів з конститутивною експресією, транскрипти індукцибельного *AtHSP90-1* не визначались за помірнього водного дефіциту у перші дні, але у дуже малій кількості з'являлися при подальшому зневодненні клітин.

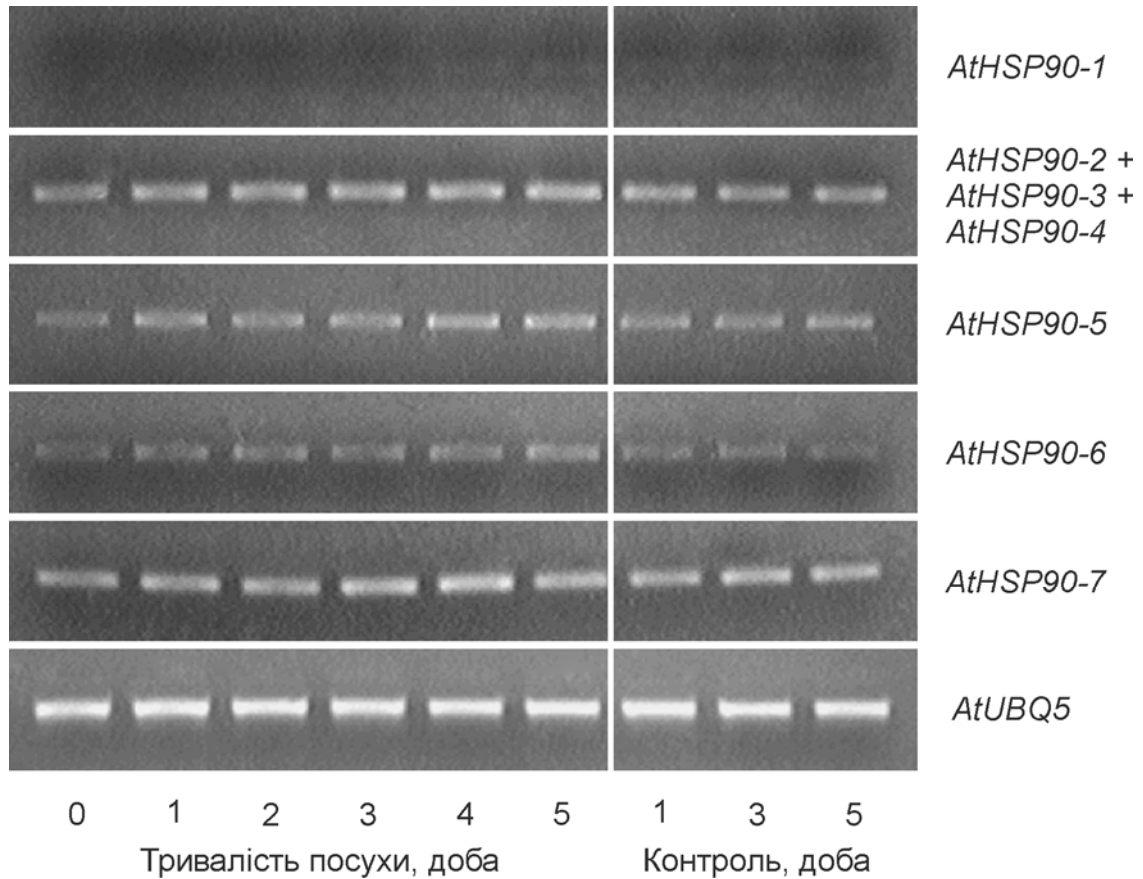


Рис. 4.12. ЗТ-ПЛР-аналіз експресії генів родини *HSP90* в проростках *A. thaliana* (Col-0) за прогресуючого водного дефіциту. Експресію *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* аналізували сумарно. Контроль – проростки за нормальної вологості середовища.

Можна відмітити, що більшість конститутивних *HSP70* і *HSP90* показувала певне підвищення рівня мРНК у перший день підсихання середовища за незначних змін вмісту води і водного потенціалу в цей період (Bobrownyzky, 2006; Бобровницький, 2016). Такий ефект відмічали також для ряду генів у контролі, де за нормальної вологості середовища їх експресія відбувалася на стабільному, але вище початкового (0 діб), рівні (рис. 4.10, 4.12, справа). Враховуюче це, можна припустити, що певна активація

експресії могла бути викликана перенесенням проростків на нове середовище перед моделюванням посухи (див. методику, п. 3.4.7).

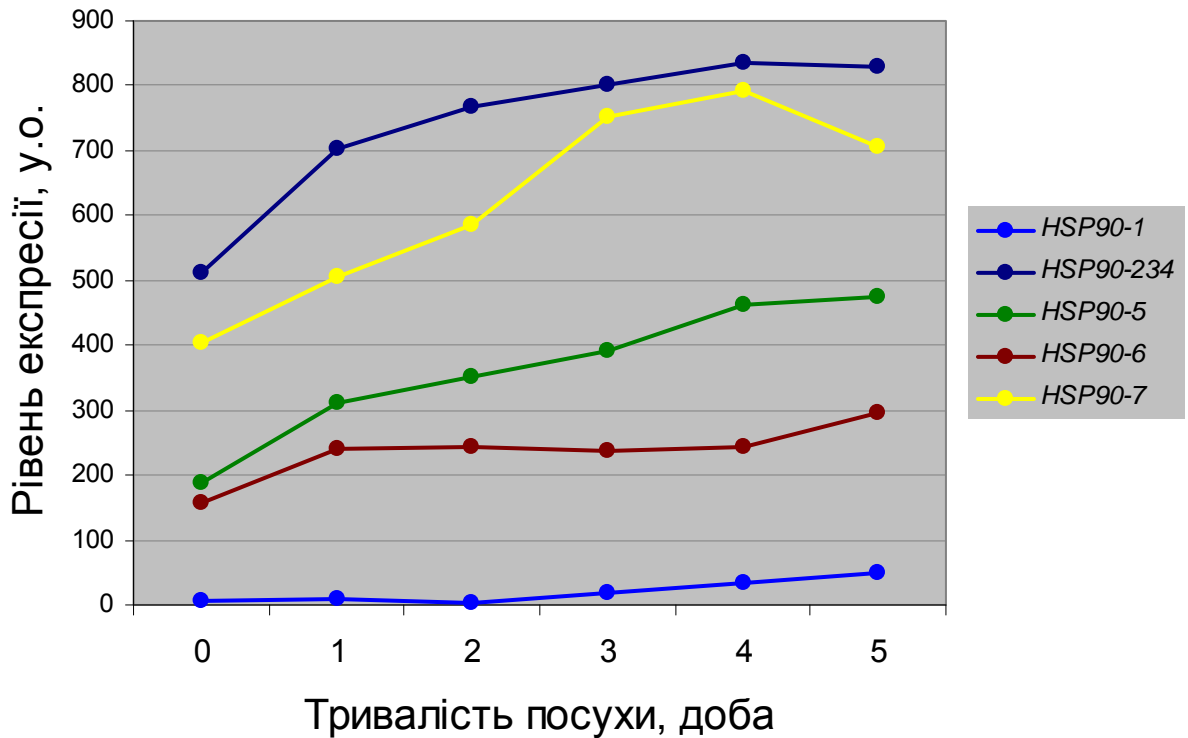


Рис. 4.13. Графічне представлення результатів аналізу експресії генів родини *HSP90* в проростках *A. thaliana* (Col-0) за прогресуючого водного дефіциту (середні значення двох незалежних експериментів). HSP90-234 – сумарний рівень мРНК *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4*. Різниця між максимальним і контрольним (0 діб) значеннями кожного профілю статистично значуща для всіх генів крім *AtHSP90-1* (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Оскільки експресія *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* у представленому ЗТ-ПЛР-аналізі оцінювалась сумарно, додатково проводилась певна деталізація експресії цитозольних членів. Для цього кДНК, загальну для чотирьох цитозольних HSP90 (рис. 4.14), піддавали рестрикції за схемою, представленою вище (рис. 4.7). За таких умов продукти рестрикції, які відповідають індукційному *AtHSP90-1*, ми не детектували (рис. 4.15, А).

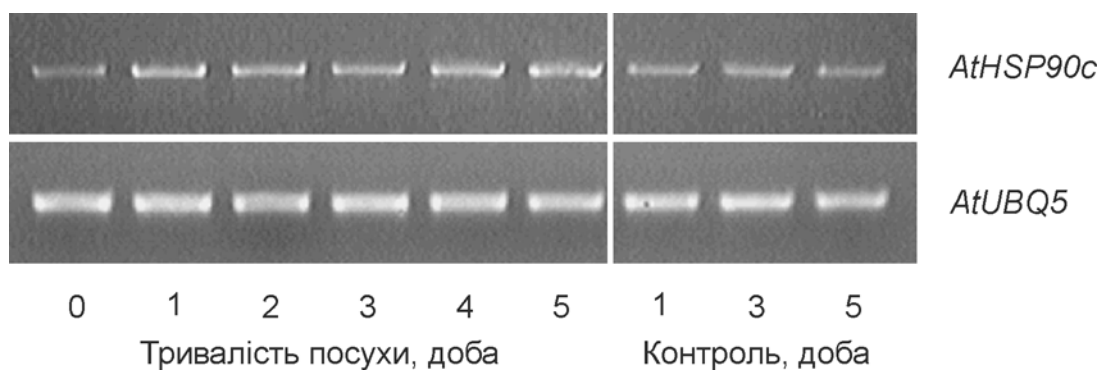


Рис. 4.14. ЗТ-ПЛР-аналіз експресії генів, що кодують цитозольні HSP90 (*HSP90c*), в проростках *A. thaliana* (Col-0) за прогресуючого водного дефіциту. Контроль – проростки за нормальної вологості середовища.

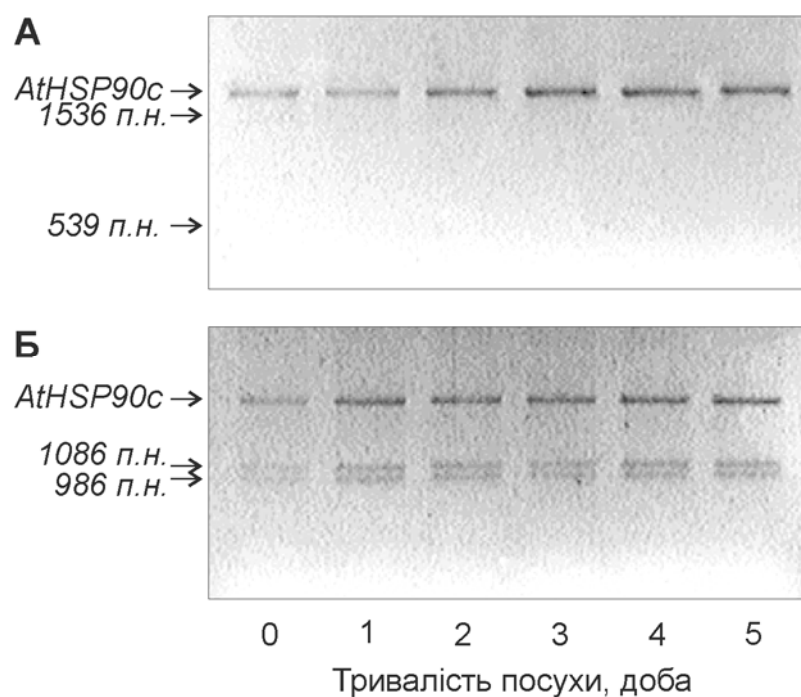


Рис. 4.15. Експресія генів цитозольних HSP90 в проростках *A. thaliana* (Col-0) за прогресуючого водного дефіциту. Аналіз проводили шляхом рестрикції сумарного продукту ЗТ-ПЛР мРНК цитозольних HSP90. Рівні об'єми кДНК обробляли рестриктазами: (А) *Eco147I* (для *HSP90-1*), (Б) *XhoI* (для *HSP90-2*).

Проте вміст транскриптів конститутивного *AtHSP90-2* стрибкоподібно збільшувався після перенесення рослин на нове середовище і далі залишався на стабільно підвищеному рівні протягом всього періоду водного дефіциту (рис. 4.15, Б). Оскільки такий характер експресії не корелював зі зростанням водного дефіциту, можна припустити, що посилення транскрипції *AtHSP90-2* на початку експерименту викликане зміною середовища. Враховуючи те, що експресію *AtHSP90-1* за такого підходу ми не детектували, сумарний рівень транскриптів *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* можна опосередковано оцінити як різницю між сумарною кДНК і продуктами рестрикції, що відповідають *AtHSP90-2*. Це дозволяє нам прогнозувати незначне посилення транскрипції цих генів в умовах зростання водного дефіциту.

Таким чином, аналіз експресії генів *HSP70* і *HSP90* за поступового посилення водного дефіциту виявив потужну індукцію гена *AtHSP70-4* на фоні певного прогресивного підвищення рівня транскриптів більшості конститутивних членів цитозолу і органел та відсутність або вкрай слабку реакцію двох інших індукцибельних генів. Підвищений рівень транскриптів більшості генів при максимальному водному дефіциті на 5-ту добу узгоджується з даними інших дослідників, які визначали значну (в 4 рази і більше) активацію ряду *HSP A. thaliana*, в першу чергу *AtHSP70-4*, через 6-7 діб після припинення поливу (Rizhsky et al., 2004). Крім того, нами виявлено особливості профілів експресії стосовно базового рівня, кінетики і ступеня активації, які свідчать про специфічну роль кожного гена в захисті білкового гомеостазу клітин при зневодненні. Можна припустити, що високий рівень експресії *AtHSP70-1* і трьох конститутивних цитозольних *AtHSP90* забезпечує високий базовий рівень активності системи шаперонів, який підсилюється активацією інших *HSP70* і *HSP90* цитозолу і органел. Порівняння індукцибельних генів вказує на провідну роль *AtHSP70-4* у захисті клітин від зневоднення і відсутність або мізерний вклад *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1*. Також слід відмітити активацію експресії генів білків цитозолу (*AtHSP70-4*, *AtHSP70-2*, *AtHSP70-14*, *AtHSP70-5*, *AtHSP90-1*), а також генів,

що кодують білки мітохондрій і ER, після 3 діб розвитку водного дефіциту, що вказує на наявність певного порогового рівня вмісту води в клітинах.

Загалом, аналізуючи результати вивчення генної експресії за впливу екстремальних факторів, слід підкреслити відмінності в реакції індукцибельних генів на дію різних чинників. Потужна індукція *AtHSP70-4* швидко відбувалась у відповідь на високу температуру, а також запускала при зростанні водного дефіциту вище певного порогу. На противагу цьому, *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* активно відповідали на високу температуру та ледве реагували на посушливі умови. Крім того, індукція *AtHSP70-4* за теплового шоку випереджала індукцію двох інших індукцибельних генів. Такі результати дозволяють вважати *AtHSP70-4* основним індукцибельним членом двох родин, а *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* – додатковими компонентами, активно задіяними у стрес-реакції на високу температуру і на низькому рівні – в адаптації до зневоднення клітин. Такі результати свідчать про диференційну регуляцію і специфічність функціонування індукцибельних HSP при формуванні реакції шаперонів за впливу різних чинників. Раніше було показано, що *AtHSP70-5* бере активну участь у реакції теплового шоку та не реагує на холод, на відміну від інших HSP70 (Sung et al., 2001). Специфічність експресії *AtHSP90-1* виявлялась по відношенню до важких металів (Miloni, Hatzopoulos, 1997; Haralampidis et al., 2002). Подібні відмінності в реакції індукцибельних HSP знайдено також у інших видів рослин. Наприклад, у *Nicotiana tabacum* два HSP70, що індукуються при тепловому шоці, по-різному реагували на посуху: *NtHSP70-1* відповідав на підсихання субстрату значною активацією транскрипції, тоді як рівень експресії *NtHSP70-3* не змінювався (Cho, Hong, 2004).

Підсумовуючи отримані нами результати дослідження експресії генів *HSP70* і *HSP90* *A. thaliana* за впливу високої температури і водного дефіциту, слід підкреслити наступні закономірності:

- участь всіх *HSP70* і *HSP90* в реакції клітин на обидва чинники;

- специфічний профіль експресії кожного гена у загальній відповіді системи шаперонів на зовнішні чинники, включаючи базовий рівень, тривалість періодів активації та зниження інтенсивності експресії, швидкість та ступінь змін;
- високий рівень експресії *AtHSP70-1* і сумарної експресії генів *AtHSP90* конститутивних білків цитозолу як за нормальних умов, так і протягом всього періоду дії несприятливих чинників, що вказує на їх важливу роль у створенні клітинного пулу шаперонів;
- диференційна регуляція і специфічна роль *AtHSP70-4*, *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* у створенні індукцйбельного (додаткового) компонента за впливу різних чинників, і водночас провідна роль *AtHSP70-4*, що проявляється у більш швидкій індукції на початку реакції теплового шоку порівняно з іншими індукцйбельними генами, а також в його участі на високому рівні в реакціях клітин на обидва фактори;
- підтримка загального вмісту транскриптів *HSP70* і *HSP90* на високому рівні при наблизенні дози зовнішнього чинника до межі діапазону стійкості.

Виходячи з цього, стає очевидним, що участь HSP у неспецифічній реакції клітин на зміни факторів середовища відбувається шляхом специфічних змін експресії кожного гена. Далі постає питання значення окремих конститутивних та індукцйбельних членів цих родин у забезпеченні стійкості клітин.

4.2. Участь окремих *HSP90* і *HSP70* у забезпеченні стійкості рослин

Стійкість до несприятливих факторів є кількісною ознакою (Ottaviano et al., 1991) і визначається експресією комплексу генів, в тому числі й *HSP*. Проте є дані, що навіть один ген може суттєво впливати на витривалість клітин. Наприклад, нокаут-мутація індукцйбельного *HSP101* в *A. thaliana*

(Hong, Vierling, 2000) і *Zea mays* (Nieto-Sotelo et al., 2002) спричиняла суттєве зниження теплостійкості.

Для аналізу ролі окремих HSP70 і HSP90 у забезпеченні стійкості до високої температури і водного дефіциту нами використано *A. thaliana* дикого типу (Col-0) та створені на його основі інсерційні нокаут-мутанти за цитозольними членами родин: індукцйбельними AtHSP90-1 і AtHSP70-5 (підродина DnaK) і конститутивними AtHSP90-4 і AtHSP70-14 (підродина HSP110/SSE) (табл. 3.4). Гетерозиготне за інсерцією насіння мутантних ліній отримано з колекції NASC (Alonso et al., 2003). Схеми генів із вставками Т-ДНК представлено на рисунку 4.16.

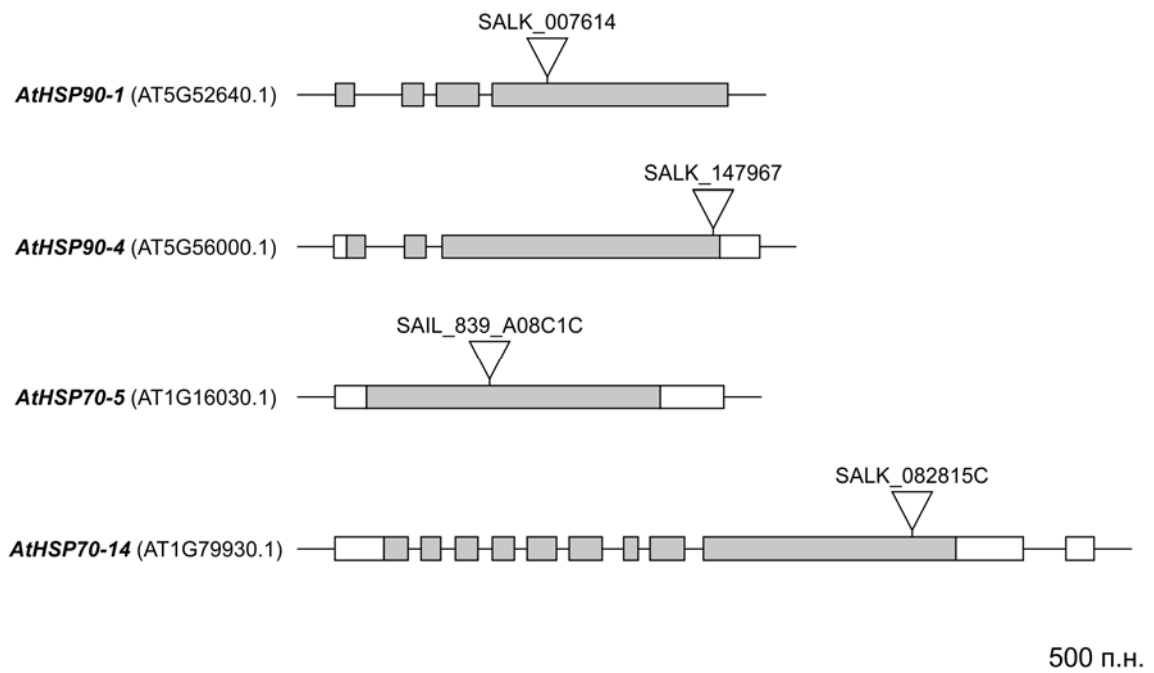


Рис. 4.16. Схема екзон-інтронної структури генів *HSP90* і *HSP70* з інсерцією Т-ДНК (позначено трикутником).

Відповідність розмірів продуктів ПЛР теоретично очікуваним перевіряли для кожного мутанта за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (рис. 3.7-3.10). Відібрано рослини, гомозиготні за вставкою Т-ДНК. Відсутність у них транскриптів відповідних генів *HSP* підтверджено методом

ЗТ-ПЛР з кДНК, отриманої на РНК з 10-12 мутантних проростків (рис. 3.7-3.10). Насіння гомозиготних рослин використано для аналізу.

4.2.1. Стійкість нокаут-мутантів *hsp* *A. thaliana* до високої температури

Як відомо з літератури (Silva-Correia et al., 2014) і підтверджено нами (наприклад, рис. 4.1, п. 4.1.1), збільшення тривалості експозиції при високій температурі призводить до різкого погіршення стану рослин та їх загибелі у вузькому діапазоні доз, який відповідає межі витривалості. Теплова обробка в цьому діапазоні дозволяє проводити тонке порівняння рівня стійкості організмів (видів, ліній) (Sung, Guy, 2003; Silva-Correia et al., 2014). Аналіз теплостійкості нокаут-мутантів *hsp* здійснювали з використанням двох підходів: оцінки базової теплостійкості проростків і оцінки теплостійкості насіння. За даними літератури (Silva-Correia et al., 2014) і власних попередніх експериментів з *A. thaliana*, потенційно летальними для проростків є нетривалі експозиції в діапазоні температур 42-46°C, для насіння – 48-52°C.

Для аналізу функціонування окремих HSP у забезпеченні теплостійкості проростків *A. thaliana* 5-добові проростки нокаут-мутантів і дикого типу витримували при 45°C протягом 50 хв, після чого переносили у нормальні умови і що дня візуально оцінювали їх стан (рис. 4.17, А). Через 3 доби після теплового шоку різниця у виживаності проростків була максимальною. Повну втрату життєздатності спостерігали у проростків *Athsp70-5*, часткову – у *Athsp90-1*, у той час як листки двох інших мутантів і дикого типу ще залишалися зеленими (рис. 4.17, Б). Такі результати свідчать, що індукцйбельні AtHSP90-1 і особливо AtHSP70-5 є надважливим інструментом у захисті активно метаболізуючих клітин від протеотоксичних ефектів високої температури. Це повністю відповідає потужній індукції цих генів під час теплового шоку у дикого типу (п. 4.1.1).

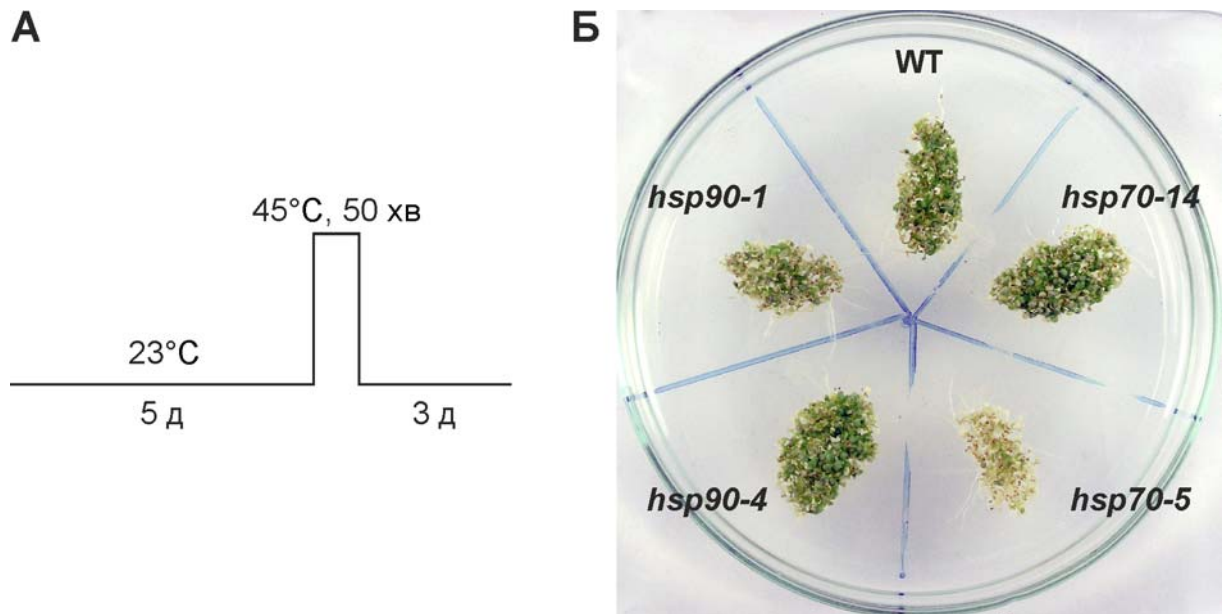


Рис. 4.17. Оцінка теплостійкості проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*. (А) Схема експерименту. (Б) Проростки через 3 доби після експозиції при 45°C протягом 50 хв.

Для тестування теплостійкості насіння набряклі насінини мутантів і дикого типу прогрівали при 48°C протягом 20-60 хв, висаджували на середовище і щоденно реєстрували відсоток пророслого насіння. У контролі енергія проростання у мутантних ліній була близькою до такої у дикого типу, за винятком *Athsp90-4*, у якого цей показник виявився достовірно нижчим (рис. 4.18). Прогрівання насіння викликало дозо-залежне зниження схожості та енергії проростання. Разом з тим, насіння мутантів, дефіцитних за різними HSP, показувало неоднаковий ступінь пригнічення цього процесу. Так, після 20-хвилинного прогрівання суттєве гальмування проростання відмічали у ліній *Athsp90-1* і *Athsp90-4*. Теплова обробка насіння протягом 40 хв викликала зниження темпів проростання у *Athsp90-1*, *Athsp90-4* і *Athsp70-5*. Після 60 хв прогрівання найменшими темпами росту характеризувалися проростки *Athsp90-1* і *Athsp70-5*. Проте насіння *Athsp70-14* виявилось близьким за теплостійкістю до дикого типу за всіх режимів.

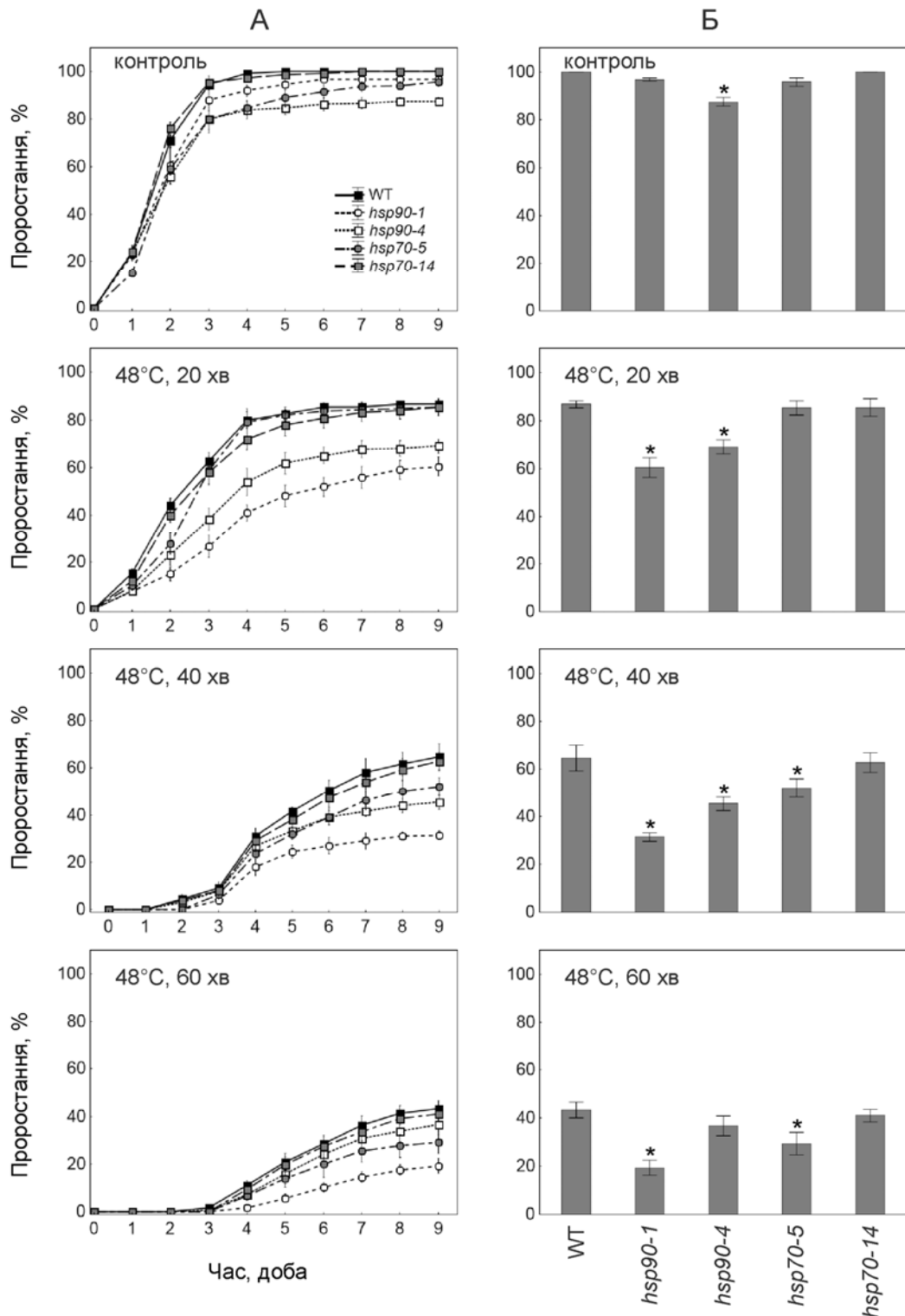


Рис. 4.18. Оцінка теплостійкості насіння *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*. (А) Динаміка проростання у контролі та після обробки насіння при 48°C протягом 20, 40 і 60 хв. (Б) Відсоток пророслого насіння на 9-ту добу. Представлено результати трьох експериментів (М ± SD). (*) Статистично значуща різниця між диким типом та позначеною мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Такі дані показують, що за нормальних умов важливим для реактивації росту зародка виявився конститутивний AtHSP90-4. Його втрата призводила до певного зниження енергії проростання. З іншого боку, посилена чутливість до прогрівання насіння ліній *Athsp90-1* і *Athsp70-5* вказує на суттєвий вклад відповідних індукцибельних HSP у забезпечення теплостійкості зародка насіння.

Аналіз існуючих даних щодо експресії генів *HSP* у насінні з використанням Arabidopsis eFP browser (<http://bar.utoronto.ca>) показує, що мРНК індукцибельних *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5* міститься в сухому насінні у великій кількості та зникає протягом першої доби проростання. Навпаки, мРНК конститутивних *AtHSP90-4* і *AtHSP70-14* присутня в сухому насінні у помірній кількості, а при проростанні відбувається реактивація їх експресії. Проте в літературі можна знайти і дані, що відрізняються від цих. Зокрема, Sung et al. (2001) не виявили за допомогою ЗТ-ПЛР транскрипти *AtHSP70-5* в сухому насінні *A. thaliana* та впродовж його дозрівання і проростання. Проте індукцію цього гена в проростках протягом реакції теплового шоку ними було підтверджено.

Отже, отримані нами дані доводять, що індукцибельні AtHSP90-1 і AtHSP70-5 відіграють важливу роль у забезпеченні теплостійкості насіння, тоді як конститутивний AtHSP90-4 є більш суттєвим для проростання.

4.2.2. Стійкість нокаут-мутантів *hsp* *A. thaliana* до водного дефіциту

Оцінку участі окремих HSP у забезпеченні посухостійкості проростків *A. thaliana* проводили з використанням моделі імітації прогресуючого водного дефіциту в стерильному агаризованому середовищі (рис. 4.19, А), характеристики якої наведено в п. 4.1.2. У даному експерименті інтегральними ростовими показниками служили довжина і добовий приріст головного кореня. Показано, що за нормальної вологості (в контролі) проростки мутантних ліній *Athsp90-4* і *Athsp70-5* мали меншу довжину кореня порівняно з диким типом, тоді як у двох інших мутантів спостерігали

ли лише тенденцію до зниження (рис. 4.20). У проростків *Athsp70-5* гальмування росту виявилось достовірним також і за добовим приростом.

При імітації посухи зниження вологості середовища призводило до поступового пригнічення росту, яке значно посилювалося, починаючи з 3-ої доби, і закінчувалося практично повною зупинкою росту на 5-ту добу експерименту. Така кінетика росту може бути обумовлена пригніченням проліферативної активності меристематичних клітин кореня та розтягу клітин у зоні диференціації (Bobrownyszky, 2006). При цьому всі мутанти мали достовірно меншу довжину кореня порівняно з диким типом (рис. 4.19, Б, 4.20). Зниження добового приросту кореня у проростків *Athsp90-1* і *Athsp70-5* було достовірним протягом всього періоду розвитку водного дефіциту, у *Athsp90-4* і *Athsp70-14* – на 2-4-ту добу.

Таким чином, у всіх досліджених нокаут-мутантів пригнічення росту за умов прогресуючого водного дефіциту виявилось більш вираженим порівняно з диким типом. Оскільки низькі темпи росту проростків *Athsp70-5* і *Athsp90-4*, або тенденція до їх зниження у *Athsp70-14* і *Athsp90-1* визначались також в контролі, можна припустити, що певна частина ефекта водного дефіциту у мутантних проростків може пояснюватися загальною необхідністю відповідних генів для підтримання ростової активності. З літератури відомо, що певне уповільнення розвитку за нормальних умов відмічалось у дорослих рослин мутантних ліній *Athsp90-2* і *Athsp90-3*, дефіцитних за відповідними конститутивними генами (високо гомологічними до *AtHSP90-4*) (Sangster et al., 2007). У нокаут-мутанта *Athsp90-1* спостерігали появу змінених фенотипів, на основі чого висловлене припущення про суттєвість навіть малих кількостей відповідного індукцибельного білка для нормального розвитку рослин (Samakovli et al., 2007). Редукований ріст реєстрували також при порушенні експресії гена *AtHSP70-15*, високо гомологічного до *AtHSP70-14* (Jungkunz et al., 2011). Однак, за результатами цих авторів, рослини нокаут-мутанта *Athsp70-14* на стадії розетки від дикого типу не відрізнялись.

Слід підкреслити, що за нашими даними більш чутливими до посушливих умов виявилися мутанти *Athsp70-5* і *Athsp90-1* по індукцйбельних генах. Це виражалось як в низьких темпах росту кореня протягом розвитку водного дефіциту, так і в більш ранній його зупинці при сильному зневодненні. Нагадаємо, що аналіз експресії відповідних генів показав їх слабку індукцію на третю добу висихання середовища (див. п. 4.1.2).

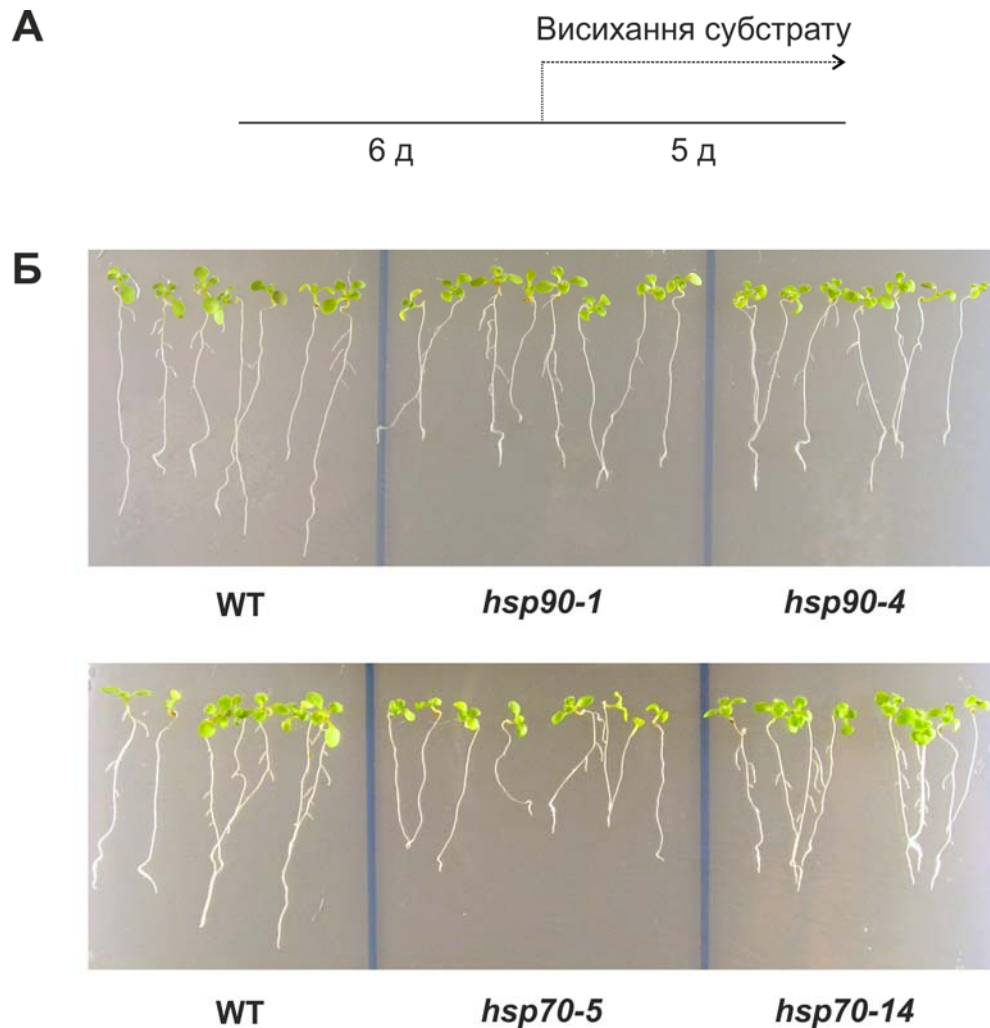


Рис. 4.19. (А) Схема експерименту з моделювання прогресуючого водного дефіциту в агаризованому середовищі. (Б) Проростки *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* на 5-ту добу росту за умов водного дефіциту.

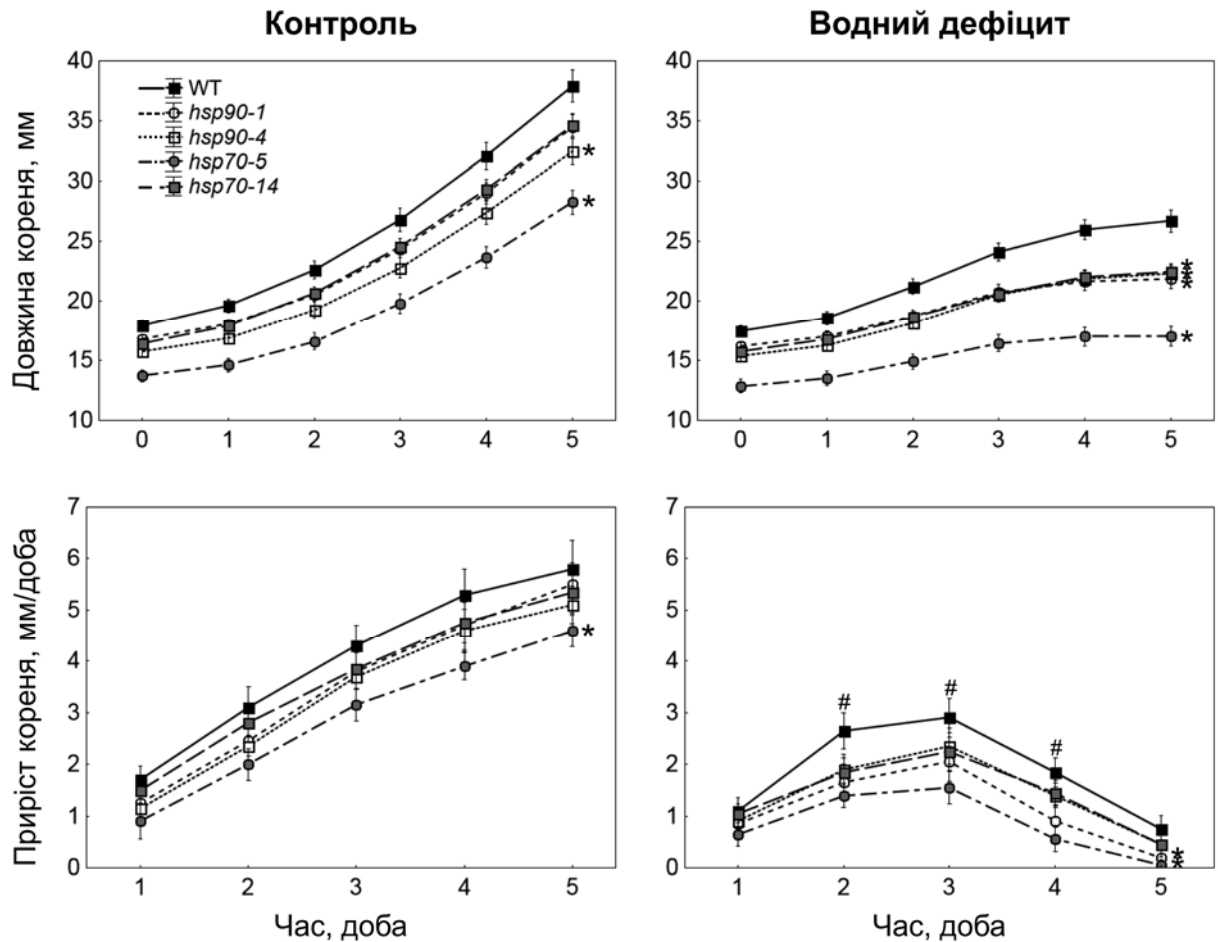


Рис. 4.20. Динаміка росту головного кореня проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* та *Athsp70-14* через 0-5 діб після переносу на середовище II у контролі та за умов прогресуючого водного дефіциту. Представлено результати трьох експериментів ($M \pm SE$). (*) Статистично значуща різниця між диким типом та позначеною мутантною лінією на всіх строках експерименту; (#) – між диким типом та всіма мутантними лініями на окремих строках експерименту (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$).

Оскільки як за нашими даними, так і за даними інших дослідників (Rizhsky et al., 2004) високий рівень індукції за посушливих умов визначали лише у *AtHSP70-4* – гена головного індукцибельного HSP70 при тепловому шоці, можна припустити, що малі кількості *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* можуть

забезпечувати додаткове посилення індукбельного компонента при зневодненні вище певного порогового рівня.

Таким чином, дані функціонального аналізу нокаут-мутантів *hsp* протягом розвитку водного дефіциту свідчать про те, що експресія як конститутивних *AtHSP70-14* і *AtHSP90-4*, так й індукбельних *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* (при тому, що останні показали лише слабку активацію у відповідь на зниження вмісту води) роблять свій внесок у підтримання ростової активності клітин в умовах водного дефіциту.

Виходячи із загальних характеристик даної моделі створення водного дефіциту (Bobrownuzky, 2006), отримані нами дані стосовно активації експресії генів *HSP* у екотипу Col-0 та знаження ростової активності у нокаут-мутантів *hsp* на 3-тю добу вказують на те, що критичні зміни білкового гомеостазу клітин в рамках даної моделі відбуваються при зменшенні вмісту води у середовищі нижче 40%. Це також корелює з різкою активацією біосинтезу проліну та зниженням активності проліферації меристематичних клітин кореня і утворення корневих волосків (Бобровницький, 2013; Бобровницький, 2016).

Відомо, що зниження кількості вільної та зв'язаної води в клітинах призводить до порушення гідратних оболонок білків, їх денатурації та втрати ферментативної активності (Billi, Potts, 2002), що потребує захисту порушених білкових структур шаперонами/HSP разом з дегідринами, Lea-білками і сумісними осмолитами (Кузнецов, Шевякова, 1999; Cuming, 1999; Bray, 2002; Белявская, 2003; Жук, 2011; Nanin et al., 2011; Chakrabortee et al., 2012). При цьому шаперони запобігають агрегації денатурованих білків та відновлюють їх нативну структуру при регідратації, або спрямовують до протеолізу (Mayer, Bukau, 2005). Здатність шаперонів протидіяти дезактивації ферментів за денатуруючих умов доведена *in vitro* (Liu et al., 2017). Про значення HSP для стійкості рослинних клітин до зневоднення свідчить також їх накопичення у зародку насіння та пилку в період дозрівання та висихання (Sung et al., 2001; Prasinos et al., 2005). При цьому

відмічаються особливості експресії окремих *HSP*, що підтверджує певну специфічність функціонування відповідних ізоформ в цих процесах. Крім того, показано, що надекспресія *HSP* підвищує стійкість рослинних клітин до різних несприятливих факторів, в тому числі, й до водного дефіциту, а також впливає на ріст і розвиток (Sung, Guy, 2003; Sato, Yokoya, 2008; Cazalé et al., 2009).

Загалом, отримані нами результати аналізу стійкості нокаут-мутантів *hsp* доводять, що *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* є додатковим індукцибельним компонентом у *A. thaliana*: вони мають важливе значення для забезпечення теплостійкості клітин (що відповідає їх потужній індукції), а також є суттєвими для підтримання ростової активності за впливу водного дефіциту (при вкрай низькому рівні їх генної експресії). Показано, що внесок *AtHSP70-5* при цьому є більш суттєвим.

4.3. Тканиноспецифічність експресії генів *HSP*

Для оцінки специфічності функціонування окремих *HSP* вивчали особливості тканинної локалізації генної експресії за нормальних і стресових умов. Для цього використовували трансгенні лінії *A. thaliana* GT_5_106091 і GT_3_103910, які містять сигнальний ген *uidA*, що кодує фермент β -глюкоронідазу (GUS), під контролем промоторів генів *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2* відповідно. Обидва гени експресуються конститутивно: *AtHSP70-10* кодує білок мітохондрій, *AtHSP90-2* – білок цитозолу/ядра. Для аналізу використовували 10-12-добові проростки, що зростали в умовах стерильної культури на агаризованому середовищі за нормальних і стресових умов. Теплову обробку проводили шляхом експозиції закритих чашок з проростками на середовищі при 37°C протягом 2 год. Умови водного дефіциту створювали шляхом поступового підсихання субстрату в стерильній культурі протягом 5 діб, як описано вище (п. 4.1.2).

За нормальних умов експресія *AtHSP70-10* виявлялась на високому рівні у гідатодах сім'ядоль і листків, прилистках, клітинах центрального циліндру і провідних пучках зони диференціювання і зрілої зони кореня, на низькому рівні – у меристемі кореня та кореневій шийці (рис. 4.21). Стосовно гідатод слід відмітити, що продукт гістохімічної реакції GUS детектувався в апікальній гідатоді сім'ядоль та апікальній і латеральних гідатодах листків розетки, як сформованих, так і таких, що ще ростуть (рис. 4.21, а, в-є). Гідатоци – високоспеціалізовані структури, які розташовані на кінці провідних пучків на краю листкової пластинки. Вони складаються з епітеми – безхлорофільних епідермальних клітин невеликих розмірів, які контактують з клітинами ксилеми і паренхіми (Candela et al., 1999; Недуха, 2011). Основна їх функція – забезпечення гутації, тобто активної секреції води з розчиненими іонами, метаболітами і білками, що потребує енергетично-залежного транспорту цих речовин і є одним з ключових регуляторів водного статусу рослин (Pilot et al., 2004). Більш детальний аналіз показав інтенсивне забарвлення клітин палисадної та губчастої паренхіми і слабке забарвлення клітин епідерми, продихів і трихом в області розташування гідатод (рис. 4.21, д-є; 4.22, в).

Враховуючи те, що *AtHSP70-10* є шапероном мітохондрій, можна припускати його необхідність для підтримання енергозалежних процесів в клітинах гідатод і контактуючих з ними клітинах. Проте різниця в інтенсивності експресії відповідного гена між окремими клітинами даної структури – висока в паренхімі та слабка в поверхневому шарі клітин, продихах і трихомах – вказує на специфічне залучення шаперона *AtHSP70-10* в певні клітинні процеси. Характерно, що гістохімічне забарвлення було присутнім в трихомах гідатод і не визначалось у трихомах інших частин листка. Такі результати можуть свідчити про системну регуляцію генної експресії і важливість цього шаперона у функціонально різних клітинах однієї структури.

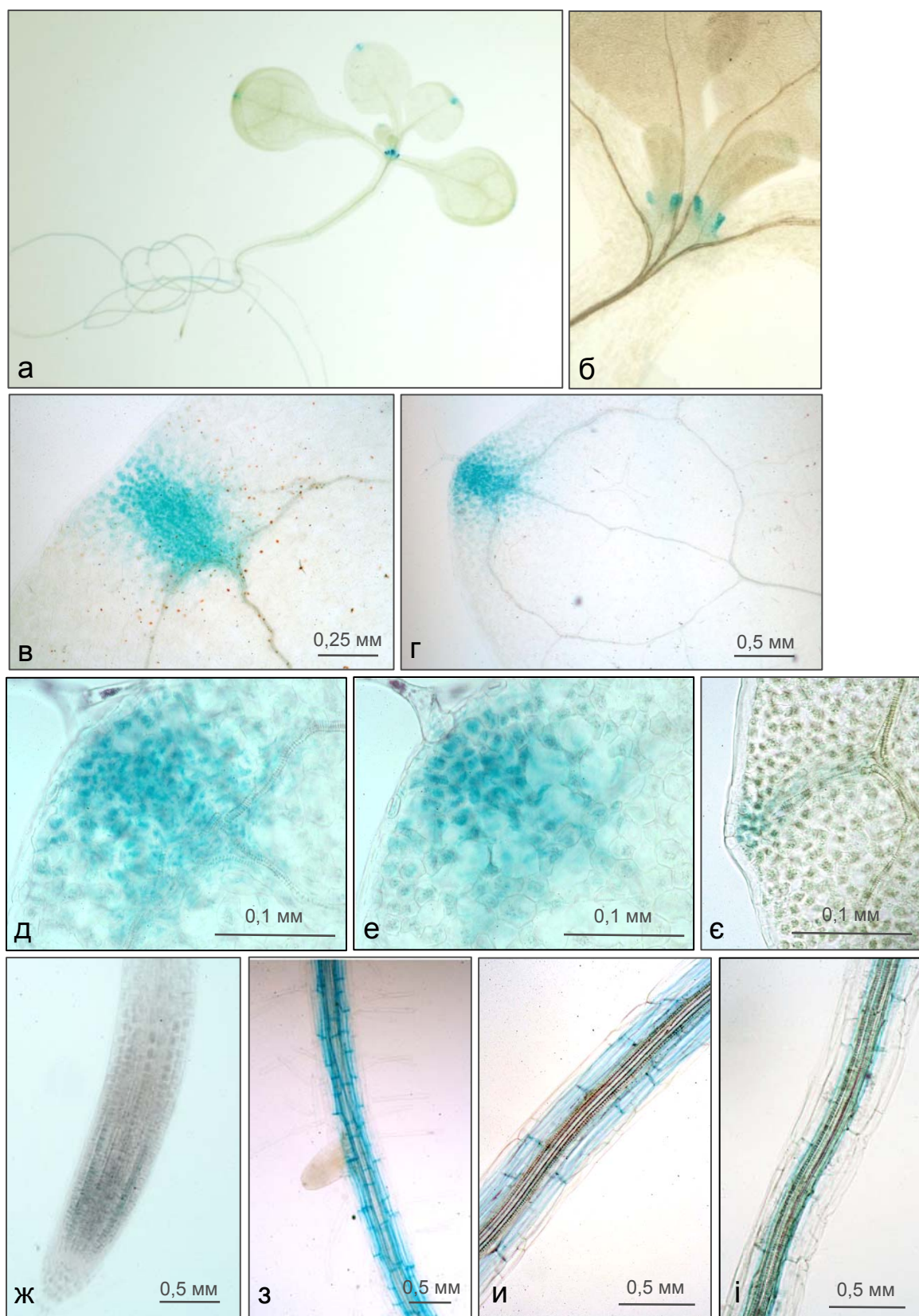


Рис. 4.21. Тканина локалізація експресії *HSP70-10-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_5_106091 за нормальних умов. (а) 12-добовий проросток; (б) апекс стебла з листками та прилистками; (в, г) – апікальні гідатоли сім'ядолі та листка; (д, е) – апікальна гідатола листка із забарвленням відповідно палисадної та губчастої паренхіми; (е) латеральна гідатола листка; (ж) апекс, (з) зона диференціювання і (и, і) зріла зона кореня.

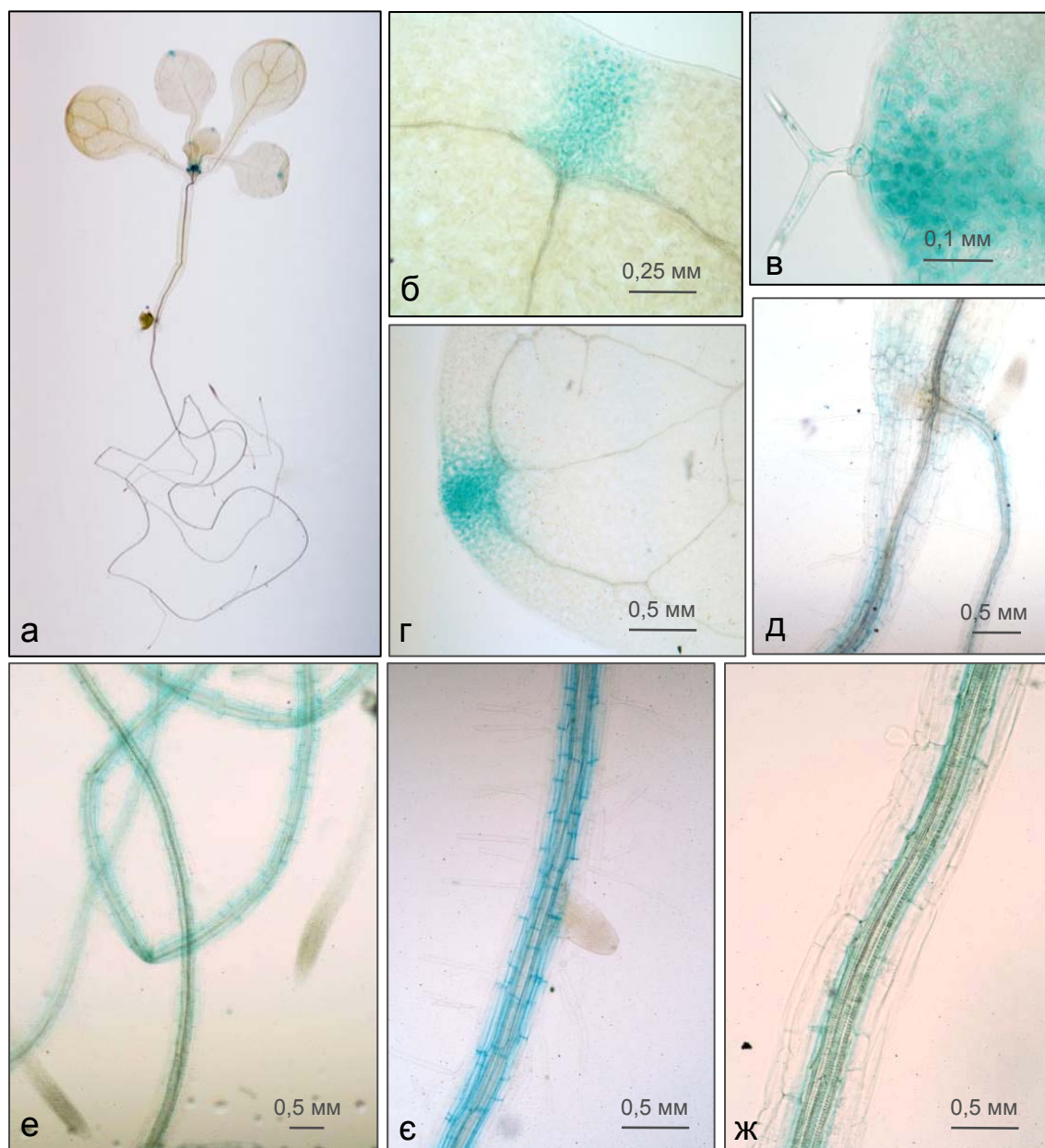


Рис. 4.22. Тканина локалізація експресії *HSP70-10-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_5_106091 після експозиції при 37°C протягом 2 год. (а) 12-добовий проросток; (б, г) апікальні гідатоли сім'ядолі та справжнього листка; (в) апікальна гідатола листка з трихомою; (д) коренева шийка; (е-ж) корені; (е) зона диференціювання і (ж) зріла зона кореня.

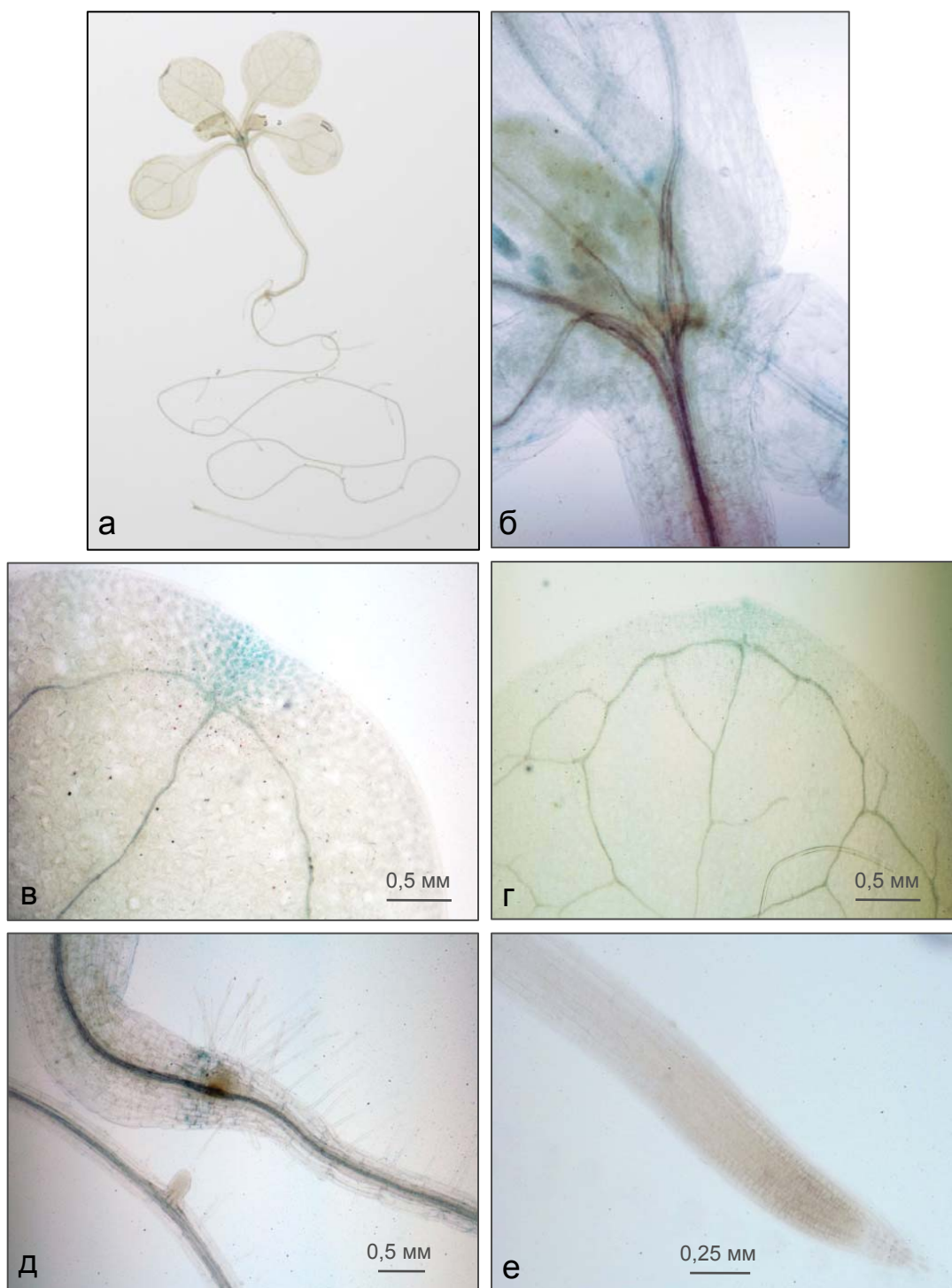


Рис. 4.23. Тканина локалізація експресії *HSP70-10-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_5_106091 за умов водного дефіциту. (а) 11-добовий проросток; (б) апекс стебла з листками та прилистками; (в, г) апікальні гідатоли сім'ядолі та справжнього листка; (д) коренева шийка; (е) апекс кореня.

Експресія *AtHSP70-10* в гідатодах і прилистках корелює з показаною іншими дослідниками експресією в цих структурах аскорбатпероксидази *Arx2*, яка є членом іншої універсальної захисної системи – антиоксидантної (Панчук та ін., 2008; Панчук, 2015). Крім того, експресія *AtHSP70-10* виявлялась в провідних тканинах кореня і клітинах кореневої шийки, перехідної зони між кореневою і стебловою системою, для яких характерні інтенсивні транспортні процеси. Такі дані дозволяють припустити, що синтез і функціонування цього шаперона притаманні клітинам окремих тканин з активним метаболізмом і транспортною функцією. Таке припущення узгоджується з тим, що однією з функцій шаперонів органел є підтримання розгорнутих білків під час транспортування між клітинними компартментами (Sheffield et al., 1990; Brodsky, 1996; Matouschek et al., 2000; Feldman, Frydman, 2000; Jackson-Constan et al., 2001; Sung et al., 2001a).

За стресових умов локалізація експресії *AtHSP70-10* зберігалась, однак змінювалась її інтенсивність. Після 2 год теплової експозиції експресія цього гена значно посилювалась (рис. 4.22), що відповідає максимальному рівню мРНК протягом стресової реакції за результатами ЗТ-ПЛР (див. рис. 4.2, п 4.1.1). В умовах водного дефіциту навпаки, гістохімічне забарвлення *AtHSP70-10-GUS* виявилось слабшим (рис. 4.23), хоча ЗТ-ПЛР-аналіз показував активацію цього гена (див. рис. 4.10, п 4.1.2).

Експресію *AtHSP90-2* за нормальних умов визначали практично в усіх органах проростків (рис. 4.24, 4.25) і разом з тим відмічали варіації її інтенсивності між проростками (рис. 4.24, а, б). Враховуючи те, що гістохімічну реакцію ми проводили за однакових контрольованих умов для всіх проростків (часто для кількох проростків разом в одній ємності), таку різницю в інтенсивності забарвлення можна інтерпретувати як міжіндивідуальну варіабельність рівня базової експресії цього гена. Вважається, що саме різниця між генотипами в рівні експресії стресових генів, зокрема всіх родин HSP, визначає різний рівень стійкості організмів (Senthil-Kumar et al., 2007).

В сформованих сім'ядолях і справжніх листках високий рівень експресії *AtHSP90-2* виявлявся в провідних пучках, паренхімі, гідатодах і прилистках, менш інтенсивний – в черешках, епідермісі, продихах і трихомах (рис. 4.24). В листках, що ростуть, експресія виникала спочатку в апексі листка і далі розвивалась поступово – від дистальної частини листкової пластинки до базальної (рис. 4.24, а, б, е). Такий характер просторової динаміки експресії цього гена корелює з переходом клітин від поділу до розтягування. Відомо, що в листку протягом його формування встановлюється поздовжній проліферативний градієнт. Зупинка проліферативної активності відбувається поступово, починаючи з апексу листка і рухаючись «фронтом арешту проліферації» в напрямку його базальної частини (Donnelly et al., 1999; Johnson, Lenhard, 2011). Порівнюючи з цим характер експресії *AtHSP90-2*, логічно припустити, що ініціація синтезу шаперона пов'язана з переходом клітин листкової пластинки *A. thaliana* до розтягування, досягаючи максимального рівня у сформованих листках.

В гіпокотилі локалізація та інтенсивність гістохімічного забарвлення HSP90-2-GUS значно варіювала між проростками (рис. 4.25, а, б). Слабку експресію *AtHSP90-2* виявляли в центральному циліндрі коренів і майже не виявляли в кореневих апексах (рис. 4.25, в, г).

Слід відмітити, що наявність експресії *AtHSP90-2* в різних тканинах більшості органів цілком узгоджується з уявленням щодо конститутивних HSP90 як білків нормального метаболізму (“house-keeping proteins”) (Picard, 2002).

Після теплової обробки локалізація гістохімічного забарвлення HSP90-2-GUS залишалась незмінною, і разом з тим відмічалось посилення його інтенсивності в сім'ядольних і справжніх листках (рис. 4.26). Це відповідає максимальній індукції експресії відповідного гена під впливом високої температури за результатами ЗТ-ПЛР (див. рис. 4.4, п. 4.1.1).

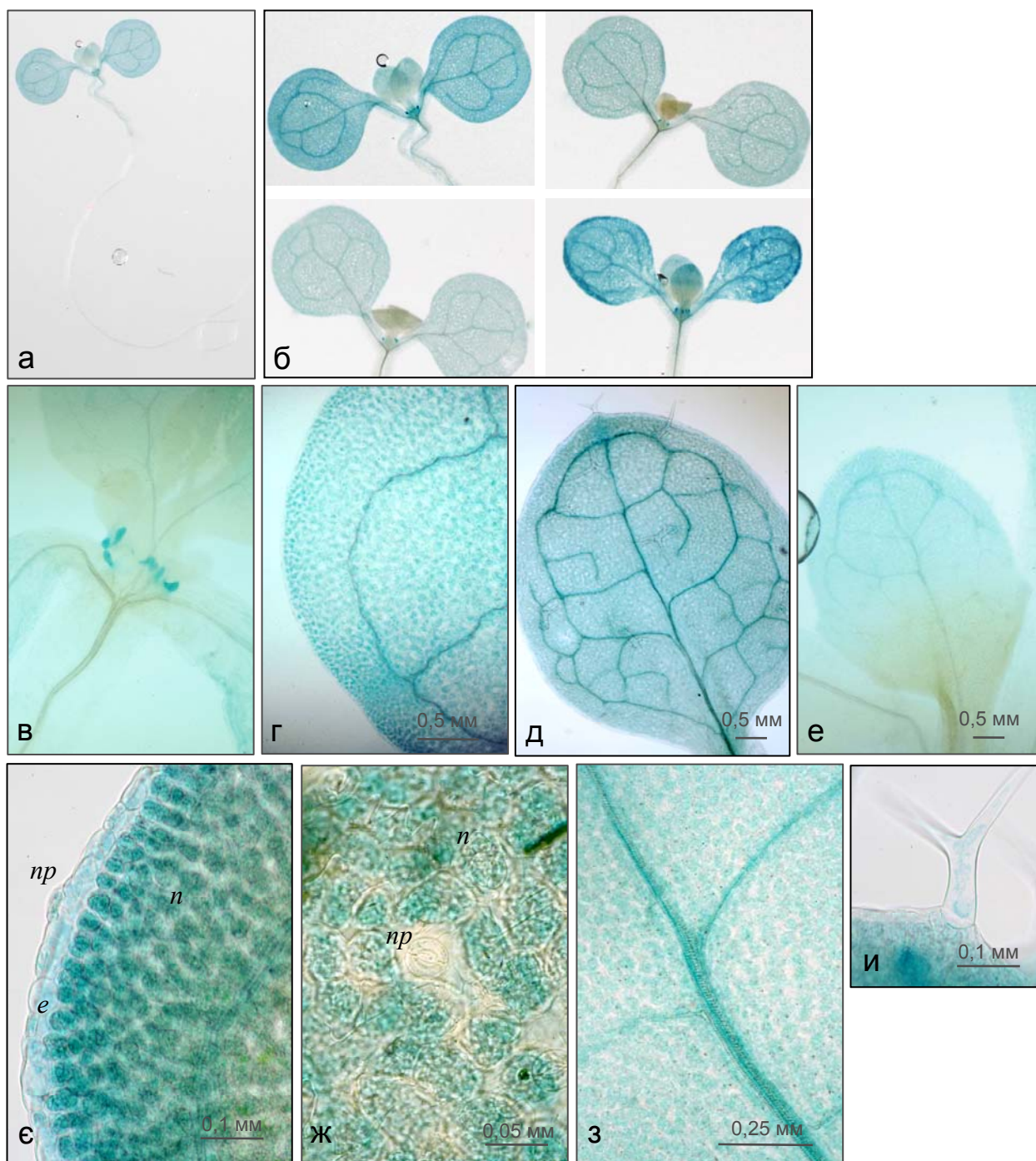


Рис. 4.24. Тканина локалізація експресії *HSP90-2-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_3_103910 за нормальних умов: (а, б) 12-добові проростки; (в) апекс стебла з листками та прилистками; (г) фрагмент сім'ядолі; (д, е) справжні листки – сформований і що розвивається; (є, ж) фрагменти сім'ядольної пластинки з клітинами паренхіми, епідерми та продихами; (з) провідний пучок сім'ядолі; (и) трихома. *n* – паренхіма, *e* – епідерма, *пр* – продих.

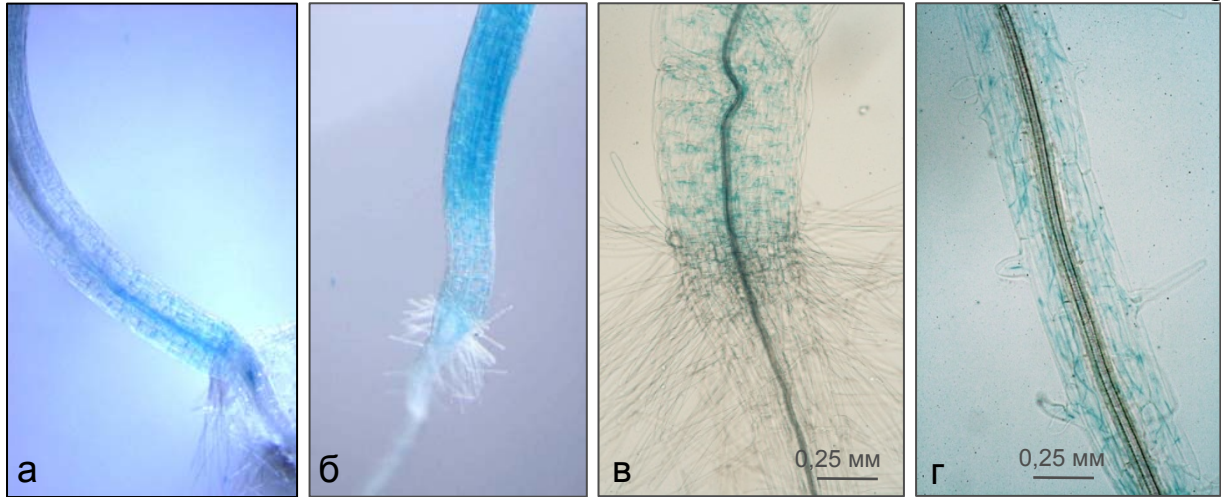


Рис. 4.25. Тканина локалізація експресії *HSP90-2-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_3_103910 за нормальних умов: (а, б) гіпокотиль; (в) коренева шийка; (г) зона диференціювання кореня.

За умов водного дефіциту інтенсивне забарвлення *HSP90-2-GUS* зберігалось в провідних пучках листків при загальному зниженні в інших тканинах (рис. 4.27). Проте, за даними ЗТ-ПЛР-аналізу експресії *HSP90-2* рівень мРНК при посиленні водного дефіциту суттєво не змінювався (див. рис. 4.12, п. 4.1.2). Разом такі дані можуть свідчити про певний перерозподіл функціонального навантаження цього шаперона під час адаптації рослини до посухи у бік клітин судинної системи. Крім того, враховуючи зниження інтенсивності забарвлення *GUS* після 5 діб прогресуючої посухи у обох досліджених генів, не можна виключати можливості впливу на рівень гістохімічної реакції зміни проникності оболонок і внутрішнього середовища клітин.

Таким чином, результати аналізу показали тканинспецифічність експресії *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2*, що свідчить про певну специфічність функціонування відповідних шаперонів. Також для *AtHSP90-2* відмічена варіабельність конститутивної експресії між індивідуумами. За впливу високої температури і водного дефіциту зміни стосувались інтенсивності експресії цих генів – в окремих тканинах та в цілому, на фоні збереження загального характеру її локалізації.



Рис. 4.26. Тканина локалізація експресії *HSP90-2-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_3_103910 після експозиції при 37°C протягом 2 год. (а) 12-добовий проросток; (б) апекс стебла з листками та прилистками; (в) фрагмент сім'ядолі; (г) фрагмент справжнього листка.

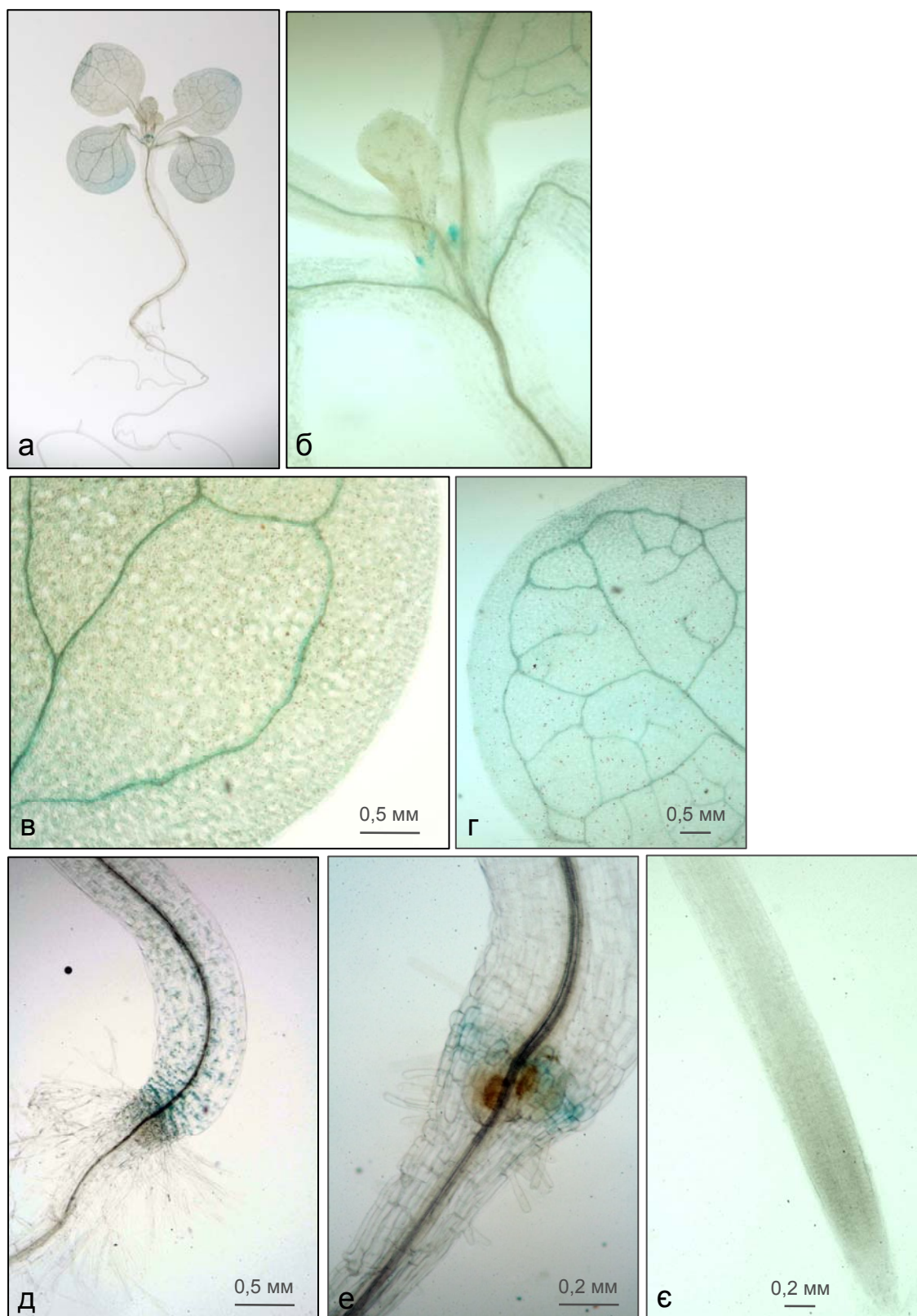


Рис. 4.27. Тканина локалізація експресії *HSP90-2-GUS* трансгенної лінії *A. thaliana* GT_3_103910 за умов водного дефіциту. (а) 12-добовий проросток; (б) апекс стебла з листками та прилистками; (в) фрагмент сім'ядолі; (г) фрагмент справжнього листка; (д, е) коренева шийка, (е) апекс кореня.

Висновок про тканиноспецифічність експресії окремих членів родин HSP, в цілому, узгоджується з даними літератури. Так, експресія рекомбінантного гена *AtHSP90-1-GUS* визначалась лише після теплового шоку і локалізувалась переважно в апексах кореня і стебла проростків (Haralampidis et al., 2002; Yamada et al., 2007). У *Brassica napus* значну кількість HSP90 знайдено в молодих тканинах, що швидко проліферують, таких як апекс стебла і квіткові бруньки (Krishna et al., 1995). З використанням ЗТ-ПЛР виявлено відмінності в рівні експресії окремих HSP70 між коренем, листками, стеблом, квітками і стручками *A. thaliana*, що свідчить про певну органоспецифічність функціонування членів родини HSP70 (Sung et al., 2001). Зокрема, експресію *AtHSP70-10 (mtHsc70-2)* виявляли в коренях, стеблі, листках (найбільше), квітках, а також стручках протягом дозрівання насіння та в насінні в період проростання. Проте, отримані нами дані доводять, що експресія як *AtHSP70-10*, так і *AtHSP90-2* притаманна певним спеціалізованим тканинам як листків, так і коренів проростків. На підставі цього, можна говорити про тканино- і органоспецифічність функціонування HSP/шаперонів за нормальних умов і тканиноспецифічну модуляцію їх синтезу (і, очевидно, активності функціонування) під впливом несприятливих чинників.

4.4. Особливості кінетики синтезу HSP70 у зв'язку з діапазоном стійкості рослин

Різниця між видами за стійкістю повинна визначатися активністю захисних клітинних механізмів у стрес-реакції та здатністю до специфічної метаболічної та морфологічної адаптації при відхиленні зовнішнього фактора від норми та його наближенні до межі стійкості, специфічної для кожного виду (Lichtenthaler, 1998; Кузнецов, 2001; Кордюм и др., 2003; Senthil-Kumar et al., 2007). На тваринних об'єктах доведено, що інформативним показником при вивченні молекулярних основ резистентності є кінетика синтезу HSP,

зокрема HSP70 (Tomanek, Somero, 2000; Tomanek, 2002; Timofeyev et al., 2009; Шатилина и др., 2010; Shatilina et al., 2011; Bedulina et al., 2013). Враховуючи це, нами проведено аналіз кінетики синтезу цитозольних HSP70 за несприятливих змін екологічних факторів та її взаємозв'язку зі стійкістю рослин. Вибір родини шаперонів HSP70 при цьому був обумовлений тим, що індукція їх синтезу вважається одним з універсальних механізмів захисту протеостазу клітин при дії стресорів різної природи практично у всіх організмів, включаючи рослини (Vierling, 1991; Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000; Sørensen et al., 2003).

Ключовими факторами довкілля, що визначають розповсюдження рослин, є температура і вода. Тому при виборі об'єктів ми ставили завдання порівняти види, контрастні за адаптивними властивостями до змін цих факторів, враховуючи при цьому спрямованість сучасних досліджень на вивчення немодельних видів (Feder, Hofmann, 1999). Отже, модельний вид *A. thaliana* з помірним адаптаційним потенціалом, порівнювали з мезофітами *Malva silvestris*, *M. pulchella* (*Malvaceae*) і *Sium sisaroides* (*Apiaceae*) та гідрофітом *Trapa natans* (*Trapaceae*).

Широке розповсюдження представників родини *Malvaceae* обумовлене їх значною жаро- і посухостійкістю та здатністю переносити тимчасове перезволоження ґрунту (Рахметов, 2000). Для дослідження нами обрано два види мальви, відмінних за певними онтогенетичними характеристиками. *M. sylvestris* – високопластичний вид, який відрізняється нерівномірною схожістю насіння, більш повільним ростом проростків і тривалим онтогенетичним періодом порівняно з ранньостиглим сортом Сильва *M. pulchella* (створеним методом багаторічного добору, автор Д.Б. Рахметов). Яскраво вираженою фізіологічною адаптивною реакцією мальви на несприятливі умови, зокрема, високу температуру, нестачу та надлишок води в ґрунті, є збереження верхівкової точки росту стебла і верхніх листків за рахунок передчасного старіння та відмирання нижніх листків.

S. sisaroides (*Apiaceae*) – типова рослина вологих ґрунтів неподалік водойм; зростає на суходолі, але здатна адаптуватися до затоплення; у літературі характеризується як мезофіт (Kordyum et al., 2017) або гігрофіт (Петрова, Барькіна, 2005). Специфічна екологічна ніша цього виду визначається спроможністю рослин швидко пристосовуватися до змін водного режиму протягом онтогенезу.

T. natans (*Trapaceae*) – водна рослина з прикріпленим до дна коренем і плаваючою листковою розеткою; спеціалізована до існування у водному середовищі, якому притаманна менша амплітуда коливань температури, ніж на суші. Це дозволило прогнозувати низький рівень стійкості рослин цього виду до температурних змін.

Для моделювання впливу екологічних чинників застосовували гостру дію високої температури та кореневого затоплення, а також поступовий розвиток ґрунтової посухи. Для лабораторних експериментів використовували ювенільні рослини, які загалом характеризуються найбільшою чутливістю до змін довкілля та найбільшим рівнем стресової індукції генної експресії HSP у вегетативних органах (Yung et al., 2001; Sørensen et al., 2003).

4.4.1. Кінетика синтезу HSP70 у зв'язку з теплостійкістю рослин

Стійкість рослин до високої температури визначали за їх виживаністю та фізіологічним станом через 2 доби реадаптації після 48-годинної експозиції при 37°C. Отримані дані дозволили розташувати види за теплостійкістю у наступному порядку: *A. thaliana* < *M. pulchella* < *M. silvestris* < *S. sisaroides* (табл. 4.1).

Теплова обробка *A. thaliana* спричиняла дозо-залежне відставання у рості та розвитку від контролю, прогресуюче пошкодження і загибель понад 80% рослин після 48 год дії фактора (рис. 4.28).

**Стан рослин через 2 доби реадаптації після експозиції при 37°C протягом
48 год**

Вид	Показник
<i>A. thaliana</i>	Виживаність 10-20% рослин
<i>M. silvestris</i>	100%-ва виживаність, втрата нижніх листків (див. рис. 4.30)
<i>M. pulchella</i>	100%-ва виживаність, втрата нижніх листків (див. рис. 4.30)
<i>S. sisaroides</i>	100%-ва виживаність

Вестерн-блот-аналіз з антитілами до консервативної ділянки цитозольних HSP70 виявив на імуноблотах *A. thaliana* зону з мол. м. 71 кДа. За характером кінетики синтезу і молекулярною масою визначена зона може містити конститутивний AtHSP70-3 та індукцибельний AtHSP70-4 з прогнозованою мол. м. 71,1 кДа (Lin et al., 2001). Слід відмітити, що ситуацію, коли імунореактивна білкова зона HSP70 містить більше ніж одну ізоформу, можна також очікувати у інших видів, результати аналізу яких викладено в цьому підрозділі. Проте для зручності кожна зона HSP70 умовно позначатиметься в тексті як «білок HSP70» відповідної молекулярної маси, маючи на увазі, що її кількісні зміни відобразатимуть сумарний рівень ізоформ з однаковою або майже однаковою молекулярною масою.

Вестерн-блот-аналіз показав, що стресова реакція листків *A. thaliana* на підвищення температури містила швидку, вже в перші 0,5 год, активацію синтезу HSP70, яка досягала максимуму через 2 год. Далі кількість його знижувалась – незначно протягом першої доби і до рівня нижче початкового у другу добу (рис. 4.28, 4.29). Такий параболоподібний характер кінетики синтезу HSP70 відповідає кінетиці експресії відповідних генів в проростках цього виду, представленої у п. 4.1.1. Важливо також відмітити, що зниження вмісту HSP70 у другу половину експозиції супроводжувалось незворотними пошкодженнями рослинних організмів і, ймовірно, було однією з причин погіршення їх стану, зупинки розвитку та врешті загибелі.

Отже, аналіз HSP70 у модельного виду *A. thaliana* у відповіді на гостре підвищення температури до 37°C, яка викликає максимальну індукцію HSP

(Клюева, Самохвалов, 1990) і тому максимально відповідає адаптивному потенціалу цього виду, показав нетривалу активацію синтезу. Це збігається з результатами, отриманими для *A. thaliana* іншими дослідниками (Клюева, Самохвалов, 1990; Sung et al., 2001). Такий характер синтезу цілком узгоджується із загальними уявленнями про те, що стресова індукція експресії *HSP70* відбувається у перші хвилини дії фактора і значно посилюється протягом кількох годин, після чого спадає. При цьому спад пов'язується з адаптацією (Маргуліс, Гужова, 2000; Schumann, 2001; Косаківська, 2003). Проте, порівняння кінетики синтезу і стану рослин після теплової експозиції в нашому експерименті доводить, що зниження вмісту *HSP70* в клітинах наприкінці експозиції пов'язано не з адаптацією до нових умов, а з поступовою втратою шаперонами спроможності підтримувати білковий гомеостаз, і тому, очевидно, відповідає стадії виснаження у стресовій реакції.

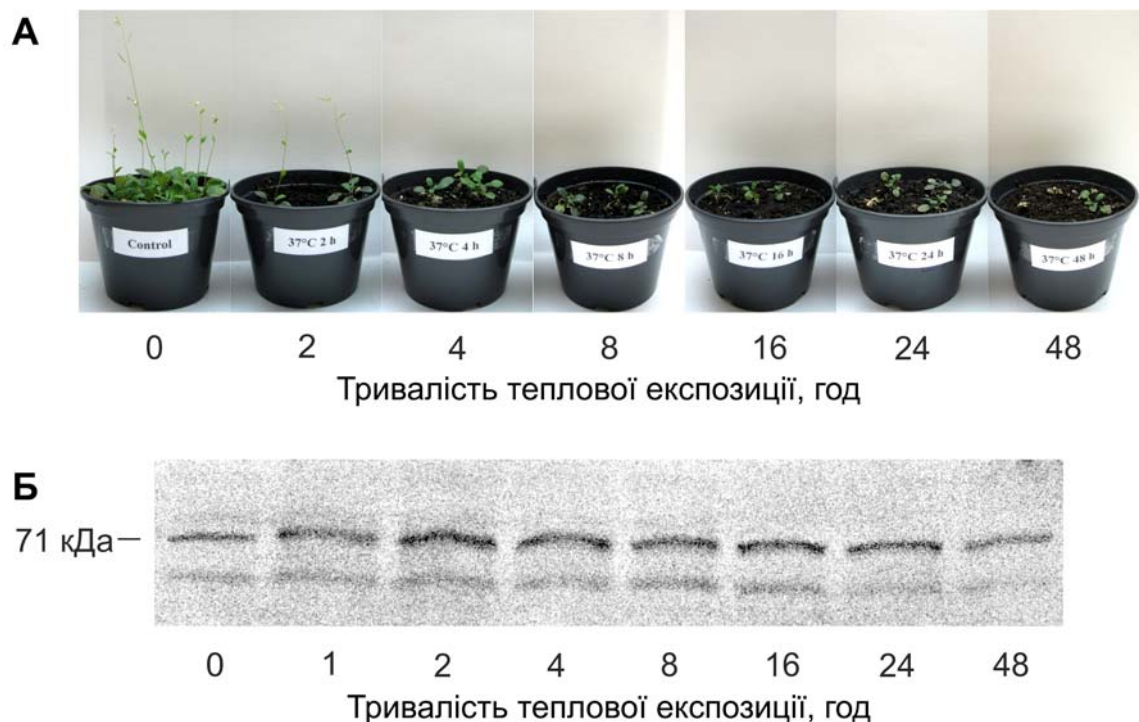


Рис. 4.28. Вплив високої температури (37°C) на рослини *A. thaliana* (Col-0) і синтез *HSP70*: (А) рослини через 2 доби після теплової експозиції; (Б) вестерн-блот аналіз *HSP70* листків.

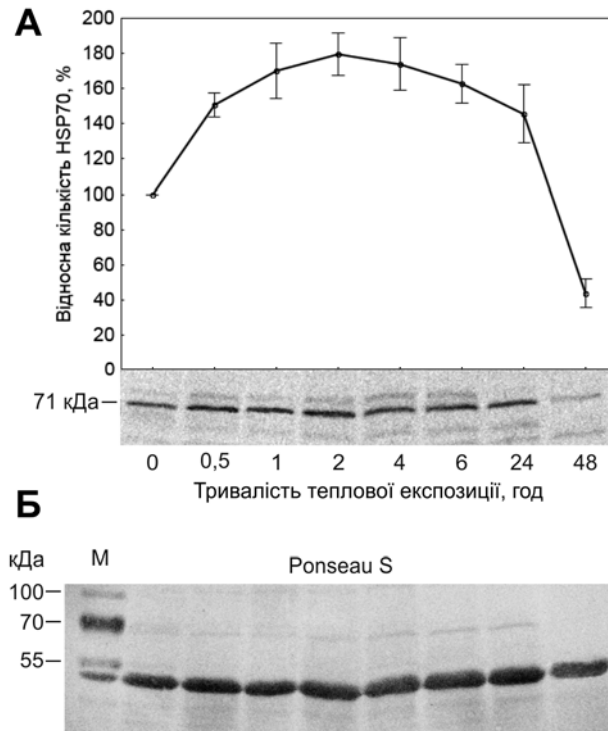


Рис. 4.29. Синтез HSP70 *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C. (А) Типовий блот розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіку рівень білка у відсотках до контролю (0 діб) ($M \pm SD$). (Б) Мембрана, забарвлена Ponceau S після електропереносу для контролю завантаження білка. М – маркер молекулярної ваги. Дано як зразок здійснення контролю кількості білка, що проводилось у кожному аналізі, проте далі не представлено.

M. silvestris і *M. pulchella* виявились близькими між собою за рівнем теплостійкості. Збереження у них верхніх листків і точки росту після теплової експозиції аж до 48 год відбувалось за рахунок відмирання нижніх листків (рис. 4.30, А). При цьому у *M. silvestris* цей процес проходив більш повільно (рис. 4.30, Б). Оскільки індукція старіння нижніх листків у мальви є яскраво вираженою неспецифічною фізіологічною реакцією за впливу не тільки високої температури, а й інших чинників, ми використовували

відсоток живих листків для диференціації її видів за рівнем стійкості в усіх експериментах даного підрозділу.

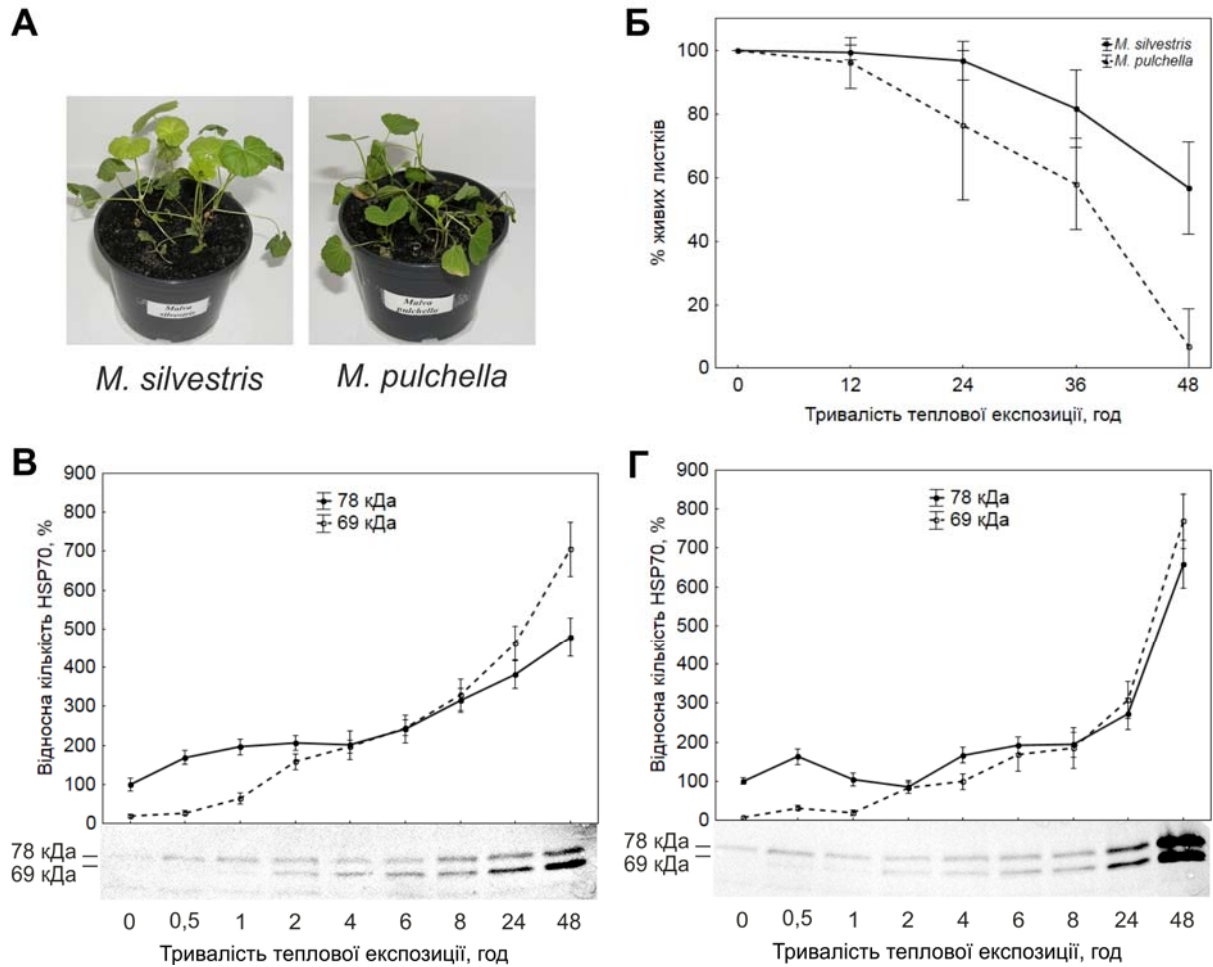


Рис. 4.30. Вплив високої температури (37°C) на *M. silvestris* і *M. pulchella*: (А) Рослини через 2 доби реадаптації після 48-годинної теплової експозиції; (Б) відсоток живих листків після 2 діб реадаптації (різниця між видами статистично значуща, One-way ANOVA, $p < 0,05$); (В, Г) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках *M. silvestris* (В) і *M. pulchella* (Г). Типові блоти розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіках рівень білка у відсотках до білка з мол. м. 78 кДа у контролі (0 год) ($M \pm SD$).

За результатами вестерн-блот-аналізу *M. silvestris* і *M. pulchella* виявлено дві імунореактивні зони HSP70 з мол. м. 78 і 69 кДа (рис. 4.30, В, Г). Характер синтезу першої зони відповідав конститутивному білку, другої – індукцибельному. Кінетика їх синтезу у відповідь на підвищення температури

до 37°C у обох видів мала схожий характер. Протягом перших 30 хв у ~1,5 рази збільшувався вміст конститутивного білка. Поріг індукції для індукцибельного білка складав 1 год, але вже через 2 год його вміст наближався до рівня конститутивного. Характерно, що подальше накопичення обох білкових зон досягало найбільшого рівня при максимальних дозах стресора. Такі результати можуть свідчити про те, що термостійкість мальви забезпечується шляхом потужного захисту білкового компоненту від теплової денатурації та деградації у верхніх листках і активної атракції метаболітів з нижніх листків. Обговорюючи різницю між видами, слід відмітити, що більш теплостійка *M. sylvestris* відрізнялась більш значною індукцією синтезу HSP70 протягом першої доби теплової експозиції, що вказує на більш потужну мобілізацію цієї захисної системи на початку стресу. Проте вищий рівень HSP70 у менш стійкої *M. pulchella* на 48-му год, навпаки, відповідає гіршому стану рослин наприкінці теплової експозиції, порівняно з *M. sylvestris*, ймовірно, внаслідок меншої ефективності інших захисних механізмів.

Рослини *S. sisaroides* залишались життєздатними та зберігали нормальний тургор після навіть 48-годинної теплової експозиції (рис. 4.31, А). Аналіз HSP70 з листків цього виду виявив одну імунореактивну зону з мол. м. 72 кДа. Ця зона визначалась за нормальних умов, а протягом теплової експозиції кількість білка в ній прогресивно збільшувалась: перші 4 год – помірно і, починаючи з 6 год, – потужно (рис. 4.31, Б). Різке збільшення вмісту білка після 6 год може бути результатом або дискретної активації конститутивної ізоформи, або запуску синтезу індукцибельної ізоформи, яка співпадає з конститутивною за молекулярною масою. Максимальний рівень цього білка підтримувався від 24 год до кінця експозиції. Таким чином, у *S. sisaroides* накопичення HSP70 протягом щонайменше 48 год відповідало нормальному фізіологічному стану рослин.

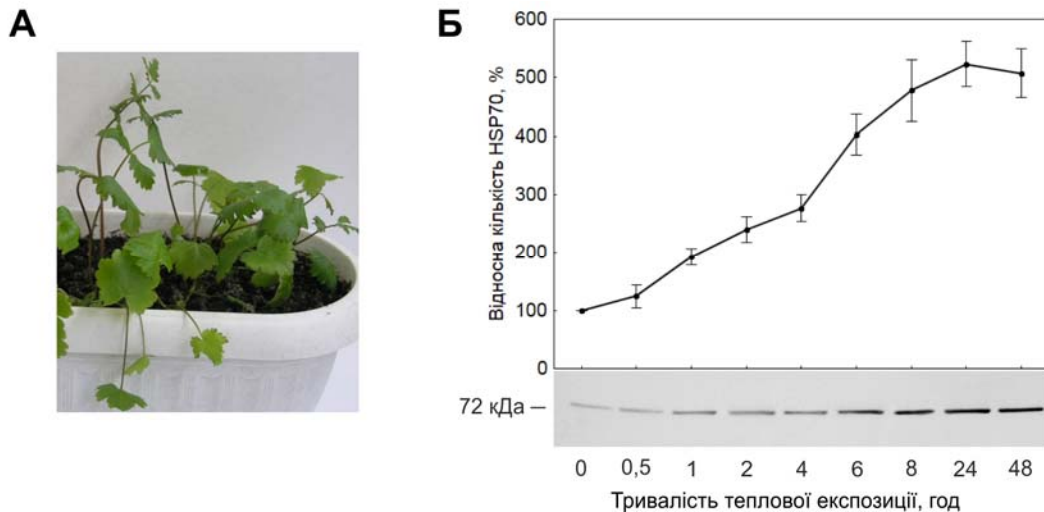


Рис. 4.31. Вплив високої температури (37°C) на *S. sisaroides*: (А) рослини через 2 доби після 48-годинної теплової експозиції; (Б) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках. Типовий блот розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіку рівень білка у відсотках до контролю (0 год) ($M \pm SD$).

Отже, з аналізу *M. silvestris*, *M. pulchella* і *S. sisaroides* випливає, що здатність рослин переносити довготривалий вплив високої температури корелює з їх здатністю до швидкої прогресивної активації синтезу конститутивного HSP70 і потужної тривалої активації після певного лаг-періоду синтезу індукцйбельної ізоформи. Такий характер кінетики синтезу HSP70 кардинально відрізняється від загальних уявлень щодо обмеженості індукції HSP першими годинами стресу, що показано для модельного виду *A. thaliana* з невисокою теплостійкістю нами та іншими дослідниками (Клюева, Самохвалов, 1990; Sung et al., 2001).

Слід також відмітити, що за нашими даними *A. thaliana* характеризувався індукцією генної експресії / активацією синтезу HSP70 в перші 0,5 год, тоді як у більш теплостійких мальви і веху лаг-період індукції складав 2 год і 6 год, відповідно. На тваринних об'єктах показано, що тепловий поріг індукції HSP у теплолюбних видів, як правило, вище, ніж у видів, адаптованих до більш помірних температур (Evgen'ev et al., 2007).

Такі закономірності певною мірою підтверджуються результатами аналізу водного виду *T. natans*. Відомо, що діапазон стійкості водних організмів до температури вужчій, ніж наземних (Одум, 1986), що ми прогнозували для *T. natans*. Рослини цього виду, зібрані у природній водоймі на фазі вегетативного росту, інкубувались при 37°C у воді за лабораторних умов. Вестерн-блот-аналіз HSP70 листків виявив імунореактивну зону з мол. м. 73 кДа і показав різке, але короткочасне підвищення вмісту цього білка через 4 год від початку дії фактора та подальше падіння нижче початкового рівня (рис. 4.32). Отже, лаг-період індукції у *T. natans* виявився довшим (4 год), а тривалість коротшою, ніж у *A. thaliana*. Такий результат підтверджує уявлення про те, що види, які займають спеціалізовану еконішу, адаптовані до малих амплітуд факторів середовища і відрізняються за реакцією HSP від видів-космополітів, що переважно показано на тваринах (Sanders et al., 1993; Tomanek, Somero, 2000; Tomanek, 2002; Тимофеев и др., 2008; Timofeyev et al., 2009; Шатилина и др., 2010; Shatilina et al., 2011; Bedulina et al., 2012, 2013).

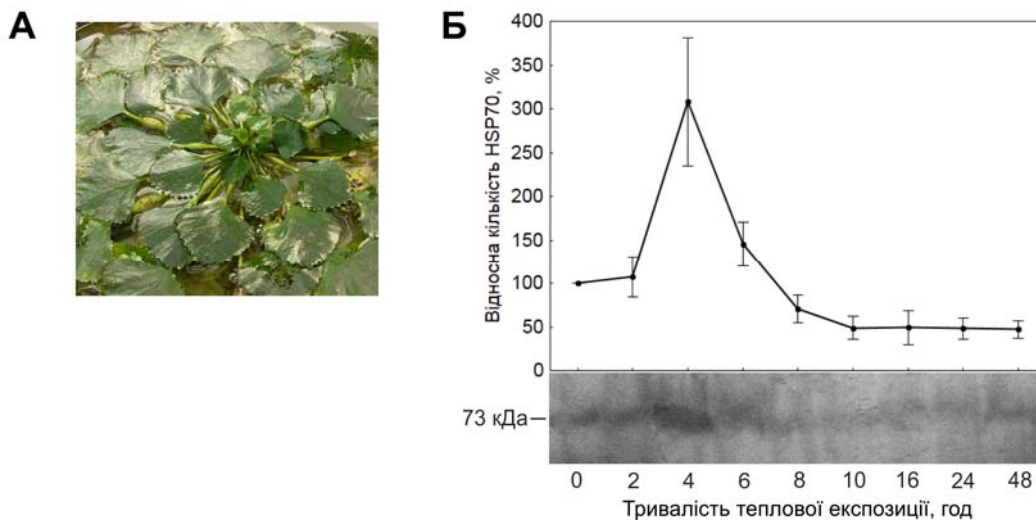


Рис. 4.32. Вплив високої температури (37°C) на *T. natans*: (А) рослини після теплової експозиції; (Б) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках. Типовий блот розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіку рівень білка у відсотках до контролю (0 год) ($M \pm SD$).

4.4.2. Кінетика синтезу HSP70 у зв'язку зі стійкістю рослин до затоплення

Рослини, що вирощувались за нормального зволоження ґрунту, піддавались затопленню кореневої системи. Стійкість до цього чинника визначали як період часу від початку затоплення, за який гинуло 50% рослин, що дозволило розташувати види у наступному порядку: *A. thaliana* < *M. silvestris* < *M. pulchella* < *S. sisaroides* (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Термін виживаності 50% рослин

Вид	Термін, доба (M ± SD)
<i>A. thaliana</i>	13 ± 1,5
<i>M. silvestris</i>	25 ± 2,2
<i>M. pulchella</i>	30 ± 2,8
<i>S. sisaroides</i>	Успішна адаптація

При вивченні реакції рослин на затоплення аналіз кінетики синтезу HSP70 як компонента неспецифічної реакції доповнено аналізом АДГ як ключового ферменту метаболічної адаптації до умов гіпоксії у двох видів – найменш стійкого *A. thaliana* і найстійкішого *S. sisaroides*. Наявність АДГ в коренях і листках визначали методом нативного електрофоретичного розподілу з наступним гістохімічним забарвленням ферменту в гелі. Крім того, для *S. sisaroides* проведено аналіз морфолого-анатомічної адаптації.

В *A. thaliana* затоплення ґрунту спричиняло гальмування переходу рослин до генеративної фази розвитку, потемніння листків, втрату тургору, відмирання нижніх листків протягом 10 діб і в подальшому загибель організму (рис. 4.33, А). Це підтверджує високу чутливість цього виду до нестачі кисню, показану й іншими дослідниками (Ellis et al., 1999; Vanti et al., 2008). За даними Ellis et al. (1999) стійкість проростків *A. thaliana* до низької концентрації кисню обмежується кількома годинами або добами.

Синтез HSP70 в листках *A. thaliana* активувався протягом 2 год від початку затоплення коренів і досягав максимуму через 4-6 год дії фактора,

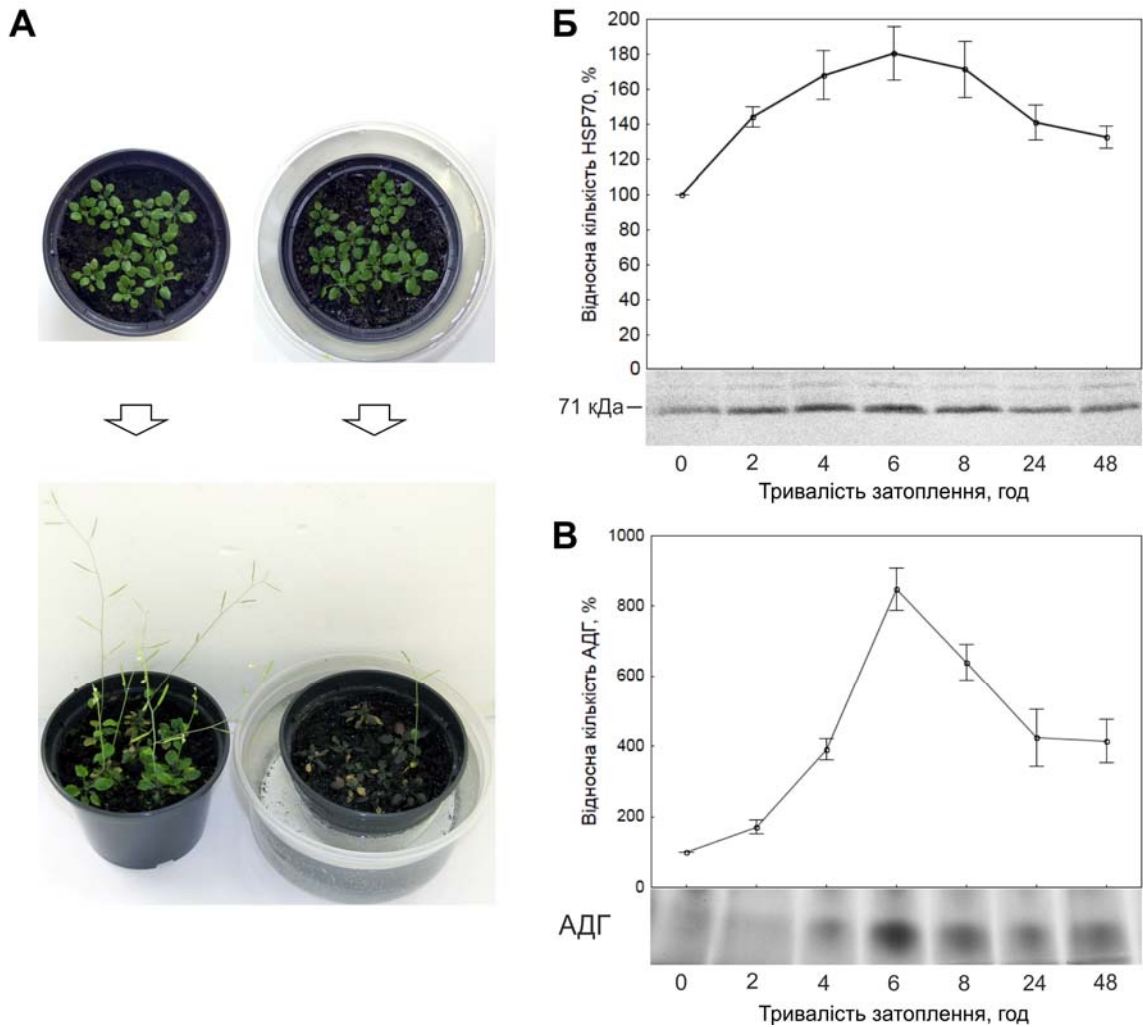


Рис. 4.33. Вплив затоплення ґрунту на *A. thaliana* (Col-0): (А) зліва – контрольні рослини, справа – до затоплення (вверху) і після 10 діб затоплення (внизу); (Б) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках; (В) аналіз АДГ в листках методом нативного електрофорезу. Типові блот і зимограма розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіках рівень білка у відсотках до контролю (0 діб) ($M \pm SD$).

після чого знижувався (рис. 4.33, Б). Аналіз АДГ в листках показав індукцію його синтезу через 4 год затоплення коренів, значне зростання на 6-ту год і далі зниження до кінця першої доби. Це узгоджується з даними Vanti et al. (2008), які визначали швидку нетривалу індукцію експресії *HSP70* і *ADH* в проростках цього виду за впливу аноксії. Крім того, за даними цих дослідників темпи зростання експресії *HSP70* значно випереджали цей

показник у *HSP25.3* – представника родини sHSP, що підтверджує провідну роль HSP70 у стресовій реакції на гіпоксію. Відомо, що синтез HSP70 може індукуватися під впливом екзогенного етанолу (Vierling, 1991).

Ґрунтове затоплення також призводило до поступового погіршення стану та загибелі протягом 30-35 діб рослин двох видів мальви. За відсотком живих листків стійкішою виявилась *M. pulchella* (рис. 4.34, А, Б).

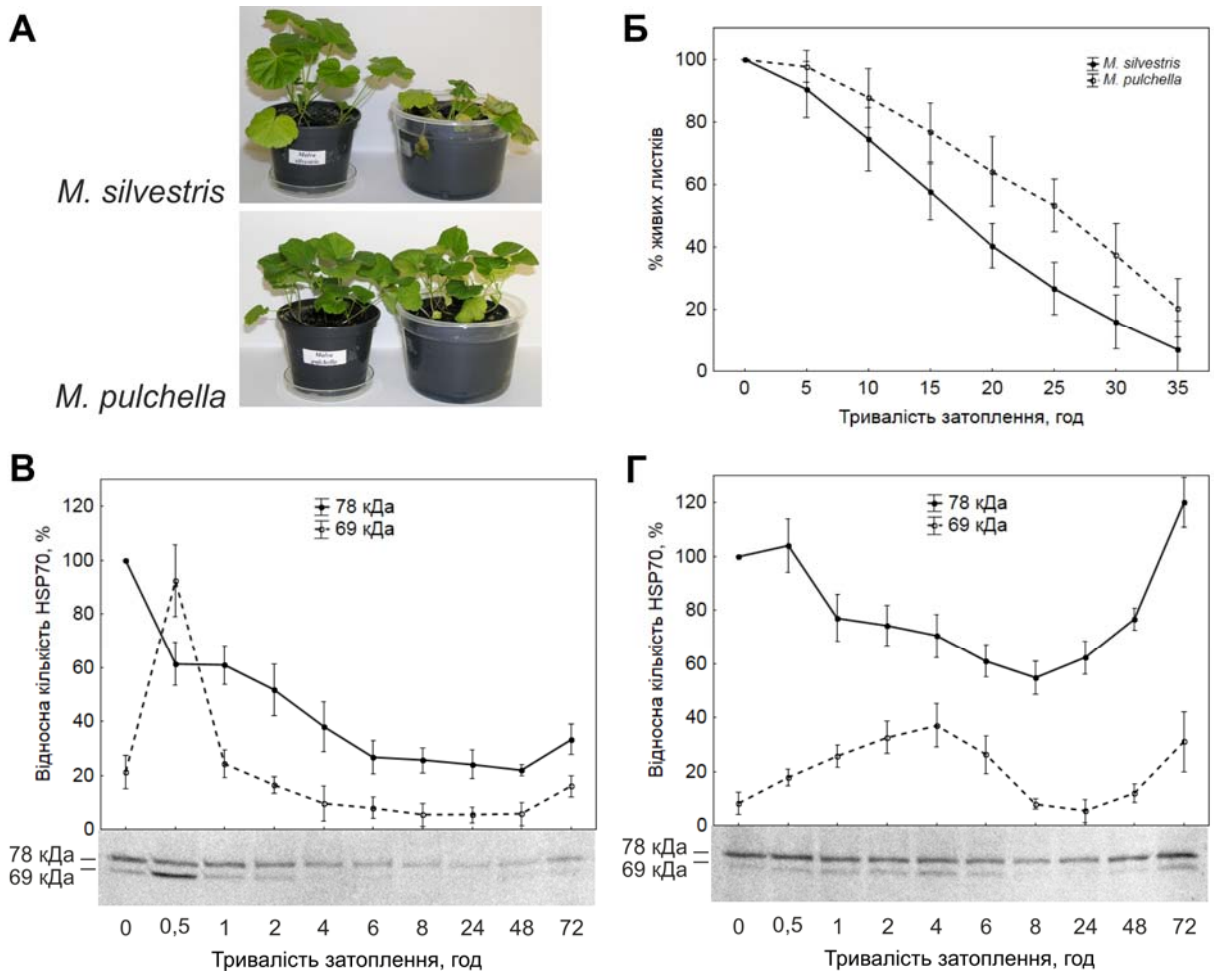


Рис. 4.34. Вплив затоплення ґрунту на *M. silvestris* і *M. pulchella*: (А) рослини у контролі (зліва) і після 10 діб затоплення (справа); (Б) відсоток живих листків (різниця між видами статистично значуща, One-way ANOVA, $p < 0,05$); (В, Г) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках *M. sylvestris* (В) і *M. pulchella* (Г). Типові блоти розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіках рівень білка у відсотках до білка з мол. м. 78 кДа у контролі (0 год) ($M \pm SD$).

Аналіз HSP70 в листках обох видів мальви показав зниження кількості білка з мол. м. 78 кДа (конститутивний білок) та тимчасову індукцію білка з мол. м. 69 кДа (індуцибельний білок) у першу добу та певне посилення їх синтезу в подальшому (рис. 4.34, В, Г). Відмінності між видами стосувались кількісних і часових параметрів. У *M. sylvestris* значна активація синтезу індукцибельного білка в перші півгодини затоплення супроводжувалась падінням вмісту конститутивного білка, і далі рівень обох HSP70 знижувався (для конститутивного білка – до ~30% від контролю) (рис. 4.34, В). У *M. pulchella* вміст конститутивного білка починав знижуватись після 30 хв, досягаючи ~60% від контрольного на 8-му год. При цьому активація синтезу індукцибельного HSP70 на початку затоплення була менш значною, проте більш тривалою, ніж у попереднього виду (рис. 4.34, Г). Отже різниця між *M. sylvestris* і *M. pulchella* стосувалась лаг-періоду, інтенсивності та тривалості синтезу індукцибельного HSP70, а також рівня конститутивного білка. Зокрема, швидка потужна індукція HSP70 у *M. sylvestris* виявилась короткою, що разом з більш низьким вмістом конститутивного білка відповідало меншій стійкості цього виду до затоплення.

Рослини *S. sisaroides*, вирощені як суходільні, успішно пристосовувалися до умов кореневої гіпоксії (рис. 4.35, В). Перед затопленням вони мали систему головного кореня і перші листки з трироздільною пластинкою (рис. 4.36, А). Через 2 доби від початку затоплення з'являлися додаткові корені на гіпокотилі поблизу кореневої шийки та на сім'ядольному вузлі (рис. 4.36, В). За 10 діб у рослин розвивалися 4–8 додаткових коренів, які досягали розмірів системи головного кореня (рис. 4.36, Б).

Найбільш ранньою реакцією на затоплення виявилась індукція синтезу HSP70 в листках (корені не аналізувались) (рис. 4.35, А). У контролі, при вологості ґрунту ~70%, цей білок містився у невеликій кількості. Під впливом затоплення відбувалась швидка індукція його синтезу: вже через 2 год відмічалось помітне збільшення вмісту білка. В свою чергу, подальше

зростання вмісту цього білка протягом 10 діб свідчить про високу інтенсивність його синтезу.

Зимограми АДГ (рис. 4.35, Б) показали поліморфізм цієї ферментної системи у рослин *S. sisaroidesum*, вирощених з насіння природних популяцій. Враховуючи це, про кількість АДГ у зразках судили за сумарною інтенсивністю забарвлення всіх його зон у треку. Через 2 год від початку затоплення відзначали індукцію синтезу ферменту в коренях і через 4 год – в листках. Далі його кількість прогресивно збільшувалась протягом 10 діб експерименту в обох органах - в коренях більшою мірою, ніж в листках.

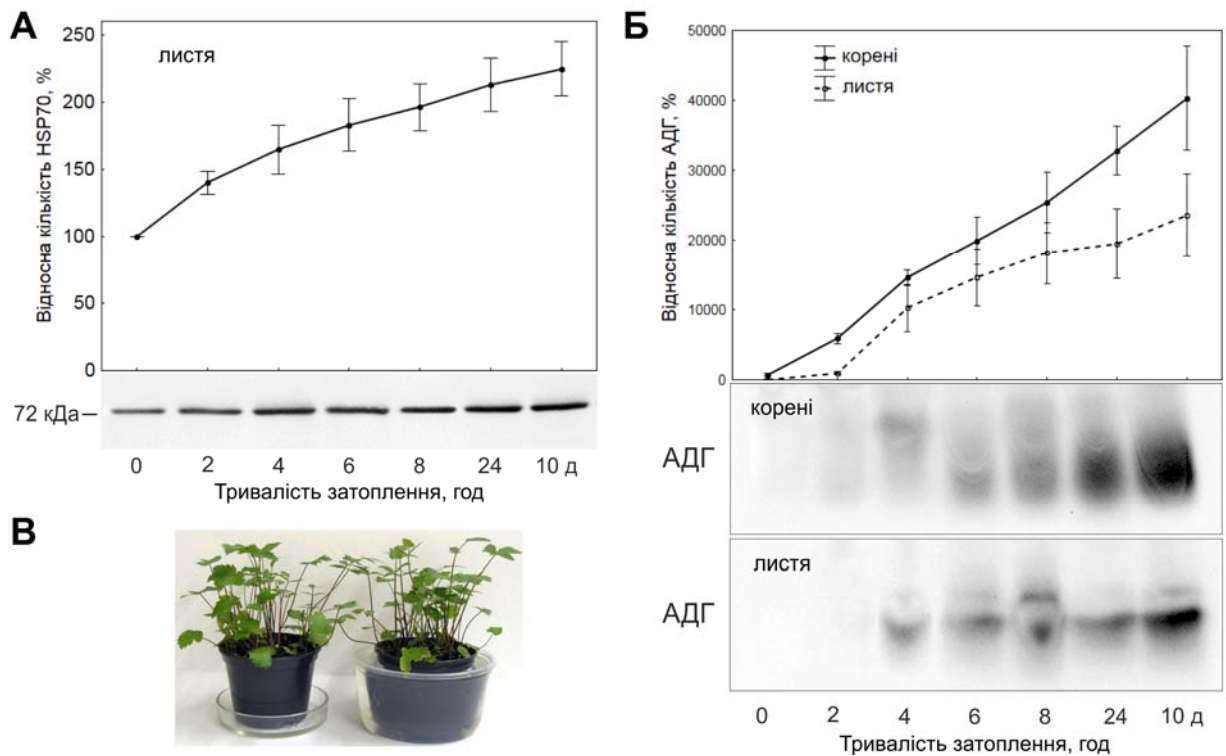


Рис. 4.35. Вплив затоплення ґрунту на *S. sisaroidesum*: (А) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках; (Б) аналіз АДГ в коренях і листках методом нативного електрофорезу. Типові блот і зимограми розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіках рівень білка у відсотках до контролю (0 діб) ($M \pm SD$). (В) рослини у контролі (зліва) і після 10 діб затоплення (справа).

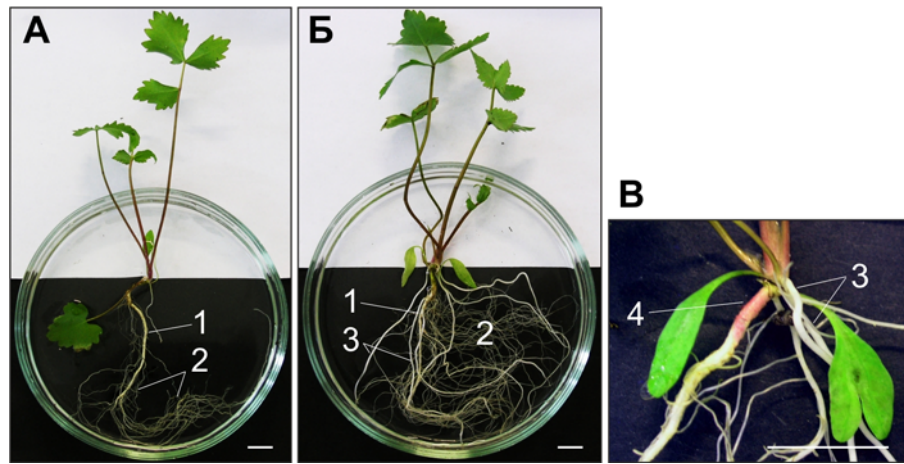


Рис. 4.36. Вплив затоплення на ріст рослин *S. sisaroides*: (А) без затоплення, (Б) після 10 діб затоплення; (В) фрагмент рослини, що росла 10 діб при затопленні: утворення додаткових коренів у базальній частині стебла. (1) головний корінь, (2) латеральні корені, (3) адвентивні корені, (4) гіпокотиль. Масштабна лінійка – 1 см.

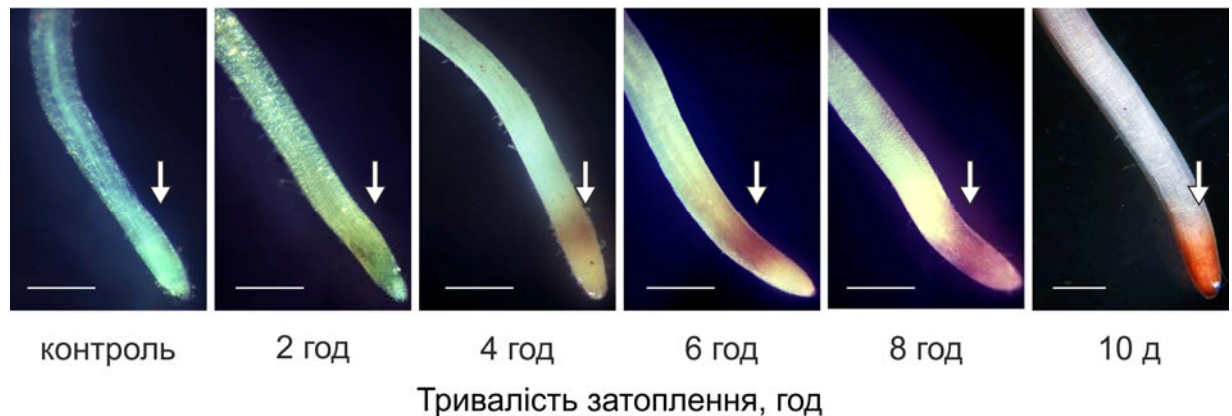


Рис. 4.37. Гістохімічне забарвлення АДГ в коренях *S. sisaroides* до затоплення (контроль) та через певний період часу від початку затоплення: 2–8 год – латеральні корені, 10 діб – адвентивний корінь. Стрілками вказано локалізацію АДГ в апексах. Масштабна лінійка – 1 мм. (Дані отримано сумісно з Ю.В. Овчаренко)

Така кінетика синтезу АДГ підтверджувалась гістохімічним визначенням його активності в коренях (рис. 4.38). У контролі та протягом перших діб затоплення аналізували латеральні (бічні) корені системи

головного кореня, а на 10-ту добу – адвентивні (додаткові) корені, ріст яких ініціювався у відповідь на дію чинника. Слід зауважити, що максимальна кількість ферменту, що визначалась за продуктом ферментативної реакції, спостерігалась в корневих апексах – меристемі та зоні розтягування. Локалізацію АДГ у цих ростових зонах за нестачі кисню раніше відзначали і в коренях *A. thaliana* (Porterfield et al., 1997, 2000).

Оскільки максимальна активність ферменту анаеробного метаболізму виявлялась в апексах коренів, виникло питання про розвиток аеренхіми в цих тканинах. Мікроскопічний аналіз локалізації утворення аеренхіми проводили з використанням поперечних зрізів у трьох зонах: 1) зоні проксимальної меристеми, близької до апікальної меристеми; 2) зоні меристеми, близької до зони розтягування; 3) зоні розтягування (рис. 4.38). В коренях контрольних проростків, що зростали за помірної вологості ґрунту (контроль), визначено доволі великі міжклітинники у верхніх шарах меристеми та в зоні розтягування (рис. 4.38, а). Вони розташовувались в середніх шарах клітин основної меристеми та, відповідно, кори. При затопленні протягом першої доби відбувалось певне збільшення розмірів цих міжклітинників, інколи їхнє злиття з утворенням невеликих порожнин (рис. 4.38, б), проте далі структура апексів латеральних коренів не змінювалась (дані не представлені). Водночас адвентивні корені, поява яких відбувалась через 2 доби після затоплення, містили добре розвинену схізогенну аеренхіму (рис. 4.38, с). Утворення системи повітряних порожнин в цих коренях починалося з великих міжклітинників уже в перших шарах основної меристеми. При переході клітин з меристеми до зони розтягування міжклітинники об'єднувались у великі міжклітинні порожнини, поступово охоплюючи майже всі шари кори. (Мікроскопічний аналіз проведено Ю.В. Овчаренко в рамках сумісного дослідження)

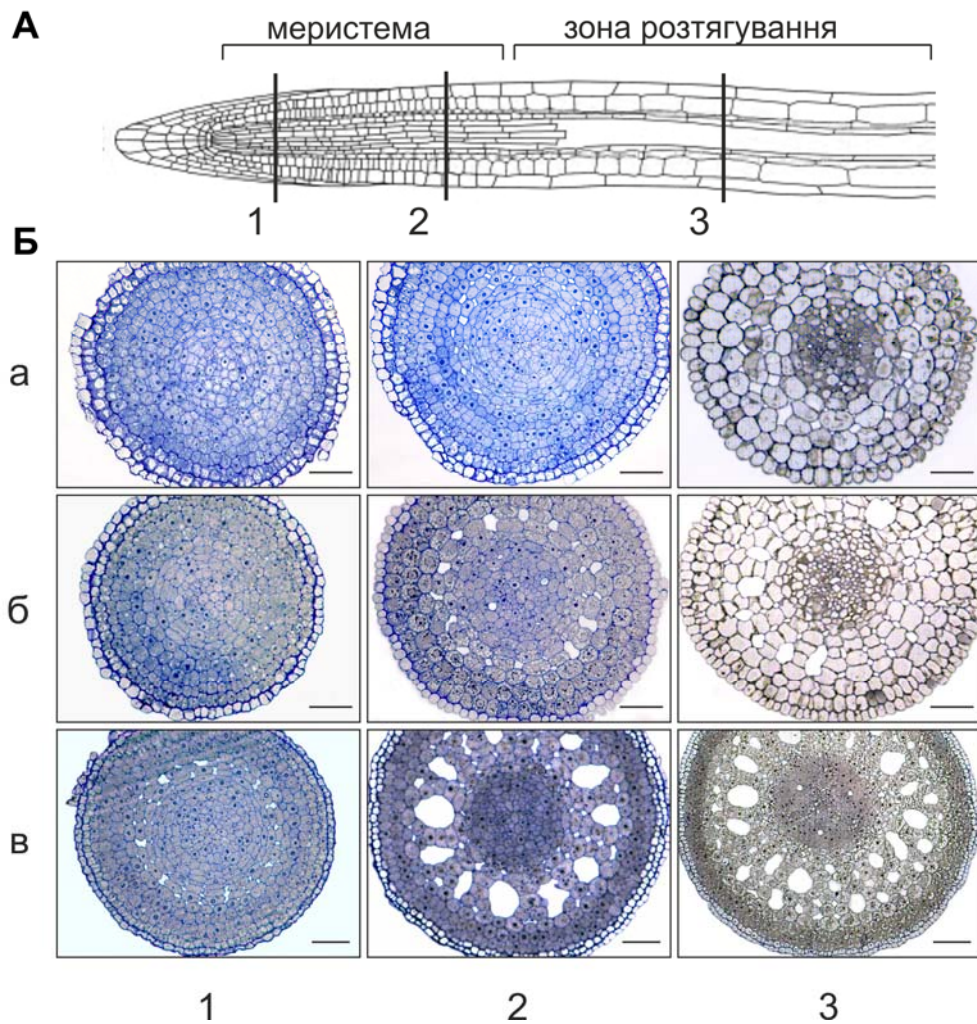


Рис. 4.38. Розвиток аеренхіми в корневих апексах *S. sisaroides*: (А) схема зон росту кореневого апексу (вертикальними лініями вказано місця розташування зрізів); (Б) поперечні зрізи: (а, б) латеральні корені за нормальної вологості ґрунту (а) та через 8 год затоплення (б); (в) адвентивні корені, ріст яких ініціювався під впливом затоплення; (1) проксимальна меристема близько до апікальної меристеми; (2) проксимальна меристема близько до зони розтягування; (3) зона розтягування. Масштабна лінійка – 50 мкм. (Дані Ю.В. Овчаренко; Козеко, Овчаренко, 2015)

Отже, дані щодо відповіді *S. sisaroides* на затоплення дозволяють розмістити досліджені процеси у певній послідовності. Найшвидшою реакцією рослин виявився синтез HSP70, що свідчить про активацію систем загального захисту (Lichtenthaler, 1998; Кузнецов, 2001; Кордюм и др., 2003). Зміни енергетичного метаболізму, які є частиною спеціалізованої адаптації

до нестачі кисню (McManmon, Crawford, 1971), починалися через певний відрізок часу і проходили двома шляхами – шляхом активації етанольного бродіння та шляхом утворення системи повітряних порожнин. Останнє відбувалося спочатку через збільшення об'єму міжклітинників латеральних коренів системи головного кореня, а пізніше – через ініціацію росту аеренхімоносних адвентивних коренів.

Важливо підкреслити, що в коренях *S. sisaroides* показана наявність як метаболічної анаеробної адаптації шляхом переключення енергетичного метаболізму клітин з окислювального фосфорилування на гліколіз та етанольну ферментацію, так і структурних змін, спрямованих на уникнення анаеробіозу. На початку затоплення в системі головного кореня відбувалась активація першого процесу, тоді як збільшення об'єму міжклітинників було незначним і не призводило до утворення аеренхіми. Тобто в перші години гіпоксії роль метаболічної анаеробної адаптації, очевидно, є вирішальною. Проте, відомо, що процес перетворення глюкози на етанол менш енергетично вигідний порівняно з окислювальним фосфорилуванням (Jackson, Ricard, 2003). З іншого боку, дифузія кисню з надземних частин рослини за відсутності аеренхіми невелика (Вартапетян, 2005). Отже, нестача енергії може бути тригером, який запускає ріст адвентивних коренів, що містять аеренхіму та здатні забезпечувати стабільне існування рослини за умов кореневої гіпоксії. Це відповідає положенню про ключову роль енергетичного метаболізму в забезпеченні толерантності рослин до анаеробних умов (Вартапетян, 2005; Kordyum et al., 2017).

Слід також зазначити, що максимальне забарвлення АДГ виявлялося в клітинах апексів як латеральних, так і адвентивних коренів. Значна активність етанольного бродіння в них може бути пов'язана з високими енергетичними потребами молодих клітин для забезпечення ростових процесів. Відомо, що критичний для дихання тиск кисню в апексі кореня є вищим за такий в більш зрілих його зонах (Jackson, Ricard, 2003). Показано також, що верхівки коренів найчутливіші до нестачі кисню і здатні

переносити аноксію, як правило, лише кілька діб (Рикар, 2003). Збіг локалізації АДГ з місцем початку формування аеренхіми в апексах адвентивних коренів свідчить про те, що значні енергетичні потреби клітин зон росту можуть забезпечуватись як за рахунок окислювального фосфорилування з використанням кисню, який надходить через аеренхіму, так і за рахунок перетворення глюкози в етанол. При цьому останній процес може бути особливо важливим для клітин апікальної меристеми та кореневого чохла, до яких аеренхіма безпосередньо не доходить.

Характерно, що наявність HSP70 і АДГ в листках, а також розвинену аеренхіму та ферментативну активність АДГ в коренях ми визначали також у рослин природних популяцій *S. sisaroides* і *S. latifolium* (див. рис. 4.54, п. 4.6; Kordyum et al., 2012, 2017).

Порівнюючи результати вивчення реакції чотирьох видів на затоплення, слід відмітити наступне. На відміну від *S. sisaroides*, затоплення рослин *A. thaliana*, *M. silvestris* і *M. pulchella* призводить до поступового погіршення їх стану і загибелі. З великою вірогідністю можна вважати, що різниця в адаптивних властивостях цих видів перш за все обумовлена відмінностями в їх здатності до утворення розвиненої аеренхіми. Прискорене старіння і загибель рослин *A. thaliana*, *M. silvestris* і *M. pulchella* при затопленні, очевидно, є наслідком відсутності генетично-детермінованих механізмів структурної адаптації до тривалої кореневої гіпоксії. Так, за даними Mühlenbock et al. (2007), у 4-тижневих рослин *A. thaliana* аеренхіма не утворюється. Здатність формувати невелику за об'ємом лізогенну аеренхіму в гіпокотилі-корені у цього виду з'являється з віком (виявлено у 12-тижневих рослин). Подібну ситуацію, ймовірно, можна прогнозувати і для мальви.

Проте швидку активацію синтезу HSP70 в листках, що є індикатором системної стрес-реакції, спостерігали у всіх видів. Її визначення в перші 30 хв свідчить про високу чутливість рослин всіх чотирьох видів до надмірної вологості ґрунту. Причинами цього можуть бути збільшення вмісту нефункціональних поліпептидів внаслідок зниження рН цитоплазми,

генерація АФК, катаболічні процеси, гормональна регуляція, зміни програми генної експресії тощо (Roberts et al., 1982; Jackson, Ricard 2003; Jackson, 2006; Ye et al., 2015).

Індукцію синтезу АДГ виявлено як у стійкого до затоплення *S. sisaroides*, так і у нестійкого *A. thaliana*. В обох видів вона певною мірою відставала від індукції HSP70, що підтверджує послідовну активацію систем загального захисту і анаеробної метаболічної адаптації.

Крім того, на прикладі *S. sisaroides* показано, що синтез АДГ у відповідь на затоплення активується спочатку в коренях *S. sisaroides*, а потім в листках. Виходячи з таких даних, можна стверджувати, що ґрунтове затоплення викликає стресову реакцію всього організму та спричиняє системну індукцію етанольного бродіння, яка починається в коренях, що зазнають нестачі кисню внаслідок затоплення, і розповсюджується на органи, що контактують з повітрям. Вплив кореневої гіпоксії на метаболізм стеблової частини рослини описаний в ряді робіт (Jackson, 2002, 2006; Jackson, Ricard 2003). На кількох видах наземних рослин показано, що трансдукція специфічного сигналу від коренів до стебла відбувається протягом перших годин кореневого затоплення (Jackson, 2002). Про наявність системних змін у метаболізмі надводної частини повітряно-водних рослин за впливу кореневої гіпоксії свідчать численні ознаки структурної та метаболічної адаптації листків, виявлені у рослин вежу природних популяцій, що зростають на мілководді (Недуха, 2011).

Слід також відмітити високу інтенсивність синтезу в *S. sisaroides* як HSP70, так і АДГ протягом щонайменше 10 діб затоплення, тобто під час ініціації та росту додаткових коренів. Це показує, що програма адаптації цього повітряно-водного виду до затоплення включає значну індукцію та підтримання на високому рівні синтезу стресових білків і ферментів етанольного бродіння протягом періоду морфологічної адаптації. Такий характер синтезу HSP70 свідчить про обмеженість загального уявлення, відповідно до якого стресові гени, зокрема HSP, експресуються лише на

початку стрес-реакції (Senthil-Kumar et al., 2007). Проте в цю концепцію цілком вкладаються нестійкі до затоплення види. Так, за нашими даними, в *A. thaliana* певне посилення синтезу HSP70 і АДГ у перші 6-8 год виявилось тимчасовим. Нетривалий синтез індукцйбельного HSP70 у перші години після затоплення виявлено також у рослин мальви. Очевидно, швидка тимчасова активація системи загального захисту і анаеробна метаболічна аклімація дають цим рослинам можливість переносити нетривалі періоди перезволоження ґрунту. Слід відмітити, що взаємозв'язок між високою чутливістю до стресу та коротким лаг-періодом і нетривалою індукцією HSP70 раніше визначали у тваринних об'єктів (Shatilina et al., 2011). Водночас більш високий рівень стійкості у рослин мальви порівняно з *A. thaliana* корелює з досить високим вмістом конститутивного HSP70, та може обумовлюватись іншими фізіологічними реакціями, такими як здатність зберігати точку росту і верхні листки за рахунок відмирання нижніх. Примітно також, що близькі за стійкістю до затоплення *M. silvestris* і *M. pulchella* характеризувалися подібними між собою профілями HSP70.

В цілому, отримані результати, по-перше, свідчать про системність реакції рослин на кореневу гіпоксію, по-друге, показують схожість розвитку стресової реакції і анаеробної аклімації в листках контрастних за стійкістю рослин у перші години ґрунтового затоплення та видоспецифічність у подальшому перебігу цих процесів, що корелює зі здатністю видів до структурної адаптації.

4.4.3. Кінетика синтезу HSP70 у зв'язку з посухостійкістю рослин

Умови посухи створювали шляхом поступового підсихання ґрунту після припинення поливу, що призводило до втрати тургору листків (або пожовтіння нижніх листків) і згодом до їх стійкого в'янення. За вологістю ґрунту, яка відповідала суттєвим змінам стану рослин, види розташовано у наступному порядку: *S. sisaroides* < *A. thaliana* < *M. pulchella* = *M. silvestris* (табл. 4.3).

Зміни фізіологічного стану рослин під час розвитку ґрунтової посухи

Вид	Вагова вологість ґрунту, % від сухої ваги (M ± SD)	
	Втрата тургору листків або пожовтіння нижніх листків (у мальви)	Стійке в'янення листків
<i>A. thaliana</i>	35 ± 0,9	21 ± 0,7
<i>M. silvestris</i>	25 ± 0,7	15 ± 0,5
<i>M. pulchella</i>	25 ± 0,7	15 ± 0,5
<i>S. sisaroides</i>	32 ± 1,1	27 ± 0,8

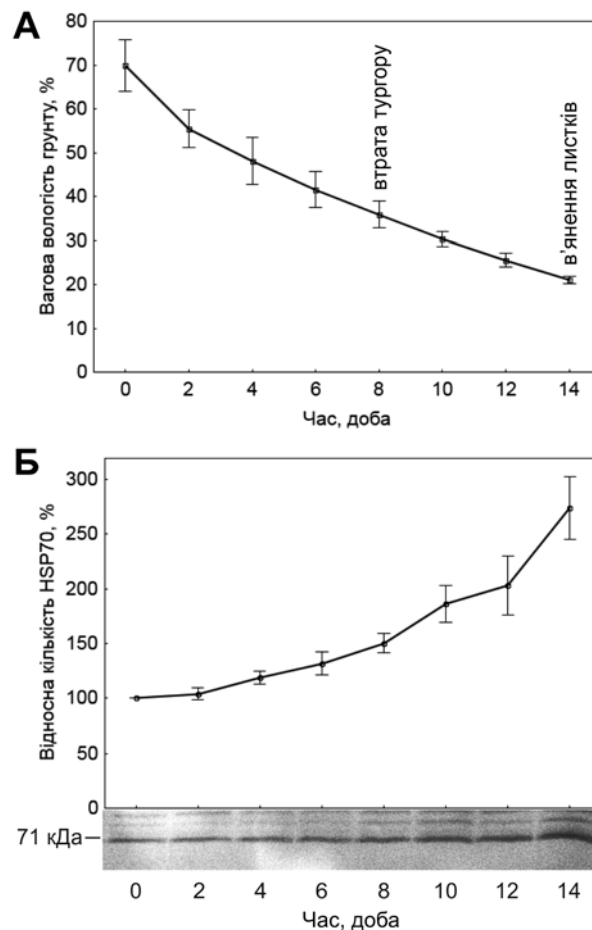


Рис. 4.39. Вплив посухи на *A. thaliana* (Col-0): (А) зміни вагової вологості ґрунту (% від сухої маси); (Б) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках. Типовий блот розташований під результатами денситометричного аналізу. На графіку рівень білка у відсотках до контролю (0 діб) (M ± SD).

Аналіз HSP70 листків *A. thaliana* виявив поступове збільшення кількості білка 71 кДа протягом розвитку посухи (рис. 4.39). Водночас значне посилення його синтезу корелювало із втратою тургору та в'яненням листків. Порівнюючи ці дані зі змінами генної експресії у проростках цього виду при моделюванні водного дефіциту, представленими у п. 4.1.2, можна припустити, що стрибкоподібне збільшення кількості HSP70 під час погіршення стану рослин обумовлено переважно індукцією синтезу AtHSP70-4.

Різниця між рослинами двох видів мальви за часткою зелених листків під час поступового підсихання ґрунту виявилася статистично недостовірною, тобто стан рослин обох видів погіршувався майже однаковою мірою (рис. 4.40, А). Схожою виявилась і динаміка синтезу HSP70 (рис. 4.40, Б, В). На початку розвитку водного дефіциту спостерігали слабку активацію синтезу HSP70 з мол. м. 78 кДа. Пожовтіння і в'янення нижніх листків починалося при зниженні вологості ґрунту нижче 40% від сухої маси, що супроводжувалося посиленням синтезу конститутивного білка у верхніх листках. Подальше підсихання ґрунту до ~25% призводило до активного відмирання нижніх листків та одночасно до посилення накопичення білка 78 кДа та індукції синтезу білка 69 кДа у верхніх листках.

Аналіз *S. sisaroides* показав високу чутливість рослин цього повітряно-водного виду до посухи. Значну активацію синтезу HSP70 в листках визначали вже на початку розвитку посухи – при зниженні вологості ґрунту до 50%, коли вміст води в листках майже не змінювався (рис. 4.41). Подальший розвиток водного дефіциту призводив до поступового накопичення HSP70, яке досягало максимуму з початком в'янення листків при зниженні вмісту води в них до ~84% і вмісту води в ґрунті до ~27%. Подальше посилення водного дефіциту призводило до незворотного в'янення рослин і деградації HSP70.

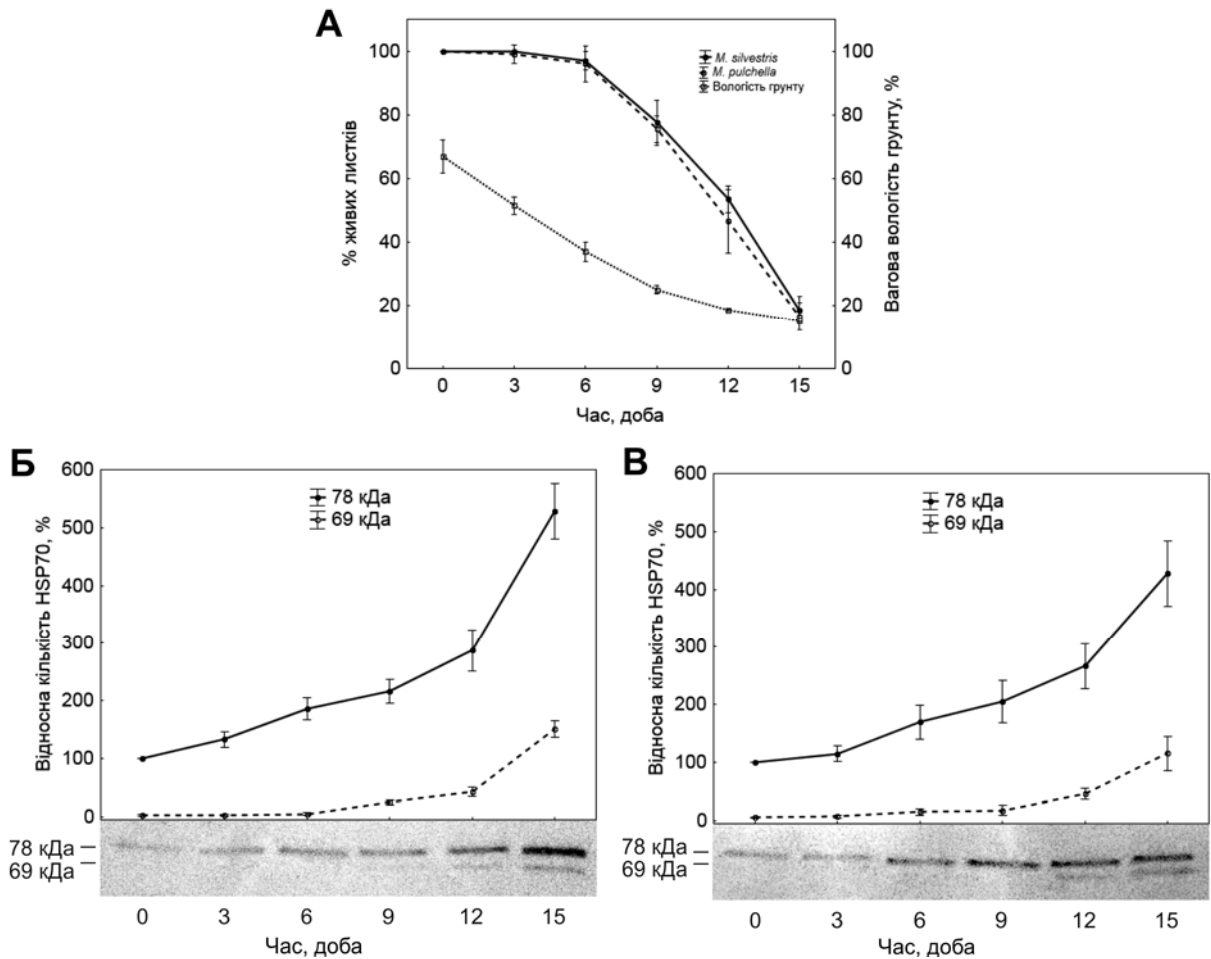


Рис. 4.40. Вплив посухи на *M. silvestris* і *M. pulchella*: (А) зміни вагової вологості ґрунту (% від сухої маси) і відсоток живих листків (різниця між видами недостовірна, One-way ANOVA, $p > 0,05$); (Б, В) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках *M. silvestris* (Б) і *M. pulchella* (В). Типові блоти розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіках рівень білка у відсотках до білка з мол. м. 78 кДа у контролі (0 год) ($M \pm SD$).

Отже, результати аналізу різних за потребами до умов водозабезпечення видів підтверджують участь HSP70 в адаптації клітин, показуючи їх прогресивне накопичення протягом розвитку водного дефіциту, і разом з тим свідчать про видові особливості та тісний взаємозв'язок характеру їх синтезу з фізіологічними змінами.

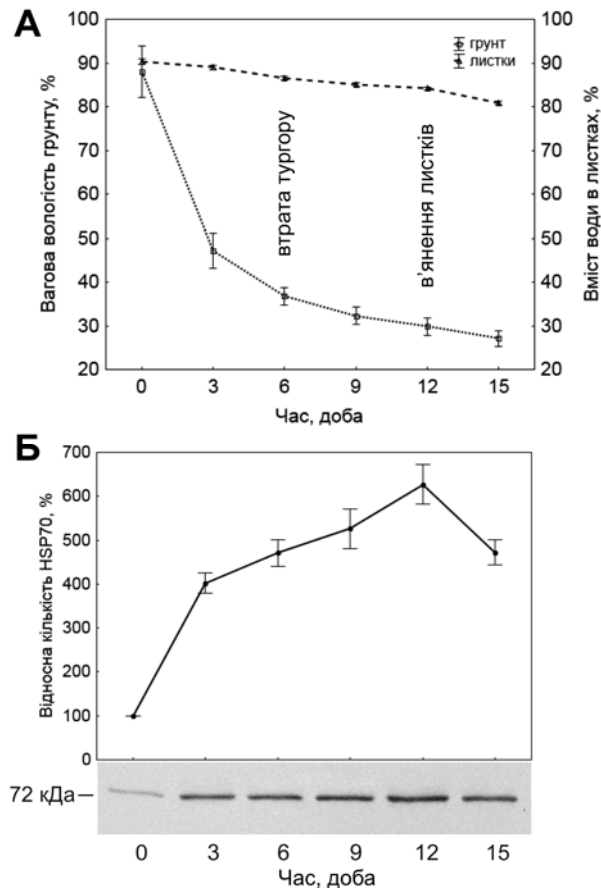


Рис. 4.41. Вплив посухи на *S. sisaroides*: (А) зміни вагової вологості ґрунту (% від сухої маси) і вмісту води в листках (% від сирої маси); (Б) вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках. Типовий блот розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіку рівень білка у відсотках до контролю (0 діб) ($M \pm SD$).

Отримані дані підтверджують наше припущення, що активація синтезу індукцибельних HSP70 відбувається при зниженні вологості ґрунту нижче певної межі. Така закономірність показана нами також для індукцибельного AtHSP70-4 за даними аналізу генної експресії в проростках *A. thaliana* при моделюванні прогресуючого водного дефіциту (див. п. 4.1.2). Близькі за посухостійкістю види мальви мали схожу між собою кінетику змін двох зон HSP70 – посилення синтезу конститутивного білка та ініціацію синтезу індукцибельного після досягнення певного рівня водного дефіциту. Характерно, що рослини посухостійких видів показували високий вміст

шаперонів під час в'янення листків, тоді як більш чутливий до посухи *S. sisaroides*, навпроти, характеризувався ранньою значною активацією синтезу HSP70 та його деградацією під час в'янення. Дані стосовно останнього виду добре узгоджуються з даними інших дослідників, які виявили значну активацію синтезу HSP70 за посушливих умов у повітряно-водного виду *Alternanthera philoxeroides*, також здатного виносити дефіцит води протягом тривалого періоду (Jia et al., 2015).

Відповідь рослин на поступове підсихання ґрунту в сучасній літературі часто називають «продовженим або хронічним водним стресом», проте у строгому сенсі до стресу, тобто реакції організму на гостру дію шкідливого агента, ці процеси віднести не можна. В цьому випадку скоріше правильно говорити про поступову адаптацію організму до посилення рівня шкідливості чинника у часі. Однак, за таких умов безперервні кількісні зміни інтенсивності фактора при досягненні їм певної межі можуть призводити до дискретних якісних змін клітинного гомеостазу і, відповідно, запуску адаптивних реакцій. Це відповідає розумінню того, що зниження вмісту води в клітинах до певного порогового рівня призводить до якісних змін гідратних оболонок білкових молекул, їх денатурації та втрати функціональної активності (Billi, Potts, 2002; Bray, 2002), а різке збільшення денатурованих білків, у свою чергу, може потребувати додаткового синтезу HSP, потрібних для захисту протеому (Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Jacob et al., 2017).

4.4.4. Базовий рівень HSP70

Під час аналізу кінетики синтезу HSP70 нами було відмічено, що рослини різних видів різнилися між собою за вмістом цих білків у контролі (тобто за нормальних умов). При цьому HSP70 у різних видів визначались за допомогою одних моноклональних антитіл, що свідчить про високу гомологію цих білків. Для перевірки питання, чи корелює базовий рівень HSP70 в листках із рівнем стійкості рослин, нами проведено вестерн-блот-

аналіз цього білка у *A. thaliana*, *M. silvestris*, *M. pulchella* і *S. sisaroidium*, які вирощувались за однакових лабораторних умов при температурі $22 \pm 1^\circ\text{C}$ і вологості ґрунту $\sim 70\%$, а також в листках природних рослин *T. natans*, витриманих кілька годин при температурі води 20°C і температурі повітря 22°C . Отже, за рівнем конститутивного синтезу HSP70 в листках види умовно розташувались у послідовності: *T. natans* < *A. thaliana* < *M. pulchella* \approx *M. silvestris* < *S. sisaroidium*, що позитивно корелює з їх адаптивними властивостями (рис. 4.42).

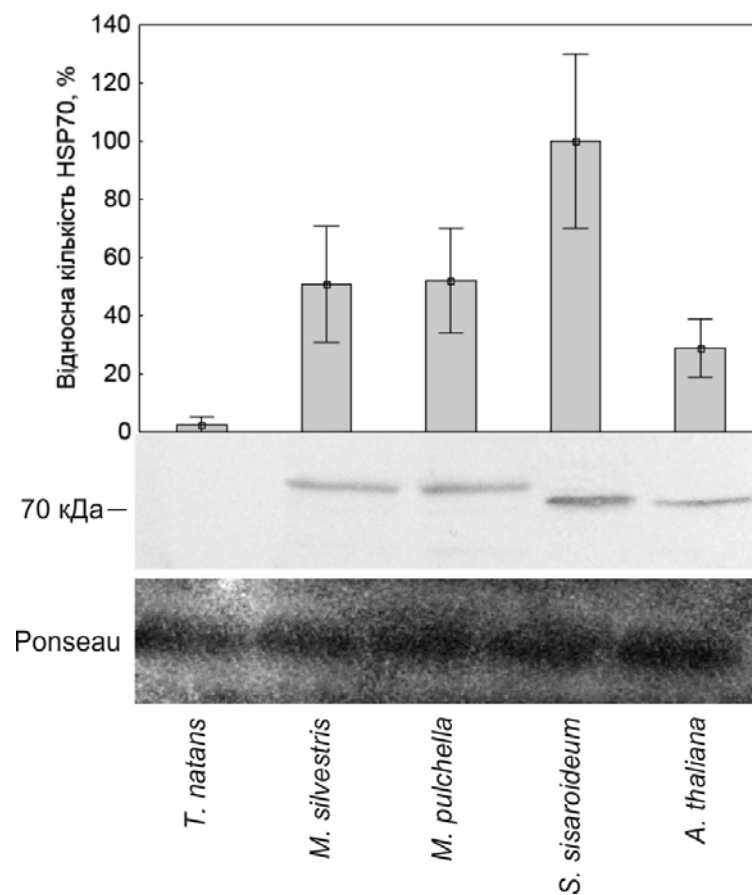


Рис. 4.42. Вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках *T. natans*, *M. silvestris*, *M. pulchella*, *S. sisaroidium* і *A. thaliana* за нормальних умов. Типовий блот розташовано під результатами денситометричного аналізу. Внизу показано мембрану, забарвлену Ponceau S після електропереносу для контролю завантаження білка. На графіку рівень білка виражено у відсотках до *S. sisaroidium* ($M \pm SD$). Різниця достовірна між всіма видами, крім *M. silvestris* і *M. pulchella* (t -тест Ст'юдента, $p > 0,05$).

Найбільший вміст білка визначено в *S. sisaroides*, здатного рости в умовах як суходолу, так і мілководдя, та стійкого до температурних змін. Вкрай малу кількість HSP70 (на межі чутливості методу) детектували у *T. natans* - водного виду, нездатного існувати поза водою та з прогнозовано вузьким температурним діапазоном, що притаманно водним рослинам (Одум, 1986). Конститутивний рівень HSP70 у двох видів мальви був майже однаковим, що відповідає їх близькості за стійкістю до досліджених чинників, проте вищим за *A. thaliana*, для якого характерні помірні адаптивні властивості. Отже, результати аналізу показують, що базовий рівень цитозольних HSP70 позитивно корелює зі ступенем/тривалістю активації їх синтезу при стресі та стійкістю досліджених видів до несприятливих чинників. Такі результати вказують на те, що базовий вміст цих шаперонів в клітинах також може мати суттєве значення для забезпечення діапазону стійкості рослинного організму.

Наші спостереження узгоджуються з результатами досліджень інших авторів. Так, при порівнянні *A. thaliana* з іншим видом родини *Brassicaceae*, високорезистентним до ряду несприятливих екологічних факторів – *Thellungiella salsuginea*, виявлено більш високий базовий вміст HSC70, HSP60 і HSP110 у більш стійкого виду (Гамбург и др., 2014). Позитивний взаємозв'язок між базовим рівнем HSP70 і ступенем їх стресової індукції та термостійкістю також визначено у тваринних об'єктів (Evgen'ev et al., 2007; Bedulina et al., 2010a, b, 2013; Shatilina et al., 2011). Залежність солестійкості від конститутивного рівня синтезу HSP70 відмічали у одноклітинних організмів (Смуров и др., 2010). Примітно, що базовий вміст sHSP виявився більш варіабельним і лінійної залежності від стійкості організмів не показував (на амфіподах) (Shatilina et al., 2011).

Отже, результати порівняльного аналізу синтезу білків родини HSP70 та діапазону стійкості видів, різних за екологією та морфологічними, онтогенетичними і адаптивними особливостями, показали:

- Імуноспорідненість цитозольних HSP70 у видів рослин різних родин, що підтверджує високу консервативність цих білків.
- Базовий рівень цитозольних HSP70 за умов, близьких до оптимальних, корелював зі стійкістю рослин до стресових чинників та їх адаптивними властивостями.
- Видові особливості кінетики синтезу HSP70 за впливу несприятливих зовнішніх чинників стосувались кількісних і часових показників і відповідали змінам фізіологічного стану рослин.
- Захист клітин на початку впливу чинника відбувався за рахунок функціонування існуючого пулу цитозольних HSP70. Збільшення дози чинника викликало збільшення пулу цих шаперонів шляхом активації синтезу конститутивних та індукцибельних білків. При цьому запуск синтезу індукцибельного компонента відбувався через певний лаг-період, що вказує на існування певного дозового порогу.
- Стійкіші до гострої дії стресового чинника (висока температура, затоплення) рослини характеризувалися більш активним синтезом конститутивних HSP70, а також тривалішим та інтенсивнішим синтезом індукцибельних білків протягом стрес-реакції.
- При поступовому підвищенні рівня шкідливості чинника у часі (розвиток водного дефіциту) підтримання білкового гомеостазу клітин відбувалося шляхом прогресивного накопичення конститутивних HSP70 та ініціації синтезу індукцибельних білків вище певної порогової дози чинника.
- Споріднені види *M. sylvestris* і *M. pulchella* характеризувались однаковим складом і близьким базовим рівнем цитозольних HSP70, а також схожим характером кінетики їх синтезу за впливу досліджених факторів.

Загалом реакція HSP70 на високу температуру, затоплення і водний дефіцит узгоджується з загальними уявленнями про індукцію HSP як неспецифічну реакцію системи захисту білкового компоненту клітини у

відповідь на дію чинників різної природи (Lichtenthaler, 1998; Sørensen et al., 2003) і підтверджує для рослин положення про те, що рівень неспецифічних захисних клітинних механізмів позитивно корелює з витривалістю організмів і темпами комплексної адаптації до змін зовнішніх чинників (Leone et al., 2003). Разом з тим, нами виявлено специфічні як для факторів, так і для видів особливості кінетики синтезу HSP70, що може бути обумовлено варіаціями в регуляторних і кодуючих ділянках відповідних генів, а також пов'язане з відмінностями в інших адаптивних механізмах.

4.5. Участь HSP70 і HSP90 в стрес-реакції і адаптації рослинних клітин до змін гравітаційного навантаження

Для з'ясування особливостей участі шаперонів у реакціях клітин на зміни гравітаційного навантаження проведено наземні експерименти, в яких ефекти гіпергравітації моделювались за допомогою центрифуги великого радіусу, ефекти мікрогравітації – за допомогою горизонтального кліноостатування (2 об/хв, далі «кліноостатування»). Аналіз проводили на проростках *P. sativum* і *A. thaliana*.

4.5.1. Синтез HSP70 і HSP90 за впливу гіпергравітації

Для вивчення ефектів гіпергравітації 5-добові етіюльовані проростки *P. sativum* піддавали дії короткочасного гіпергравітаційного навантаження різної величини і тривалості. Методом вестерн-блотингу виявлено суттєві кількісні зміни HSP70 і HSP90 в клітинах проростків. Центрифугування протягом 15 хв призводило до активації синтезу HSP70, і цей ефект збільшувався зі збільшенням прискорення – від 13% при 3 g до майже 100% при 14 g в порівнянні з контрольними рослинами (рис. 4.43, А, В). Через 1,5 год реадaptaції після центрифугування кількість HSP70 знижувалась в проростках, які зазнали впливу 3 g і 7 g, однак продовжувало зростати в проростках після 10 g і 14 g. В результаті центрифугування протягом 1 год

рівень HSP70 перевищив такий у контролі на 40-85%, залишався високим після 1,5 год реадаптації і знижувався через 24 год (рис. 4.43, Б, Г). Зокрема, вміст білка досягав контрольного рівня після 3 г і 7 г.

Рівень HSP90 істотно не змінювався після 15-хвилинного центрифугування, проте після 1-годинного підвищувався на 60-80% (рис. 4.43). В процесі реадаптації після 1 год центрифугування вміст HSP90 залишався високим протягом перших 1,5 год і знижувався до початкового на 24-ту год.

Такі дані свідчать про те, що реакція рослинних клітин на гіпергравітацію включає активацію синтезу HSP70 і HSP90, ступінь якої залежить від величини прискорення і тривалості його дії. Це, в свою чергу, може бути індикатором порушення клітинного гомеостазу і вказує на необхідність посилення шаперонних функцій. Найбільш значна і тривала активація синтезу виявлялася після 10 г і 14 г, однак такі навантаження перевершують ті, що відбуваються під час зльоту та посадки космічного апарату. З іншого боку, при дозах, які більшою мірою відповідають реальним (3-8 г, 8-15 хв), активація синтезу HSP була помірною, після чого спадала, що вказує на здатність клітин швидко відновлювати гомеостаз після таких навантажень.

Як вже відмічалось, сигналом для індукції генів *HSP* вважається накопичення в клітинах ненативних білків у високих концентраціях (Ananthan et al., 1986). До виникнення небезпеки накопичення частково денатурованих білків може призводити, зокрема, активізація окиснювальних процесів внаслідок генерації АФК, яка виявлялася в проростках гороху при гіпергравітації (Барабой, Жадько, 1992).

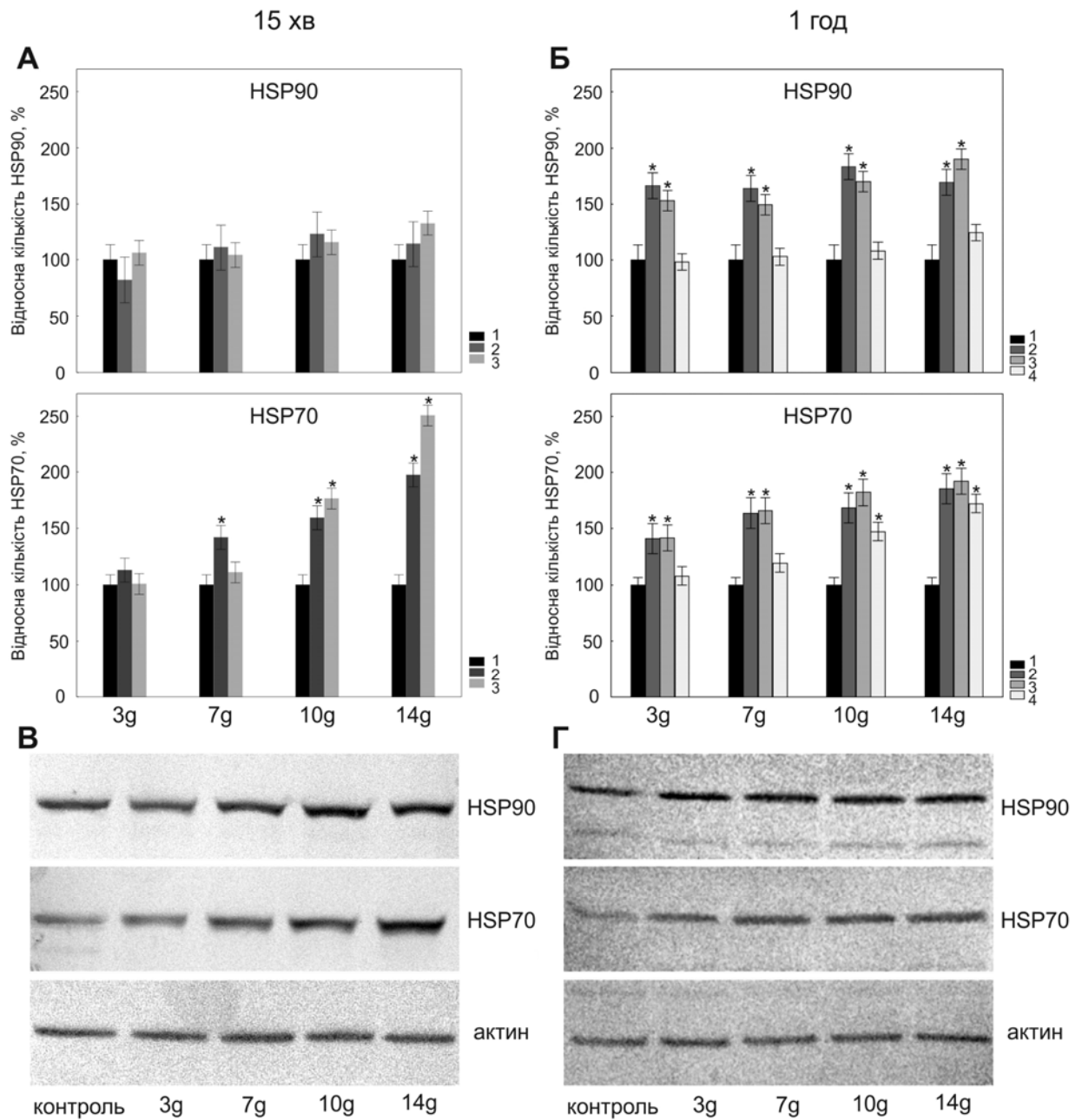


Рис. 4.43. Вестерн-блот аналіз HSP90 і HSP70 3-добових проростків *P. sativum* після гравітаційного навантаження різного ступеню протягом 15 хв (А, В) і 1 год (Б, Г). (А, Б) Результати денситометричного аналізу відносної кількості білків у контролі (1), після гравітаційного навантаження (2) і реадаптації протягом 1,5 год (3) і 24 год (4); рівень HSP виражено у відсотках до контролю (1 g) ($M \pm SE$); (*) статистично значуща різниця відносно контролю (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$). (В, Г) Типові імуноблоти HSP90, HSP70 і актину (контроль завантаження білка).

Відповідно до іншої моделі, заснованої на ролі цитоплазматичної мембрани як первинного сайту сприйняття зовнішніх сигналів, до індукції цих генів можуть призводити зміни в стані мембрани, які передаються до ядра через каскад хімічних і фізичних чинників (Leone et al., 2003). На користь цього механізму може свідчити зміни форми клітини під дією гіпергравітації, показані на прикладі тваринних клітин, зовнішнім шаром яких є цитоплазматична мембрана (van Loon et al., 2005).

Слід також відмітити, що залежність рівня HSP70 від дози чинника була більш значною, зміни ініціювалися раніше і зберігалися протягом більш тривалого періоду часу, ніж це було визначено для HSP90, що підтверджує його провідну роль в стрес-реакції.

В цілому отримані нами дані вказують на те, що зміни в рівні HSP70 і HSP90 під впливом гіпергравітації повинні відігравати важливу роль у відновленні білкового гомеостазу клітин під час і після дії гравітаційного навантаження.

4.5.2. Синтез HSP70 і HSP90 за впливу кліноостатування

Вивчення ефектів довготермінового кліноостатування проводили шляхом обертання проростків на кліноостаті від початку проростання насіння. Кліноостатування проростків *P. sativum* призводило до певного зниження темпів і дезорієнтації їх росту (рис. 4.44). 3-добові проростки досягали довжини $13,2 \pm 1,5$ мм (CV=11,4) в контролі (стаціонарні умови) та $12,1 \pm 1,8$ мм (CV=14,9) при кліноостатуванні. В контролі коріння проростків росли вниз за напрямком вектора гравітації, тоді як кліноостатування призводило до порушення орієнтації росту і форми рослин, що є результатом неможливості сприйняття за таких умов вектора гравітації апаратом гравірецепції (Сытник и др., 1984; Меркис, 1990; Кордюм и др., 1994; Kordyum, 2014). Проростки *A. thaliana* (Col-0), що росли при кліноостатуванні, також характеризувалися значною варіабельністю форми і розмірів стеблової системи (див. рис. 4.54; 6.27). Такі спостереження підтверджують, що

морфогенез проростків в умовах кліноостатування (як і мікрогравітації) відбувається в рамках генетично детермінованої програми виду відповідно до інших умов середовища, і відсутність сприйняття вектора гравітації не є критичним фактором для існування рослинного організму (Kordyum, 2014). Відхилення ростових процесів від норми вже на ранніх етапах розвитку можуть відбиватися на метаболізмі клітин, і зокрема, на білковому синтезі.

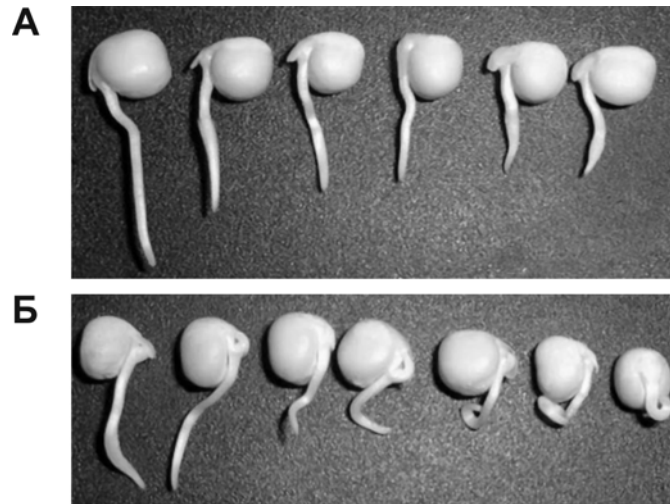


Рис. 4.44. 3-добові проростки *P. sativum*, що росли за стаціонарних умов (А) і при кліноостатуванні (Б) від початку проростання насіння.

Як відомо, проростання насіння супроводжується значними змінами білкового спектру клітин, зокрема, гідролізом запасних білків (Kozeko, Musatenko, 1992; Gallardo et al., 2001). Білки, накопичені у великій кількості в зрілому насінні – запасні білки, білки захисту клітин при зневодненні (LEA, дегідрини, HSP) – гідролізуються, і одночасно запускається синтез білків, що забезпечують реактивацію ростових процесів. Результати електрофоретичного розподілу розчинних білків *P. sativum* за денатуруючих умов виявили схожі зміни білкового спектру протягом проростання насіння і росту проростку як в контролі, так і при кліноостатуванні (рис. 4.45) (більш детально описано в (Козеко, 2006)). Однак у варіанті з кліноостатуванням, разом зі збереженням основних закономірностей цих змін, виявлено певні кількісні відмінності в окремих білкових зон (рис. 4.45, вказано стрілками).

Білки, які відмічено, належать до тих, вміст яких знижується протягом проростання. Тому можна припустити, що більш високий вміст цих білків в кліноостатованих проростках обумовлюється сповільненням їх протеолізу, що так само може бути однією з причин зниження темпів росту проростків. Це узгоджується з іншими досить численними і різнобічними відомостями про зміну швидкості біологічних процесів в умовах кліноостатування (Кордюм и др., 1994; Kordyum, 2014). З іншого боку, ідентичність білкових спектрів 3-добових проростків у контролі та при кліноостатуванні узгоджується з результатами інших дослідників, які за допомогою двомірного електрофорезу радіоактивно мічених білків показали відсутність суттєвих змін у синтезі розчинних білків в *A. thaliana* за впливу хронічного кліноостатування (Piastuch, Brown, 1995).

Отже, реалізація в цілому морфогенетичної програми, відносна стабільність білкового спектру і разом з тим певні відхилення в рості проростків і білковому обміні при кліноостатуванні дозволяють поставити питання щодо механізмів підтримання білкового гомеостазу в умовах тривалої дії кліноостатування. У зв'язку з цим нами проведено оцінку участі HSP70 і HSP90 у відповіді клітин на дію цього чинника.

В насінні *P. sativum* під час проростання виявлено одну імунореактивну зону HSP90 з мол. м. біля 81 кДа і дві зони HSP70 з мол. м. біля 70 кДа (рис. 4.46). Показано значний вміст HSP90 і одного HSP70 з меншою електрофоретичною рухомістю у зародку сухого насіння і різке його зниження в перші 2 доби проростання (рис. 4.46, 4.47). Вміст іншого HSP70 підтримувався на постійному рівні. У *P. sativum* описано два цитозольні HSP70 – індукцибельний з мол. м. 71,166 кДа і конститутивний з мол. м. 71,003 кДа (Vierling, 1991). Стабільну експресію гена конститутивного HSP70 показано в різних органах гороху за нормальних умов, тоді як активну експресію індукцибельного HSP70 виявлено в дозріваючому насінні (DeRocher, Vierling, 1995). Описано високий вміст HSP у зрілому насінні (Wehmeyer et al., 1996).

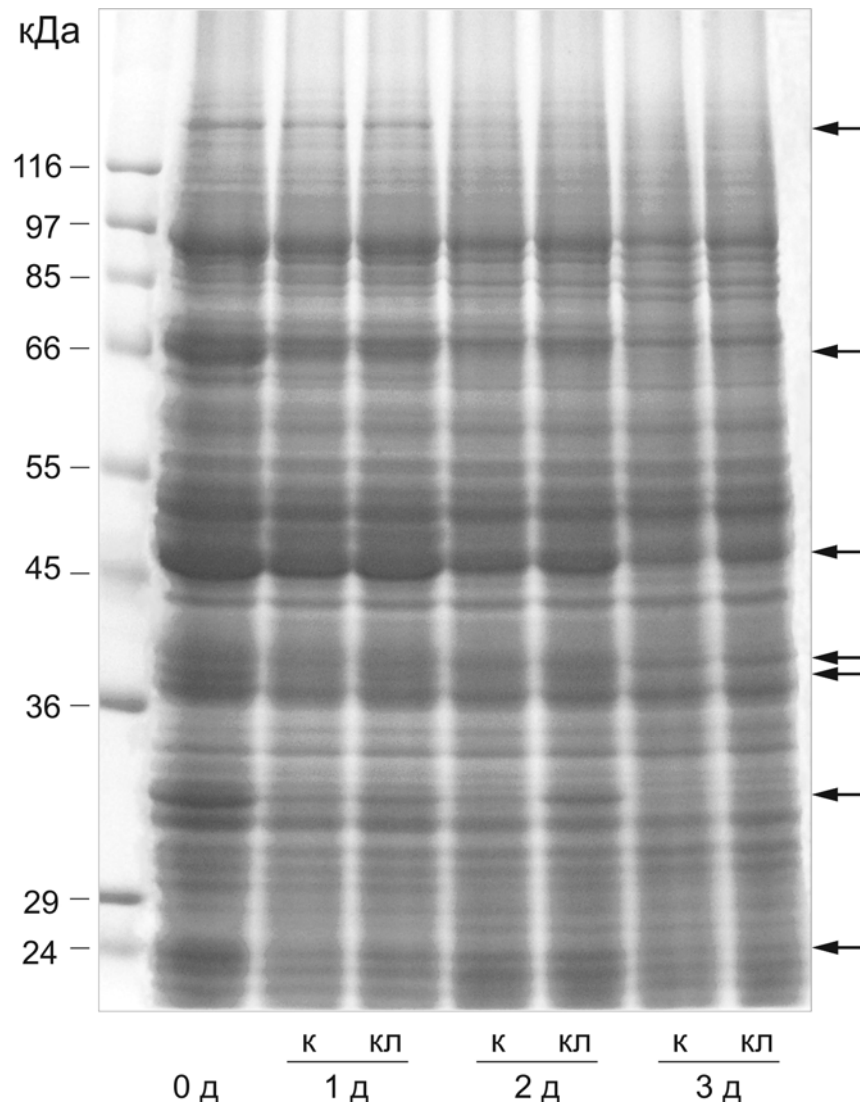


Рис. 4.45. Електрофореграми білків гороху *P. sativum*: зародкової осі сухого насіння (0 д) та 1-, 2- і 3-добових проростків, що росли за стаціонарних умов (к) і при кліностатуванні (кл). Зліва – мол. м. білків-стандартів, справа стрілками вказано смуги, в яких кількість білка вище при кліностатуванні, ніж в контролі.

При кліностатуванні вміст HSP90 та індукцйбельного HSP70 виявився вищим за контроль протягом перших 3 діб, проте далі від контрольного рівню не відрізнявся (щонайменше до 7-ої доби) (рис. 4.46, 4.47). Враховуючи описані вище дані щодо змін ростової активності та загального білкового спектру, такі результати можуть бути інтерпретовані як свідчення

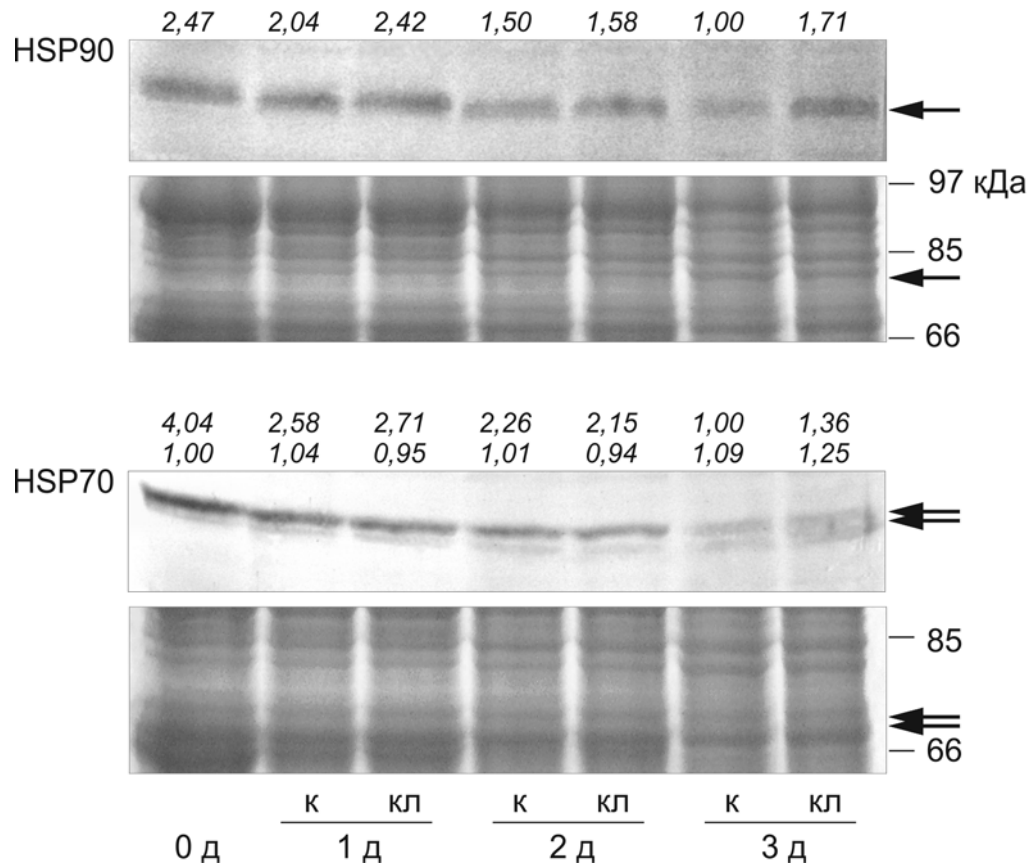


Рис. 4.46. Вестерн-блот-аналіз HSP90 і HSP70 *P. sativum*: зародкової осі сухого насіння (0 д) та 1-, 2- і 3-добових проростків, що росли за стаціонарних умов (к) і при кліностадуванні (кл). Під типовими блотами розташовано відповідні фрагменти електрофореграм для контролю завантаження білка. Розташування HSP вказано стрілками. Над блотами наведено відносну кількість білка (ум. од.) за результатами денситометричного аналізу, по відношенню до зони білка, представленої на блоті у найменшій кількості.

про певне сповільнення протеолізу HSP за умов кліностадування з подальшим виходом на рівень, близький до контрольного. З іншого боку, це може свідчити про необхідність підвищеної кількості HSP в процесі адаптації клітин до кліностадування в період регідратації та реактивації метаболізму і росту. Подібну закономірність визначено також для sHSP та їх мРНК при проростанні за умов кліностадування насіння гороху (Talalaev, 2005; Talalaev, Kordyum, 2014).

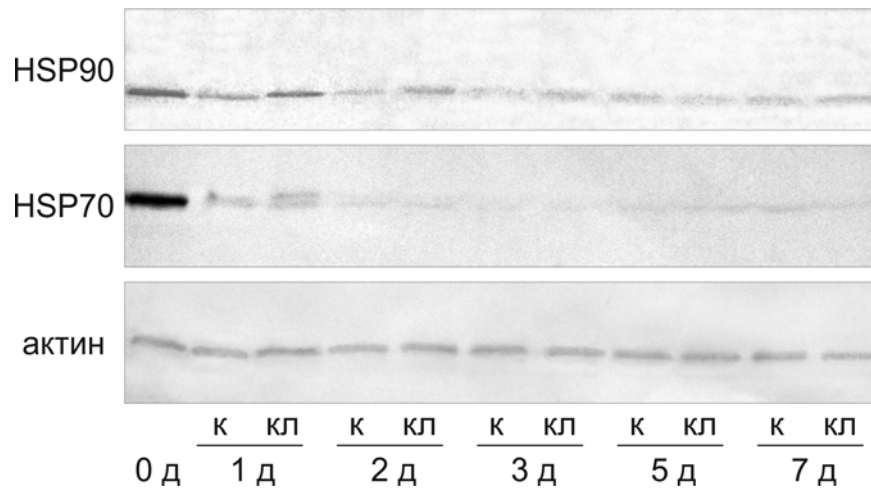


Рис. 4.47. Вестерн-блот-аналіз HSP90 і HSP70 *P. sativum*: зародкової осі сухого насіння (0 д) і 1-, 2-, 3-, 5- та 7-добових проростків, що росли за стаціонарних умов (к) і при кліностагуванні (кл). Актин використовували для контролю завантаження білка.

В ефекті кліностагування виділяють дві складові – ефект «обертання» об'єкта і ефект «положення», обумовлений його просторовою орієнтацією (Brown et al., 1976). До умовного ефекту «обертання» крім впливу відцентрової сили, очевидно, слід віднести дію комплексу супутніх факторів, таких як механічний, електромагнітний тощо, які також можуть впливати на клітинні процеси. Виходячи з цього, ми спробували з'ясувати, яка з двох складових – ефект обертання об'єкта і ефект положення – діє на рослину при горизонтальному кліностагуванні, викликаючи підвищений рівень HSP. Щоб відокремити ці ефекти, порівнювали вміст білків 3-добових проростків, що росли при горизонтальному і вертикальному кліностагуванні (2 об/хв) та за стаціонарних умов (контроль). За допомогою ІФА визначено, що при обох типах кліностагування кількість HSP70 і HSP90 була вище за контрольну (рис. 4.48).

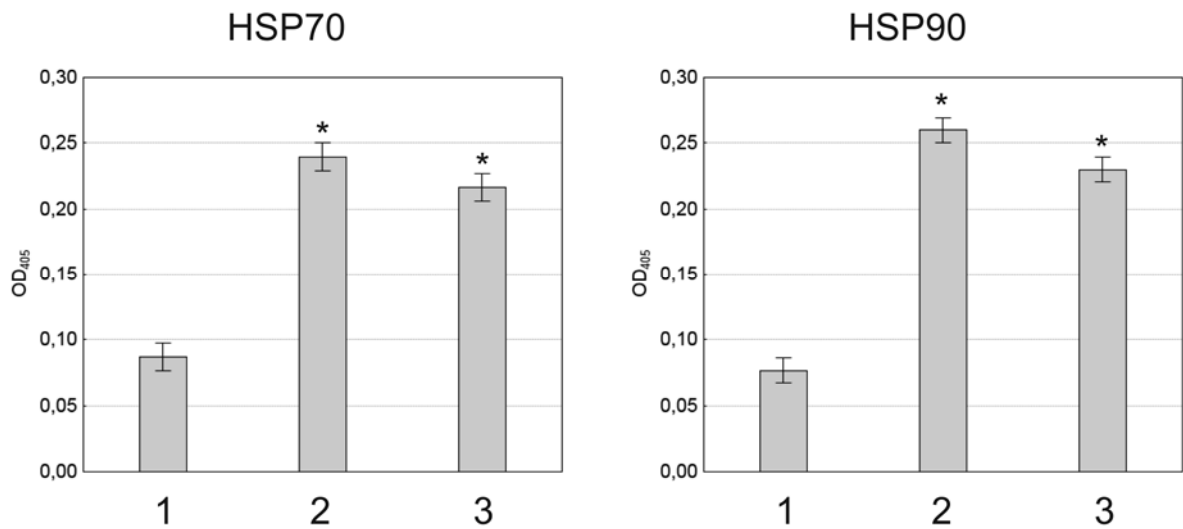


Рис. 4.48. Імуноферментний аналіз (ІФА) HSP70 і HSP90 3-добових проростків *P. sativum*, що росли за стаціонарних умов (1, контроль), при горизонтальному (2) і вертикальному (3) кліноостатуванні від початку проростання насіння. (*) Статистично значуща різниця порівняно з іншими варіантами (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Водночас ефект горизонтального кліноостатування достовірно перевищував ефект вертикального. Виходячи з цього, можна вважати, що основну частку ефекту горизонтального кліноостатування становить ефект обертання, проте зміна положення рослини відносно вектора гравітації також робить свій невеликий, але статистично значущий внесок. Такі дані підтверджують точку зору про комплексний характер впливу горизонтального кліноостатування (Brown et al., 1976; Сытник и др., 1984; Меркис, 1990), що необхідно враховувати при його застосуванні для вивчення ефектів мікрогравітації в наземних експериментах.

Вивчення впливу кліноостатування на експресію окремих генів цитозольних HSP70 і HSP90 проводили з проростками *A. thaliana*. Порівняння вмісту транскриптів в проростках, які росли при кліноостатуванні та за стаціонарних умов протягом 12 діб, проводили за допомогою методу кількісної ПЛР у режимі реального часу. Визначено, що при кліноостатуванні рівень експресії цих генів у 2-7 разів вище, за виключенням генів

конститутивних HSP90 (*HSP90 c*), кількість транскриптів яких визначали сумарно (рис. 4.49). При цьому максимальне збільшення показали індукцйбельні HSP70, особливо *AtHSP70-4*, і менше – індукцйбельний *AtHSP90-1*. Отже, тривале кліностаування спричиняє активацію генної експресії цитозольних HSP70 і HSP90 щонайменше на рівні транскрипції, що може свідчити про необхідність підвищеного рівня цих HSP (або їх транскриптів) для адаптації клітин до даного фактору. В той же час, відсутність суттєвої різниці у вмісті білків між кліностатованими і контрольними проростками *P. sativum* за даними вестерн-блот-аналізу скоріш за все обумовлена меншою чутливістю методу.

Такі результати узгоджуються з даними, отриманими в космічних експериментах. В ячменю після 26 діб росту за умов космічного польоту кількість транскриптів *HSP70* і *HSP90* перевищувала наземний контроль у 2,5 і 2,0 рази, відповідно, (Shagimardanova et al., 2010). Суттєве підвищення рівню транскриптів індукцйбельних *AtHSP70-4*, *AtHSP70-5*, *AtHSP90-1*, *AtHSP101*, *AtHSP17.4*, *AtHSP17.6* і факторів теплового шоку *AtHSFA2* і *AtHSFA7A* знайдено в культурі клітин, проте зміни їх експресії були відсутні в етіолозованих проростках *A. thaliana*, що свідчить про більшу здатність організованих клітин інтактного організму підтримувати білковий гомеостаз (Paul et al., 2012). Характерно, що за даними ряду дослідників експресія генів sHSP у інтактних рослин суттєвих змін під впливом мікрогравітації не зазнавала ані в польотних (ячмінь, Shagimardanova et al., 2010; проростки *A. thaliana*, Paul et al., 2012), ані в наземних експериментах (горох, Talalaiev, Korzum, 2014). Виходячи з особливостей функціонування родин шаперонів, виявлена активація генної експресії цитозольних HSP70, HSP90 (і HSP101) свідчить про потребу клітин в їх мобілізації для рефолдингу і підтримки білкових конформацій за незвичних умов. Водночас відсутність реакції низькомолекулярних шаперонів, ймовірно, показує, що загроза утворення білкових агрегатів при змінах гравітаційного навантаження мінімальна.

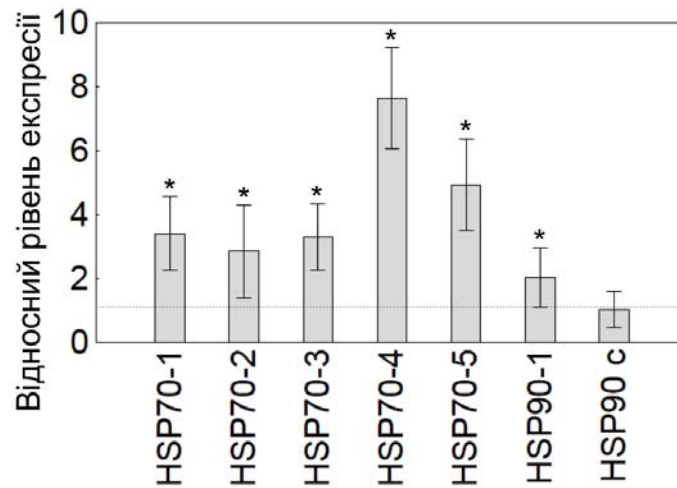


Рис. 4.49. Вплив кліностакування на експресію генів *HSP70* і *HSP90* в проростках *A. thaliana* (Col-0). Представлено відносний рівень експресії в 12-добових проростках, що росли при кліноставанні, по відношенню до контролю (проростки, що росли за стаціонарних умов (= 1), переривчаста лінія). (HSP90 c) означає сумарну експресію *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4*. Кількість мРНК визначали методом ЗТ-ПЛР і нормалізовували по відношенню до *AtUBQ5*. Представлено результати 3-х біологічних і 3-х аналітичних повторностей ($M \pm SD$). (*) Статистично значуща різниця між кліностакованими і контрольними проростками (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

За визначенням, стрес є реакцією організму на гостру дію чинника (Selye, 1936). Щоб відповісти на питання, чи беруть шаперони участь у стрес-реакції рослинних клітин на кліностакування, ми поміщали на кліностаат 3-добові проростки *P. sativum*. За результатами вестерн-блот-аналізу відповідь клітин містила помірну тимчасову активацію синтезу обох білків (рис. 4.50). При цьому активація HSP70 була більш швидкою і значною, порівняно з HSP90: максимальний рівень HSP70 відзначався вже через 2 год, тоді як в HSP90 – через 6 год. Слід відмітити також, що вміст обох білків повертався до рівня, близького до контрольного, протягом доби. Важливо відмітити, що така кінетика синтезу HSP корелює з часовим перебігом утворення іншого

компонента стрес-реакції – АФК (Барабой и др., 1991), який може спричиняти порушення структури білків.

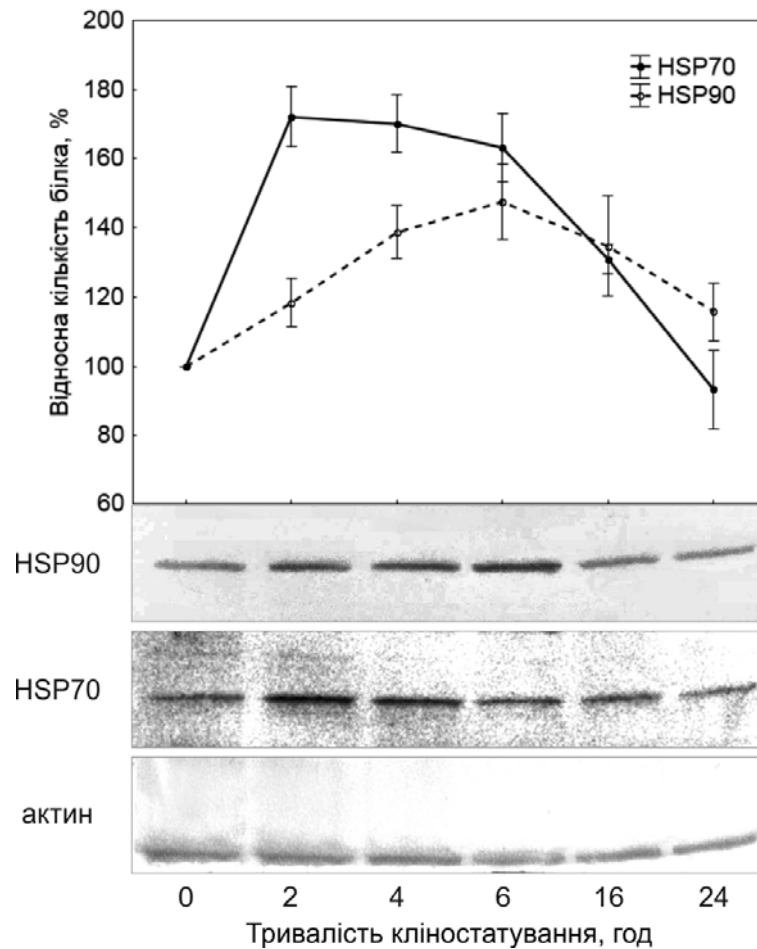


Рис. 4.50. Вестерн-блот аналіз HSP70 і HSP90 3-добових проростків *P. sativum* за умов кліноостатування протягом 2-24 год. Типові блоти розташовано під результатами денситометричного аналізу. Актин використовували для контролю завантаження білка. На графіку рівень HSP90 і HSP70 виражено у відсотках до контролю (0 год) ($M \pm SD$). Вплив кліноостатування на рівень синтезу кожного з білків статистично значущий (One-way ANOVA, $p < 0,05$).

Отже, отримані результати свідчать про участь шаперонів у стрес-реакції клітин на кліноостатування. Однак невеликі зміни рівня цих білків порівняно з реакцією клітин на сильні стресори, зокрема високу температуру, свідчать

про те, що кліноостатування та симульовані за його допомогою біологічні ефекти мікрогравітації можна вважати слабкими стресорами для рослин.

4.5.3. Вплив кліноостатування на стресову індукцію *HSP70* і *HSP90* та теплостійкість рослинних клітин

Щоб відповісти на питання, чи впливає кліноостатування на рівень неспецифічної стійкості рослинних клітин, тобто чи призводить воно до перехресної стійкості, визначали рівень стрес-реакції проростків, що росли при кліноостатуванні, на високу температуру і пов'язану з цим термостійкість.

Проростки *P. sativum*, вирощені при кліноостатуванні або стаціонарно, піддавали впливу високих температур – сублетальних (38°C, 40°C) та потенційно летальних (45°C і 45°C з передобробкою при 38°C). Вестерн-блот-аналіз *HSP70* і *HSP90* показав, що ступінь індукції синтезу цих білків у відповідь на високу температуру, тобто реакція теплового шоку, виявилась вищою в клітинах рослин, що росли при кліноостатуванні, хоча при нормальній температурі рівень цих білків за даними цього методу від контрольного не відрізнявся (рис. 4.51). Показано також більш інтенсивне накопичення кліноостатованими проростками білка *HSP70* у часі (рис. 4.51, Б).

Вивчення впливу кліноостатування на реакцію теплового шоку на рівні транскрипції проводили з проростками *A. thaliana*. 12-добові проростки, що росли при кліноостатуванні або стаціонарно, піддавали дії 37°C протягом 0,5, 1 і 2 год – періоду, за який індукція експресії генів цитозольних *HSP70* і *HSP90* досягає максимального рівня (див. п. 4.1.1). За допомогою методу кількісної ЗТ-ПЛР показано, що швидка індукція їх експресії відбувалась в обох варіантах, проте з певними відмінностями (рис. 4.52). Так, рівень мРНК конститутивного *AtHSP70-1* зростав повільно протягом теплової експозиції і показував лише тенденцію до посилення після кліноостатування.

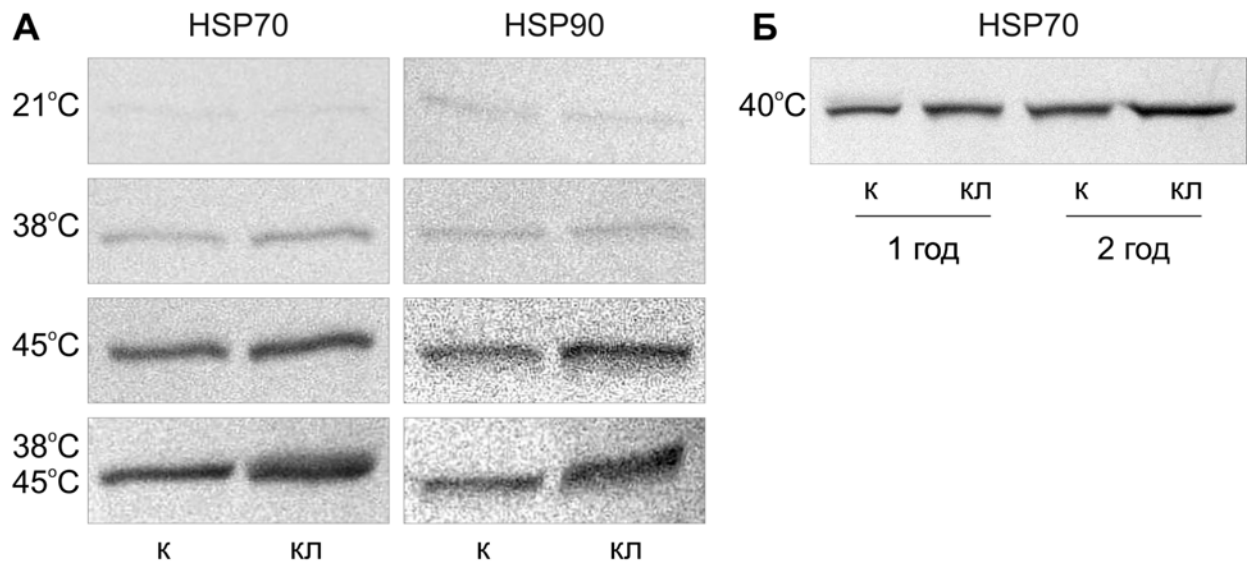


Рис. 4.51. Вплив кліноостатування на реакцію теплового шоку. Вестерн-блот-аналіз HSP70 і HSP90 5-добових проростків *P. sativum*, що росли за стаціонарних умов (к) і при кліноостатуванні (кл) протягом 5 діб від початку проростання, після чого піддавались дії високої температури: (А) 21°C (контроль); 38°C (1,5 год); 45°C (2 год); і 45°C (2 год) після передобробки 38°C (1,5 год); (Б) аналіз HSP70 після експозиції при 40°C протягом 1 і 2 год.

Активація генів з конститутивною експресією *AtHSP70-2*, *AtHSP70-3* та *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3*, *AtHSP90-4* (сумарно) досягала максимуму за 1 год, після чого рівень експресії певною мірою знижувався. При цьому кліноостатовані проростки відрізнялись більш швидкою активацією експресії *AtHSP70-2* і *AtHSP70-3* та, навпаки, тенденцією до зниження експресії *HSP90*. Індуцибельні *AtHSP70-4*, *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* виявляли потужну індукцію в перші 30 хв теплової експозиції, значне її посилення протягом наступних 30 хв і стабільно високий рівень протягом 2-ої год. Після кліноостатування індукція цих генів посилювалась на початку реакції швидше і досягала більш високого рівня, ніж в контролі, що було особливо виражене у *AtHSP70-4* і *AtHSP70-5*.

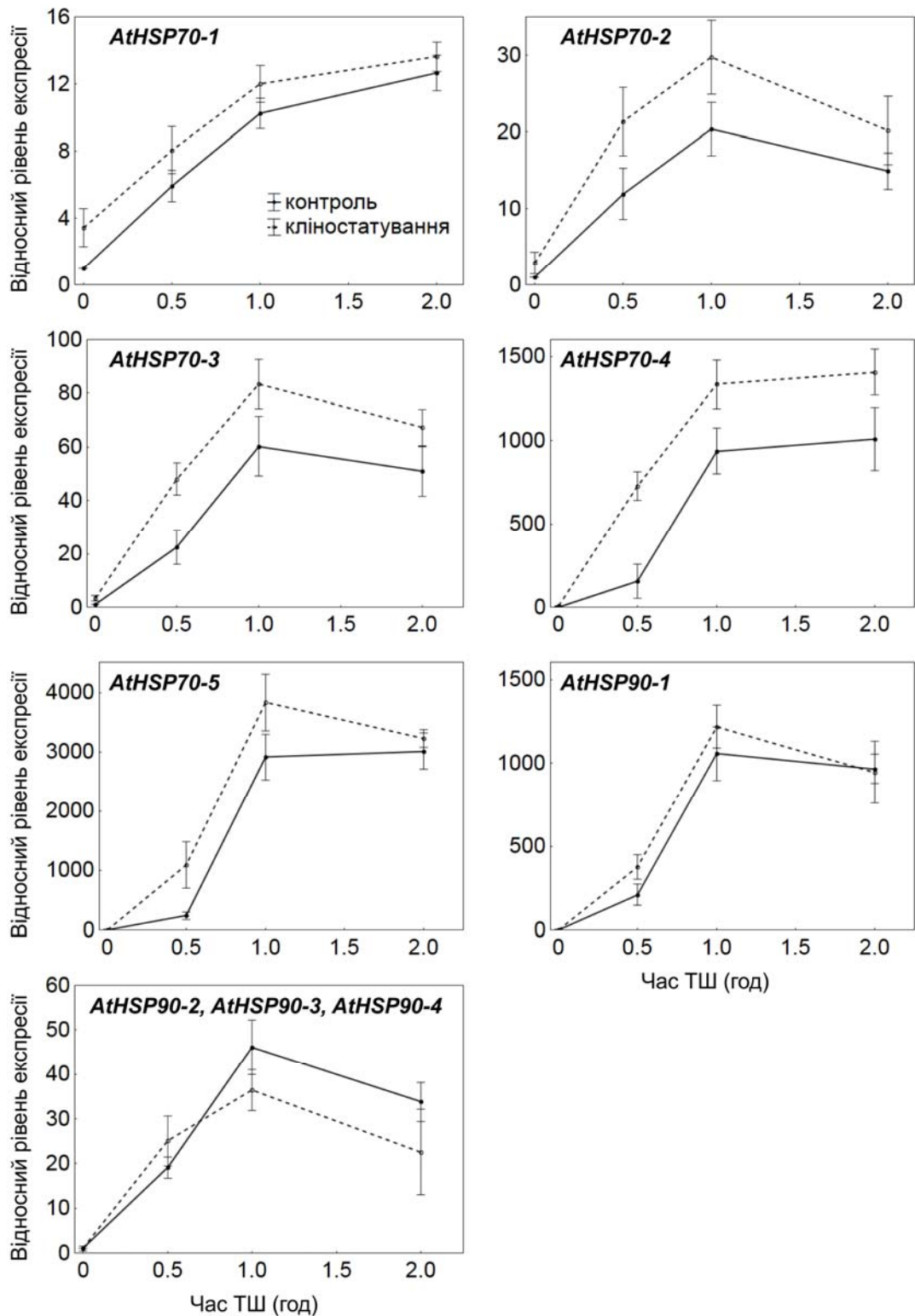


Рис. 4.52. Вплив кліностакування на реакцію теплового шоку проростків *A. thaliana* (Col-0). 12-добові проростки, вирощені за стаціонарних умов (контроль) і при кліноставанні, інкубували при 37°C протягом 0,5, 1 і 2 год. Рівень мРНК визначали методом кількісної ЗТ-ПЛР і нормалізували до *AtUBQ5*. Відносний рівень експресії оцінювали по відношенню до контролю (= 0 год теплової обробки). Представлено результати 3 біологічних і 3 аналітичних повторностей ($M \pm SD$). Ефект високої температури статистично значущий для всіх HSP, ефект кліностакування – для *AtHSP70-2*, *AtHSP70-3*, *AtHSP70-4*, *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* (Two-way ANOVA, $p < 0,05$).

Таким чином, кліноостатування викликало невелике підвищення рівня експресії генів п'яти цитозольних *AtHSP70s* і *AtHSP90-1* при нормальній температурі (див. рис. 4.49, п. 4.5.2), а також більш швидку і потужну індукцію при тепловому шоці. Характерно, що найбільший ефект відмічався у індукцибельних генів *AtHSP70-4*, *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1*, які є ключовим компонентом стійкості клітин (Sørensen et al., 2003). Сумарний рівень транскриптів генів *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* з конститутивною експресією, навпаки, при кліноостатуванні за нормальної температури не відрізнявся від контролю і характеризувався меншою індукцією при тепловому шоці.

Такі результати аналізу генної експресії в *A. thaliana* добре узгоджуються з результатами аналізу синтезу HSP70 і HSP90 у *P. sativum*, представленими вище. Спроба знайти цьому пояснення призвела до двох протилежних припущень. З одного боку, висока індукцибельність кількох HSP може відображати посилення чутливості клітин кліноостатованих проростків до високої температури. З іншого боку, можна припустити, що більш високий рівень їх експресії може сприяти посиленню неспецифічної стійкості клітин, тобто виникненню під впливом кліноостатування перехресної стійкості.

Для перевірки цих припущень проведено порівняння теплостійкості кліноостатованих і контрольних проростків *A. thaliana*. Критерієм служила їх виживаність після теплової експозиції у потенційно летальній дозі – 45°C протягом 45 хв. Обробці піддавались проростки на 5 і 12 добу росту. На обох строках виживаність рослин, що росли за умов кліноостатування, перевищувала таку в контролі. Так, 5-добові проростки, шоковані після кліноостатування, довше залишалися зеленими (рис. 4.53).

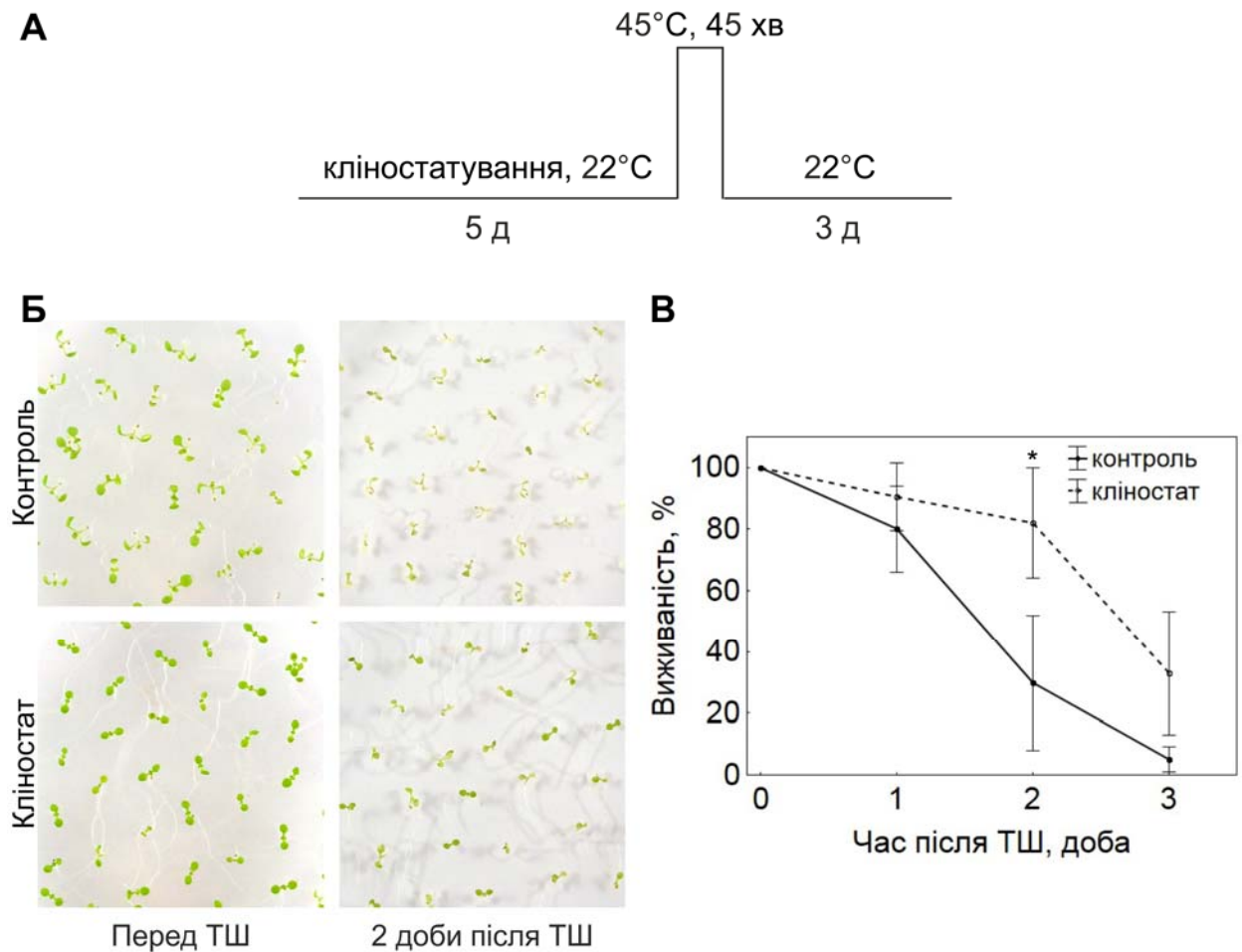


Рис. 4.53. Вплив кліноостатування на термостійкість 5-добових проростків *A. thaliana* (Col-0). (А) Схема експерименту. (Б) Проростки до теплового шоку (ТШ) при 45°C протягом 45 хв і через 2 доби після ТШ. (В) Вживаність проростків після ТШ ($M \pm SD$, $n = 3$ чашки по ~ 25 проростків у кожній; (*) t-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Частина 12-добових кліноостатованих проростків після теплового шоку виявилась здатною продукувати нові зелені листки протягом 6 діб реадаптації, в той час як контрольні повністю втрачали життєздатність (рис. 4.54). Такі результати свідчать на користь припущення, що посилення під впливом кліноостатування індукційного компонента клітинного пулу шаперонів сприяє виникненню перехресної стійкості.

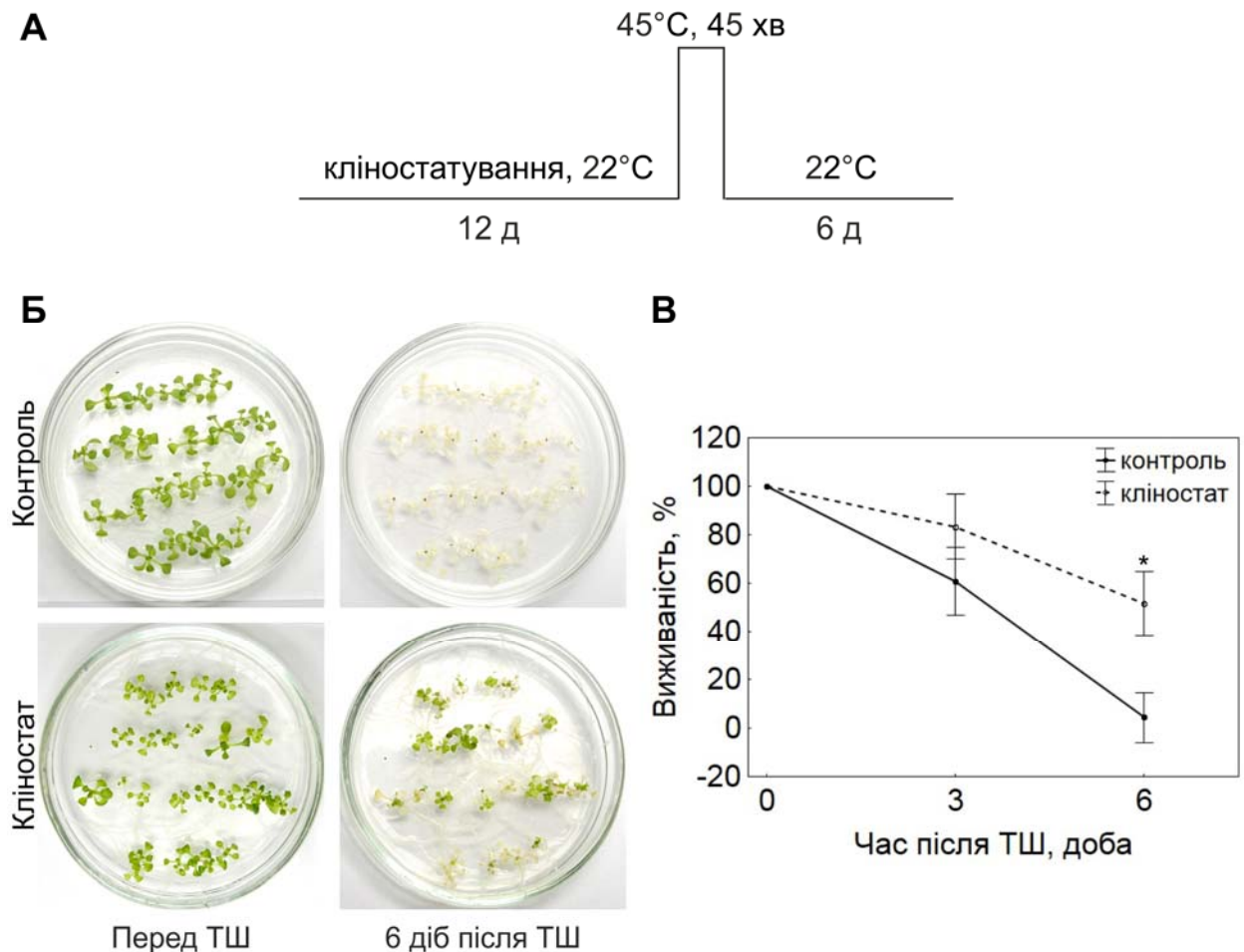


Рис. 4.54. Вплив кліноостатування на терmostійкість 12-добових проростків *A. thaliana* (Col-0). (A) Схема експерименту. (Б) Чашки з проростками до теплового шоку (ТШ) при 45°C протягом 45 хв і через 6 діб після ТШ. (В) Вживаність проростків після ТШ ($M \pm SD$, $n = 3$ чашки по ~ 25 проростків у кожній; (*) t-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Підсумовуючи результати аналізу ефектів гіпергравітації та кліноостатування, можна зробити наступні висновки. Перш за все, треба відмітити, що за несприйняття гравітаційного стимулу морфогенетична програма рослинного організму реалізується повністю, проте із певними відхиленнями у розмірах і просторовому розташуванні органів.

Рослинні клітини в активному фізіологічному стані (клітини проростків) реагували як на гіпергравітацію, так і на кліноостатування тимчасовою активацією синтезу HSP70 і HSP90 – швидше в HSP70 і повільніше в HSP90,

що показує координовану участь цих шаперонів у стрес-реакції на зміни гравітаційного навантаження. Активація синтезу цих білків у відповідь на гіпергравітацію носила дозо-залежний характер, тобто посилювалась як з прискоренням, так і з тривалістю її дії.

Адаптація до тривалого кліноостатування включала затримку протеолізу запасних HSP70 і HSP90 під час проростання насіння і раннього росту проростків, що корелювало з затримкою гідролізу інших запасних білків насіння і зниженням ростової активності проростків, а також певне посилення експресії генів цитозольних членів цих родин у подальшому. Вперше продемонстровано комплексний характер впливу кліноостатування на синтез цих білків, а саме, відокремлено ефект власно симульованої мікрогравітації. Отримані дані є підтвердженням стресорності для рослинних клітин як гіпергравітації, так і кліноостатування / симульованої мікрогравітації, а також доводять участь HSP90 і HSP70 в стрес-реакції на дію цих факторів та в адаптації до тривалого кліноостатування. Це узгоджується з положенням про здатність рослин адаптуватися до мікрогравітації в рамках фізіологічної відповіді (Kordyum, 2014). Крім того, це цілком узгоджується з висновком, зробленим за результатами польотного експерименту, що зміни в генній експресії рослинних клітин після кількох днів космічного польоту відносяться скоріше до довготермінової адаптації, ніж до стрес-реакції (Paul et al., 2012).

Крім того, нами показано, що кліноостатування за інших оптимальних умов призводить до посилення здатності клітин відповідати на дію іншого стресора (теплого шоку) індукцією експресії генів цитозольних HSP70 і HSP90, тобто до виникнення перехресної стійкості. Отже, посилення пулу шаперонів є ключовим компонентом неспецифічної стійкості клітин не тільки до звичних для наземних організмів чинників (Swindell et al., 2007), а і до незвичних.

4.6. HSP70 як біомаркер стану рослин

Експериментальні дослідження зазвичай спрямовані на вивчення біологічних ефектів одного чи кількох контрольованих факторів. Проте в природних умовах організми одночасно відчують вплив комплексу неконтрольованих факторів різної природи. Тому пошук біомаркерів стану рослин природних угруповань є одним з пріоритетних завдань сучасної біології. Очевидно, що для цього потрібен показник, який значно змінюється при переході будь-якого зовнішнього фактора з зони оптимуму до зони критичних значень. Такому критерію повністю відповідають індукцйбельні HSP70. Як відмічалось вище, індукція синтезу білків цієї родини вважається універсальним механізмом захисту клітин від ушкоджень при дії стресорів різної природи практично у всіх організмів, включаючи рослини (Vierling, 1991; Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000; Sørensen et al., 2003). Це підтверджується результатами нашого аналізу на рівні транскрипції та трансляції (див. п. 4.1, 4.4), а також визначенням ролі індукцйбельних генів у стійкості рослинних клітин (див. п. 4.2). Вважають, що первинним сигналом для їх індукції є поява в клітині під впливом шкідливих чинників значної кількості поліпептидів з порушеною конформацією (Ananthan et al., 1986; Pelham, 1986). Тобто їх високий вміст свідчить про порушення протеостазу. Ідея використання HSP70 як індикатора стресу висловлювалася раніше для тваринних об'єктів у рамках робіт з токсикології та моніторингу забруднення середовища важкими металами, пестицидами та іншими шкідливими сполуками (Sanders, 1993; Werner, Hinton, 1999; Mukhopadhyay et al., 2003; De Jong et al., 2006; Тимофеев и др., 2008; Sørensen, 2010; Yousef et al., 2011). Проте відомі нам роботи на рослинах поодинокі. HSP70 розглядався як біомаркер стресу водних рослин *Fucus serratus* і *Lemna minor* (Ireland et al., 2004). Також пропонувалось вважати білок HSP70В зелених водоростей, локалізований у хлоропластах, раннім маркером окиснювального стресу (Юрина, 2010).

Стосовно переваг HSP70 у цьому сенсі над іншими родинами HSP можна відмітити наступне. Відносне підвищення вмісту білків HSP90 в клітинах при стресі є помірним (Lai et al., 1984; Picard, 2002). Родини HSP100 і sHSP, які теж мають індукційні члени (Hong, Vierling, 2000, 2001; Queitsch et al., 2000; Sun et al., 2002; Lee et al., 2006; Waters, 2013), характеризуються більш високою варіабельністю послідовностей та їх реактивності, що ускладнює їх використання для тестування рослин.

Високий ступінь гомології амінокислотних послідовностей HSP70 у різних видів (Gupta, Golding, 1993; Boorstein et al., 1994) являється важливою обставиною при пошуці методичних підходів. Так, наявність в N-термінальній частині білків цієї родини висококонсервативної ділянки (Маргулис, Гужова, 2000; Lin et al., 2001) дає можливість використання специфічних до неї антитіл для тестування представників різних таксонів. Крім того, визначений нами в експериментах з ґрунтовим затопленням системний характер реакції HSP70 на зміни умов середовища (п. 4.4.2) вказує на можливість використання окремих органів (наприклад, листків) для оцінювання стану всього організму. Перевірка ефективності такого підходу потребувала експериментального підтвердження наступних положень:

- Можливість використання моноклональних антитіл, специфічних до консервативної ділянки HSP70 для тестування рослин різних видів і родин.
- Високий рівень HSP70 в листках рослин може бути індикатором стресового / напруженого стану рослин при дії несприятливих чинників різної природи (тестування різних видів рослин за контрастних умов середовища);
- Використання HSP70 як біомаркера стану рослин є більш ефективним, порівняно з HSP90 – іншою високо консервативною родиною (визначення обох шаперонів у рослин одного виду за різних умов середовища).

Для перевірки цих положень і відпрацювання методу ми обрали види покритонасінних рослин, різних за своєю екологією, зокрема за вимогами до умов водозабезпечення: наземні *Salix purpurea* (*Salicaceae*), *Malva pulchella* і *M. sylvestris* (*Malvaceae*), *Epipremnum aureum* (*Araceae*), *S. sisaroidium* (*Apiaceae*); повітряно-водні *Sium latifolium* (*Apiaceae*) та *Hydrocotyle verticillata* (*Apiaceae*), які здатні рости як у прибережній водній зоні, так і на суші; справжні водні – плаваюча у воді *Pistia stratiotes* (*Araceae*), яка може адаптуватися до росту на суходолі, та прикріплена до ґрунту *Trapa natans* (*Trapaceae*) з плаваючою на поверхні води листковою розеткою, для якої існування поза водою неможливе. Для аналізу використовували листки з рослин, які зазнавали впливу водного дефіциту, затоплення і теплового стресу в природних умовах або в експерименті. Для імунодетекції білка використовували напівкількісний метод вестерн-блотингу. В кожному аналізі проби містили рівну кількість загального білка.

Перш за все, для порівняння чутливості реакції HSP70 і HSP90 проведено тестування повітряно-водних рослин *S. latifolium* і суходільних рослин *S. sisaroidium* з природних популяцій однієї території. У всіх рослин для аналізу брали повітряні листки 3-го ярусу. Отримані результати підтверджують участь як HSP70, так і HSP90 в адаптації природних рослин до умов довкілля. Активність синтезу обох HSP певною мірою корелювала між собою у кожного організма, проте значно варіювала між особинами однієї популяції за однакових погодних умов (рис. 4.55, А). Оскільки в природі кожен організм відчуває вплив унікального для нього комплексу зовнішніх чинників, то варіабельність у рівні HSP може бути обумовлена гетерогенністю локальних умов місцезростання, хоча не можна виключати і відмінності в індивідуальній здатності особин до адаптації та індукції цього білка. Разом з тим, варіації вмісту HSP70 виявились більш значними, порівняно з HSP90, що цілком відповідає загальним відомостям. Вважається, що HSP70 неспецифічно зв'язує ненативні білки (Mayer, Bukau, 2005) та є головними у рефолдингу білків у багатьох видів (Sørensen et al., 2003). Також

треба підкреслити швидку інтенсивну акумуляцію індукцибельних членів цієї родини під час стресу (див. п. 4.1, 4.4). На відміну від HSP70, HSP90, як відмічалось, характеризується високим вмістом у клітинах за нормальних умов (Lai et al., 1984; Picard, 2002) і помірною індукцією при стресі, ймовірно, підключаючись до зв'язування денатурованих білків тоді, коли інші шаперони вже не справляються з ситуацією. Також за нашими результатами, представленими в п. 4.1, реакція індукцибельного HSP90 *A. thaliana* виявилась специфічною до типу стресора. Все це разом доводить більшу чутливість шаперонів HSP70 до варіабельного середовища.

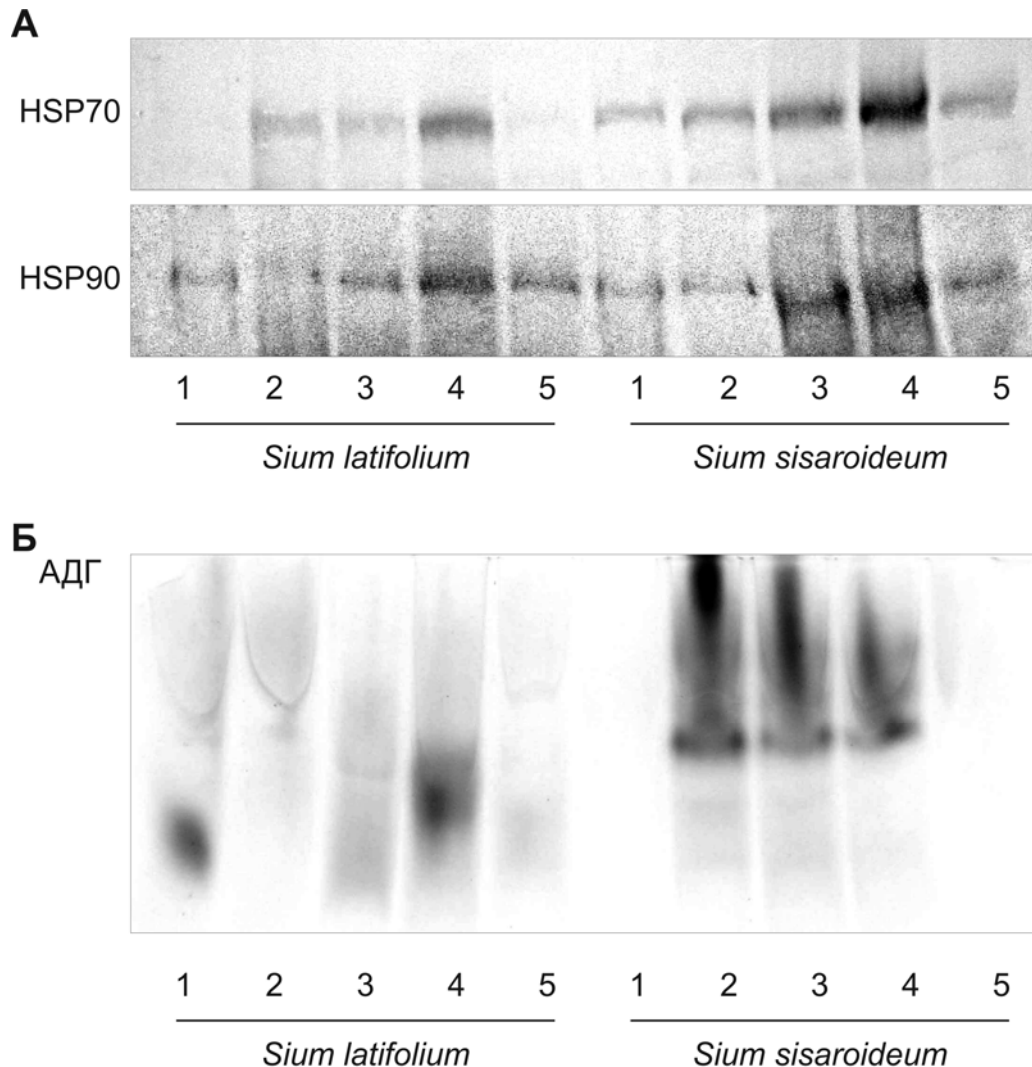


Рис. 4.55. Імуноблоти HSP70 і HSP90 (А) та зимограми АДГ (Б) повітряних листків п'яти рослин *S. latifolium*, що зростали на мілководді та п'яти рослин *S. sisaroidium*, що зростали на березі за одних погодних умов.

Порівняння двох видів *Sium* показало більш високий загальний рівень HSP70 у суходільних рослин *S. sisaroides* (рис. 4.55). Теоретично це могло бути спричинено як нестачею води в ґрунті місць зростання суходільних рослин, так і, навпаки, його перезволоженням. Паралельне визначення АДГ, ключового ферменту анаеробного метаболізму, показало позитивний взаємозв'язок між рівнем ферменту і HSP70, що підтверджує вплив кореневої гіпоксії на синтез шаперона за надмірної вологості ґрунту.

Підтвердженням участі HSP70 у захисті клітин від негативних ефектів гіпоксії також можуть бути результати визначення вмісту цього білка в гетерофільних листках *S. latifolium*. Гетерофілія є одним з яскравих прикладів пластичності повітряно-водних рослин, що забезпечує ефективне функціонування листків у воді і повітрі (Кордюм, 2001; Silvertown, Charlesworth, 2001; Jackson, 2006; Недуха, 2011). Так, *S. latifolium* на початку вегетації формує підводні багатократно розсічені листки з ниткоподібними частками, листки другого порядку з черешками у воді та менш розсіченими листовими пластинками над водою, і повітряні листки верхніх ярусів з більш цільними листовими пластинками (Петрова, Барыкина, 2005; Недуха, 2011). Визначення HSP70 показало його високий вміст в листках, занурених у воду, зниження у проміжних листках і низький вміст в повітряних листках (рис. 4.56).

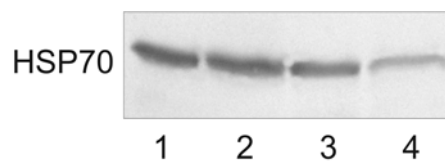


Рис. 4.56. Імуноблоти HSP70 з гетерофільних листків повітряно-водної рослини *S. latifolium*: (1, 2) нижні занурені у воду багаторозсічені листки; (3) проміжний листок, черешок якого знаходиться у воді, а листові пластинки – над водою; (4) повітряний листок.

З великою ймовірністю можна вважати, що вміст шаперона корелював зі ступенем впливу гіпоксії, що підтверджує його участь у підтриманні гомеостазу клітин листків за гіпоксичних умов. Це цілком узгоджується з нашими спостереженнями при моделюванні кореневого затоплення в лабораторному експерименті (див. п. 4.4.2), а також з даними літератури. Відомо, що індукція експресії *HSP70* може відбуватися при обробці екзогенним етанолом – продуктом етанольного бродіння (Vierling, 1991). Одночасна швидка індукція АДГ і *HSP70* у відповідь на аноксію показана в проростках *A. thaliana* (Banti et al., 2008).

Результати тестування семи видів за контрастних умов представлено на рисунку 4.57 і в таблиці 4.4. У рослин *S. latifolium*, частина з яких зростала на мілководді, інші – на невеликій відстані на березі ріки, високий рівень *HSP70* виявлявся за жарких посушливих погодних умов, причому у суходільних – більший (рис. 4.57, А). Очевидно, для повітряно-водних рослин в цьому випадку критичним фактором була висока температура, для рослин суходолу – комплексна дія високої температури і посухи. У обох видів мальви *HSP70* не визначався за помірного рівня вологості та температури, проте так, як і у попереднього виду, активно синтезувався за жарких посушливих умов (рис. 4.57, Б). У трав'янистої ліани *E. aureum* *HSP70* детектували у невеликій кількості за нормальних умов та в умовах ґрунтової посухи, тоді як значний його вміст виявлявся після затоплення кореневої системи протягом тижня і максимальний – після 2 год теплової експозиції при 40°C (рис. 4.57, В). У деревного виду *S. purpurea* мала кількість *HSP70* в листках детектувалась без поливу за природної зволоженості ґрунту, і значна кількість – за умов поливу (рис. 4.57, Е). Це відповідає екологічній характеристиці виду, згідно якої сприятливими для нього є рихлі, добре аеровані, помірно зволожені ґрунти. У двох водних видів, які можуть адаптуватися до умов суходолу – плаваючого *P. stratiotes* і прикріпленого до ґрунту *H. verticillata* – спостерігали однакову закономірність: *HSP70* не детектувався у водних рослин, проте у значній кількості виявлявся в рослин, які зростали на березі

водойми (рис. 4.57, Г, Д). Крім того, у водних рослин *H. verticillata* відзначено високий рівень індукції синтезу HSP70 після 2 год теплової експозиції при 40°C. У справжньої водної рослини *T. natans*, яка не може існувати поза водою, білок детектували у слідовій кількості (на межі чутливості методу) за нормальних умов і в невеликій порівняно з іншими видами кількості після 4 год теплової експозиції при 37°C (рис. 4.32, п. 4.4.1). Таку слабку індукцію синтезу стресового білка у відповідь на високу температуру можна пов'язати зі спеціалізацією цього виду до зростання у воді і неможливості існування поза водою. Відомо, що амплітуда температурних коливань у воді значно менша, ніж у повітрі (Одум, 1986). Це, ймовірно, може бути причиною послаблення механізмів неспецифічної стійкості. Такий феномен відомий для ряду спеціалізованих і ендемічних видів тварин, які є адаптованими до вузької екологічної ниши (Sanders et al., 1993; Tomanek, Somero, 2000; Tomanek, 2002; Тимофеев и др., 2008; Timofeyev et al., 2009; Шатилина и др., 2010; Shatilina et al., 2011; Bedulina et al., 2013).

Таким чином, тестування рослин 9 видів 6 родин за різних умов середовища виявило наявність HSP70 у значній кількості за несприятливих умов і відсутність або присутність у малій кількості за умов, близьких до оптимальних, специфічних для кожного виду. Ці спостереження разом з нашими даними щодо генної експресії та кінетики стресового синтезу (див. п. 4.1, 4.4) дозволяють розглядати рівень HSP70 як інтегральний індикатор стану рослин за формулою: *більший вміст HSP70 в клітинах є показником напруженого стану рослин і негативного впливу середовища.*

Слід також відмітити, що здатність клітин до посилення біосинтезу цього білка за несприятливих умов позитивно корелювала з діапазоном стійкості видів. Крім того, результати проведеного нами дослідження підтвердили можливість використання антитіл, реактивних до консервативної послідовності HSP70, для тестування рослин різних видів і родин.

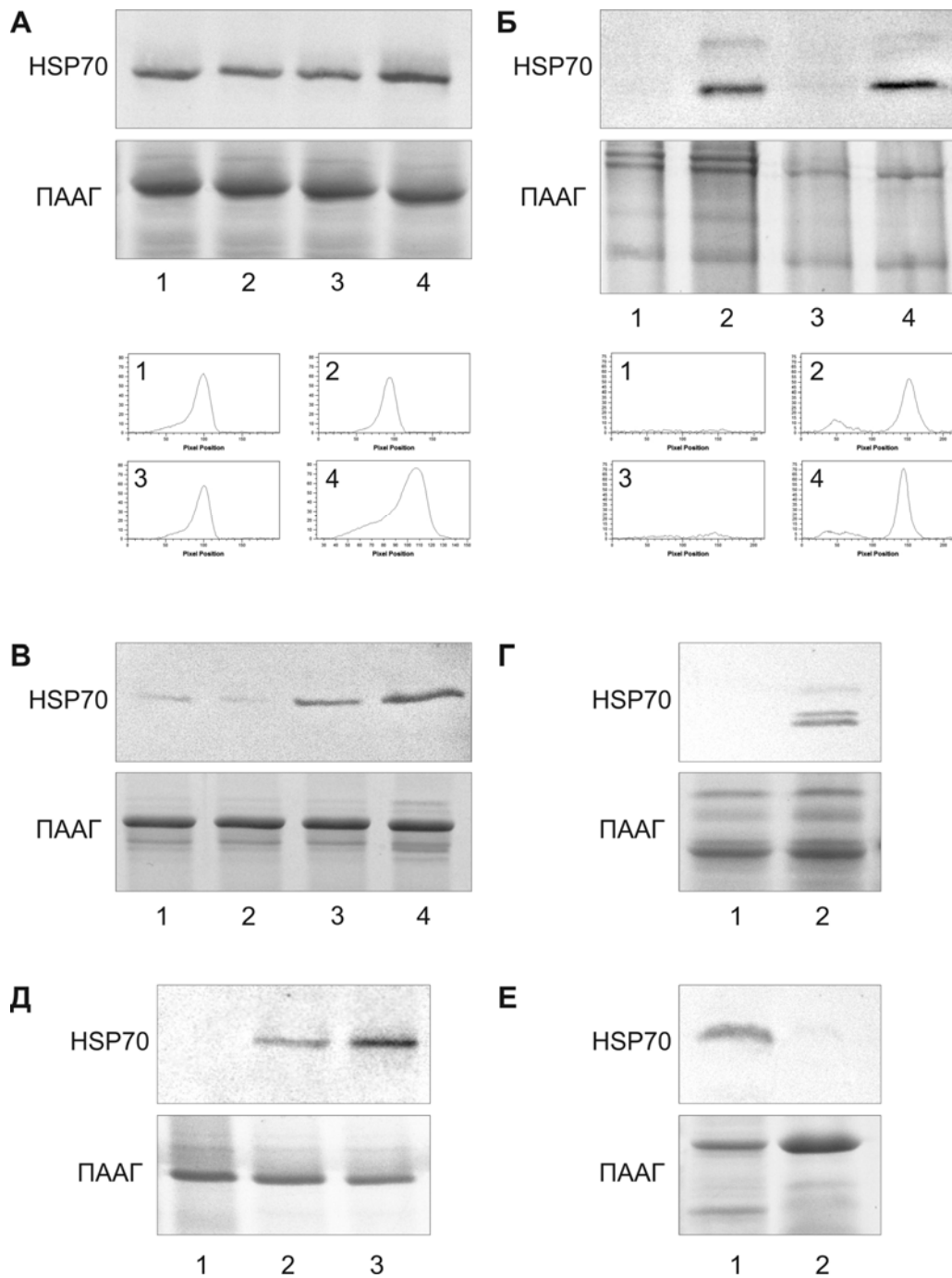


Рис. 4.57. Вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках: (А) *Sium latifolium* - повітряно-водних (1-3) та суходільної (4) рослин при температурі повітря 41°C; (Б) *Malva pulchella* (1, 2) і *M. sylvestris* (3, 4) – за умов помірного зволоження ґрунту при температурі повітря 17°C (1, 3) і в посушливий період при температурі повітря 41°C (2, 4); (В) *Epipremnum aureum* – при поливі (1), за посушливих умов (2), при затопленні (3) і після експозиції при 40°C протягом 2 год (4); (Г) *Pistia stratiotes* – плаваючі рослини при температурі води 21°C (1) і рослини, які росли на суші при температурі повітря 20°C (2); (Д) *Hydrocotyle verticillata* – при зростанні у воді з температурою 21°C (1), на суші при температурі повітря 20°C (2) і водні рослини після експозиції при 40°C протягом 2 год; (Е) *Salix purpurea* – на перезволоженому ґрунті (1) і на ґрунті нормального зволоження (2) при температурі повітря 17°C.

Результати тестування стану рослин з використанням HSP70

Вид	Умови росту рослин	Фактори середовища	Оцінка рівню HSP70	Рисунок
<i>S. latifolium</i>	Повітряно-водна	Тп 40°C	+++	4.57, А, 1-3
	Суходільна	Тп 40°C, тривала посуха	++++	4.57, А, 4
<i>M. sylvestris</i>	Наземна	Тп 17°C, w = 30 ± 0,3%	±	4.57, Б, 1
		Тп 41°C, w = 5 ± 0,1%, тривала посуха	++++	4.57, Б, 2
<i>M. pulchella</i>	Наземна	Тп 17°C, w = 30 ± 0,3%	±	4.57, Б, 3
		Тп 41°C, w = 5 ± 0,1%, тривала посуха	++++	4.57, Б, 4
<i>E. aureum</i>	Наземна	Тп 20°C, w = 88 ± 0,6%, полив	+	4.57, В, 1
		Тп 20°C, w = 18 ± 0,2%, без поливу протягом тижня	±	4.57, В, 2
		Тп 20°C, затоплення	++	4.57, В, 3
		Тп 40°C, 2 год	++++	4.57, В, 4
<i>P. stratiotes</i>	Водна плаваюча	Тп 20°C, Тв 21°C	–	4.57, Г, 1
	Суходільна	Тп 20°C	+++	4.57, Г, 2
<i>H. verticillata</i>	Водна	Тв 21°C	–	4.57, Д, 1
	Суходільна	Тп 20°C	++	4.57, Д, 2
	Водна	Експозиція при Тп 40°C, 2 год	+++	4.57, Д, 3
<i>S. purpurea</i>	Наземна	Тп 17°C, 28 ± 0,2 %, без поливу	–	4.57, Е, 1
		Тп 17°C, 64 ± 0,3 %, полив	++	4.57, Е, 2
<i>T. natans</i>	Водна	Тп 23°C, Тв 20°C	–/±	4.32
		Експозиція при Тп 37°C, 2 год	+	4.32

Примітка. Тп - температура повітря; Тв - температура води; w - вагова вологість ґрунту. Оцінка рівню HSP70 за результатами вестерн-блот-аналізу: (–) не визначається, (±) дуже мала кількість (на межі чутливості методу), (+) мала кількість; (++ - +++) активація синтезу різного ступеню.

При цьому напівкількісний метод вестерн-блотингу виявився достатнім для визначення суттєвих змін у вмісті білка, залишаючи за межами аналізу тонкі варіації, що відповідає задачам оціночного тестування. Щоправда, працездатність методу і необхідність спеціального обладнання та кваліфікованого персоналу свідчить про доцільність створення більш простої для широкого використання тест-системи.

На основі результатів тестування запропоновано спосіб визначення стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин, що включає оцінку фізіологічного стану рослини та впливу на неї екологічних факторів за

вмістом білків теплового шоку HSP70 у зразку рослинного матеріалу (листках), визначеним шляхом імунодетекції з використанням моноклональних антитіл, специфічних до HSP70 широкого кола організмів, включаючи рослини (Патент на корисну модель № 65170, Козеко та ін., 2011).

Висновки до розділу 4

Викладені у розділі результати наших досліджень показують значення функціонування шаперонів HSP70 і HSP90 на всьому діапазоні стійкості рослинного організму – як за нормального, так і за критичного рівня факторів.

- Позитивний взаємозв'язок між пороговою дозою фактора, вище якої відбувається індукція *HSP70*, та стійкістю рослин вказує на значення базового вмісту шаперонів для визначення *діапазону нормальної життєдіяльності* організму.
- Позитивний взаємозв'язок базового рівня шаперонів HSP70 зі ступенем та тривалістю активації їх синтезу при стресі та стійкістю досліджених видів до несприятливих чинників вказує на значення конститутивного синтезу HSP70 для забезпечення *адаптивного потенціалу* рослини.
- Про участь шаперонів у забезпеченні виживаності та відновленні гомеостазу клітин і організму за критичного рівня факторів середовища і визначенні *діапазону стійкості* свідчать:
 - Активація генної експресії всіх (або більшості) членів родин – як конститутивних, так і індукцибельних – при стресі та адаптації до змін факторів;
 - Зниження активності генної експресії та вмісту шаперонів при досягненні летальних доз факторів, тобто виході за межі стійкості організму;

- Ключове значення індукцйбельного компонента у забезпеченні стійкості, а саме – високий ступінь індукції відповідних генів, а також зниження тепло- і посухостійкості рослин при порушенні їх експресії;
- Видові особливості кінетики синтезу HSP70 та їх тісний взаємозв'язок з процесами метаболічної, структурної, морфологічної та фізіологічної адаптації кожного виду та з адаптивним потенціалом рослин, зокрема:
- Висока інтенсивність синтезу HSP70 в органах, особливо важливих для виживання організму (верхні листки рослин мальви під час відмирання нижніх);
- Необхідність збільшення пулу шаперонів *під час зміни траєкторії розвитку* організму (акт пластичності розвитку), показана як висока інтенсивність синтезу HSP70 та його системний характер протягом періоду адаптації рослин до кореневої гіпоксії – нетривалої активації анаеробного метаболізму у *A. thaliana* та тривалої структурно-функціональної адаптації у *S. sisaroides*;
- Участь шаперонів HSP70 і HSP90 у стрес-реакції та адаптації рослин до еволюційно незвичних змін гравітаційного навантаження *за відсутності генетично детермінованої програми пластичної відповіді*;
- Активація генної експресії HSP70 і HSP90 при виникненні *перехресної стійкості* (посилення теплостійкості в результаті кліностагування).

Крім того, виявлено наступні закономірності:

- Певна специфічність функціонування членів родин HSP70 і HSP90, що виявляється в особливостях тканинної локалізації і профілів генної експресії;
- Відмінності у функціонуванні між індукцйбельними членами родин і, відповідно, їх роллю в стрес-реакції та адаптації до різних зовнішніх чинників;
- Швидкіша та значніша реакція на зовнішні чинники у членів родини HSP70 порівняно з HSP90, що свідчить про їх провідну роль у захисті протеостазу;

- Міжіндивідуальна варіабельність рівня базової експресії генів *HSP* (показано на прикладі *AtHSP90-2*).

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Kozeko L.Ye., Buy D.D., Pirko Ya.V., Blume Ya.B., Kordyum E.L. Clinorotation affects induction of the heat shock response in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Gravitational Space Res.*, 2018, 6 (1): 2-9.

2. Козеко Л.Е. Участие цитозольных белков теплового шока HSP70 и HSP90 в адаптации к водному дефициту проростков *Arabidopsis thaliana*. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2018, 2 (44): 41-49.

3. Kordyum E., Kozeko L., Ovcharenko Y., Brykov V. Assessment of alcohol dehydrogenase synthesis and aerenchyma formation in the tolerance of *Sium* L. species (*Apiaceae*) to water-logging. *Aquatic Bot.*, 2017, 142: 71-77.

4. Козеко Л.Є. Синтез білка теплового шоку HSP70 і алкоголь-дегідрогенази у листках *Arabidopsis thaliana* і *Sium sisaroides* у відповідь на затоплення ґрунту. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2017, 3 (42): 46-51.

5. Козеко Л.Є., Рахметов Д.Б. Особливості динаміки синтезу білків теплового шоку HSP70 у *Malva silvestris* і *M. pulchella* (*Malvaceae*) у зв'язку зі стійкістю до високої температури, затоплення та посухи. Укр. Ботан. Журн., 2016, 73 (2): 194-203.

6. Козеко Л.Є., Овчаренко Ю.В. Динаміка структурно-функціональної адаптації *Sium latifolium* (*Apiaceae*) до затоплення кореневої системи. Укр. Ботан. Журн., 2015, 72 (2): 172-179.

7. Козеко Л.Е., Кордюм Е.Л. Белок теплового шока Hsp70 как индикатор состояния и резистентности растений. Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных

условиях и техногенной среде», 10-13 июня 2013, Иркутск, Россия. - Иркутск, 2013: 458-461.

8. Kordyum Ye.L., Kozeko L.Ye., Ovcharenko Yu.V. Phenotypic plasticity of aerial-aquatic plants *Alisma plantago-aquatica* L. and *Sium latifolium* L.: structural and molecular aspects. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: біологія, 2012, 52 (3): 11-16.

9. Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух Г.Я., Рахметов Д.Б., Мартинюк Г.М., Дідух Я.П., Кордюм Є.Л. Оцінка стану рослин при несприятливих змінах екологічних факторів з використанням білка теплового шоку 70 кДа (Hsp70). Укр. Ботан. Журн., 2011, 68 (6): 890-900.

10. Кордюм Є.Л., Дідух Я.П., Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух А.Я. Розробка та підготовка до впровадження методу оцінки стану рослин у несприятливих умовах зовнішнього середовища. Наука та інновації, 2011, 7 (5): 73-78.

11. Kozeko L., Kordyum E. Effect of hypergravity on the level of heat shock proteins 70 and 90 in pea seedlings. Microgravity Sci. Technology, 2009, 21 (1): 175-178.

12. Козеко Л.Е. Количественные изменения белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в реакции проростков гороха на кратковременное действие гипергравитации. Доповіді НАН України, 2009, 1: 140-143.

13. Kozeko L. Effects of simulated microgravity on thermotolerance of pea seedlings. J. Gravitational Physiol., 2008, 15 (1): 173-174.

14. Kozeko L.Ye., Kordyum E.L. Heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings under clinorotation of different duration. J. Gravitational Physiol., 2007, 14 (1): 115-116.

15. Козеко Л.Е. Влияние реальной и моделированной микрогравитации на генную экспрессию белков теплового шока. Космічна наука і технологія, 2007, 13 (2): 57-61.

16. Kozeko L.Ye., Kordyum E.L. Altered gravity effect on the heat shock protein level in plants. *J. Gravitational Physiol.*, 2006, 13(1): 117-118.

17. Козеко Л.Е. Изменения в спектре растворимых белков и в содержании стрессовых белков БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха в ответ на клиностатирование. *Біополімери і клітина*, 2006, 22(2): 136-142.

18. Kozeko L., Kordyum E. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response. *Microgravity sci. technol.*, 2006, XVIII-3/4: 254-256.

19. Kozeko L., Ivanenko G., Kordyum E. Whole-mount GUS staining analysis of heat shock proteins HSP90 and HSP70 expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings // International Conference “Advances in Cell Biology and Biotechnology”, 11-13 October 2015, Lviv, Ukraine, P. 28.

РОЗДІЛ 5

РЕГУЛЯЦІЯ ГЕННОЇ ЕКСПРЕСІЇ HSP І СТІЙКОСТІ РОСЛИН ШАПЕРОНАМИ HSP90

Вивчення здатності HSP90 регулювати експресію HSP в рослинних клітинах шляхом негативної регуляції активності конститутивних транскрипційних факторів HsfA1 (далі HSF) проводили з використанням специфічного інгібітора ГДА. При цьому прогнозувався наступний ланцюг подій: зв'язування антибіотика з шаперонами HSP90 і блокування їх АТФ-залежних функцій → вивільнення молекул HSF → тримеризація і активація HSF → ініціація тримерами HSF транскрипції генів *HSP* → активація синтезу HSP. Критеріями функціонування такого механізму служили залежні від концентрації антибіотика зміни синтезу HSP70 і HSP90 та теплостійкості. Експерименти проводились з *A. thaliana* (Col-0).

5.1. Вплив інгібування HSP90 на синтез HSP70 і HSP90

В експериментах цього розділу ГДА використовували в концентраціях 1, 10 і 100 мкМ. Для оцінки впливу антибіотика на базовий синтез HSP 12-добові проростки інкубували з його розчином протягом 6 год у темряві при 24°C. На імуноблотах аналізували дві імунореактивні зони HSP70 і одну HSP90. Зони HSP70, які умовно позначено як HSP70.1 і HSP70.2, за молекулярною масою відповідають: перша - AtHSP70-3 і AtHSP70-4 (71,1 кДа), друга - AtHSP70-5 (70,9 кДа) (Lin et al., 2001). Зона HSP90 з мол. м. ~80 кДа може містити 4 цитозольні ізоформи – 3 конститутивні та 1 індукцибельну (Krishna, Gloor, 2001). Показано, що обробка проростків ГДА викликала індукцію синтезу обох HSP70 і HSP90 за нормальних умов (рис. 5.1). Оскільки ефективною виявилась навіть така низька концентрація антибіотика, як 1 мкМ, можна говорити про високу специфічність зв'язування антибіотика з HSP90. Втім, найефективнішою при обробці

проростків була концентрація 10 мкМ. Розчинник ДМСО у відповідних концентраціях на синтез цих білків не впливав (дані не показано). Отримані нами результати узгоджуються з даними Yamada et al. (2007), які визначили індукцію експресії *HSP70*, *HSP90* і *HSP101* в проростках *A. thaliana* в результаті обробки ГДА і РАД у подібному експерименті. Зазначимо також, що індукцію *HSP70*, *HSP90* і *HSP25* під впливом ГДА раніше детектували у тваринних клітин (Conde et al., 1997; Новоселова и др., 2008). Отже, показані нами зміни підтверджують гіпотезу щодо регуляції синтезу HSP білками HSP90 за принципом зворотного зв'язку (Ali et al., 1998; Morimoto, 1998; Zou et al., 1998) для рослинних клітин.

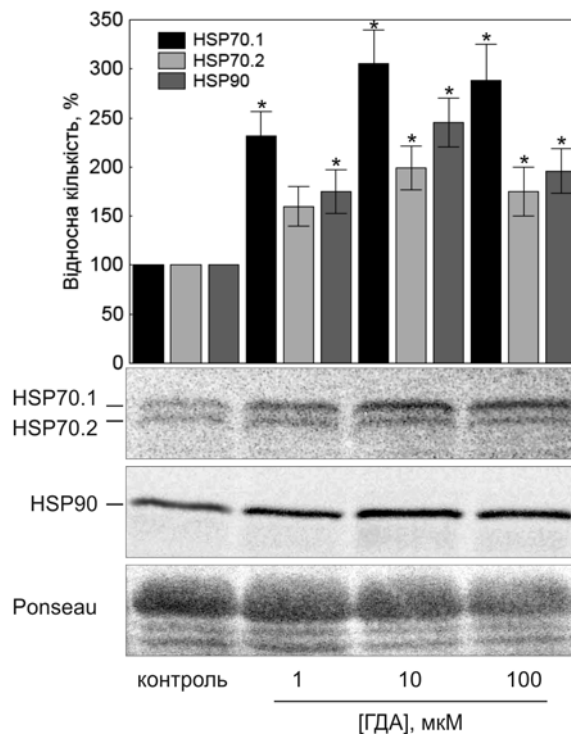


Рис. 5.1. Вплив ГДА на синтез HSP70 і HSP90 в проростках *A. thaliana* (Col-0) за нормальних умов. Типові вестерн-блоти представлено під результатами денситометричного аналізу. Забарвлення Ponceau S використовували для контролю кількості сумарного білка у зразках та якості переносу на мембрану (також у наступних аналізах даного розділу). На графіку – рівень білка у відсотках до контролю ($M \pm SD$); (*) статистично значуща різниця відносно контролю (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

За результатами Duncan (2005), отриманими на тваринних клітинах, підвищений рівень синтезу HSP після інкубації з ансаміциновими інгібіторами HSP90 підтримується лише протягом кількох годин. Проте за нашими даними, обробка інгібіторами HSP90 насіння *A. thaliana* мала віддалені у часі ефекти на ріст і розвиток рослин (див. розд. 6). На підставі цього ми припустили, що обробка насіння інгібітором HSP90 може мати пролонгований вплив на експресію HSP. Для перевірки цього припущення нами проведено аналіз рівня HSP в проростках *A. thaliana* після обробки ГДА насіння. Результати вестерн-блот-аналізу показали, що інкубація насіння з ГДА у темряві при кімнатній температурі протягом 24 год призводила до посилення синтезу HSP у 12-добових проростків за нормальних умов (рис. 5.2, А). Активація синтезу HSP70 визначалася вже при концентрації ГДА 1 мкМ і зростала з її збільшенням, тоді як рівень HSP90 ставав вищим за контрольний лише при концентраціях 10 і 100 мкМ. Однак, ступінь такого підвищення вмісту HSP в проростках після обробки ГДА насіння був меншим порівняно з ефектом обробки безпосередньо проростків. Перевірка можливої дії розчинника ДМСО в еквівалентних концентраціях суттєвих змін у синтезі цих білків не виявила (рис. 5.2, Б). Крім того, за результатами електрофоретичного розподілу в ПААГ спектр розчинних білків проростків після обробки насіння ГДА також не змінювався (дані не показано).

Таким чином, обробка антибіотиком насіння впливала на базовий синтез HSP70 і HSP90 в проростках щонайменше протягом перших 12 діб росту. Проте механізм цього явища залишається нез'ясованим. Оскільки на початку росту проростків відбувається гідроліз HSP, преформованих у зрілому насінні, та реактивація синтезу конститутивних HSP (Queitsch et al., 2000; Sung et al., 2001; Kozeko, Kordyum, 2006), можна передбачати вплив ГДА на ці процеси, тобто взаємодію між програмою індивідуального розвитку та індукуванням синтезу HSP70 і HSP90 під впливом ГДА. Не виключена також можливість того, що після потрапляння у клітини фоточутливий антибіотик

стає більш захищеним від деструктивної дії світла і залишається активним триваліший час.

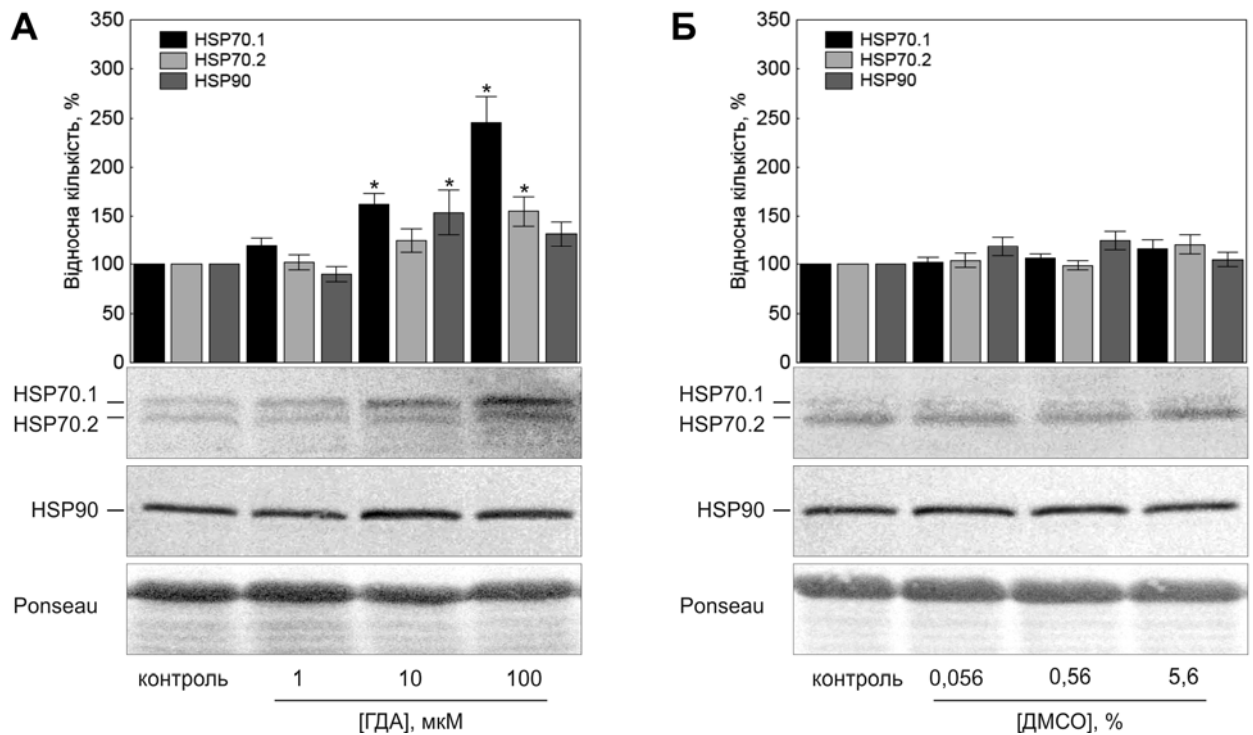


Рис. 5.2. Вплив обробки насіння ГДА (А) і розчинником ДМСО в еквівалентних концентраціях (Б) на синтез HSP70 і HSP90 в 12-добових проростках *A. thaliana* (Col-0) за нормальних умов. Типові вестерн-блоти розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіку – рівень білка у відсотках до контролю ($M \pm SD$); (*) статистично значуща різниця відносно контролю (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Для вивчення впливу обробки насіння ГДА на рівень індукції синтезу HSP в проростках при стресі їх піддавали тепловій експозиції – сублетальній (37°C, 2 год) і потенційно летальній (45°C, 1 год). У першому випадку з підвищенням концентрації антибіотика підвищувався рівень індукції синтезу HSP70, особливо HSP70.1, і активація синтезу HSP90 при максимальній концентрації (рис. 5.3, А). При 45°C зміни носили більш складний характер (рис. 5.3, Б). Так, при концентрації ГДА 1 мкМ рівень індукції HSP70.1 практично не змінювався, утім відмічалась затримка активації HSP70.2 і

навіть зниження вмісту HSP90. Більш високі концентрації антибіотика викликали посилення індукції синтезу всіх HSP. В цілому, ступінь активації був вищим при температурі 37°C, яка, як відомо, викликає найбільш інтенсивний синтез HSP (Клюева, Самохвалов, 1990) і максимально сприяє аклімації *A. thaliana* (Silva-Correia et al., 2014) та виникненню індукованої теплостійкості (Silva-Correia et al., 2014). Отже, обробка насіння ГДА посилювала здатність клітин до індукції синтезу HSP при стресі.

Такі дані доводять, що інгібування HSP90 не тільки спричиняє індукцію синтезу HSP70 і HSP90, але і має пролонгований вплив на інтенсивність їх синтезу за нормальних і стресових умов. Відзначено, що кількісні зміни були найбільш вираженими в HSP70.1, що, за нашим припущенням, відповідає активації синтезу перш за все індукцйбельного AtHSP70-4. Зміни вмісту HSP70.2, який ми пов'язуємо з ізоформою AtHSP70-5, були менш значними і відбувалися з певною затримкою. Такий характер кінетики експресії відповідних генів описано нами при тепловому шоці (див. п. 4.1.1).

Зміни в синтезі HSP90 відставали від HSP70 і були менш вираженими, а інколи і неоднозначними. Так, після обробки семян 1 мкМ ГДА вміст HSP90 в проростках *A. thaliana* протягом теплового шоку при 45°C знижувався. Схожі зміни в синтезі HSP90 під впливом цього антибіотика раніше визначали в тваринних клітинах після опромінення лазерним світлом (Новоселова и др., 2008). На тваринних клітинах також показано відставання активації синтезу HSP90 відносно HSP70. Наприклад, в культурі клітин *Drosophila* синтез HSP90 знижувався протягом перших 0,5 год теплового шоку і активувався при подальшому збільшенні дози фактору (Duncan, 2005). Можна припустити, що причиною неоднозначних змін рівня HSP90 може бути участь цих білків не тільки в негативній регуляції транскрипційних факторів HSF за нормальних умов та їх активації при стресі, а і в регуляції розвитку цієї реакції протягом тривалої дії стресора та її завершенні, що описано в п. 2.6 огляду літератури.

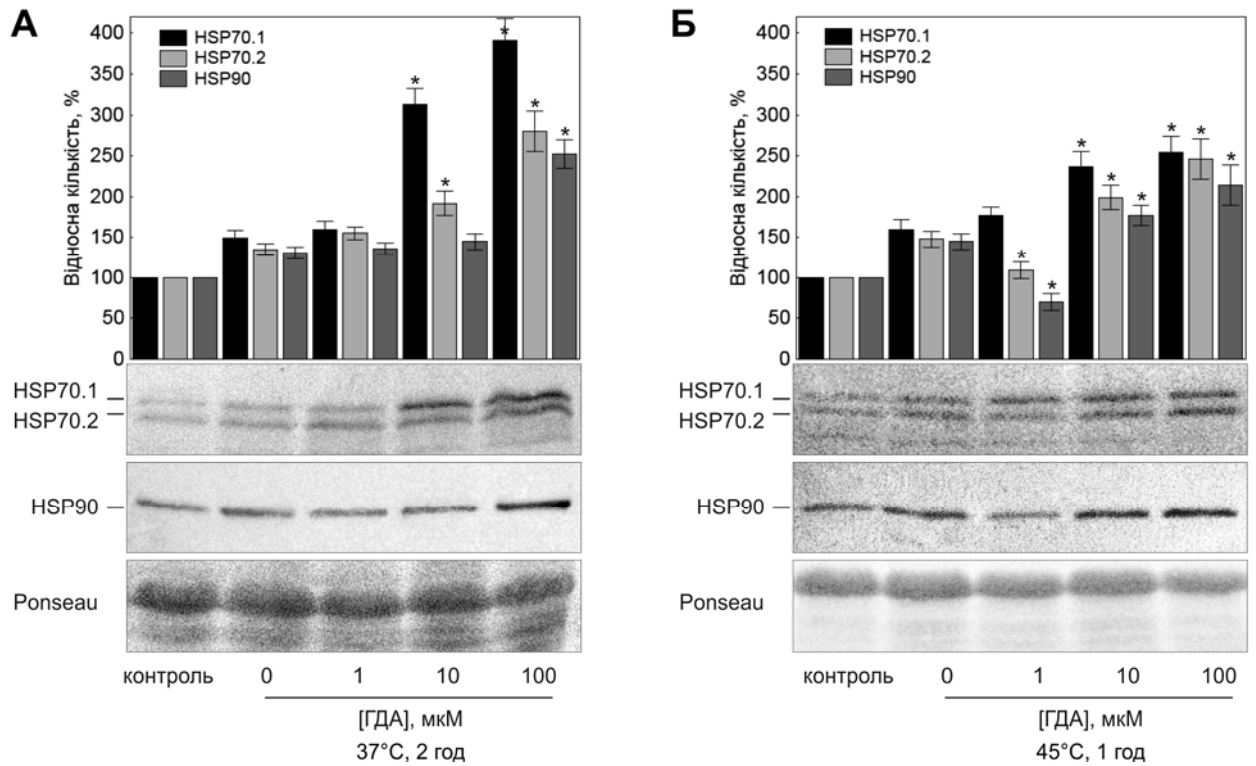


Рис. 5.3. Вплив обробки ГДА насіння на індукцію синтезу HSP70 і HSP90 в проростках *A. thaliana* (Col-0) при тепловому шоці: (А) 37°C, 2 год; (Б) 45°C, 1 год. Типові вестерн-блоти розташовано під результатами денситометричного аналізу. На графіку – рівень білка у відсотках до контролю ($M \pm SD$); (*) статистично значуща різниця відносно варіанту з тепловою експозицією без обробки ГДА (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

5.2. Вплив інгібування HSP90 на термостійкість рослин

Як відомо, накопичення HSP в клітинах посилює виживаність організмів за впливу потенційно летальних доз зовнішнього чинника (Queitsch et al., 2000; Bowen et al., 2002; Sørensen et al., 2003; Yamada et al., 2007). Ми ілюстрували цей феномен на прикладі індукованої термостійкості, коли значна активація синтезу HSP70 і HSP90 (прогнозовано, й інших HSP) в результаті попереднього прогріву при 37°C протягом 2 год і короткої реадаптації сприяла виживанню проростків під час наступної 1-годинної експозиції при 45°C (рис. 5.4).

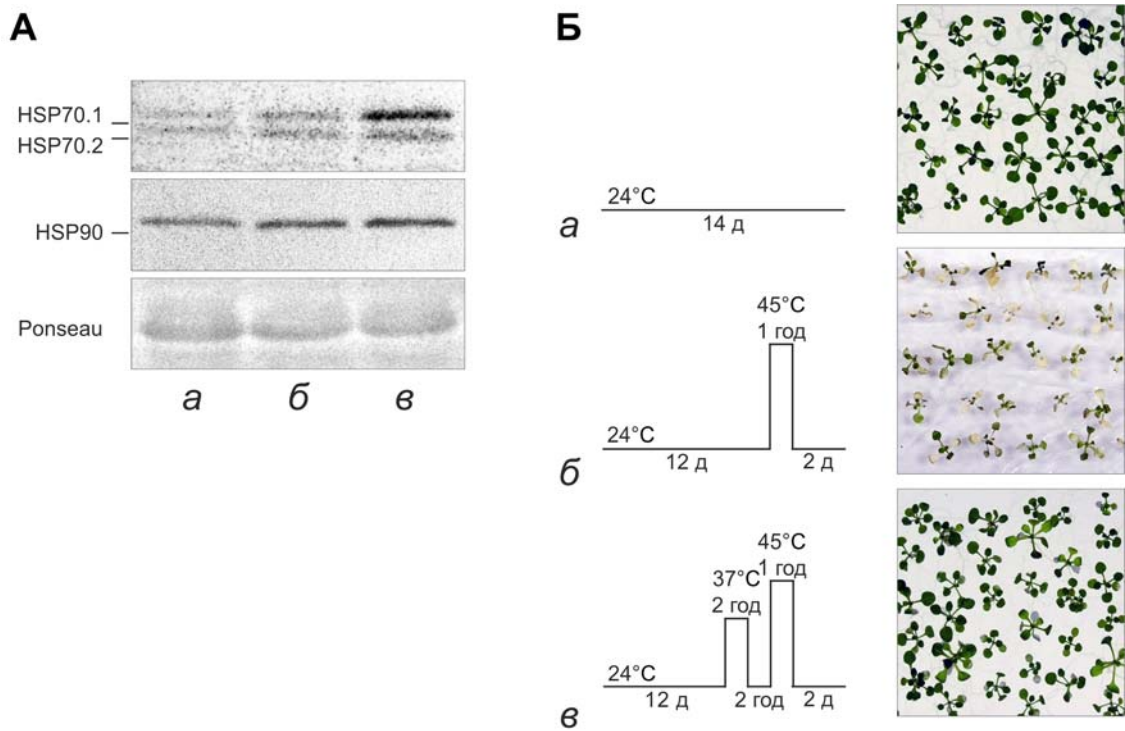


Рис. 5.4. Індукція синтезу HSP70 і HSP90 (А) і теплостійкості (Б) проростків *A. thaliana* (Col-0) в результаті попередньої обробки сублетальною температурою 37°C. (А) Типові вестерн-блоти. (Б) Проростки після теплової експозиції; схему експерименту представлено на схемах (а, б, в).

В роботі Yamada et al. (2007) обробка проростків *A. thaliana* інгібіторами HSP90 підвищувала їх теплостійкість, при цьому теплову експозицію проводили відразу після обробки антибіотиком. Для вивчення питання, чи змінюється теплостійкість проростків після обробки ГДА насіння, дії високої температури піддавали 3-добові проростки. Такий вік проростків обрано, виходячи з того, що протягом перших двох діб проростання відбувається зниження рівня стійкості клітин, пов'язане з гідролізом запасних речовин насіння, зокрема, гідролізом преформованих HSP (Queitsch et al., 2000).

У першому експерименті теплостійкість проростків визначали за їх виживаністю після інкубації при 45°C. Показано, що тепла інкубація проростків протягом 30 хв на їх життєздатність не впливала. Підвищення тривалості інкубації до 45 хв призводило до загибелі біля 50% проростків у контролі протягом 5 діб (рис. 5.5). Після обробки ГДА процент проростків,

які вижили, був вищим і позитивно корелював з концентрацією антибіотика. Проте більш тривала теплова інкубація виявилась летальною в усіх варіантах.

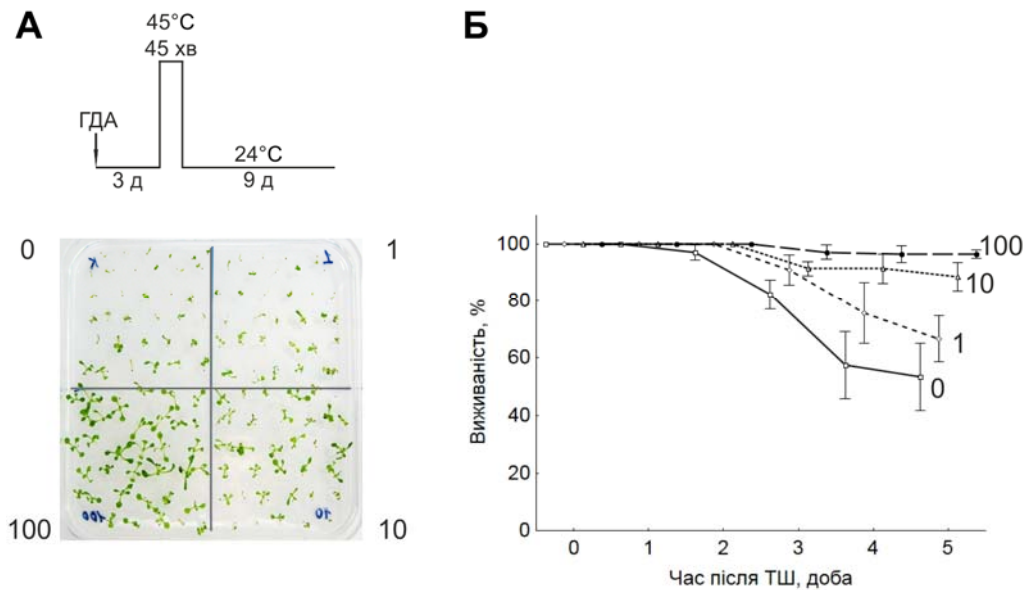


Рис. 5.5. Вплив обробки ГДА насіння на теплостійкість проростків *A. thaliana* (Col-0): (0) контроль, (1) 1 мкМ, (10) 10 мкМ, (100) 100 мкМ ГДА. (А) Проростки через 5 діб після експозиції; режим обробки представлено на схемі. (Б) Вживаність проростків; ефект ГДА в концентраціях 10 і 100 мкМ статистично значущий (One-way ANOVA, $p < 0,05$).

У наступному експерименті вивчали вплив обробки ГДА насіння на здатність клітин проростків до набуття індукованої теплостійкості. Для цього після попередньої обробки сублетальною температурою 37°C і реадaptaції 3-добові проростки піддавали дії 45°C протягом різних термінів (див. схеми, рис. 5.6). Через 9 діб після теплової експозиції в усіх варіантах спостерігалось пригнічення росту. Втім, різниця за ростовою активністю між варіантами ставала помітною пізніше (рис. 5.6, А). Визначення маси проростків через 15 діб після експозиції показало позитивний ефект ГДА, який ставав більш вираженим при збільшенні тривалості експозиції при 45°C з 1,5 до 2,5 год (рис. 5.6, Б). Більш тривала експозиція викликала загибель проростків в усіх варіантах.

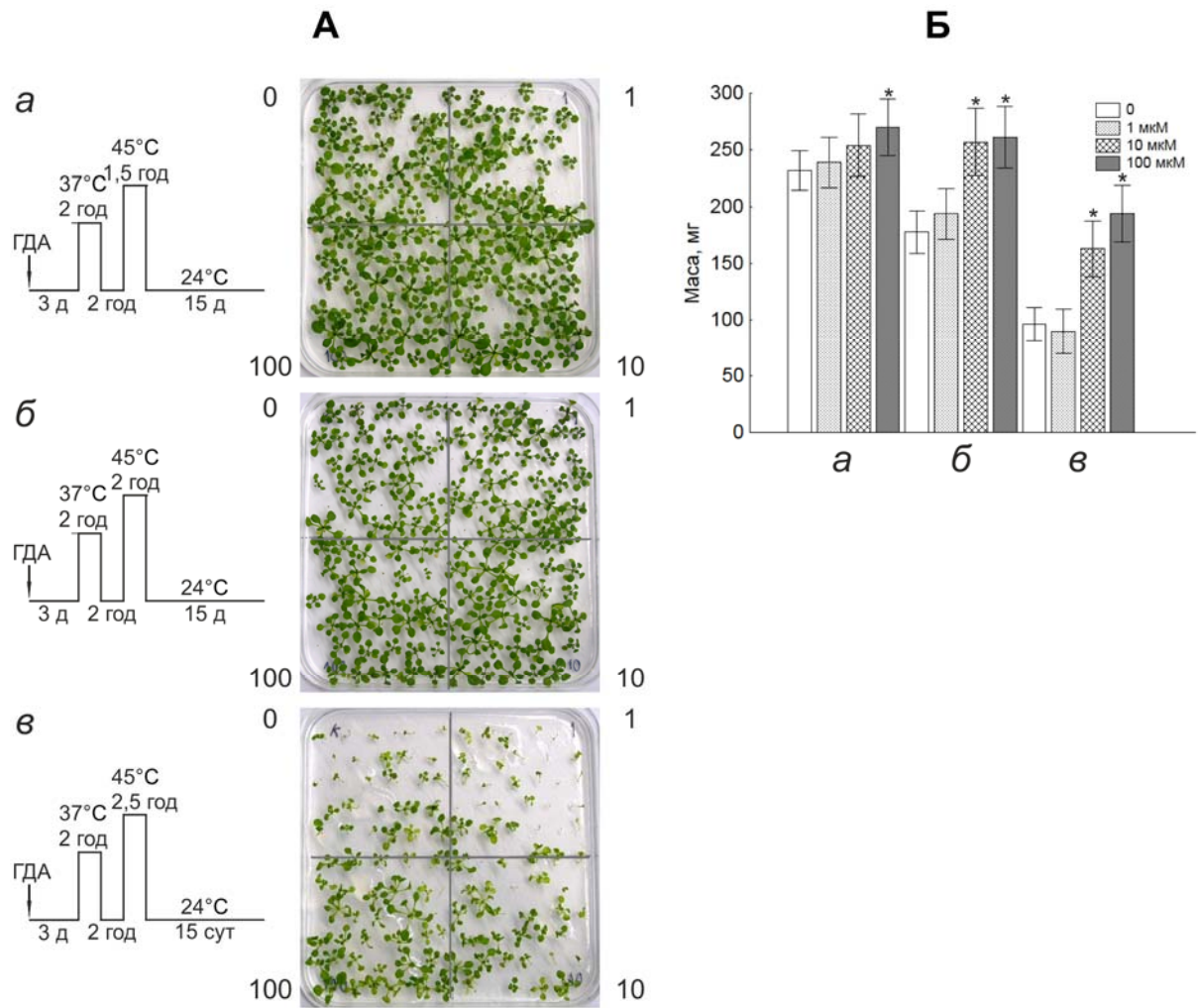


Рис. 5.6. Сумісний вплив обробки ГДА насіння і передобробки сублетальною температурою проростків *A. thaliana* (Col-0) на їх теплостійкість: (0) контроль, (1) 1 мкМ, (10) 10 мкМ, (100) 100 мкМ ГДА. (А) Проростки після теплової експозиції; режим обробок представлено на схемах (а, б, в). (Б) Маса 25 проростків ($M \pm SD$); (*) статистично значуща різниця відносно варіанту без обробки ГДА (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

5.3. Вплив інгібування HSP90 на синтез HSP70 після γ -опромінення

В розділі 6 (п. 6.1.2.3) описано, що обробка насіння *A. thaliana* інгібіторами HSP90 після γ -опромінення призводила до стимуляції росту та розвитку (див. рис. 6.10; табл. 6.7). Оскільки γ -радіація викликає гено- і протеотоксичні ефекти, ми припустили, що стимуляція росту опромінених

клітин після обробки ГДА пов'язана з посиленням активності клітинного пулу шаперонів через регуляцію експресії генів *HSP*. Для з'ясування цього ми використовували варіанти без опромінення і з опроміненням в дозі 1 кГр, які характеризувалися відповідно мінімальним і максимальним ростовим ефектом антибіотика. Вестерн-блот-аналіз білка HSP70, участь якого описана в реакції на іонізуючу радіацію (Park et al., 2000), виявив слабе збільшення вмісту цього білка в проростках, вирощених з опроміненого насіння, порівняно з контрольними (рис. 5.7).

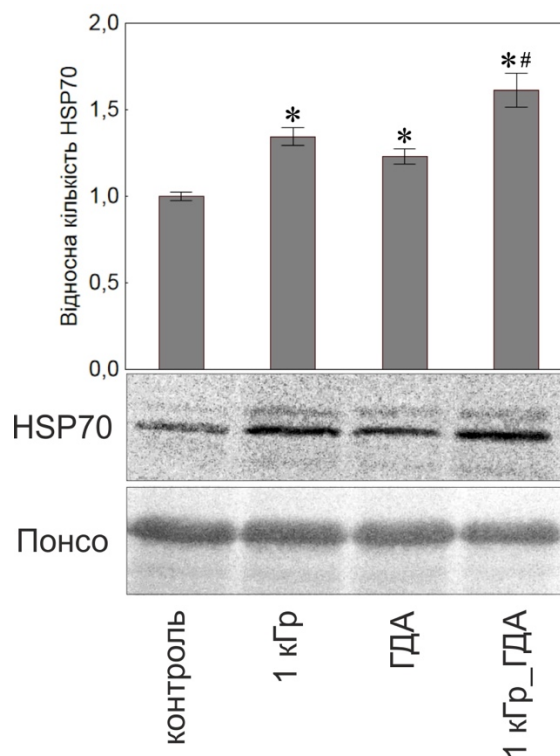


Рис. 5.7. Вестерн-блот аналіз HSP70 у 14-добових проростках *A. thaliana* (*Ler*) після γ -опромінення сухого насіння в дозі 1 кГр і обробки 5 мкМ ГДА. Типовий вестерн-блот представлено під результатами денситометричного аналізу; на графіку – рівень білка у відсотках до контролю ($M \pm SD$). (*, #) Статистично достовірна різниця по відношенню до проростків у контролі та проростків, вирощених з неопроміненого насіння з обробкою ГДА, відповідно (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Обробка ГДА викликала підвищення рівня HSP70 в обох випадках, але після дії радіації ефект антибіотика був більшим. Підвищення вмісту HSP70 під впливом ГДА могло сприяти відновленню білкового гомеостазу клітин після опромінення та посиленню ростової активності. Крім того, за даними літератури, HSP беруть участь у репарації ДНК (Park et al., 2000; Calini et al., 2003).

Такі результати свідчать про те, що обробка насіння інгібітором HSP90 має віддалені у часі ефекти – посилення синтезу HSP70 і HSP90 в проростках як за нормальних умов, так і за дії високої температури та γ -радіації. Крім того, про це свідчить підвищення в результаті обробки рівня теплостійкості клітин та стимуляція ростової активності після опромінення. Оскільки механізм ініціації генної експресії шляхом зв'язування HSF з HSE в промоторах генів всіх родин HSP є консервативним, подібний ефект ГДА можна очікувати також для інших родин HSP. Такий прогноз узгоджується з даними інших дослідників. Так, Yamada et al. (2007) показали індукцію *HSP70*, *HSP90* і *HSP101* та ряду інших залежних від HSF генів у результаті обробки інгібіторами HSP90 ГДА і РАД проростків *A. thaliana*. Інший інгібітор HSP90 моноцілін I (monocillin I) індукував експресію *HSP70* і *HSP101* і посилював виживаність проростків *A. thaliana* за дії високої температури (McLellan et al., 2007). Можна також очікувати посилення стійкості клітин до інших шкідливих чинників.

Разом з тим, при обговоренні ефектів обробки антибіотиком насіння треба враховувати, що регуляція ним експресії *HSP* під час проростання насіння, очевидно, повинна накладатися на онтогенетичну регуляцію цих генів. Відомо, що преформовані HSP та їх мРНК знаходяться у великих кількостях у сухому зрілому насінні та швидко зникають після початку регідратації, що супроводжується різким зниженням стійкості клітин, зокрема до високої температури (Queitsch et al., 2000; Sung et al., 2001). Одночасно відбувається реактивація генної експресії конститутивних HSP (Sung et al., 2001). Проте шляхи можливої взаємодії онтогенетичної і

фармакологічної регуляції цих процесів залишаються нез'ясованими. Можна припустити, що антибіотик посилює експресію HSP протягом раннього періоду росту, що може впливати на стійкість клітин в подальшому. Не можна також виключати можливості того, що довготерміновий ефект ГДА може бути результатом більшої захищеності цього світлочутливого антибіотика від світла при обробці ним насіння. Тому клітинні механізми пролонгованих ефектів обробки інгібіторами HSP90 насіння потребують подальшого детального вивчення.

Отже, наведені в розділі результати принципово підтверджують гіпотезу авторегуляції синтезу HSP за принципом зворотного зв'язку і регуляції стійкості рослинних клітин білками HSP90.

Висновки до розділу 5

Викладені у розділі результати досліджень:

- Дають підставу розглядати *авторегуляцію синтезу HSP* шаперонами HSP90 як важливий молекулярний механізм регуляції чисельності клітинного пулу шаперонів, який забезпечує стійкість рослинних клітин і організму до змін факторів середовища.
- Показують *відносну нестабільність меж діапазону стійкості*, які частково визначаються вмістом HSP в клітинах (зокрема, HSP70 і HSP90) і контролюються шаперонами HSP90.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Kozeko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds. *Life Sci. Space Res.*, 2015, 6: 51-58.
2. Козеко Л.Є. Изменения в синтезе белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином. *Цитология*, 2014, 56(6): 419-426. (Kozeko L.Ye.

Changes in heat-shock protein synthesis and thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings resulting from Hsp90 inhibition by geldanamycin. *Cell Tissue Biology*, 2014, 8(5): 416-422.

3. Козеко Л.Е. Синтез Hsp70 при ингибировании Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana* (доказательство авторегуляции синтеза белков теплового шока). Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», 10-13 июня 2013, Иркутск, Россия. - Иркутск, 2013, С. 119-121.

РОЗДІЛ 6

РОЛЬ HSP90 І HSP70 У ФЕНОТИПІЧНІЙ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ РОСЛИН

Різноманітність фенотипів популяції, як зазначалось у розділі 1, є сумарним результатом генетичного поліморфізму особин, фенотипічної пластичності кожного генотипу та внутрішньої нестабільності розвитку. Здатність шаперонів HSP90 стабілізувати і контролювати активність низки метастабільних регуляторних білків дозволила розглядати їх участь у всіх цих процесах (Sangster et al., 2004; Rutherford et al., 2007; Samakovli et al., 2007; Taipale et al., 2010; Mason et al., 2018; Zabinsky et al., 2018, 2019). Можливість функціонування таких молекулярних механізмів у межах єдиного HSP90-залежного механізму активно дискутується (Meiklejohn, Hartl, 2002; Sangster et al., 2004) і потребує подальшого всебічного аналізу. Враховуючи різноманіття білків-клієнтів шаперона у рослин (див. Додаток А), ми прогнозували, що зниження активності клітинного пулу HSP90 будь-яким способом може спричиняти послаблення різних сигнальних і регуляторних шляхів і, в результаті, дестабілізацію росту і розвитку, виникнення широкого спектру морфологічних порушень, та зміну чутливості до зовнішніх впливів. У даному розділі представлено результати комплексного дослідження функціонування шаперонів HSP90 у трьох механізмах каналізування росту і формотворення рослин:

1) Виходячи із здатності HSP90 стабілізувати структуру регуляторних білків, вивчали їх функціонування як буферної системи стохастичних процесів, яка обмежує вплив варіацій внутрішнього і зовнішнього середовища «шумового» характеру і таким чином стабілізує процеси росту і розвитку за обраною траєкторією. Аналіз проводили на ізогенних лініях за оптимальних умов середовища.

2) Згідно з гіпотезою Rutherford і Lindquist (1998), за умов генетичної мінливості існує можливість того, що шаперон HSP90, взаємодіючи з білком-

клієнтом з частково зміненою амінокислотною послідовністю, буде підтримувати його у нормальній функціональній конформації і через те сприяти приховуванню генетичних змін та формуванню нормального фенотипу. Здатність HSP90 протидіяти проявленню генетичного поліморфізму вивчали з використанням поліморфного матеріалу за оптимальних умов середовища.

3) Уявлення про те, що шаперони HSP90 асистують низці білків – компонентів різних сигнальних шляхів і можуть визначати компетентність останніх до сприйняття та передачі сигналу, призвело до припущення, що ця родина може опосередковувати вплив середовища на ріст і розвиток рослинного організму. Виходячи з цього, модулювання активності HSP90 повинно призводити до системних змін залежних від них шляхів трансдукції сигналів та експресії відповідних генетичних програм, впливаючи тим самим на фізіологічні та морфогенетичні реакції. Вивчення цього питання проводили на ізогенних лініях за впливу зовнішніх чинників, що викликають у рослин пластичні реакції.

Крім того, враховуючи коеволюцію шаперонів HSP90 і HSP70 (Travers, Fares, 2007) та їх функціонування у тісній кооперації (Dittmar et al., 1997; Nollen, Morimoto, 2002; Grad, Picard, 2007; Noël et al., 2007; Козеко, 2010; Clément et al., 2011; Karagöz, Rüdiger, 2015), а також виявлення множинних дефектів розвитку при експресії домінантної негативної форми HSP70 у *Drosophila* (Elefant, Palter, 1999), дисертантом висловлюється гіпотеза щодо участі HSP70 у підтримці стабільності процесів росту, розвитку і формотворення рослин за нормальних умов, та їх пластичних реакцій на зовнішні стимули.

Для зниження кількості / активності HSP нами використано два підходи:

- Інгібіторний аналіз з використанням специфічних інгібіторів HSP90, які дозволяють знизити загальний рівень активності клітинного пулу цих шаперонів (Rutherford, Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002).

- Інсерційні нокаут-мутанти з порушенням експресії окремих HSP90 і HSP70.

Для феномного аналізу застосовували статистичну оцінку середньої тенденції та розсіяння значень кількісних ознак в комплексі з визначенням індивідуальних особливостей фенотипів. Для пояснення використання такого підходу слід відмітити наступне. Засобами статистичного аналізу визначається основна тенденція (середнє, медіана) та ступінь варіабельності ознаки. При цьому сумарна оцінка фізіологічного процесу через центральну тенденцію відноситься до відповідної популяції особин. Поведінка середньостатистичного індивідууму вважається такою, що відображає загальну поведінку особин популяції. Втім, за такого підходу індивідуальні особливості спрощуються або втрачаються. Статистичне усереднення може також призводити до неправильної оцінки дійсних механізмів в окремому організмі (Trewavas et al., 2003). Враховуючи це, особлива увага нами приділялась аналізу нестандартних фенотипів. При цьому ми визначали кількість, розміри, темпи утворення, просторове розташування і морфологічні особливості окремих органів та особливості фенотипу в цілому. *Критеріями нестабільності* служили посилення варіабельності ознак, кількість морфозів, десинхронізація росту і розвитку особин, зниження точності формування (асиметрія) парних органів і білатеральних ознак, збільшення коефіцієнту варіації кількісних морфологічних ознак і фізіологічних відповідей.

Дослідження, представлені в цьому розділі, проводились на модельному виді *A. thaliana* з використанням його екотипів і мутантів *hsp*. Гетерозиготність особин цього самозапильного виду надзвичайно мала (Abbott, Gomes, 1989), ізольовані лінії генетично високомономорфні та характеризуються доволі високою синхронністю темпів росту і формотворення, габітус є зручним для феномного аналізу як на ранніх, так і на пізніх стадіях онтогенезу (Boyes et al., 2001; Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2007). Секвенований геном, наявність екотипів і

мутантів створює широкі можливості для функціонально-генетичних досліджень.

6.1. Значення загальної функціональної активності клітинного пулу HSP90 для стабілізації росту і морфогенезу рослин

Для інгібування HSP90 використовували антибіотики гелданаміцин (ГДА, geldanamycin) і радицикол (РАД, radicicol), які специфічно блокують його N-термінальний сайт зв'язування АТФ (Prodromou et al., 1997). Ці антибіотики мають різну хімічну природу: ГДА відноситься до бензохінонових ансаміцинів, тоді як РАД є природним макроциклічним антибіотиком (Roe et al., 1999).

У відомих нам попередніх роботах інших дослідників ці інгібітори вносились в агаризоване середовище для вирощування. Однак повідомляється, що на світлі вони швидко (у перші дві доби) втрачають активність (Queitsch et al., 2002). Враховуючи це, ми обробляли інгібітором насіння перед висаджуванням на середовище.

6.1.1. Вплив інгібування HSP90 на ріст і морфогенез ізогенної лінії *A. thaliana* за нормальних умов середовища

6.1.1.1. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків

Для перевірки спроможності HSP90 стабілізувати ріст і формотворення проростків за впливу стохастичних процесів проведено серію експериментів з вивчення фенотипічних ефектів інгібування активності шаперона з використанням лабораторної лінії *A. thaliana* екотипу Col-0 як ізогенної лінії (Queitsch et al., 2002).

Стерилізоване насіння після холодової стратифікації інкубували з 0,5 мл розчину антибіотика в мікропробірках у темряві протягом 24 год. Для визначення ефективних концентрацій за таких умов аналізували вплив

антибіотиків в широкому діапазоні концентрацій: ГДА застосовували в діапазоні концентрацій 10^{-7} - 5×10^{-5} М, РАД – в діапазоні 10^{-9} - 10^{-5} М. Ефективність дії інгібіторів оцінювали за наступними критеріями: 1) відсутність гальмівного ефекту на ріст проростків; і 2) максимальний прояв фенотипічної варіабельності проростків (просторового розташування, форми і розмірів органів) без суттєвих аномалій у розвитку. Показано, що у всіх проаналізованих концентраціях антибіотики не впливали на життєздатність насіння (табл. 6.1, 6.2). Темпи росту проростків визначали на 11-12-ту добу від початку проростання за методикою, що розроблена для *A. thaliana* (Boyes et al., 2001).

Таблиця 6.1

Вплив ГДА на проростання насіння і фенотипічну варіабельність проростків *A. thaliana* (Col-0)

Показники	Концентрація ГДА, М						
	0	10^{-7}	5×10^{-7}	10^{-6}	5×10^{-6}	10^{-5}	5×10^{-5}
Схожість насіння	97,4%	97,4%	96,6%	99,1%	98,2%	98,3%	99,1%
Частка проростків з відхиленнями	6,1% (7/114)	10,3%* (12/116)	17,4%* (20/115)	19,8%* (23/116)	23,2%* (26/112)	40,8%* (47/118)	39,3%* (44/112)

Примітка. Показники в табл. 6.1 і 6.2 представлено у процентах і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості насіння або проростків (у дужках). Опис морфологічних відхилень представлено в Додатку Б. (*) Достовірна різниця порівняно з контролем.

Таблиця 6.2

Вплив РАД на проростання насіння і фенотипічну варіабельність проростків *A. thaliana* (Col-0)

Показники	Концентрація РАД, М					
	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Схожість насіння	92,1%	90,4%	95,6%	95,6%	95,7%	97,4%
Частка проростків з морфологічними відхиленнями	4,8% (5/105)	7,8% (8/103)	13,8%* (15/109)	16,5%* (18/109)	19,1%* (21/110)	20,7%* (23/111)

Примітка. Дивись табл. 6.1.

Відмічено, що в контрольному варіанті ріст відбувався досить синхронно: більшість проростків перебувало на стадіях росту 1.03-1.05 (рис. 6.1), найбільша частина – на стадії 1.04 (тобто проростки мали чотири листка розетки більше 1 мм). Після обробки антибіотиком у частини проростків спостерігали затримку росту (стадії 0.5-1.02), у інших – навпаки, прискорення росту (стадія 1.06). При цьому варіабельність темпів росту посилювалася зі збільшенням концентрації антибіотиків, про що свідчить збільшення розкиду даних. При застосуванні ГДА максимальний розкид стадій росту спостерігався при концентраціях 1 і 5 мкМ, тоді як концентрації 10 і 50 мкМ викликали певне гальмування ростової активності (рис. 6.1, А). Обробка РАД в концентраціях до 0,1 мкМ призводила до прискорення росту більшої частини проростків. За більш високих концентрацій РАД у частини проростків відмічалось сповільнення росту. Максимальний розкид темпів росту спостерігався при концентрації 10 мкМ РАД (рис. 6.1, Б).

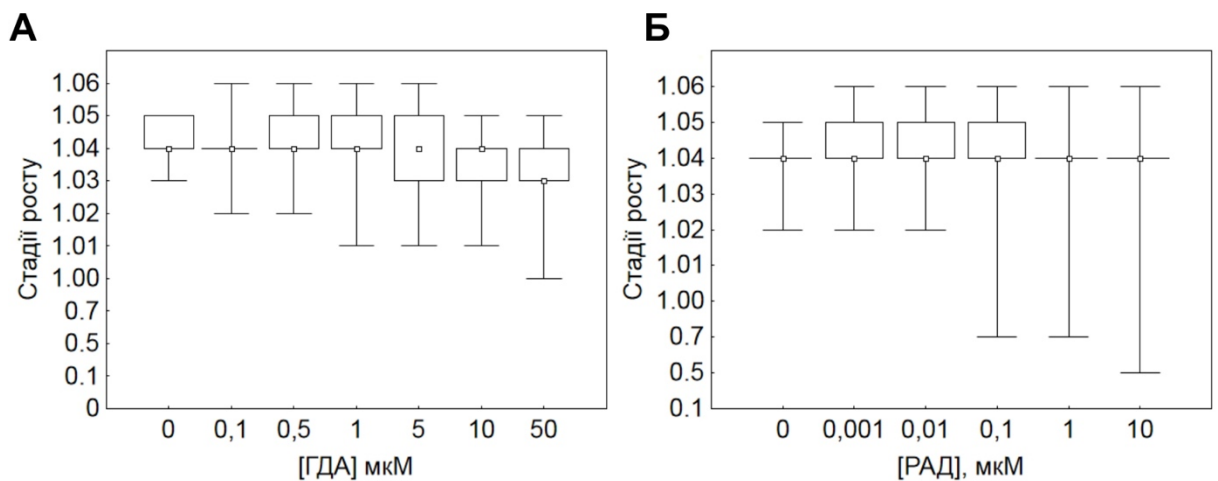


Рис. 6.1. Діаграма стадій росту проростків *A. thaliana* (Col-0) після обробки насіння ГДА (А) і РАД (Б) у різних концентраціях (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). Для аналізу використано 12-добові проростки після обробки ГДА та 11-добові проростки після обробки РАД.

Для характеристики фенотипів використовували особливості морфології стеблової частини проростків, які на 11-12-ту добу в нормі мають сформовані сім'ядолі та першу пару справжніх листків. В контрольному варіанті проростки характеризувалися відсутністю значних порушень розвитку та слабкою фенотипічною варіабельністю в межах нормального фенотипу виду (рис. 6.2, А). Разом з тим, поодинокі проростки мали відхилення в розмірах, формі або просторовому розташуванні органів: наприклад, S-подібні сім'ядолі, сім'ядолі з вертикально розташованими пластинками, сім'ядолі різні за розміром або з черешками різної довжини (рис. 6.2, Б, В, Е).

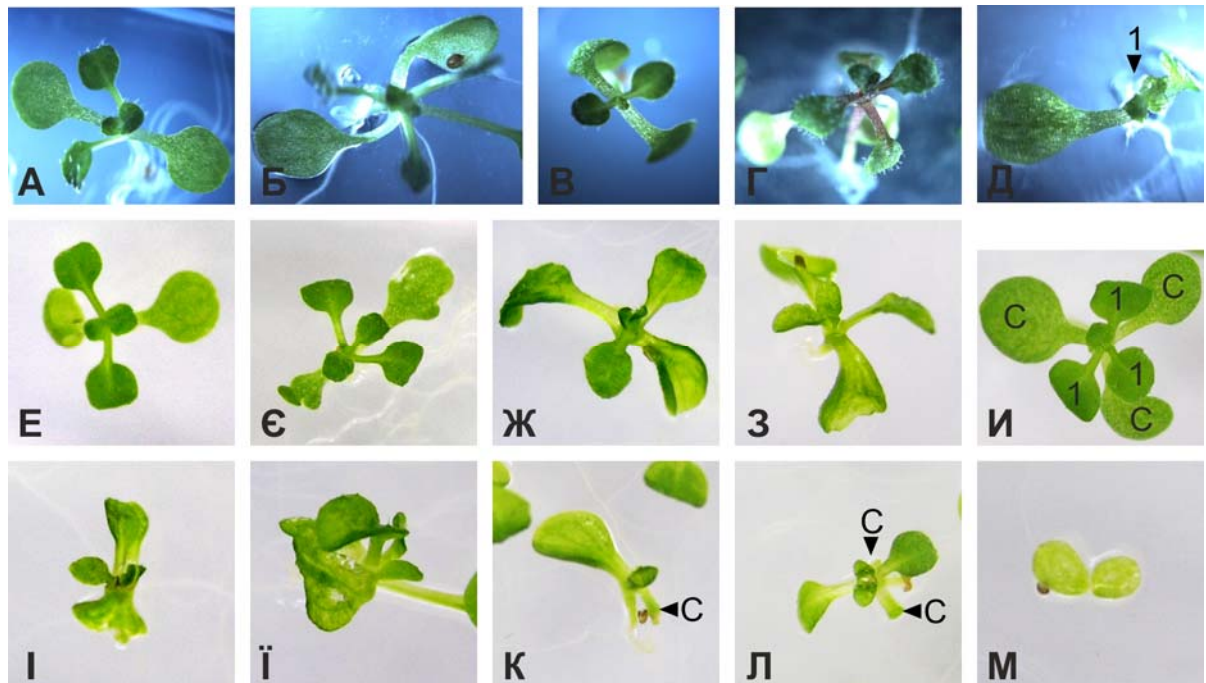


Рис. 6.2. Фенотипи проростків *A. thaliana* (Col-0), які з'являються після обробки насіння антибіотиками ГДА і РАД: (А) нормальний фенотип; (Б-М) фенотипи з морфологічними змінами: (Б) S-подібні сім'ядолі; (В, Е) дві або одна епінастичні сім'ядолі; (Г) гіпокотиль і черешки листків антоціанового кольору; (Д) нерозвинені листки; (Є) сім'ядольні пластинки з дефектами краю; (Ж) черешок сім'ядолі короткий, сім'ядоля увігнута; (З) деформовані сім'ядолі; (И) 3 сім'ядолі та 3 листки першого порядку; (І, Ї) деформовані проростки; (К, Л) 1 або 2 нерозвинені сім'ядолі; (М) проросток складається з двох сім'ядоль. Позначення: (с) сім'ядоля, (1) листок першого порядку.

В результаті обробки насіння антибіотиками частка фенотипів зі змінами та ступінь цих змін зростала з ростом концентрації (табл. 6.1 і 6.2; Додаток Б). ГДА і РАД викликали схожий спектр фенотипічних змін, які стосувалися форми, розмірів, взаємного розташування, кольору та числа сім'ядоль і листків розетки; довжини, орієнтації та кольору гіпокотилія; форми, розмірів і кольору всього проростку (рис. 6.2, Б-М; Додаток Б).

Зокрема, з'являлись проростки з такими порушеннями, як зведені сім'ядолі (кут між черешками менше 120°); листкова пластинка, розташована абаксіальною поверхнею догори; локальні порушення маргінального росту сім'ядолі або справжнього листка; ненормальна кількість листків (три сім'ядолі та три листки одного міжвузля, або відсутність листків); деформовані, ненормальних розмірів, антоціанового кольору органи або весь проросток. За результатами аналізу найбільш ефективними для інгібування HSP90 концентраціями ГДА при обробці насіння *A. thaliana* виявились концентрації 1-5 мкМ, які призводили до максимального різноманіття фенотипів і разом з тим не викликали суттєвого гальмування росту та значних порушень морфогенезу. Для РАД максимальну кількість проростків з морфологічними змінами спостерігали при концентрації 10 мкМ.

Слід також відмітити, що в нашій роботі антибіотиками оброблялось насіння перед висаджуванням на середовище, для чого використовувався малий об'єм розчину. Вплив на фенотипічну варіабельність проростків при такому способі обробки виявився близьким до результатів Queitsch et al. (2002), які вносили антибіотик в середовище для вирощування. Дослідниками відмічалось, що подальше збільшення концентрації призводило до зниження життєздатності проростків та значних порушень розвитку, що також узгоджується з нашими даними. На підставі цього зроблено висновок, що обробка насіння є ефективною і дозволяє суттєво зменшити витрати коштовних антибіотиків.

Таким чином, структурно незалежні інгібітори HSP90 викликали посилення варіабельності проростків за темпами росту і появу різноманітних

морфологічних відхилень, причому такі зміни посилювались з ростом концентрації антибіотиків. Оскільки дослідження проводилось з використанням ізогенної лінії, особини якої вирощувались за однакових зовнішніх умов, то фенотипічну варіабельність за таких умов можна вважати проявом впливу мікрофлуктуацій внутрішнього і зовнішнього середовища. Враховуючи участь субстратів HSP90 у різноманітних регуляторних клітинних процесах (Додаток Б), посилення фенотипічної варіабельності при інгібуванні HSP90 підтверджує гіпотезу про участь цих шаперонів у підтриманні стабільності росту і формотворення за дії стохастичних процесів (Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007).

Разом з тим, слід відмітити, що частка змінених фенотипів у результаті обробки інгібіторами складала меншу частину проростків. На нашу думку, це можна пояснити наступним чином. Відомо, що вміст HSP90 у клітині за нормальних умов високий (~1% від всього цитозольного білка; Lai et al., 1984). Число його потенційних білків-клієнтів за оцінками може досягати 20% протеому (Zhao et al., 2005; Jarosz, Lindquist, 2010; Taipale et al., 2010). З іншого боку, використання інгібіторів дає можливість лише знизити сумарну активність цих шаперонів у клітині (Queitsch et al., 2002). Крім того, ці антибіотики втрачають активність під впливом світла протягом кількох діб інкубації (Queitsch et al., 2002). За таких умов визначення, які саме білки-клієнти та залежні від них процеси при цьому стануть мішенню, носить імовірнісний характер. Можна припустити, що посилення фенотипічної варіабельності може бути наслідком зниження активності шаперонів протягом проростання насіння і перших діб росту проростків.

6.1.1.2 Вплив інгібування HSP90 на ріст рослин

Для вивчення довготривалих ефектів інгібування HSP90 на ріст і розвиток аналізували рослини *A. thaliana* (Col-0) після обробки насіння 50 мкМ ГДА. Проведено 4 незалежних експерименти, у кожному варіанті яких аналізували по 14 рослин (рис. 6.3). Під час переходу до генеративної

фази розвитку, яку визначали за появою першого квітконосу висотою 1 см, реєстрували вік рослин, кількість листків та діаметр розетки (табл. 6.3).



Рис. 6.3. Рослини *A. thaliana* (Col-0) у контролі (зліва, без маркування) та після обробки насіння 50 мкМ ГДА (справа, червоне маркування).

Таблиця 6.3

Вплив обробки насіння 50 мкМ ГДА на ріст і розвиток рослин *A. thaliana* (Col-0) за результатами чотирьох експериментів (M ± SD)

Характеристики під час переходу рослин до цвітіння	Контроль	ГДА	Порівняння середніх, t-тест ($p < 0,05$)
Кількість рослин, використаних для аналізу	56	56	
Вік рослин, доба	30,9 ± 1,4	31,7 ± 1,5	p = 0,010
Кількість листків розетки	14,3 ± 1,2	14,2 ± 1,2	p = 0,750
Коефіцієнт кореляції Пірсона між віком рослин і кількістю листків розетки	r = 0,688	r = 0,354	p = 0,007
Діаметр розетки, мм	78,8 ± 14,5	78,7 ± 12,8	p = 0,951

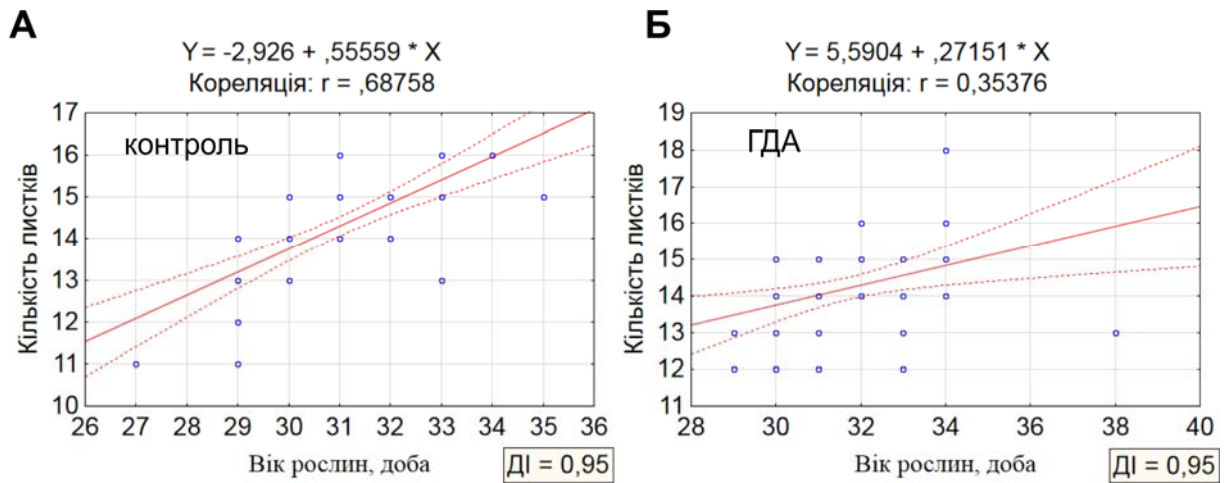


Рис. 6.4. Графіки розсіювання при аналізі кореляційного зв'язку між віком рослин під час переходу до цвітіння та кількістю листків розетки в контролі (А) та після обробки насіння 50 мкМ ГДА (Б).

Результати аналізу показали, що після обробки насіння ГДА рослини не відрізнялися від контрольних за діаметром розетки та кількістю листків розетки. Проте антибіотик призводив до невеликої, але статистично достовірної затримки переходу до цвітіння, якщо він визначався за віком рослин (рис. 6.3, табл. 6.3). Раніше збільшення тривалості вегетативного періоду було показано у ліній HSP90-RNAi *A. thaliana* з генетично редукованим рівнем конститутивних цитозольних HSP90 (Sangster et al., 2007).

Відомо, що вік рослин *A. thaliana* на початку цвітіння чітко корелює з кількістю листків розетки. Ця ознака підтримується на певному рівні відповідно до умов середовища, тобто є каналізованою (Hall et al., 2007; Sangster et al., 2007). Для аналізу залежності між віком рослин під час переходу до цвітіння та кількістю листків розетки ми використали параметричний кореляційний метод Пірсона (Реброва, 2002). Визначення коефіцієнту кореляції показало, що обробка насіння ГДА призводила до зниження кореляційного зв'язку між кількістю листків розетки і часом переходу до генеративного розвитку, порівняно з контролем (табл. 6.3, рис. 6.4). Порівняння коефіцієнтів кореляції між варіантами показало

статистичну значущість різниці. Це вказує на послаблення взаємозв'язку між показниками, очевидно, через зниження стабільності темпів формування листків після обробки ГДА.

6.1.2. Вплив інгібування HSP90 на ріст і морфогенез проростків *A. thaliana* з поліморфного насінневого матеріалу

Здатність HSP90 стабілізувати нормальне формотворення за наявності генетичних змін вивчали на проростках *A. thaliana* з використанням поліморфного насінневого матеріалу різного походження.

В серії експериментів використовували насіння, зібране з рослин природних популяцій, яке є гетерогенним за якістю внаслідок варіабельних умов середовища під час його формування і дозрівання, а також низького рівня гетерозиготності й ауткросингу (Abbott, Gomes, 1989; Kuittinen et al., 1997; Mitchell-Olds, Schmitt, 2006). Крім того, враховуючи, що насіння збирали на міських і приміських територіях, можна прогнозувати підвищений рівень генетичного поліморфізму під впливом антропогенних факторів середовища.

У наступній серії експериментів поліморфізм було індуковано в насінні екотипів штучно – шляхом опромінення УФ-В і гамма-радіації. Як відомо, радіація індукує меристемогенні та мутагенні морфологічні аномалії, які можуть мати як морфозний, так і спадковий характер. Найбільш чутливими мішенями іонізуючої радіації є ДНК і білки, що призводить до генетичної нестабільності, виникнення мутацій та порушення білкової структури (Koornneef et al., 1982; Гродзинский, 1989; Гродзинський та ін., 2007; De Micco et al., 2011). Показано, що радіація може викликати зміни динаміки конформаційних переходів у мультидоменних білків (Горобченко и др., 2006), до яких належать субстрати HSP90. Дози опромінення обирали на основі напівлетальних доз для насіння, при цьому очікувалося, що більшість насіння залишиться життєздатним (Гродзинский, 1989; Гродзинський та ін., 2007). Використовуючи такий підхід, ми прогнозували дозо-залежне

збільшення генетичних і структурних змін в екотипах *A. thaliana*, і зокрема, в білках-клієнтах шаперона.

6.1.2.1. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків з насіння природних популяцій

Для аналізу використовували насіння *A. thaliana*, зібране з природних популяцій міських і приміських територій Києва. Це насіння виявилось значною мірою різноякісним: від 10% до 40% не проростало (табл. 6.4), решта давала проростки досить варіабельні за темпами росту і фенотипами. Їх розподіл по стадіях росту показав наявність певної частки особин з затримкою росту порівняно з екотипом Col-0, який служив контролем (рис. 6.5). Аналіз фенотипів показав, що в поліморфному матеріалі частка проростків з морфологічними відхиленнями значно перевищувала таку в контролі (табл. 6.4). Крім того, було виявлено порушення, відсутні в екотипу: орієнтація сім'ядольних пластинок абаксіальною поверхнею догори, сім'ядолі та справжні листки з вираженими локальними порушеннями маргінального росту пластинки, нерозвинені сім'ядолі та листки, карликові та гігантські проростки тощо (Додаток В).

Залежність фенотипічної варіабельності від функціонування HSP90 в цьому експерименті визначали із застосуванням 2 мкМ ГДА. Обробка антибіотиком насіння призводила до збільшення частки непророслого насіння (табл. 6.4) та посилення варіабельності темпів росту проростків (рис. 6.5). Крім того, відсоток фенотипів з морфологічними змінами після обробки антибіотиком збільшувався в 2-3 рази, часто морфологічні відхилення ставали більш складними і множинними (табл. 6.4; Додаток В).

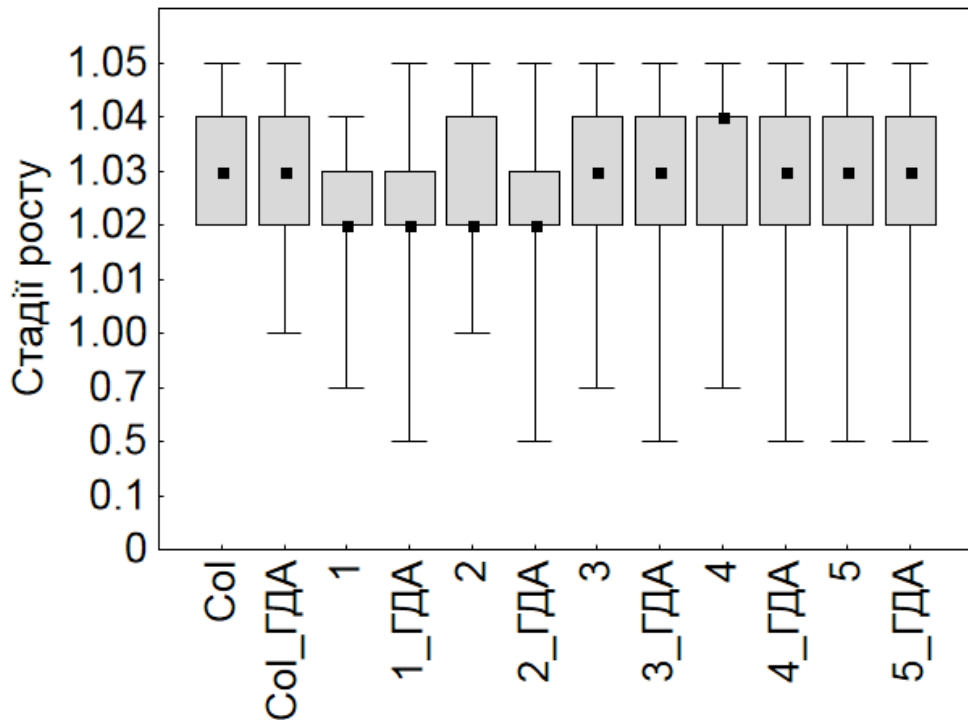


Рис. 6.5. Діаграма стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana*, вирощених з насіння природних популяцій п'яти місцезростань (позначено цифрами 1-5) без обробки та після обробки ГДА (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення; n = 120-150). Екотип Col-0 служив контролем.

Отже, більша варіабельність темпів росту проростків та їх фенотипів порівняно з контролем, ускладнений характер морфологічних відхилень, іноді значні порушення формотворення, наявність нежиттєздатного насіння – все це, очевидно, може бути як проявом генетичного поліморфізму, так і результатом впливу умов середовища в період формування та дозрівання насіння, в тому числі цито- і генотоксичних факторів (Kranner et al., 2010). Як вже згадувалось, рівень генетичного поліморфізму в природних популяціях *A. thaliana* за оцінками складає біля 0,3% (Abbott, Gomes, 1989). З іншого боку, доведено, що зростання рослин за несприятливих факторів докільля призводить до посиленої фенотипічної варіабельності потомства (наприклад, за помірного підвищення температури; Samakovli et al., 2007). Проте головним результатом даного експерименту є те, що обробка ГДА сприяла більш значному прояву вказаних тенденцій.

Таблиця 6.4

**Вплив 2 мкМ ГДА на проростання насіння *A. thaliana* природних популяцій і фенотипічну варіабельність
12-добових проростків**

Джерело насіння	Col-0		Популяція 1		Популяція 2		Популяція 3		Популяція 4		Популяція 5	
	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА
Обробка насіння 2 мкМ ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА
Схожість насіння (n=120-240)	99,2%	99,3%	82,8%	76,4%	61,1%	50,1%	89,9%	82,7%	63,7%	52,9%	72,0%	64,3%
Частка проростків з відхиленнями*	5,0% (6/120)	14,6%* (21/143)	6,7% (8/120)	19,7%* (29/147)	12,4% (14/113)	20,5%* (25/122)	7,7% (10/130)	18,0%* (24/133)	7,4% (9/121)	20,0%* (28/140)	7,9% (9/114)	20,6%* (29/141)

Примітка. Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями представлена у процентах і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (у дужках). Опис морфологічних відхилень представлено в Додатку В. (*) Достовірна різниця порівняно з варіантом без обробки ГДА.

6.1.2.2. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків після опромінення насіння УФ-В

В даному експерименті для отримання поліморфного матеріалу насіння *A. thaliana* (Col-0) після набрякання у воді при 4°C протягом 2 діб опромінювали УФ-В у дозах 0,017; 1,7; 4,1 кДж/м², після чого половину кожного зразка інкубували з 5 мкМ ГДА.

Згідно отриманих результатів, менші дози УФ-В на виживаність насіння не впливали, а найбільша доза спричиняла втрату життєздатності частини насіння. Цей ефект максимальної дози посилювався під впливом ГДА (табл. 6.5).

Крім того, опромінення генерувало значну гетерогенність насінневого матеріалу. По-перше, це виражалось у розширенні діапазону темпів росту проростків як у бік стимуляції, так і у бік пригнічення росту (рис. 6.6). З підвищенням дози опромінення гальмування росту посилювалось. Причинами посилення варіабельності проростків за ростовою активністю могли бути як відмінності в індивідуальній чутливості організмів, так і цито- та генотоксичні ефекти УФ-В (Гродзинський та ін., 2007; Данильченко, 2005;

Таблиця 6.5

Вплив ГДА на проростання насіння *A. thaliana* (Col-0) і фенотипічну варіабельність 12-добових проростків після опромінення насіння УФ-В

Доза УФ-В	Контроль		0,017 кДж/м ²		1,7 кДж/м ²		4,1 кДж/м ²	
	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА
Обробка насіння 5 мкМ ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА	-	ГДА
Схожість насіння (n=110-205)	97,4%	99,1%	98,9%	98,4%	98,1%	99,2%	93,2%	86,7%
Частка проростків з відхиленнями	4,4% 5/114	17,0%* 19/112	17,6% 33/186	40,0%* 76/190	16,3% 17/104	42,9%* 51/119	17,2% 33/192	30,3%* 57/188

Примітка. Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями представлена у процентах (над рискою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під рискою). Опис морфологічних відхилень представлено в Додатку Г. (*) Достовірна різниця за показником порівняно з варіантом без обробки ГДА.

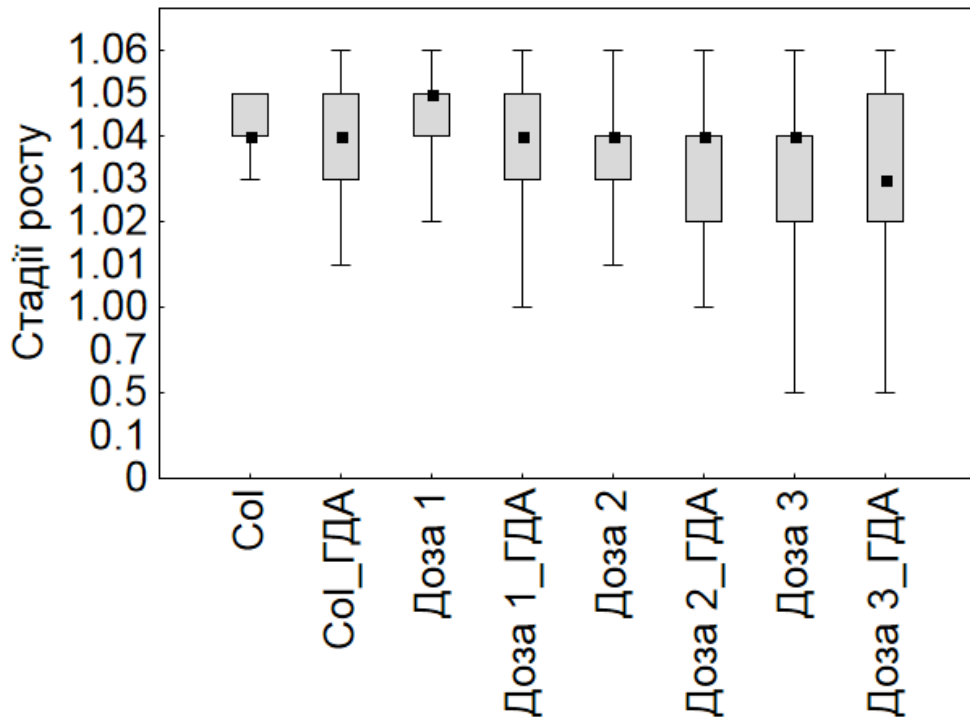


Рис. 6.6. Діаграма стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana* (Col-0) в контролі та після опромінення УФ-В у дозах 0,017 кДж/м² (доза 1); 1,7 кДж/м² (доза 2) і 4,1 кДж/м² (доза 3) і обробки ГДА (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення; n = 112-192).

Кравец, 2009). По-друге, аналіз морфологічних особливостей 12-добових проростків показав, що в результаті опромінення значна частина насіння набувала суттєвих морфологічних змін (табл. 6.5; Додаток Г). Серед найбільш частих слід відмітити зміну орієнтації сім'ядольних пластинок на 90°-180°, асиметрію парних органів, карликовість проростків. Крім того, з'являлись сім'ядольні та первинні листки з локальним порушенням маргінальної меристеми, що призводило до зміненої форми листкової пластинки. Зустрічалися особини з трьома сім'ядолями і трьома листками першого порядку. Максимальна доза опромінення викликала в частини проростків виникнення суттєвих пошкоджень, таких як некроз тканин, значну деформацію проростка, відсутність окремих органів.

Обробка опроміненого насіння ГДА призводила до посилення гетерогенності проростків за темпами росту, а також зміщення центральної

тенденції та розкиду даних у бік затримки росту порівняно з контролем (рис. 6.6). Частка проростків з морфологічними відхиленнями під впливом антибіотика збільшувалась у 2 і більше рази (табл. 6.5; Додаток Г). З'являлися проростки з ненормальною просторовою орієнтацією, гігантськими листками, антоціановим кольором тощо. Слід відмітити, що у варіанті з максимальною дозою УФ-В і обробкою інгібітором процент проростків з морфологічними відхиленнями був нижчим порівняно з меншими дозами опромінення, зникали проростки з тотальними порушеннями, несумісними з подальшим розвитком (сильна деформація проростка; некроз тканин; проростки, що склалися лише з сім'ядоль), і водночас збільшувалася частка непророслого насіння (табл. 6.5).

Можна припускати, що поява проростків з трьома сім'ядолями і трьома листками одного порядку після опромінення пов'язана з розщепленням зачатку сім'ядолі або з індукцією морфогенезу через активацію клітин апексу з боку експозиції. Не можна виключати й того, що утворення додаткових органів може бути проявом генетичних змін, індукованих УФ-В. Такий ефект в *A. thaliana* визначали інші дослідники в результаті хімічного мутагенезу (Mason et al., 2018). Проте виникнення таких проростків в нашому експерименті траплялося рідко, що не дало можливості оцінити його залежність від функціонування HSP90.

6.1.2.3. Вплив інгібування HSP90 на ріст проростків після опромінення насіння γ -радіацією

Для отримання поліморфного матеріалу з використанням γ -радіації проведено два експерименти, в яких опромінювали сухе насіння *A. thaliana*. В першому експерименті насіння екотипу *Ler* опромінювали у дозах 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 і 1 кГр, для інгібування HSP90 використовували 5 мкМ ГДА. Другий експеримент проводили з екотипом *Col-0*, радіацію застосовували в дозах 0,1; 0,5 і 1 кГр, для інгібування використовували 10 мкМ РАД.

Оскільки ступінь генетичного поліморфізму, індукованого іонізуючою радіацією, прямо залежить від ступеню пошкодження ДНК (Koornneef et al., 1982; Гродзинский, 1989), в першому експерименті нами проведено оцінку цілісності ДНК за допомогою кометного аналізу. Цей метод є ефективним для визначення генотоксичних ефектів у невеликих зразках сухого насіння (Khan et al., 2002): 100-150 мг виявилось достатнім для виділення ядер для аналізу. В ході кометного електрофорезу деградована ДНК мігрує від ядра в напрямку аноду, утворюючи хвіст специфічної форми і розмірів. Ядра з неопроміненого насіння утворювали короткі хвости ДНК (рис. 6.7, А). В результаті опромінення розмір хвостів збільшувався з дозою радіації. Для оцінки ступеню фрагментації ДНК визначали довжину міграції та відсоток ДНК у хвості. Збільшення довжини хвоста виявилось статистично достовірним за всіх застосованих доз радіації. Збільшення частки ДНК у хвості було достовірним при дозах 0,5-1 кГр (рис. 6.8). При максимальній дозі відсоток ДНК у хвості досягав 78%.

Пророщування насіння показало, що його виживаність при всіх застосованих дозах радіації залишалась близькою до 100% ($n = 2 \times 115$ насінин) (рис. 6.7; табл. 6.6). Такі результати узгоджуються з даними щодо високої стійкості до іонізуючої радіації насіння родини *Brassicaceae* (Гродзинский, 1989; Jan et al., 2012).

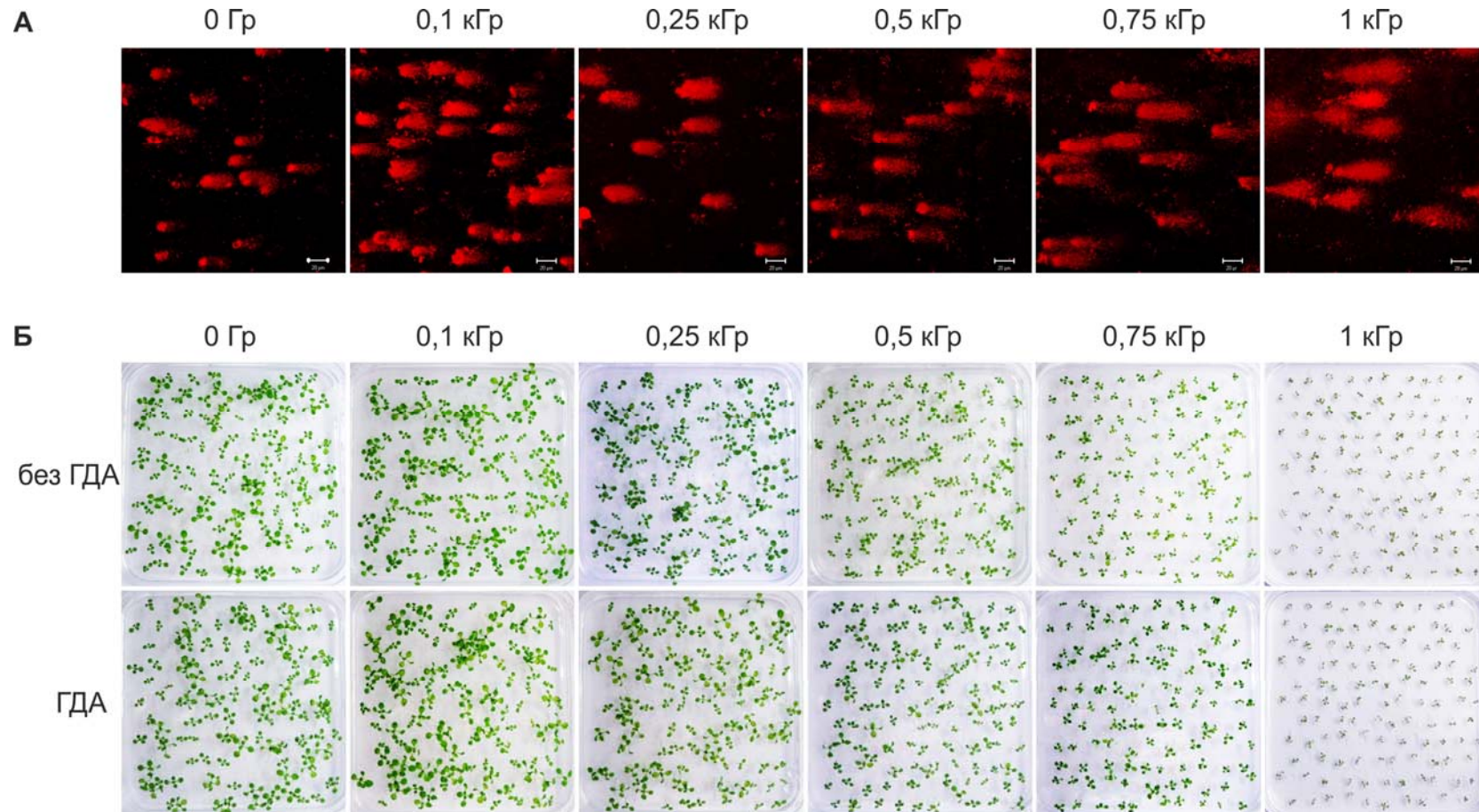


Рис. 6.7. Аналіз *A. thaliana* після опромінення насіння γ -радіацією. (А) Типові ДНК-комети з опроміненого насіння, забарвлені бромистим етидієм. (Б) 12-добові проростки, вирощені з опроміненого насіння, без обробки (зверху) і після обробки ГДА (внизу).

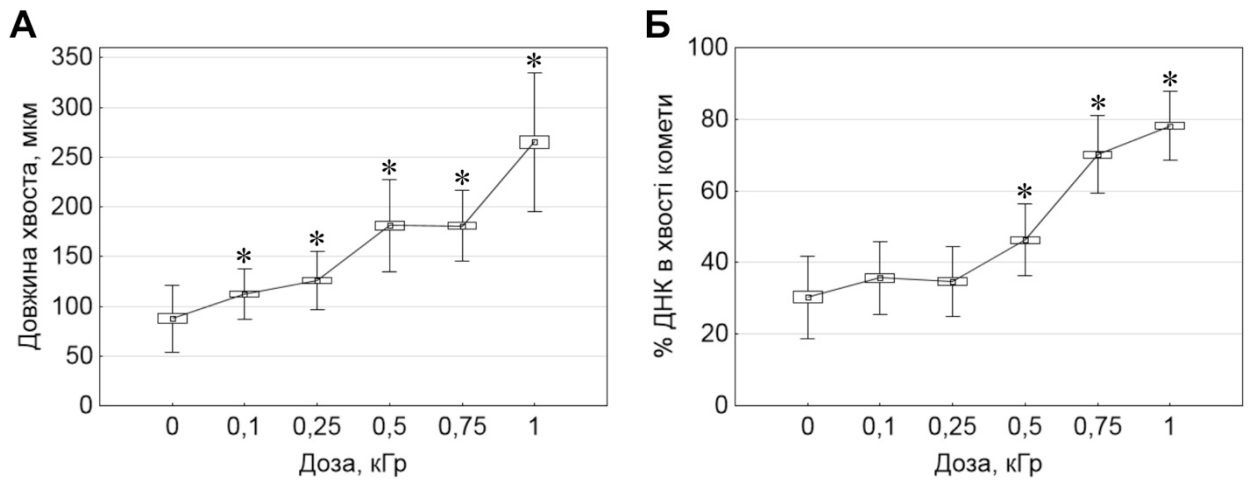


Рис. 6.8. Зміни цілісності ДНК в результаті опромінення сухого насіння *A. thaliana* різними дозами γ -радіації за даними кометного аналізу. (А) Довжина хвосту ДНК-комет; (Б) частка ДНК в хвості ($M \pm SE$ (бокси) і SD). (*) статистично достовірна різниця по відношенню до неопроміненого насіння (U-тест Манна-Уїтні, $p < 0,005$).

Таблиця 6.6

**Вплив ГДА на проростання насіння *A. thaliana* (Ler) і фенотипічну
варіабельність проростків після γ -опромінення**

Показники	Обробка насіння 5 мкМ ГДА	Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями					
		0 Гр	0,1 кГр	0,25 кГр	0,5 кГр	0,75 кГр	1 кГр
Схожість насіння	-	100% (220/220)	99,6% (222/223)	100% (226/226)	99,1% (225/227)	99,0% (210/212)	99,6% (223/224)
	ГДА	100% (225/225)	100% (223/223)	99,5% (220/221)	100% (223/223)	99,5% (211/212)	99,1% (220/222)
Частка проростків з відхиленнями	-	0,9% (2/220)	3,6% (8/222)	4,0% (9/226)	5,3% (12/225)	14,3% (30/210)	22,4% (50/223)
	ГДА	3,6% (8/225)	5,4% (12/223)	6,8% (15/220)	11,7% (26/223)	22,7% (48/211)	38,2% (84/220)
Частка гігантських проростків	-	4,5% (10/220)	12,6% (28/222)	8,0% (18/226)	0% (0/225)	0% (0/210)	0% (0/223)
	ГДА	7,1% (16/225)	18,8% (42/223)	13,6% (30/220)	0% (0/223)	0% (0/211)	0% (0/220)
Частка карликових проростків	-	0,9% (2/220)	1,4% (3/222)	0,4% (1/226)	4,0% (9/225)	7,1% (15/210)	15,7% (35/223)
	ГДА	0,4% (1/225)	0,4% (1/223)	1,4% (3/220)	2,2% (5/223)	6,2% (13/211)	14,1% (31/220)

Примітка. Відносні показники представлено у процентах і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості насіння або проростків (у дужках). Для аналізу фенотипів використовували 12-добові проростки. Частку карликових проростків визначали на 14-ту добу росту. Частку проростків з відхиленнями визначали без врахування гігантських і карликових проростків. Опис морфологічних відхилень представлено в Додатку Д.

Водночас опромінення суттєво вплинуло на ріст рослин (рис. 6.7). Це підтверджується визначенням темпів росту проростків (рис. 6.9) і маси 21-добових рослин (рис. 6.10). Хоча пошкодження ДНК насіння після експозиції 0,1 кГр було відносно слабким (достовірним тільки для довжини хвоста комет), ця доза викликала стимуляцію росту, а також призводила до суттєвих фенотипічних варіацій проростків, включаючи гігантські проростки та індукований морфогенез (проростки з трьома сім'ядолями і трьома листками першого порядку) (табл. 6.6; рис. 6.11; Додаток Д). Певна стимуляція відмічалась також при дозі 0,25 кГр. Слід відмітити, що стимулюючі дози γ -променів для насіння цього виду виявились значно вищими, порівняно з насінням багатьох інших видів (Sheppard, Evenden, 1986; Moussa, 2011; Jan et al., 2012; Akshatha, Chandrashekar, 2013; Ahuja et al., 2014). За думкою авторів цих статей, стимуляція росту проростків після опромінення насіння може бути опосередкована активацією синтезу РНК і білка, ензиматичних процесів, антиоксидантної системи та мітотичної активності. Враховуючи широкий спектр білків-клієнтів HSP90, можна прогнозувати певний вплив шаперона на ці процеси.

Суттєве пошкодження ДНК насіння при дозах радіації від 0,5 кГр і вище, навпаки, призводило до дозо-залежного пригнічення росту (рис. 6.9; 6.10), появи карликових проростків, а також посилення частоти і ступеню морфологічних змін (рис. 6.11; табл. 6.6; Додаток Д). Це узгоджується, наприклад, з результатами Terfer et al. (2012), які повідомляли про затримку росту *A. thaliana* після опромінення насіння іонізуючою радіацією. Отже, в цьому експерименті поріг ефективного функціонування систем протекції та репарації в насінні *A. thaliana*, очевидно, лежить між дозами 0,25 і 0,5 кГр.

Дозо-залежні зміни темпів росту проростків і посилення варіабельності фенотипів свідчать про збільшення ступеню гетерогенності матеріалу в результаті опромінення. Морфологічні аномалії сім'ядоль і листків розетки

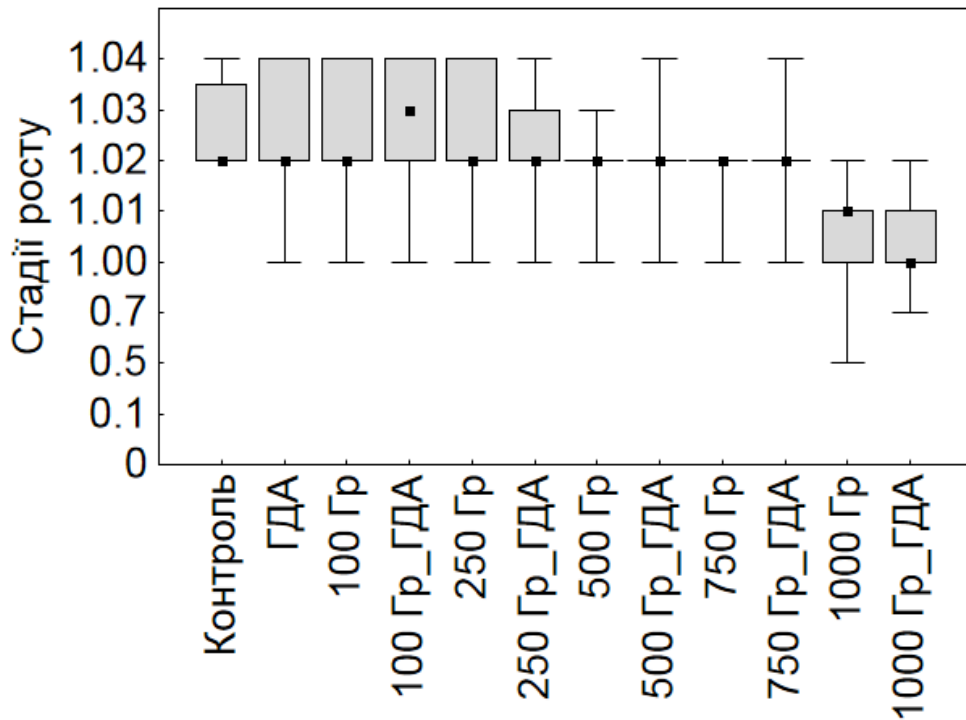


Рис. 6.9. Діаграма стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana* (Ler) у контролі та після γ -опромінення насіння і обробки ГДА (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення; n = 101-115).

можуть бути результатом локальних пошкоджень зачатків сім'ядоль і апексу зародку під час опромінення насіння. Крім прямого пошкодження клітин, зміна ростової активності та морфологічні аберації можуть бути наслідком генетичних змін, які виникають в результаті помилок репарації і акумуляції дефектних білків (Koornneef et al., 1982; Гродзинский, 1989; Roy et al., 2006; De Micco et al., 2011; Van Der Vyver et al., 2011). Це опосередковано підтверджується високою кореляцією між частотою аномальних фенотипів і ступенем пошкодження ДНК в насінні за коефіцієнтом кореляції Спірмена: $r_s = 0,9275$ для кореляції з довжиною хвоста комети, $r_s = 0,9730$ для кореляції з % ДНК в хвості ($p < 0,05$). Виходячи з того, що радіація викликає геномну нестабільність, гомогенно розподілену по всіх органах зародку насіння (Kovalchuk et al., 2000), можна апроксимувати такі зміни на весь проросток.

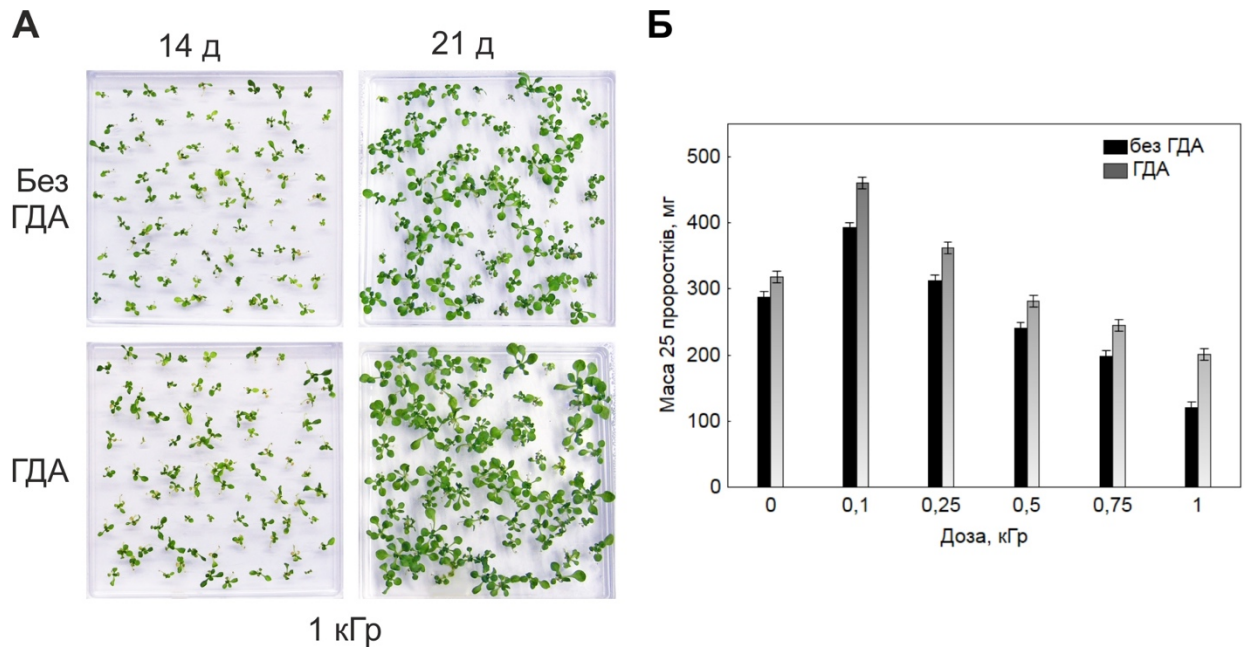


Рис. 6.10. Вплив ГДА на ріст *A. thaliana* (Ler) після γ -опромінення насіння. (А) 14- і 21-добові проростки, вирощені з насіння, опроміненого у дозі 1 кГр, без обробки і з обробкою 5 мкМ ГДА. (Б) біомаса 25-ти 21-добових рослин після опромінення у різних дозах і обробки ГДА ($M \pm SD$). Ефекти всіх доз радіації та ГДА є статистично значущими при $p < 0,05$ (Two-way ANOVA).

Обробка насіння ГДА після опромінення не впливала на його схожість, проте викликала посилення варіабельності проростків за темпами росту (рис. 6.9). Іншим ефектом ГДА було збільшення числа змінених фенотипів у 1,5-2,8 рази (табл. 6.6). При максимальній дозі радіації частка аномальних фенотипів після обробки антибіотиком досягала 40%. Проте слід зазначити, що у варіантах з дозами 0,75 і 1 кГр частка таких фенотипів була заниженою внаслідок затримки росту. Подальші спостереження виявили тотальні морфологічні зміни у більшості проростків, що, очевидно, є результатом суттєвого радіаційного пошкодження меристематичних клітин, проте повністю маскувало ефекти ГДА і унеможливило аналіз.

Крім того, обробка ГДА опроміненого насіння викликала певну стимуляцію росту, що відмічалось за стадіями росту і масою проростків при всіх дозах радіації (рис. 6.9; 6.10). Так, при дозі 1 кГр ГДА сприяло збільшенню маси проростків на ~60%. Крім того, при дозах 0,1 і 0,25 кГр, які

мали загальний стимулюючий ефект, реєструвалося збільшення у 1,2-1,5 рази кількості гігантських проростків (табл. 6.6).

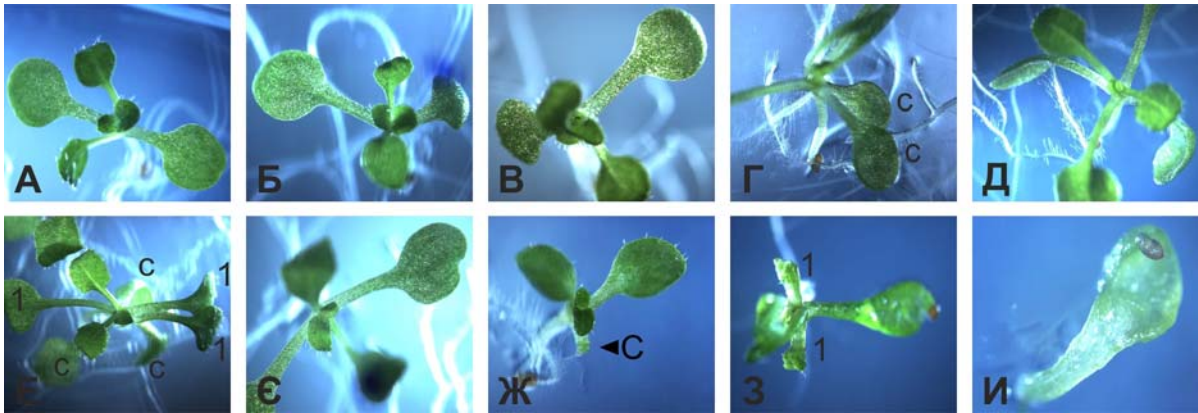


Рис. 6.11. Фенотипи 12-добових проростків *A. thaliana* після γ -опромінення сухого насіння: (А) нормальний фенотип *Ler*; (Б-И) фенотипи з морфологічними змінами: (Б) сім'ядолі різних розмірів; (В) черешок сім'ядолі короткий; (Г) кут між сім'ядолями менше 90°; (Д) епінастичні сім'ядолі; (Е) 3 сім'ядолі та 3 листки першого порядку; (Є) сім'ядольна пластинка з дефектом краю; (Ж) нерозвинені сім'ядолі; (З) деформовані сім'ядолі, нерозвинені листки; (И) проросток складається з однієї сім'ядолі. Позначення: (с) сім'ядоля, (1) листок першого порядку.

У другому експерименті обробка опроміненого насіння Col-0 іншим інгібітором HSP90 РАД привела до схожих закономірностей. РАД не впливав на життєздатність насіння, однак призводив до збільшення діапазону темпів росту проростків і, одночасно, певної стимуляції росту і розвитку, на що вказують результати визначення біомаси і частки квітучих рослин на 24-ту добу (рис. 6.12; табл. 6.7). Водночас обробка РАД опроміненого насіння призводила до збільшення числа морфозів в 1,2-1,6 рази. Так, за максимальної дози радіації частка 12-добових проростків з морфологічними змінами після обробки антибіотиком досягала 60% (табл. 6.7).

**Вплив РАД на проростання насіння, ріст і розвиток рослин *A. thaliana*
(Col-0) після γ -опромінення**

Обробка насіння 10 мкМ РАД	Доза опромінення, кГр			
	0	0,1	0,5	1
Схожість насіння				
–	93,3% (140/150)	89,3% (134/150)	94,7% (142/150)	93,3% (140/150)
РАД	89,3% (134/150)	90,0% (135/150)	93,3% (140/150)	92,6% (139/150)
Частка 12-добових проростків з морфологічними відхиленнями				
–	4,3% (6/140)	19,4% (26/134)	40,1% (57/142)	38,7% (55/142)
РАД	11,9% (16/134)	31,1% (42/135)	47,9% (67/140)	60,4% (84/139)
Маса 20-ти 24-добових рослин, мг (M \pm SD), * $p < 0,05$				
–	325 \pm 18,6	424 \pm 13,5	307 \pm 10,5	267 \pm 15,5
РАД	350 \pm 19,5	479 \pm 23,0 *	343 \pm 16,1 *	302 \pm 17,4
Кількість 24-добових рослин, що цвітуть				
–	2,2% (3/139)	9,2% (12/130)	7,9% (11/139)	2,9% (4/137)
РАД	6,8% (9/132)	33,1% (44/133)	18,4% (25/136)	11,2% (15/134)

Примітка. Відносні показники представлено у процентах і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості насіння або проростків (у дужках).

Стимуляція росту та прискорення розвитку в результаті обробки ГДА після γ -опромінення сухого насіння, за нашим припущенням, можуть бути пов'язані зі здатністю HSP90 регулювати експресію генів HSP. Результати вивчення цього питання представлено у розділі 5.

Отримані результати дозволяють розглядати можливість використання інгібіторів HSP90 для стимуляції росту після опромінення насіння, а також для відбракування дефектних організмів та відбору нормальних фенотипів.

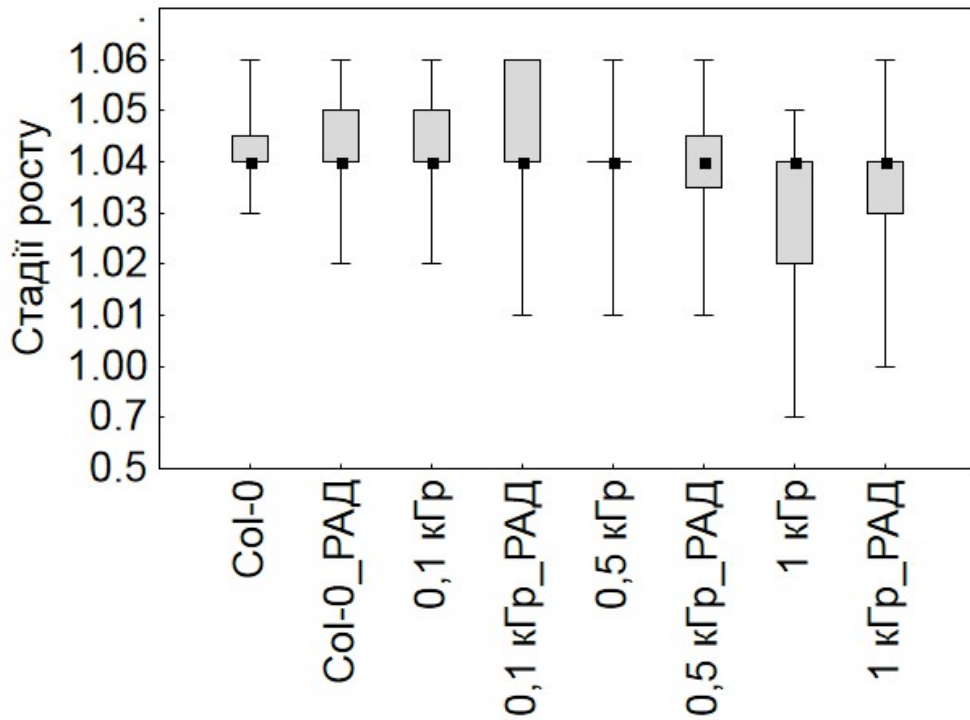


Рис. 6.12. Діаграма стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana* (Col-0) після γ -опромінення насіння і обробки РАД (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення; n = 130-140).

6.1.2.4. Порівняння впливу інгібування HSP90 на поліморфний матеріал різного походження

Оскільки при вивченні ефектів інгібування HSP90 у поліморфному матеріалі *A. thaliana* в різних експериментах інгібітори використовували в різних концентраціях, проведено додатковий експеримент з використанням 5 мкМ ГДА. При цьому було обрано варіанти, для яких прогнозувалось, що частина насіння може бути нежиттєздатною: 1) насіння природної популяції; 2) насіння Col-0, опромінене УФ-В в дозі 4,1 кДж/м² (набрякле насіння); 3) насіння Col-0, опромінене γ -радіацією в дозі 1 кГр (сухе насіння). Лабораторна лінія Col-0 служила контролем.

Результати експерименту підтвердили основні закономірності, отримані за впливу інгібіторів HSP90 в попередніх експериментах і описані вище. Обробка ГДА, не впливаючи на схожість насіння Col-0, призводила до збільшення частки непророслого поліморфного насіння у 2–3 рази (рис. 6.13,

табл. 6.8). Антибіотик також посилював десинхронізацію росту проростків, притаманну поліморфному матеріалу. Істотна частка проростків з поліморфного насіння характеризувалась значною кількістю морфологічних аномалій, таких як локальні порушення росту, зміна форми, розмірів та кольору (антоціанові та безхлорофільні) органів, деформація проростків та відсутність в них окремих органів. В результаті обробки ГДА частка аномальних фенотипів збільшувалась у 2–2,7 рази (табл. 6.8).

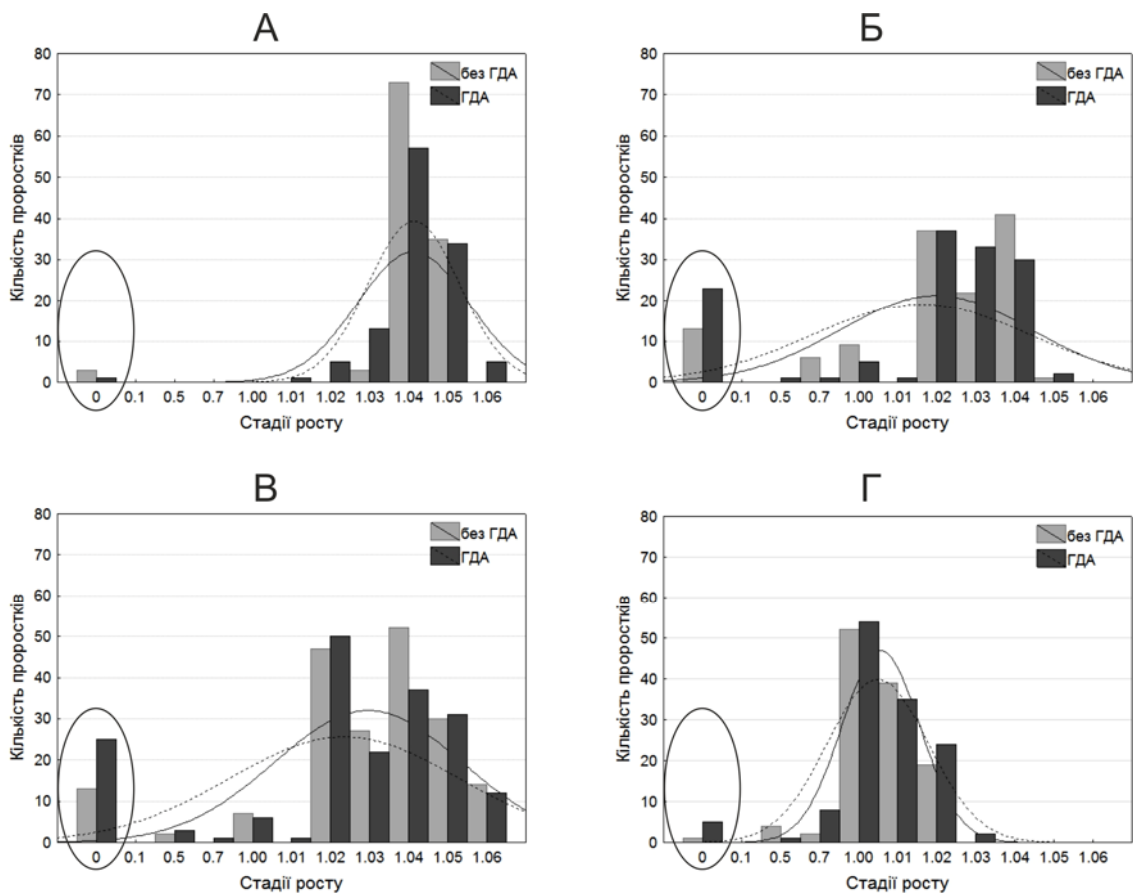


Рис. 6.13. Гістограма розподілу стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana* після обробки насіння ГДА та без неї: А – лабораторна лінія екотипу Col-0 (контроль); Б – проростки, вирощені з насіння природної популяції; В – після опромінення УФ-В набряклого насіння екотипу; Г – після γ -опромінення сухого насіння екотипу. Овалом виділено гістограми кількості непророслого насіння.

Вплив обробки насіння ГДА на схожість насіння та появу морфологічних відхилень у проростків *A. thaliana*

Показник	Col-0		Насіння природної популяції		Опромінення УФ-В насіння Col-0		Гамма-опромінення насіння Col-0	
	Без ГДА	ГДА	Без ГДА	ГДА	Без ГДА	ГДА	Без ГДА	ГДА
Частка непророслого насіння	2,6% 3/116	0,9% 1/115	10,1% 13/129	17,3% 23/133 *	7,3% 14/192	12,9% 24/186 *	0,8% 1/120	3,2% 4/124
Частка проростків з морфологічними відхиленнями	4,5% 5/111	12,3% 14/114 *	8,6% 10/116	22,7% 25/110 *	18,5% 33/178	35,2% 57/162 *	21,8% 26/119	39,1% 47/120 *
Частка проростків зі значними порушеннями, несумісними з подальшим розвитком	0 % 0/111	0 % 0/114	3,4 % 4/116	0 % 0/110	5,6 % 10/178	1,2 % 2/162	4,2 % 5/119	1,6 % 2/120

Примітка. Частки представлено у відносних (%) і абсолютних величинах. (*) Статистично достовірна різниця між варіантами без обробки та з обробкою ГДА ($p < 0,05$).

Водночас на фоні загального посилення фенотипічної варіабельності відмічено зменшення кількості проростків зі значними порушеннями (тотальна деформація проростку, відсутність осьових органів, некротичні плями), які, очевидно, є несумісними з нормальним подальшим ростом організму. Такі дані можуть вказувати на необхідність HSP90 для підтримки вітальності клітин за наявності серйозних пошкоджень, які загрожують нормальному розвитку організму. Це може відбуватися як шляхом приховання шапероном генетичних змін (Rutherford, Lindquist, 1998), так і через його участь у захисті клітин від протеотоксичних ефектів. Виходячи з цього, можна пропонувати використання інгібіторів HSP90 для відбракування дефектних організмів після дії генотоксичних факторів.

Отже, зниження виживаності гетерогенного за якістю, генетично поліморфного насіння та посилення варіабельності темпів росту і морфології проростків *A. thaliana* при зниженні функціональної активності шаперонів

HSP90 може свідчити про участь білків цієї родини у підтриманні гомеостазу та стабілізації росту і морфогенезу рослин.

6.2. Роль окремих HSP90 і HSP70 у рості та розвитку рослин

Для аналізу ролі окремих HSP90 і HSP70 у формуванні фенотипу нами використано *A. thaliana* дикого типу (Col-0) та створені на його основі інсерційні нокаут-мутанти за цитозольними членами родин: індукцибельними AtHSP90-1 і AtHSP70-5 (підродина DnaK) і конститутивними AtHSP90-4 і AtHSP70-14 (підродина HSP110/SSE) (табл. 3.4, рис. 4.16). Для аналізу фенотипів використовувались рослини, гомозиготні за T-ДНК-вставкою.

Феномний аналіз мутантів проводили у трьох серіях експериментів:

- Феномний аналіз проростків;
- Феномний аналіз рослин протягом онтогенезу;
- Аналіз пластичних реакцій проростків.

Відмітимо, що аналіз стійкості проростків цих мутантних ліній представлено в п. 4.2.

Для аналізу фенотипів проростків їх вирощували в стерильній культурі на агаризованому середовищі. Для аналізу протягом онтогенезу рослини вирощували в ґрунті.

6.2.1. Роль окремих HSP90 і HSP70 у рості та морфогенезі проростків *A. thaliana*

Порушення експресії одного з чотирьох генів *HSP*, що досліджувались, на життєздатність насіння кардинально не впливало. Разом з тим, у ліній *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* відмічали достовірне зниження схожості насіння, порівняно з диким типом, і у лінії *Athsp90-4* – тенденцію до зниження (рис. 6.15). Разом з тим, цей показник значно варіював між нащадками різних особин всередині кожної мутантної лінії (рис. 6.15, табл. 6.9). Схожі результати одержано Samakovli et al. (2007) для T-ДНК-ліній

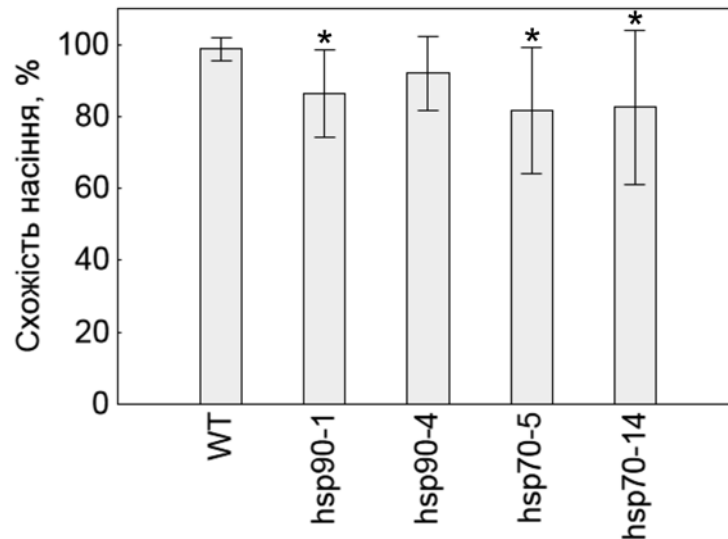


Рис. 6.15. Схожість насіння *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* (середні значення та їх стандартні відхилення зі всіх експериментів з мутантами в агаризованій культурі). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та позначеною мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Таблиця 6.9

Частка проростків з морфологічними відхиленнями у дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *A. thaliana*

Показник	WT	<i>Athsp90-1</i>	<i>Athsp90-4</i>	<i>Athsp70-5</i>	<i>Athsp70-14</i>
Частка проростків з морфологічними відхиленнями	8,4% (11/131)	27,0% * (65/240)	14,9% * (44/295)	15,8% * (38/240)	21,4% * (64/299)

Примітка. Частки представлено у відносних (%) і абсолютних (у дужках) величинах. Частки проростків з морфологічними відхиленнями розраховували на загальну кількість проростків у варіанті з трьох експериментів. Відхилення визначали у 10-добових проростків; опис представлено в Додатку Е. (*) Достовірна різниця між мутантом і диким типом.

A. thaliana з порушенням експресії цитозольних HSP90: в *Athsp90-1* частка непророслого насіння була максимальною (~40%), у мутантів по конститутивних генах – біля 15%. Причиною тому може бути значне порушення ембріогенезу у окремих насінин. Аналіз зародків непророслого насіння нокаут-мутантів *HSP90* виявив значні порушення морфології,

зокрема, такі аберації, як дезорганізований ріст і розриви центральної частини кореня, поява другого зародкового кореня, порушення структури сім'ядоль і організації провідних пучків, два зрослих зародки з однією сім'ядолею. Крім того, лінія *Athsp90-1* характеризувалася ранньої загибеллю частини проростків і певною затримкою росту і розвитку (Samakovli et al., 2007). Враховуючи активну експресію *HSP90*, особливо *AtHSP90-1*, під час формування зародка та дозрівання насіння (Prasinos et al., 2005), можна припускати його необхідність для нормального ембріогенезу. Те саме можна очікувати і для *Athsp70-5* і *Athsp70-14*, оскільки їх мРНК також міститься у сухому насінні в значній кількості (Arabidopsis eFP browser, <http://bar.utoronto.ca>).

Визначення ростової активності проростків за темпами росту (стадії росту за методикою Boyes et al., 2001) та масою показало збереження центральної тенденції в *Athsp90-1*, *Athsp90-4* і *Athsp70-14*, та її достовірне зниження в *Athsp70-5* (рис. 6.16). Водночас у всіх мутантів за обома показниками відмічали збільшення діапазону розкиду даних. Це обумовлено появою як великих за розмірами та масою проростків, так і проростків зі значним відставанням за ростовою активністю.

Для морфологічного аналізу використовували стеблову частину 10-добових проростків. В нормі проростки *A. thaliana* цього віку мають розвинені сім'ядолі та першу пару справжніх листків. Це виявилось більш зручною моделлю, порівняно з 12-добовими проростками, які використовувались нами для феномного аналізу в експериментах з інгібуванням *HSP90* (див. п. 6.1) і мали в нормі дві пари справжніх листків та, відповідно, більше можливостей для варіацій фенотипів, що ускладнювало аналіз. Крім того, в даному експерименті ми вирішили залишити поза увагою особливості просторового розташування органів і реєструвати лише зміни стеблової системи, які ведуть до асиметрії парних ознак або до значних морфологічних порушень. При цьому ми виходили з того, що посилення

асиметрії парних органів або білатеральних ознак розглядається як показник дестабілізації ростових процесів (Milton et al., 2003).

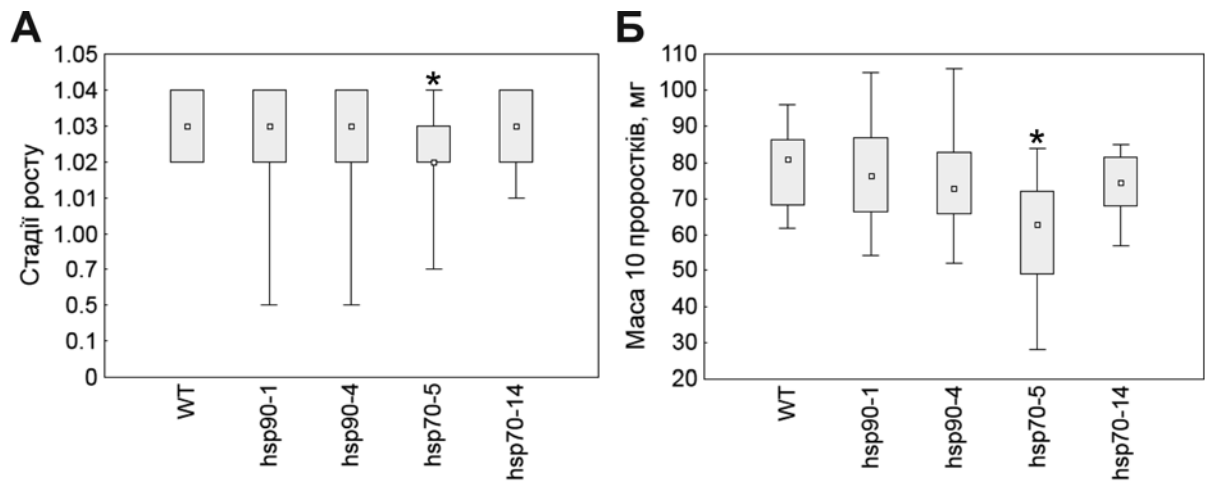


Рис. 6.16. Стадії росту (А) і маса (Б) 10-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Аналіз проростків показав, що більшість особин мутантних ліній формує стандартний фенотип дикого типу. Разом з тим, певна частина проростків мала морфологічні зміни від помірних до значних, а саме: локальні порушення маргінального росту листкових пластинок; деформації окремих органів або всього проростка; нерозвинені органи; додаткові органи (3 сім'ядолі, 3 листки першого порядку) (рис. 6.17; Додаток Е). У дикого типу морфологічні відхилення виявлялися у невеликої кількості проростків (8,4%) і здебільшого стосувалися асиметрії парних ознак (табл. 6.9; Додаток Е). У мутантів частка ненормальних фенотипів виявилася у 2-3 рази більшою за дикий тип. При цьому спостерігалось як збільшення різноманіття та кількості проявів асиметрії, так і поява фенотипів зі значними абераціями – від деформації або відсутності окремих органів до утворення зайвих органів. Максимальну кількість таких фенотипів показала лінія *Athsp90-1* (27,0%).

Слід також відмітити, що мутантні лінії різнилися між собою за наявністю або частотою окремих фенотипів. Наприклад, дефекти краю сім'ядольних пластинок частіше виявлялися у *Athsp90-1*, відсутність сім'ядоль – у обох мутантів *hsp90*, сім'ядолі різних розмірів – у обох мутантів *hsp70*. Подібну специфічність до змінених фенотипів у нокаут-мутантів за окремими цитозольними HSP90 раніше відмічали Samakovli et al. (2007).

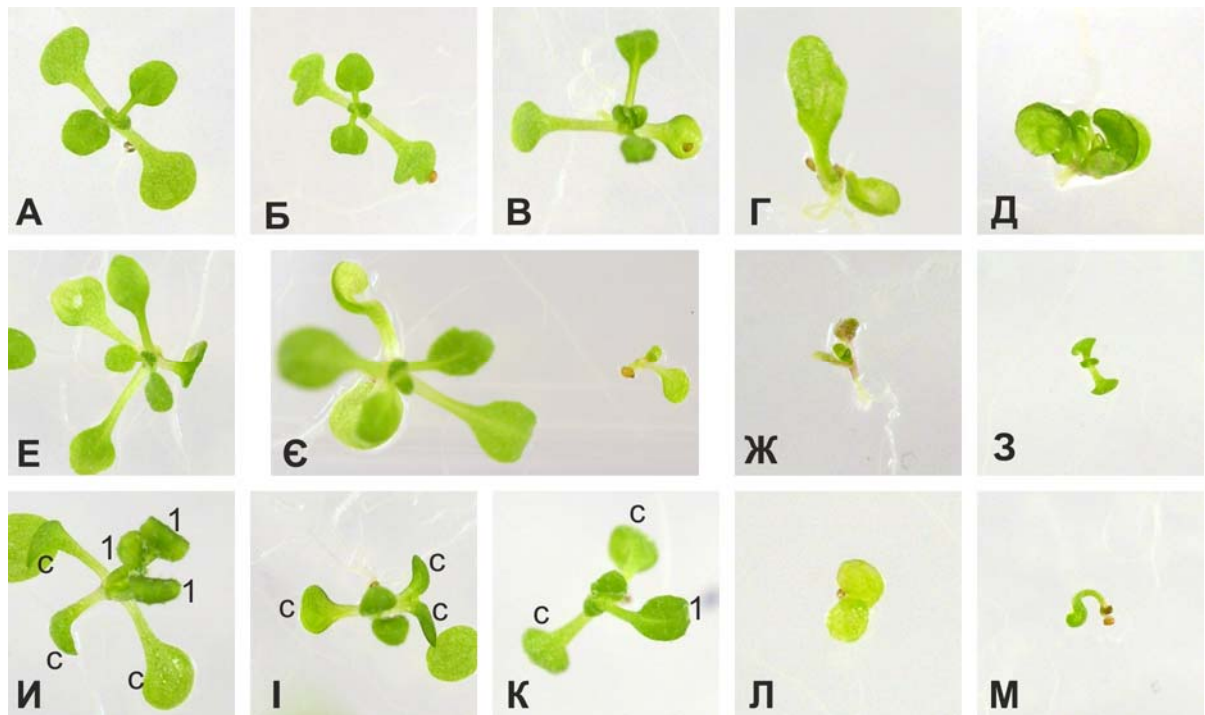


Рис. 6.17. Приклади фенотипів з морфологічними відхиленнями у 10-добових проростків нокаут-мутантів *hsp*: (А) нормальний проросток; (Б, Є) сім'ядолі з дефектом краю; (В) черешки сім'ядоль різної довжини; (Г, Д) деформований проросток; (Е) сім'ядольна пластинка з діркою; (Є) одна сім'ядоля відсутня, затримка росту; (Ж) карликовий проросток антоціанового кольору; (З) карликовий проросток; (И) 3 сім'ядолі та 3 листки першого порядку; (I) 3 сім'ядолі, в двох черешки зрослися; (К) 1 справжній лист першого порядку відсутній; (Л) проросток складається з двох сім'ядоль; (М) проросток складається з однієї сім'ядолі. Позначення: (с) сім'ядоля, (1) листок першого порядку.

Таким чином, результати аналізу проростків показали появу фенотипів, відмінних від стандартного фенотипу, при порушенні експресії як окремих *HSP90*, так і окремих *HSP70*, як за конститутивними членами родин, так і за індукцибельними. Формування подібних фенотипічних порушень ми спостерігали також при зниженні активності клітинного пулу *HSP90* в результаті обробки інгібіторами, що описано у п. 6.1.1 (див. також Додаток Б). Такі спостереження збігаються з даними літератури, де повідомляється про появу аномальних фенотипів при зниженні кількості / активності *HSP90*. Так, проростки з трьома сім'ядолями виявлялися у нокаут-мутантів *Athsp90-1* і *Athsp90-4* (Samakovli et al., 2007). Проростки із зміненою кількістю листків одного порядку (відсутність одного чи двох листків, або утворення додаткового листка), проростки антоціанового кольору, деформація листків, виражена асиметрія парних органів, сповільнення росту спостерігалось при зниженні загального рівню цитозольних *HSP90* за допомогою інгібіторів та RNAi (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2007). Проте поява подібних фенотипів при порушенні експресії окремих *HSP70* показана нами вперше.

Слід звернути увагу також на те, що у мутанта за індукцибельним *AtHSP90-1* частка аномальних фенотипів була найбільшою, що збігається з результатами дослідження нокаут-мутантів за цитозольними *HSP90* Samakovli et al. (2007). Також слід відмітити, що поява морфологічних порушень у мутанта *Athsp70-5* відбувалася на фоні певного відставання у темпах росту. Оскільки *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5* активно транскрибуються наприкінці ембріогенезу та протягом дозрівання насіння (*Arabidopsis* eFP browser <http://bar.utoronto.ca>), можна припустити, що відповідні *HSP* відіграють важливу роль у стабілізації процесів ембріогенезу, що є основою нормального формотворення щонайменш у ранньому розвитку рослини. Зокрема, підтвердженням такому припущенню може бути часте виникнення таких аберацій, як сім'ядолі з дефектом маргінального росту пластинок або відсутність сім'ядоль в лінії *Athsp90-1*, враховуючи те, що закладка цього

органу відбувається в ембріогенезі. Це також узгоджується з великою кількістю аберацій у непророслого насіння цієї лінії *Athsp90-1*, що описано Samakovli et al. (2007). Не можна також виключати специфічний вплив *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5* на формотворчі процеси при проростанні під час гідролізу преформованих в насінні HSP та їх мРНК.

Стосовно *AtHSP90-4* і *AtHSP70-14* відомо, що їх мРНК міститься у сухому насінні в помірній кількості, збільшується протягом проростання та транскрибується на високому рівні в період активного росту (*Arabidopsis* eFP browser <http://bar.utoronto.ca>). Виходячи з цього, отримані нами дані дозволяють припустити, що функціонування конститутивних *AtHSP90-4* і *AtHSP70-14* може певною мірою впливати на процеси ембріогенезу та набувати більшого значення на ранніх етапах росту проростків.

Аналіз модульної природи морфозів у нокаут-мутантів *hsp*. Поява аномальних фенотипів у нокаут-мутантів за генами *HSP90* і *HSP70* розглядається нами як результат збоїв у сигнальних і регуляторних шляхах, що залежать від відповідних HSP. Морфологічні зміни в 10-добових проростків можуть виникати внаслідок порушень клітинного росту як в період ембріогенезу (закладка сім'ядоль), так і під час раннього росту проростків (розвиток сім'ядоль, формування стеблового апексу та ріст першої пари листків розетки) (Weigel, Glazebrook, 2002). Водночас залишається невідомим, наскільки такі порушення є системними та можуть впливати на подальше формотворення. Для вирішення цього питання ми відстежували ріст аберантних фенотипів, що мали: 1) зайву кількість органів (сім'ядолі, листки); 2) відсутність органу(-ів); 3) органи зі зміненими формою або кольором. Аналіз здійснювали, виходячи з концепції модульної будови рослинного організму (Harper, 1977, 1980; Марфенин, 1999, 2008) і модульної концепції фенотипічної пластичності (de Kroon et al., 2005). Модулем в проростках *A. thaliana* вважали міжвузля з асоційованою парою сім'ядольних або справжніх листків. Головним критерієм було повторення характеру змін в наступних модулях.

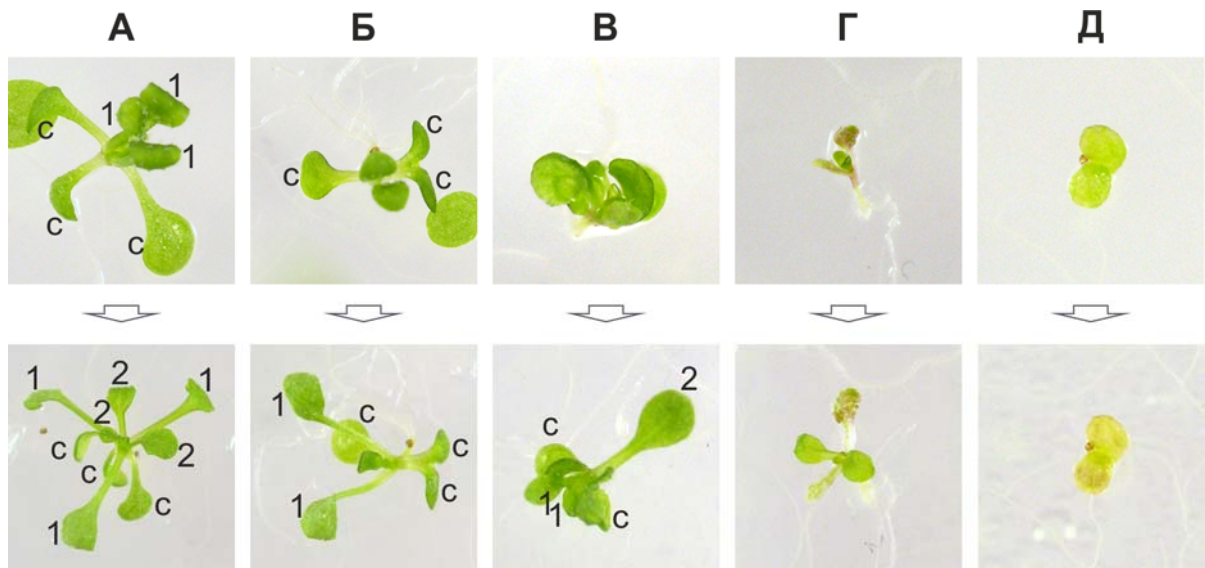


Рис. 6.18. Проростки нокаут-мутантів *hsp* з морфологічними відхиленнями на 9-ту добу (зверху) і 11-ту добу (внизу): (А) 3 сім'ядолі, 3 листки першого порядку та 3 листки другого порядку (*Athsp90-1*); (Б) 3 сім'ядолі, в двох з них черешки зрослися (*Athsp70-14*); (В) деформовані сім'ядолі та перша пара справжніх листків (*Athsp70-14*); (Г) сім'ядолі та гіпокотиль антоціанового кольору (*Athsp70-5*); (Д) проросток складається з двох сім'ядоль (*Athsp90-1*). Позначення: (с) сім'ядоля, (1) справжній листок першого порядку; (2) справжній листок другого порядку.

Проростки з трьома сім'ядолями виявлялися нами у лінії *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* (рис. 6.18, А, Б; 6.19, А). Samakovli et al. (2007) реєстрували таку аномалію в лініях, дефіцитних як за *AtHSP90-1*, так і за *AtHSP90-4*. Оскільки сім'ядолі в *A. thaliana* закладаються в ембріогенезі (Weigel, Glazebrook, 2002), можна припустити, що ініціація трьох сім'ядоль замість двох відбулася в період формування зародку. Подальше спостереження показало, що помилка могла повторюватися на рівні щонайменше двох наступних модулів, про що свідчить утворення трьох справжніх листків першого і навіть другого порядку (рис. 6.18, А; 6.19, А), або могла бути виправленою шляхом формування нормальної пари листків на рівні будь-якого з наступних модулів (рис. 6.18, Б; 6.19, А, Б). Відсутність однієї сім'ядолі або одного листка певного порядку визначалася на рівні

одного модуля, тобто наступний модуль зазвичай мав нормальну пару листків (рис. 6.18, Є, К; 6.19, В). Подібну закономірність виявляли також і у проростків з іншими відхиленнями. Наприклад, у проростків з деформованими сім'ядолями (рис. 6.17, Б; рис. 6.18, В) і сім'ядолями та гіпокотилем антоціанового кольору (рис. 6.18, Г) часто вже наступний модуль мав нормальний вигляд.

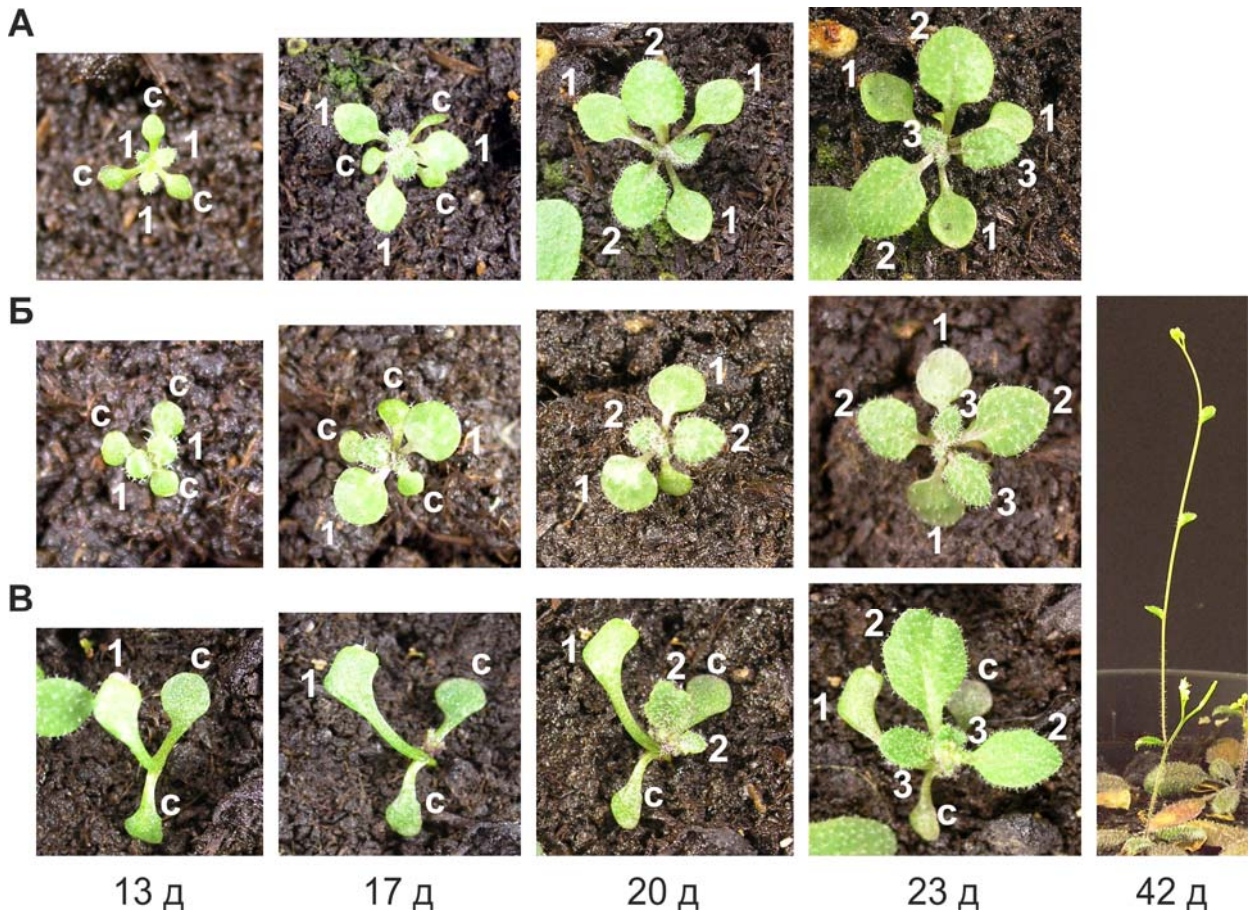


Рис. 6.19. Мутантні проростки з морфологічними відхиленнями на 13, 17, 20, 23 та 42 добу: (А) проросток *Athsp70-14* з 3 сім'ядолями і 3 справжніми листками першого порядку; (Б) проросток *Athsp70-5* з 3 сім'ядолями; (В) проросток *Athsp70-5* з 1 справжнім листком першого порядку. Дані взято з аналізу фенотипів в онтогенезі, представленого у наступному підрозділі. Позначення як на рис. 6.18.

На відміну від цього, тотальні порушення, пов'язані з відсутністю нормальних меристем, призводили до елімінації організму, наприклад,

проростки, що склалися лише з однієї або двох сім'ядоль (рис. 6.17, Л, М; рис. 6.18, Д).

В цілому, результати спостережень за фенотипічною структурою модулів проростків мутантних ліній, як правило, вказують на те, що їх генотип несе інформацію нормальної морфогенетичної програми виду за виключенням мутації по одному з генів *HSP*. Водночас збої в процесах морфогенезу та метаболізму, якщо вони не стосуються тотальних порушень організму або його меристем, відбуваються на рівні окремого модуля або його конструктивних елементів і можуть як повторюватись, так і бути відсутніми або іншими в наступних морфогенетичних циклах. Оскільки змінені фенотипи з'являлися у нокаут-мутантів *hsp* та були рідкими або були відсутні у дикого типу, логічно припустити, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися на рівні окремого модуля.

Підсумовуючи результати аналізу проростків нокаут-мутантів, можна зробити висновок, що відповідні HSP90 і HSP70 є важливими для підтримання процесів росту та формування нормального фенотипу в період раннього розвитку та мають певну специфіку функціонування. Порушення експресії одного з генів цитозольних індукцйбельних *AtHSP90-1*, *AtHSP70-5* та конститутивних *AtHSP90-4*, *AtHSP70-14* призводило до зниження життєздатності насіння, посилення варіабельності темпів росту проростків та появи морфозів. Це свідчить про значення відповідних HSP у каналізуванні формотворення та підтриманні певного рівня стабільності ростових процесів на початкових етапах формування рослинного організму. Відмічено, що фенотипічні аномалії проростків мутантних ліній по генах *HSP90* і *HSP70* часто відбувалися на рівні окремого модуля. Показано, що спектр фенотипів кожної мутантної лінії *hsp* мав особливості, що свідчить про певну специфічність функціонування відповідних HSP90 і HSP70. Порушення експресії індукцйбельних *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5* спричиняло серйозні зміни за нормальних умов. Наприклад, у лінії *Athsp90-1* реєстрували максимальну

кількість аберантних проростків, тоді як *Athsp70-5* характеризувалась помітною затримкою росту.

6.2.2. Роль окремих *HSP90* і *HSP70* у рості та розвитку рослин *A. thaliana*

Аналіз проводили на двох фазах розвитку – під час переходу до цвітіння, який визначали за появою першого квітконосу висотою 1 см (рис. 6.20), та наприкінці цвітіння цього квітконосу. Проведено два експерименти протягом 60 діб, під час яких проаналізовано 32-40 рослин у кожному варіанті. В обох експериментах виявлено подібні закономірності. Оскільки аналіз спрямований на виявлення різниці у стабільності росту і розвитку між організмами за максимально однакових умов, у даному розділі представлено результати одного з проведених експериментів.



Рис. 6.20. Рослини *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* у фазі розетки на початку переходу до цвітіння.

За тривалістю вегетативного періоду від проростання до початку цвітіння всі мутантні лінії характеризувалися більш значною варіабельністю, порівняно з диким типом (рис. 6.21). Центральна тенденція за цим показником виявила затримку переходу до цвітіння у ліній *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* та тенденцію до затримки у лінії *Athsp90-4*. Такі дані по *hsp90* повністю узгоджуються з нашими даними інгібіторного аналізу, які

показали, що після обробки насіння ГДА поява квітконосу в рослин Col-0 відбувалася на 1 добу пізніше (див. п. 6.1.1.2). Схожий результат отримали Sangster et al. (2007). Вони визначили, що перехід до цвітіння при зниженні загальної кількості цитозольних HSP90 у RNAi-ліній *A. thaliana*, а також при порушенні експресії генів *AtHSP90-2* і *AtHSP90-3* відбувався на 1-3 доби пізніше. Однак в їх досліджах тривалість вегетативного періоду у *Athsp90-1* була близькою до дикого типу, тоді як за нашими даними рослини цієї лінії переходили до цвітіння на 3 доби пізніше за дикий тип.

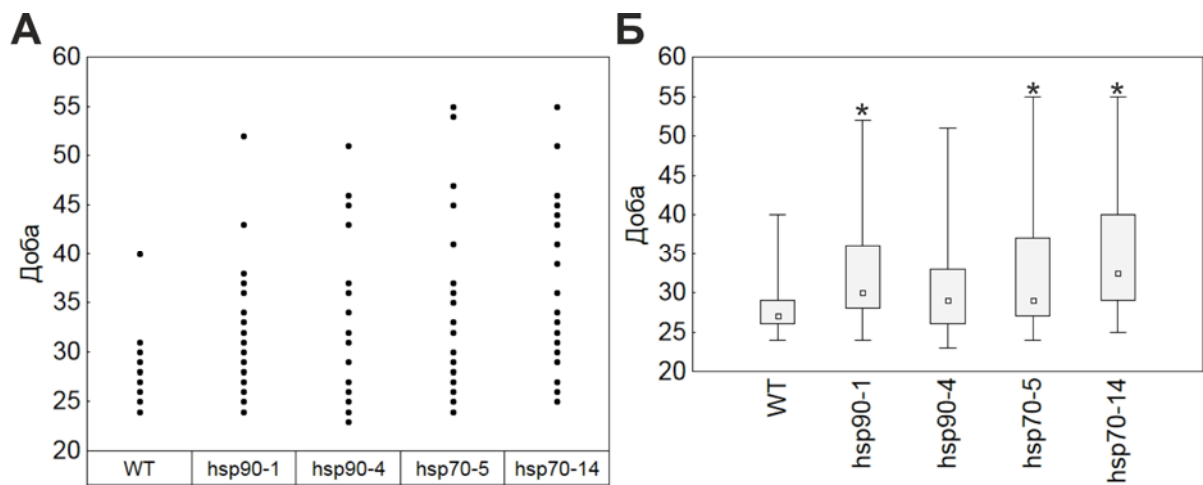


Рис. 6.21 Тривалість вегетативного періоду рослин *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*: (А) діаграма розкиду; (Б) Ме [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення. (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Для характеристики морфологічної структури ліній на початку цвітіння визначали діаметр розетки, кількість листків розетки та розміри найдовшого листка (довжина і ширина пластинки, довжина черешка, співвідношення довжин пластинки/черешка). Всі мутанти відрізнялись від дикого типу меншим середнім діаметром розетки та більшою його варіабельністю

порівняно з диким типом (рис. 6.22, А). Проте кількість листків виявилась меншою лише у *Athsp70-5* (рис. 6.22, Б).

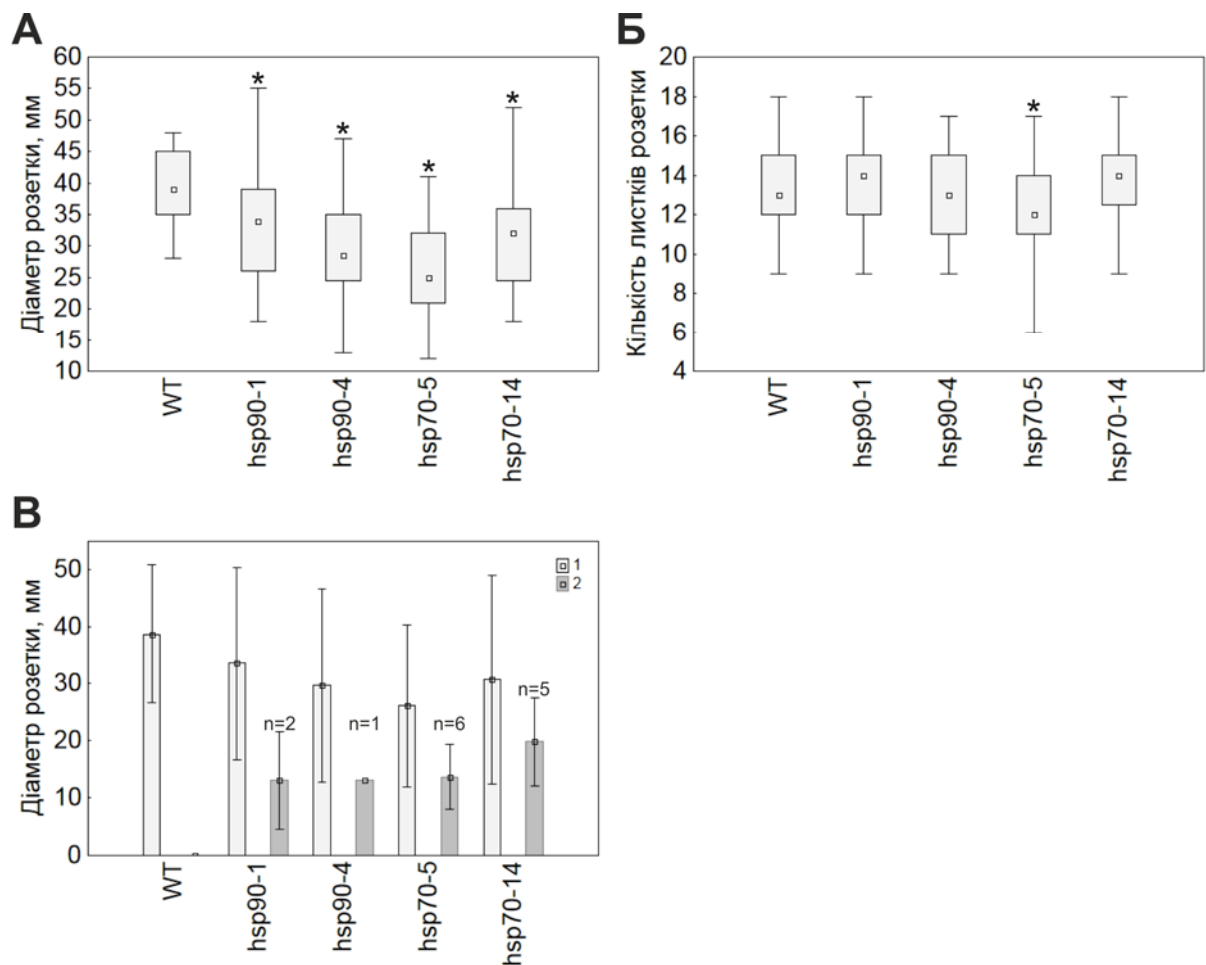


Рис. 6.22. Морфометричні характеристики рослин *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*: (А) діаметр розетки на початку цвітіння; (Б) кількість листків розетки на початку цвітіння (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення); (В) діаметр розетки на початку цвітіння (1) і діаметр розетки у рослин, які не зацвіли протягом 60 діб експерименту (2) ($M \pm SD$). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантною лінією (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Як відмічалось вище, вік рослин *A. thaliana* на початку цвітіння чітко корелює з кількістю листків розетки, і ця ознака є каналізованою (Hall et al., 2007; Sangster et al., 2008 a). Для аналізу стабільності цієї ознаки при порушенні експресії окремих *HSP* ми використали параметричний

кореляційний метод Пірсона (Реброва, 2002). Визначення коефіцієнтів кореляції між кількістю листків розетки і тривалістю вегетативного періоду показало низький рівень кореляційного зв'язку у мутантів *hsp90* порівняно з диким типом (табл. 6.10). Проте мутанти *hsp70* за рівнем кореляції від дикого типу не відрізнялися. Це вказує на важливість окремих HSP90 для стабілізації темпів утворення листків розетки. Такий висновок цілком узгоджується з нашими результатами щодо зниження кореляції між цими показниками після обробки інгібітором HSP90 (п. 6.1.1.2), а також з результатами аналізу ліній HSP90-RNAi (Sangster et al., 2008 a).

Таблиця 6.10

Кореляція між віком рослин і кількістю листків розетки на початку цвітіння у мутантів і дикого типу (WT, Col-0)

Показник	WT	<i>Athsp90-1</i>	<i>Athsp90-4</i>	<i>Athsp70-5</i>	<i>Athsp70-14</i>
Кількість рослин, використаних для аналізу	19	37	32	39	32
Коефіцієнт кореляції Пірсона, r	0,538	0,306	0,414	0,521	0,538

У всіх мутантів визначено зменшення розмірів найдовшого листка розетки разом з посиленням розкиду даних (рис. 6.23, А-В). При цьому лінії *Athsp90-1* і *Athsp70-14* були близькими до дикого типу за співвідношенням довжин пластинки/черешка, що вказує на збереження координації росту частин листка. Лінія *Athsp90-4* характеризувалася посиленою гетерогенністю за цим співвідношенням, що може бути інтерпретовано як послаблення координації ростових процесів за відсутності конститутивного AtHSP90-4. В *Athsp70-5* відмічалось не тільки найбільше зниження за всіма абсолютними показниками, а й зменшення співвідношення довжин пластинки/черешка, що може свідчити про певну специфічність функціонування AtHSP70-5 у координації росту частин листка (рис. 6.23, Г).

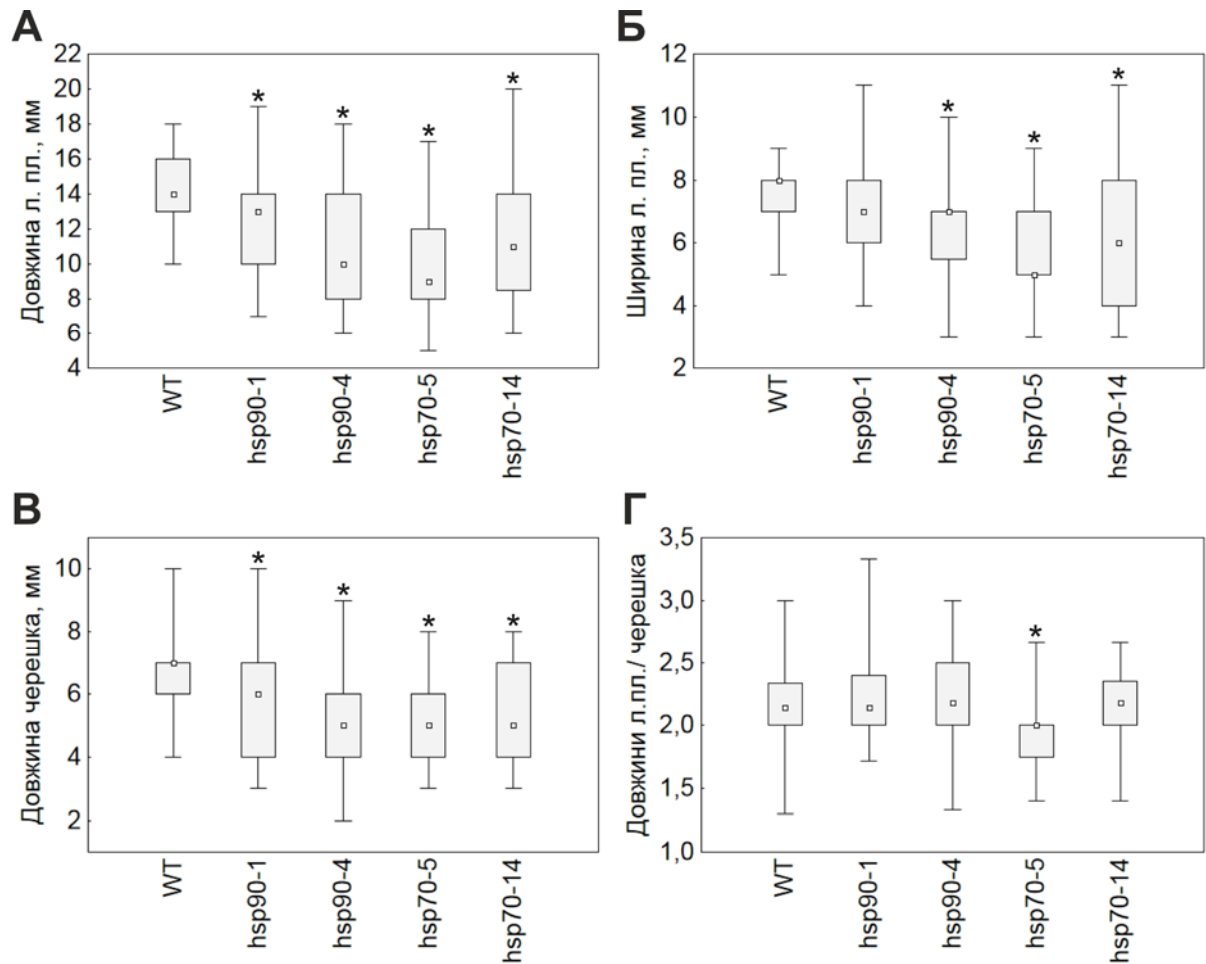


Рис. 6.23. Морфометричні показники найдовшого листка розетки на початку цвітіння *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*: (А) довжина листкової пластинки; (Б) ширина листкової пластинки; (В) довжина черешка; (Г) співвідношення довжин пластинки/черешка. (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

У роботі Sangster et al. (2007) менша довжина найбільшого листка розетки *A. thaliana* визначалась при зниженні загального рівня експресії генів цитозольних HSP90 у RNAi-ліній. Проте нокаут-мутанти за окремими HSP90, за їх даними, від дикого типу достовірно не відрізнялись.

За 60 діб експерименту всі рослини дикого типу і переважна більшість мутантних рослин перейшли до репродуктивного розвитку і закінчили

цвітіння. Кілька рослин мутантних ліній, які не зацвіли, характеризувалися значним відставанням в рості. Про це, зокрема, свідчить малий діаметр їх розетки наприкінці експерименту (рис. 6.22, В). Спостереження за цими рослинами після експерименту показали, що вони закінчили свій онтогенез на стадії розетки.

Аналіз мутантних рослин, які зацвіли, продемонстрував збільшення розкиду значень тривалості періоду вегетації до закінчення цвітіння першого квітконосу, тобто посилення варіабельності за темпами розвитку (рис. 6.24, А). При цьому лінія *Athsp70-14* відрізнялася суттєвим видовженням періоду цвітіння. Частково це може бути пов'язано з тим, що у частини мутантних рослин спостерігалось порушення апікального домінування, що призводило до більш тривалого періоду цвітіння: у 5,4% рослин *Athsp90-1*; 6,3% – в *Athsp90-4*; 10,3% – в *Athsp70-5*; 21,9% – в *Athsp70-14*. Раніше порушення апікального домінування відмічали у RNAi-ліній зі зниженим рівнем експресії генів цитозольних HSP90 (Sangster et al., 2007).

Крім того, лінії *Athsp90-1*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* в середньому мали коротший квітконос, меншу кількість бокових гілок на ньому і меншу кількість квіток (рис. 6.24, Б, В, Г). Лінія *Athsp90-4* показала лише тенденцію до зменшення цих показників на фоні збільшення розкиду даних. Оскільки переважна більшість рослин у нашому експерименті мала один квітконос (від 96% до 100% у різних ліній), зменшення числа квіток у мутантів вказує на важливість відповідних HSP для підтримання плодючості рослин на високому рівні. Таке припущення щодо мутантів *hsp90* узгоджується з даними Sangster et al. (2007), які показали зниження загальної маси насіння з однієї рослини у T-ДНК- і RNAi-ліній HSP90.

Визначення коефіцієнтів варіації (CV) неперервних кількісних ознак також продемонструвало високіший рівень міжіндивідуальної варіабельності у мутантів *hsp* порівняно з диким типом за винятком співвідношення довжин пластинки/черешка найдовшого листка розетки (табл. 6.11). Така закономірність підтверджує припущення Sangster et al. (2008 b) про те, що

практично кожна кількісна морфологічна ознака, яка є результатом експресії локусів кількісних ознак, може бути залежною від HSP90. Показово, що коефіцієнт варіації дискретної кількісної ознаки – числа листків розетки – мало відрізнявся або не відрізнявся від такого у дикого типу.

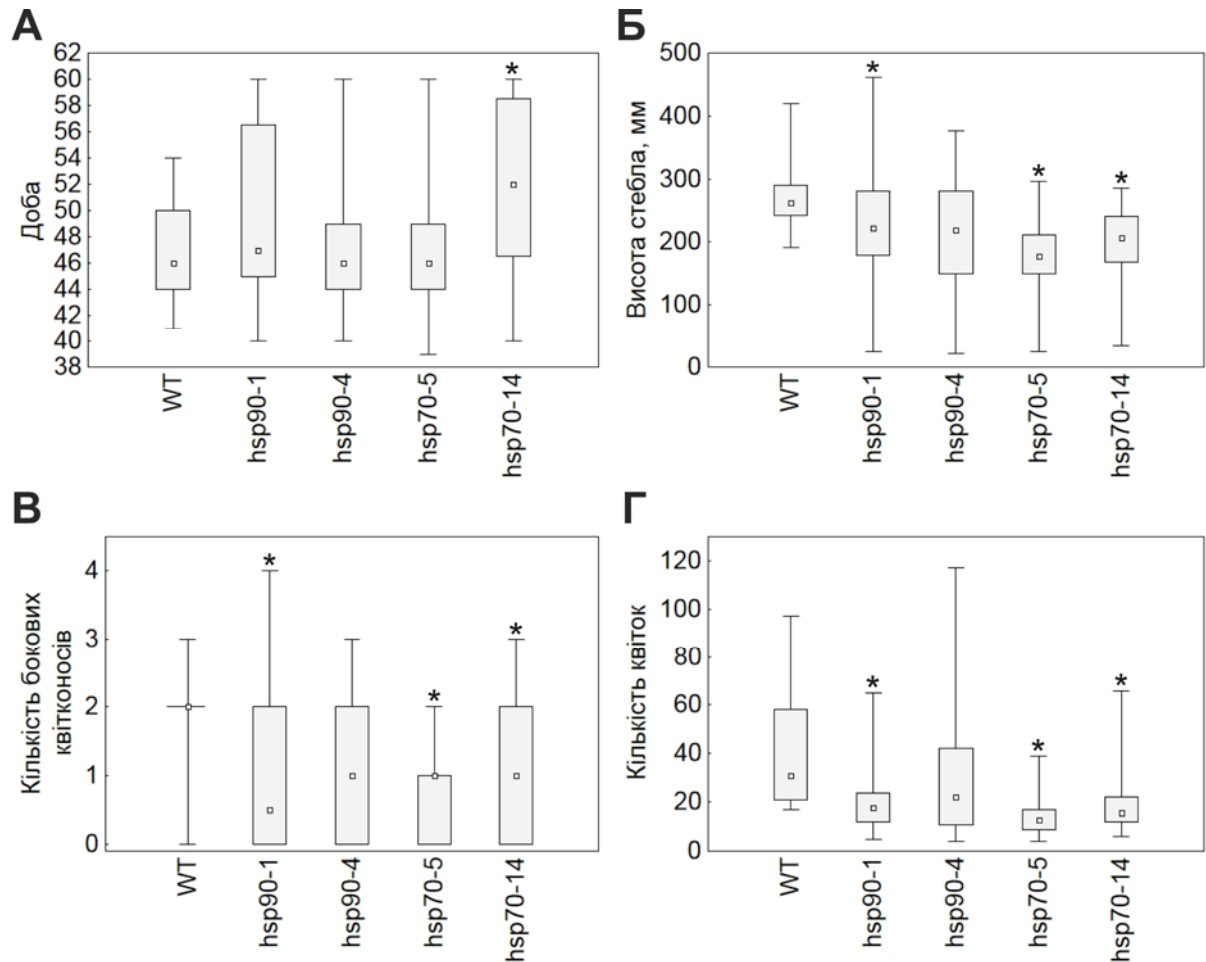


Рис. 6.24. Тривалість вегетації до закінчення цвітіння першого квітконосу та фенотипічні характеристики рослин *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*: (А) тривалість вегетації до закінчення цвітіння; (Б) висота першого квітконосу; (В) кількість бокових гілок на ньому; (Г) кількість квіток (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

**Варіабельність ростових характеристик рослин *A. thaliana* дикого типу
(WT, Col-0) і нокаут-мутантів**

Показник	Коефіцієнт варіації (CV), %				
	WT	<i>Athsp90-1</i>	<i>Athsp90-4</i>	<i>Athsp70-5</i>	<i>Athsp70-14</i>
Початок цвітіння					
Тривалість вегетативного періоду	12,3	17,4	22,8	26,1	22,3
Діаметр розетки	15,7	25,1	28,6	27,2	29,8
Кількість листків розетки	17,7	15,3	15,8	18,1	15,2
Довжина листової пластинки найдовшого листка розетки	15,3	23,5	31,2	28,6	32,0
Ширина листової пластинки найдовшого листка розетки	14,1	21,0	26,6	24,1	32,3
Довжина черешка найдовшого листка розетки	22,6	28,8	35,8	25,9	31,1
Довжина листової пластинки / довжина черешка	18,3	15,9	18,8	14,7	13,9
Кінець цвітіння першого квітконосу					
Тривалість періоду вегетації	8,2	13,8	13,1	12,5	12,6
Висота першого квітконосу	25,1	37,8	43,1	41,0	29,3
Кількість квітучих бокових гілок на першому квітконосі	41,4	120,6	97,4	110,5	110,3
Кількість квіток на першому квітконосі	63,3	63,8	84,2	59,9	71,0

Вважається, що коефіцієнт варіації однієї кількісної ознаки між схожими модулями одного індивідууму (флуктуюча асиметрія) показує *абсолютну величину фенотипічної мінливості*, тобто внутрішньої нестабільності або внутрішнього шуму розвитку (Falconer, 1981; Григорьева, Черданцев, 2012). Так, рівень внутрішньої нестабільності в *A. thaliana* може бути визначений окремо для кожної рослини шляхом вимірювання коефіцієнта варіації довжини стебла між першими 5 стручками першого квітконосу (Sangster et

al., 2008 b). Визначення цього показника в нашому експерименті показало достовірне зниження центральної тенденції CV у ліній *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* і тенденцію до зниження у *Athsp90-4* (рис. 6.25). Це може бути інтерпретовано як зниження рівня внутрішньої нестабільності при порушенні експресії відповідних *HSP*. Такий результат для HSP90 кардинально відрізняється від даних Sangster et al. (2008 b), які показали збільшення CV цієї ознаки при зниженні загального рівня експресії генів цитозольних HSP90 у RNAi-ліній *A. thaliana*. Результати аналізу асиметрії білатеральних ознак *Drosophila* при інгібуванні HSP90, навпаки, привели Milton et al. (2003) до висновку про незалежність флюктуючої асиметрії від функціонування HSP90. Можна припустити, що такий різнобій результатів обумовлюється особливостями об'єктів і способом зниження кількості / активності пулу HSP90. Це вказує на необхідність подальших системних досліджень цього питання.

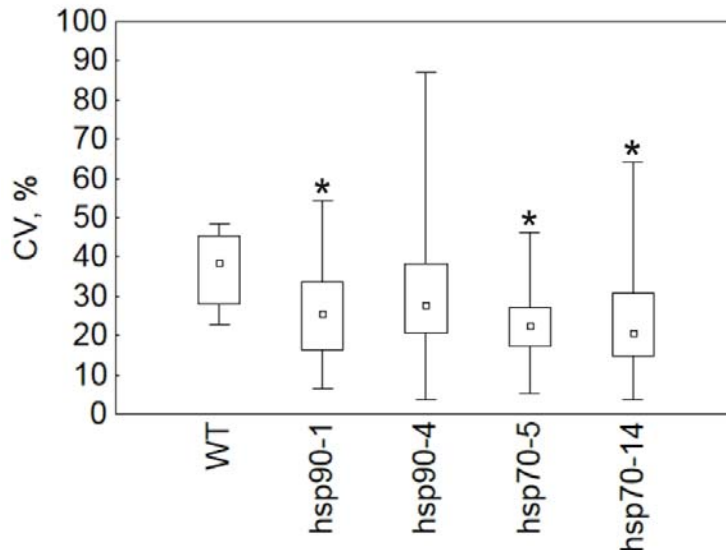


Рис. 6.25. Коефіцієнт варіації довжини перших чотирьох міжвузлів між стручками першого квітконосу під час закінчення цвітіння рослин *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*. Ме [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення. (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантною лінією (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Водночас в нашому експерименті разом зі зниженням центрального значення CV мутантні лінії *hsp* мали більший розкид його значень порівняно з диким типом, найбільший у *Athsp90-4*. Тобто всередині кожної лінії з'являлися особини, у яких варіабельність (нестабільність) довжини міжвузлів значно відрізнялася від середнього рівня. Виходячи з цього, можна припустити, що відповідні HSP можуть бути необхідні для підтримання оптимального рівня внутрішньої (не)стабільності ростових процесів.

Таким чином, аналіз нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* протягом онтогенезу продемонстрував посилення варіабельності темпів розвитку і ростових показників та в багатьох випадках зміщення центральної тенденції. Це свідчить про вагомість відповідних HSP для підтримання певного, ймовірно, оптимального рівня темпів росту і розвитку. Участь цих шаперонів у стабілізації ростових процесів також підтверджується більш високими порівняно з диким типом значеннями коефіцієнта варіації CV за більшістю ознак. Виключенням стали співвідношення довжин пластинки/черешка найдовшого листка розетки і число листків розетки, CV яких у мутантів виявилось або меншим, або близьким до дикого типу, що може свідчити про різний ступінь каналізованості ознак і вплив на нього шаперонів.

Зниження кореляції між тривалістю вегетативної фази розвитку та кількістю листків розетки у мутантів *hsp90* і відсутність різниці у мутантів *hsp70* порівняно з диким типом вказує на залучення HSP90, на відміну від HSP70, до стабілізації темпів формування розетки.

Відмінності між мутантними лініями за різними показниками вказують на певну специфічність функціонування HSP90 і HSP70. Так, лінія *Athsp70-5* характеризувалась найменшими значеннями більшості абсолютних показників. Зміщення центральної тенденції та збільшення розкиду даних спостерігали також у мутанта за індукбельним AtHSP90-1. Такі результати вказують на вплив цих індукбельних HSP на процеси росту і розвитку протягом онтогенезу за нормальних умов середовища.

Визначення абсолютної величини фенотипічної мінливості (внутрішньої нестабільності) шляхом вимірювання CV довжини стебла між першими 5 стручками квітконосу показало достовірне зниження центральної тенденції разом з більшим розкидом його значень у мутантних ліній порівняно з диким типом. Це дозволяє припускати, що функціонування відповідних HSP90 і HSP70 необхідне для підтримання оптимального рівня внутрішньої нестабільності ростових процесів.

6.2.3. Роль окремих HSP90 і HSP70 у пластичних реакціях проростків *A. thaliana*

Для дослідження участі HSP в пластичних реакціях проведено серію експериментів щодо функціонування окремих HSP90 і HSP70 у ростових реакціях проростків на гравітацію та світло – головних факторів, які визначають орієнтацію росту рослин у просторі. Як відомо, ріст стебла спрямований до світла й проти вектору гравітації, тоді як корінь росте за напрямком вектору гравітації й від світла. Тому форма і просторове розташування рослини регулюються, головним чином, кооперацією процесів гравітропізму і фототропізму (Correl, Kiss, 2002; Molas, Kiss, 2009; Kiss, 2014). Стосовно пластичних реакцій на гравітацію в роботі використано два підходи. Класичним підходом є утворення гравітропічного вигину осьових органів у відповідь на зміну розташування рослини відносно вектору гравітації (Холодный, 1927, 1935; Went, 1974; Сытник и др., 1984; Masson et al., 2002). В процесі еволюції у рослин виник механізм гравітропізму, який забезпечує певну, очевидно, оптимальну швидкість утворення вигину осьових органів, зокрема, кореня (Меркис, 1990; Ishikawa, Evans, 1997; Masson et al., 2002; Soga, 2010). Молекулярні механізми забезпечення стабільності цього процесу з'ясовано не повністю. Зокрема, дані стосовно змін гравітропічної реакції кореня при інгібуванні HSP90 антибіотиком в екотипах та інбредних лініях *A. thaliana* дозволили розглядати ці шаперони як фактор стабілізації процесу (Queitsch et al., 2002). Це припущення

підкріплюється також даними про те, що субстратами HSP90 є білки, задіяні в трансдукції ауксинового сигналу і регуляції ростових процесів, які забезпечують утворення вигину (Додаток А). Інший підхід – кліноостатування дозволяє симулювати окремі ефекти мікрогравітації за наземних умов, коли гравісенсорні системи рослини не здатні сприймати гравітаційний стимул, що призводить до дезорієнтації росту (Сытник и др., 1984; Меркис, 1990; Kordyum, 2014). Для вивчення пластичних реакцій на світло використано три режими, які викликають контрастні відповіді. За нормальної інтенсивності освітлення у проростків дводольних формується короткий гіпокотиль і довге коріння. Класичним прикладом пластичності фенотипу є ріст проростка у темряві, коли формується видовжений етіольований гіпокотиль і вкорочений корінь (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2008 a). Ріст етіюльованих проростків, з одного боку, є високо чутливим до світла низької інтенсивності, а з іншого, може модифікуватися низьким рівнем або відсутністю гравітаційного навантаження (Kiss, 2014).

Виходячи з цього, в серії експериментів з нокаут-мутантами *A. thaliana* нами вивчалось функціонування окремих HSP90 і HSP70 у ростових реакціях проростків на зміни розташування рослин відносно напрямку гравітаційного вектору за різних умов освітлення:

- Стаціонарні умови / освітлення (контроль);
- Кліноостатування / освітлення;
- Стаціонарні умови / темрява;
- Кліноостатування / темрява;
- Кліноостатування / точкове джерело світла низької інтенсивності;
- Гравітропічна реакція кореня / темрява.

6.2.3.1. Ріст проростків нокаут-мутантів *hsp* за нормальних умов

Аналіз довжини осьових органів проростків дикого типу і нокаут-мутантів *hsp*, що зростали у вертикальному положенні за стаціонарних умов і нормального освітлення (100 мкмоль/м²с), виявив більш низькі темпи росту

гіпокотилія у ліній *Athsp90-1* і *Athsp70-5* та кореня у ліній *Athsp90-1*, *Athsp90-4* і *Athsp70-5* порівняно з диким типом (рис. 6.26). Разом з тим, гіпокотиль у *Athsp90-4* та гіпокотиль і корінь у *Athsp70-14* достовірно не відрізнялися від дикого типу за медіаною, проте мали більший розкид за квартілями та екстремальними значеннями. Проростки всіх мутантів також характеризувалися більшою варіабельністю за співвідношенням довжин гіпокотиль/корінь.

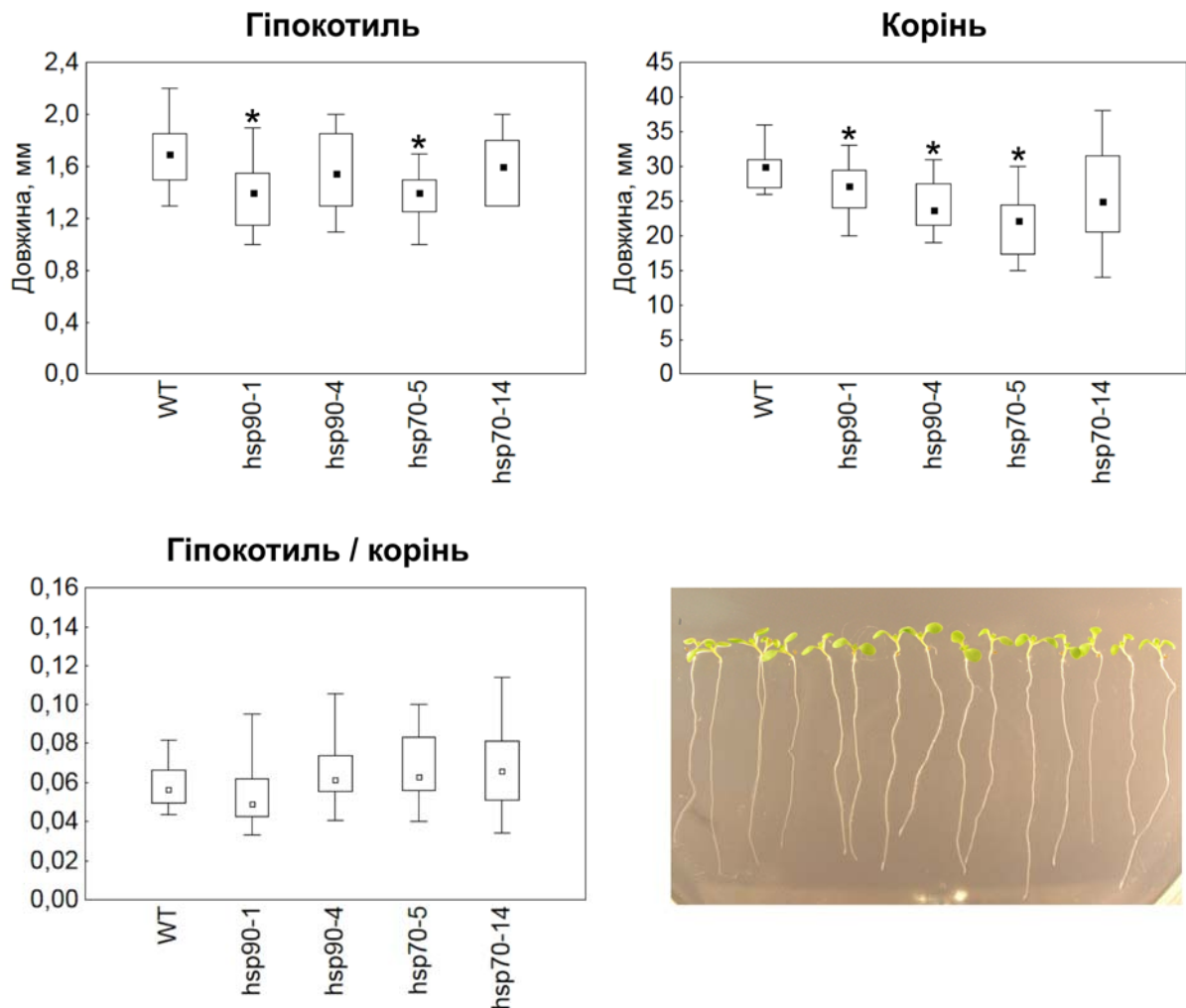


Рис. 6.26. Довжини гіпокотилія і кореня та їх співвідношення у 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*, що зростали за стаціонарних умов і освітлення (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантом (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$). На фотографії наведено типові фенотипи проростків.

6.2.3.2. Ріст проростків нокаут-мутантів *hsp* при кліноостатуванні

Кліноостатування при нормальному освітленні призводило до дезорієнтації росту проростків усіх ліній та посилення варіабельності за всіма показниками проростків мутантів *hsp* порівняно з диким типом (рис. 6.27).

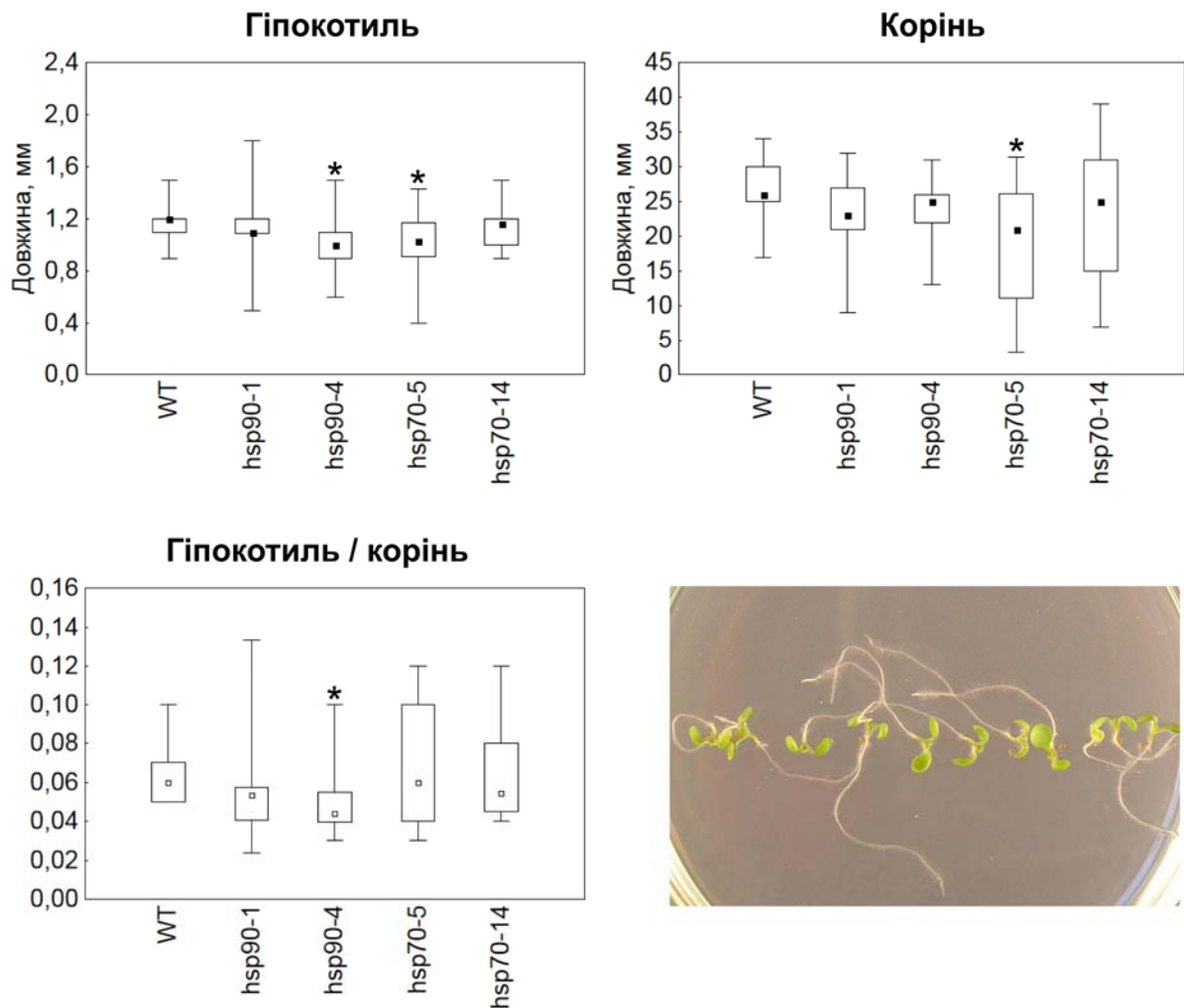


Рис. 6.27. Довжини гіпокотиля і кореня та їх співвідношення у 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*, що зростали при кліноостатуванні та освітленні (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантом (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$). На фотографії наведено типові фенотипи проростків.

Проростки лінії *Athsp90-4* мали меншу довжину гіпокотилля, що давало менше співвідношення довжин гіпокотиль/корінь. Лінія *Athsp70-5* відрізнялась меншою довжиною як гіпокотилля, так і кореня, при цьому зниження ростової активності виявилось нескоординованим, результатом чого стала висока варіабельність співвідношення їх довжин. Лінія *Athsp70-14* показала високу варіабельність за довжиною кореня та, відповідно, співвідношенням довжин гіпокотиль/корінь.

6.2.3.3. Ріст проростків нокаут-мутантів *hsp* за стаціонарних умов у темряві

Відсутність світла призводила до формування у всіх ліній етіюльованих проростків з видовженим гіпокотилем і вкороченим коренем (рис. 6.28). При цьому всі мутанти відрізнялись від дикого типу більшим розкидом значень. Разом з тим, центральна тенденція довжини гіпокотилля у ліній *Athsp90-1*, *Athsp90-4* і особливо у *Athsp70-5* була достовірно меншою за цей показник у дикого типу. У *Athsp90-4* невелика частина проростків мала редукований ріст окремих органів або всього проростка. У *Athsp70-14* з'являлись як проростки з вкороченими органами, так і проростки з довгим корінням.

Слід зазначити, що дані відносно менших розмірів гіпокотилля етіюльованих проростків *Athsp90-1* і *Athsp90-4* узгоджуються з даними інших дослідників, які показали зниження ростової активності гіпокотилля *A. thaliana* у темряві при інгібуванні функціональної активності HSP90 антибіотиком ГДА (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2008 a). Оскільки ступінь зниження у різних екотипів та інбредних ліній був різним, авторами зроблено висновок про генетичну детермінованість ефекту ГДА на розтяг гіпокотилля (Queitsch et al., 2002). Показана залежність від HSP90 локусів кількісних ознак, пов'язаних з цією реакцією. Визначено меншу чутливість до ГДА росту коренів за відсутності світла (Sangster et al., 2008 a). Разом все це показує суттєвість як загального рівня активності клітинного пулу HSP90 для стабілізації пластичної реакції, так і окремих його членів.

Виявлені нами менша довжина гіпокотиля у проростків *Athsp70-5* і висока гетерогенність за розмірами органів проростків *Athsp70-14* вказують на те, що шаперони HSP70 також можуть специфічним чином впливати на стабілізацію росту за відсутності світла.

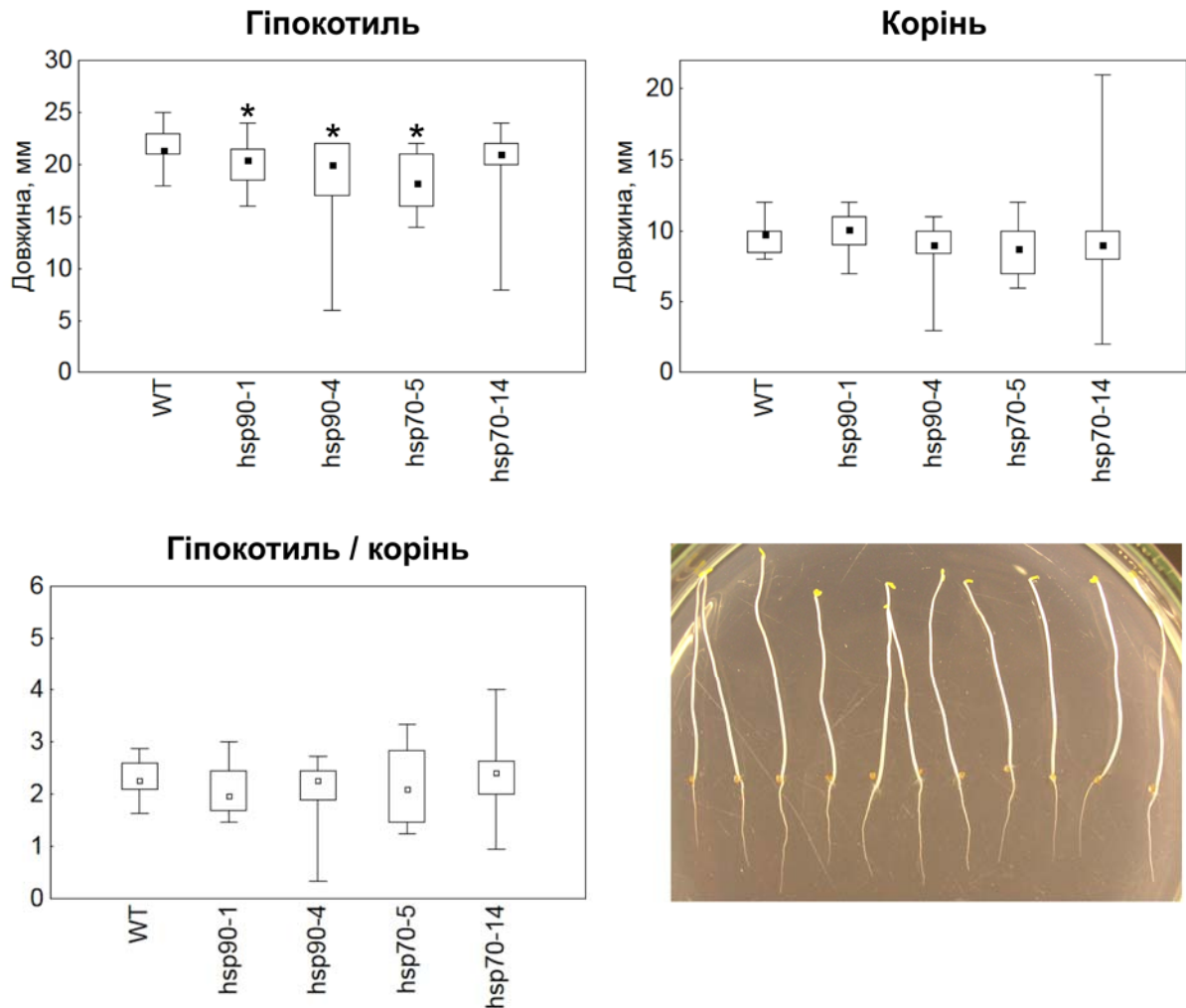


Рис. 6.28. Довжини гіпокотиля і кореня та їх співвідношення у 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*, що зростали за стаціонарних умов у темряві (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантом (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$). На фотографії наведено типові фенотипи проростків.

6.2.3.4. Ріст проростків нокаут-мутантів *hsp* при кліноостатуванні у темряві

Кліноостатування за відсутності світла призводило до формування етіологованих проростків з дезорієнтованим ростом (рис. 6.29). Аналіз ростових характеристик виявив їх значну варіабельність у мутантних ліній порівняно з диким типом та водночас певні зміни центральної тенденції.

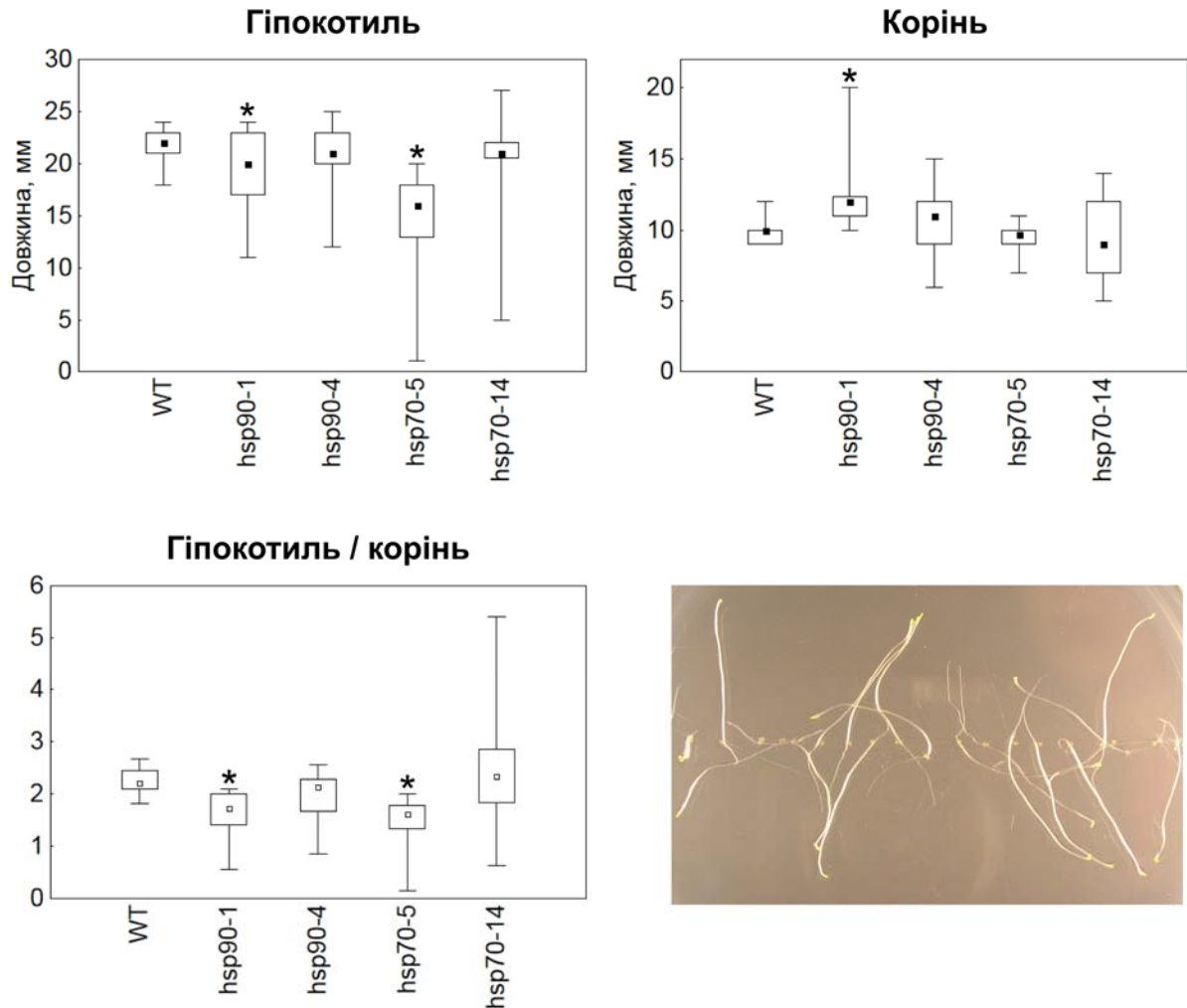


Рис. 6.29. Довжини гіпокотиля і кореня та їх співвідношення у 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*, що зростали при кліноостатуванні у темряві (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантом (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$). На фотографії наведено типові фенотипи проростків.

Так, лінія *Athsp90-1* характеризувалась меншою довжиною гіпокотиля і більшою довжиною кореня порівняно з диким типом. Суттєве зменшення довжини гіпокотиля, в окремих випадках навіть до редукції органу, виявляли й у проростків *Athsp70-5*. Обидва мутанти характеризувалися достовірним зниженням співвідношення довжин гіпокотиль/корінь. Слід також відмітити значну гетерогенність за розмірами органів та їх співвідношенням при збереженні центральної тенденції у проростків *Athsp70-14*.

6.2.3.5. Ріст проростків нокаут-мутантів *hsp* при кліноостатуванні з точковим джерелом світла низької інтенсивності

Точкове джерело світла низької інтенсивності імітували потоком світла, що проходив через отвір діаметром 5 мм у фользі, в яку було загорнуто чашку з проростками (~ 0,05 мкмоль/с на чашку). Отвір знаходився збоку чашки на перпендикулярі до лінії розташування насіння (див. схему, рис. 3.2). Таке освітлення за умов кліноостатування індукувало фототропізм етіолозованих проростків, певне гальмування розтягу гіпокотиля, посилення росту кореня та позеленіння малих за розмірами сім'ядоль у всіх ліній (рис. 6.30, порівняння з рис. 6.29). Отже, малої кількості світла вистачило для орієнтації росту проростків за неможливості сприйняття гравітаційного стимулу, що підтверджує високу світлочутливість процесів фототропізму (Kiss, 2014).

При цьому мутантні проростки відрізнялись від дикого типу більшою варіабельністю за формою та розташуванням у просторі, навіть до відсутності фототропічної реакції у окремих особин, що вказує на суттєвість відповідних HSP для її підтримання. З іншого боку, мутантні лінії характеризувались сильнішим, ніж у дикого типу, гальмуванням розтягу гіпокотиля під впливом світла низької інтенсивності.

Зміни ростової активності кореня, на відміну від гіпокотиля, виявились неоднозначними. Проростки *Athsp90-1* відрізнялись від дикого типу більшою довжиною кореня, як і у варіанті з кліноостатуванням за відсутності світла.

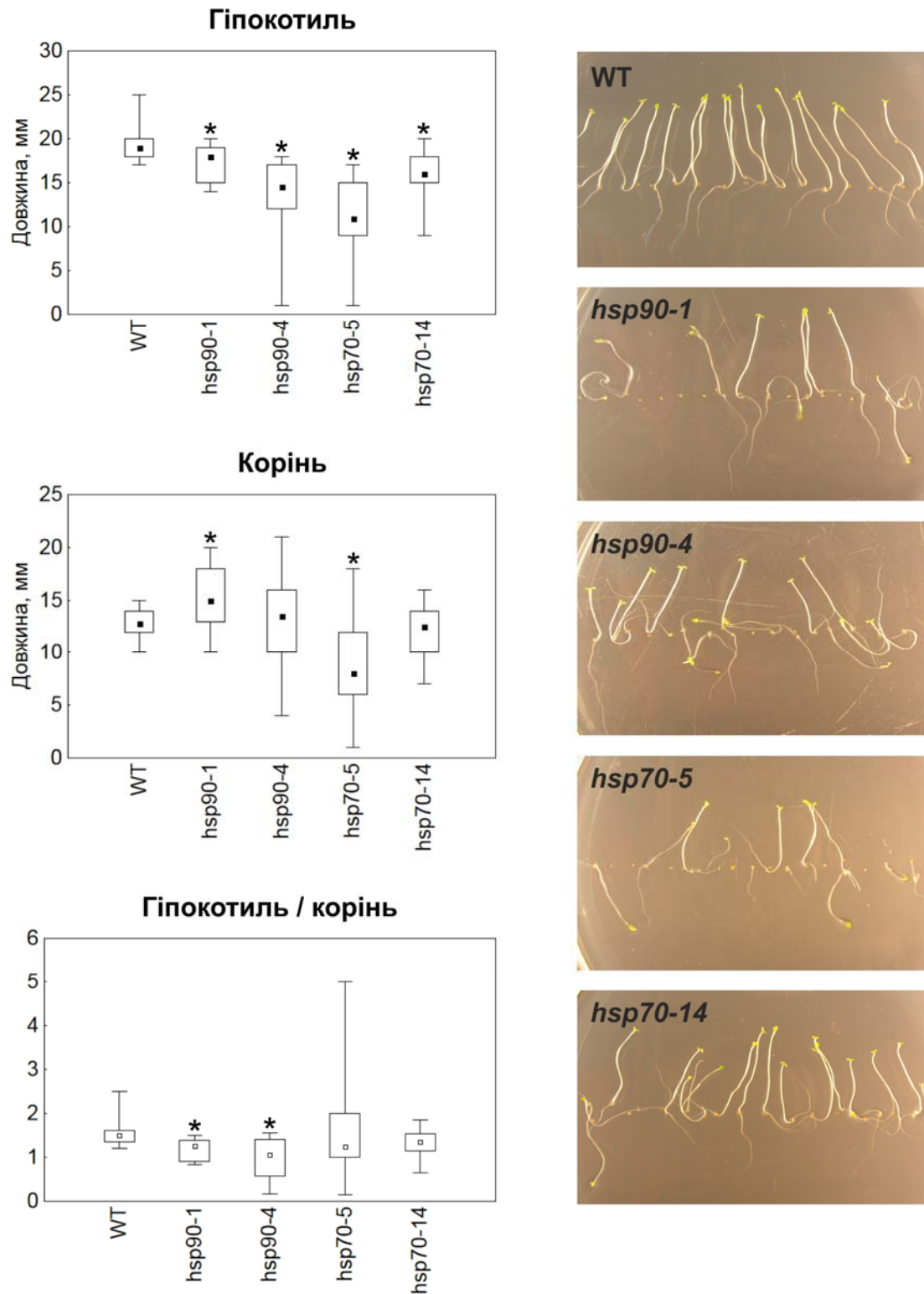


Рис. 6.30. Ростові характеристики та фенотипи 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*, що зростали при кліностагуванні з точковим джерелом світла (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантом (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$). На фотографіях наведено типові фенотипи проростків.

Проростки *Athsp70-5*, навпаки, мали коротший, ніж у дикого типу, корінь. У ліній *Athsp90-1* і *Athsp90-4* визначено достовірне зниження співвідношення довжин гіпокотиль/корінь. Ці дані узгоджуються з даними про різницю у світлочутливості гіпокотилія та кореня за умов редукованої гравітації (Kiss, 2014). Слід також відмітити більш високу варіабельність всіх мутантів за довжиною осьових органів за таких умов.

Порівнюючи ці ефекти, можна зробити висновок, що одночасне посилення гальмування розтягу гіпокотилія під впливом світла у мутантних ліній, відмінності в рості кореня, зниження в них ступеню стабільності/каналізованості фототропічної реакції (висока варіабельність просторового розташування органів проростків) свідчить про відмінності у шляхах впливу шаперонів на зміни ростової активності окремих органів, а також на здатність проростків орієнтувати свій ріст відносно світла. Для HSP90 це можна пояснити їх необхідністю для функціонування білків-клієнтів, залучених до різних регуляторних шляхів (див. Додаток А). Наприклад, до субстратів HSP90 відносяться компоненти стероїдного сигналіngu, порушення якого призводить до зниження чутливості до світла і ростових реакцій (Yin et al., 2002; Lachowiec et al., 2013; Shigeta et al., 2014), і трансдукції сигналу ауксину, який відповідає за регуляцію гравітропічної реакції (Wang et al., 2016; Watanabe et al., 2016, 2017). Відмітимо також, що нами вперше виявлено залежність ступеню і стабільності ростових реакцій від шаперонів HSP70.

6.2.3.6. Гравітропічна реакція нокаут-мутантів *hsp*

Для аналізу гравітропічної реакції використано проростки, що росли у темряві, з метою унеможливлення впливу фототропізму (рис. 6.31). Вимірювання кута гравітропічного вигину кореня показало збереження центральної тенденції при збільшенні діапазону значень у мутантів порівняно з диким типом (рис. 6.32). Лінії *Athsp70-5* і *Athsp70-14* характеризувалися невеликим збільшенням розкиду даних (CV відповідно

34,6 % і 34,0 %; у дикого типу – 31,2 %). Варіабельність цього показника у ліній *Athsp90-1* і *Athsp90-4* виявилася значно більшою (CV відповідно 62,6 % і 53,9 %). Корені 10,8% проростків *Athsp90-1* і 2,4% проростків *Athsp90-4* проявляли негативну гравітропічну реакцію. Чутливість цієї реакції до загального рівня активності HSP90 раніше показана в умовах інгібування цих шаперонів антибіотиками (Queitsch et al., 2002). Такі результати вказують на те, що цитозольні HSP90 важливі для утворення позитивного гравітропічного

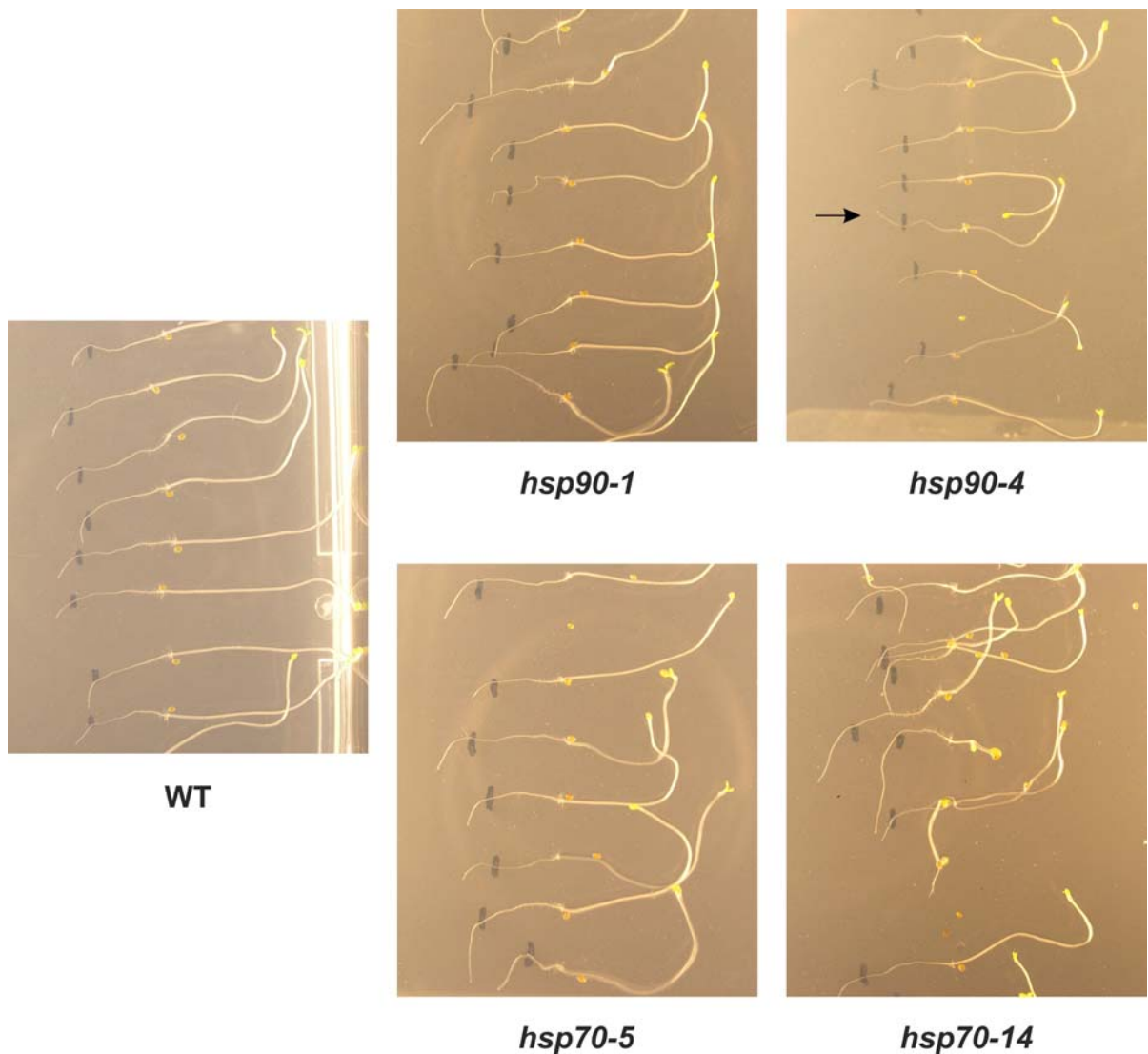


Рис. 6.31. 6-добові етіюльовані проростки *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* після 2 діб гравістимуляції. Стрілкою вказано корінь з негативною гравітропічною реакцією.

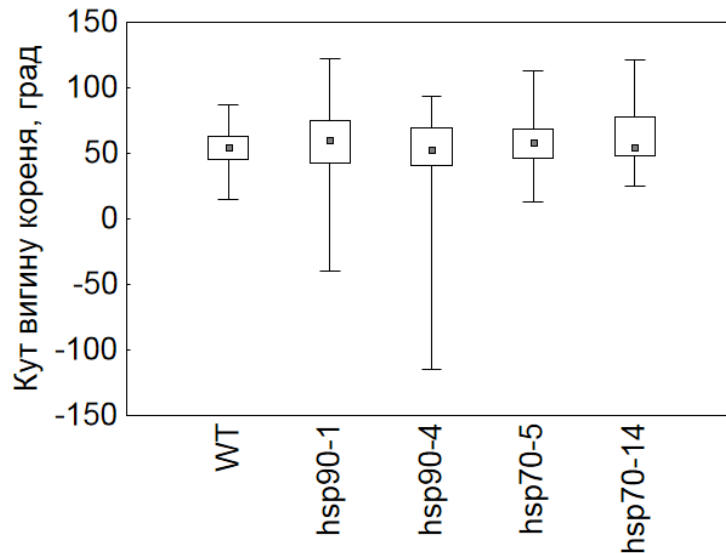


Рис. 6.32. Кут гравітропічного вигину кореня проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). Різниця між варіантами недостовірна (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$).

вигину кореня. Водночас посилення варіабельності цієї ознаки у всіх мутантів порівняно з диким типом вказує на участь як HSP90, так і HSP70 у підтриманні певного рівня стабільності цієї пластичної реакції. В цьому відношенні особливу увагу привертає до себе значна варіабельність за розмірами, формою та просторовим розташуванням фенотипів *Athsp70-14*, що дозволяє припускати особливий внесок AtHSP70-14 у стабілізацію та орієнтування росту відносно вектора гравітації за відсутності світла.

Для того, щоб сфокусувати увагу на пластичності окремих органів і значенні для цієї пластичності окремих HSP, результати описаних у даному підрозділі експериментів представлено також у вигляді середніх значень, їх стандартних відхилень (рис. 6.33) і коефіцієнтів варіації (табл. 6.12). Гістограми наочно ілюструють, що головним фактором, який визначав ростову активність органів, було світло. Різниця між варіантами з етіюльованими проростками, що росли у темряві чи при освітленні низької інтенсивності, та проростками, що росли за нормального освітлення, була достовірною у всіх ліній. Вплив зміненої гравітації на активність росту

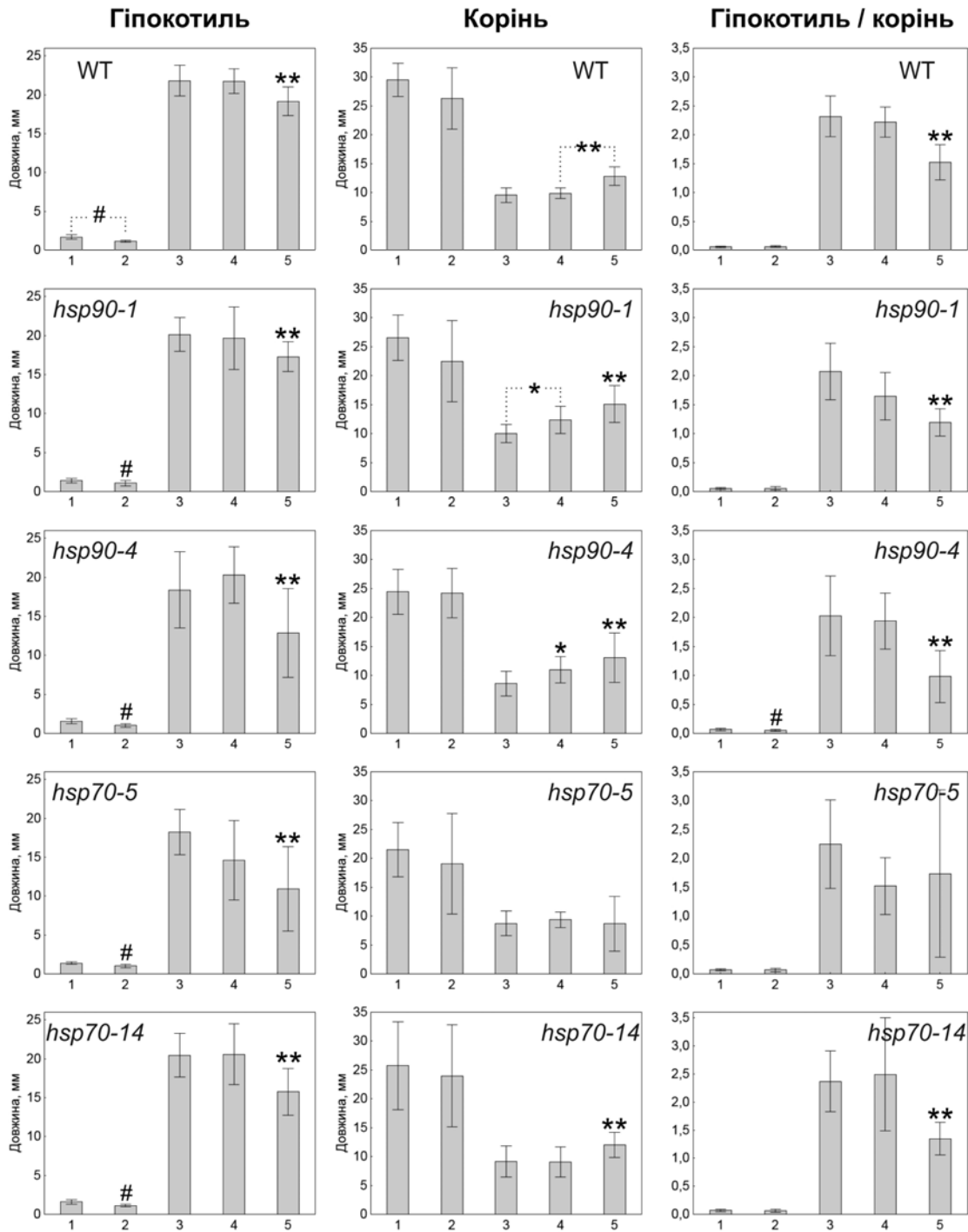


Рис. 6.33. Довжини гіпокотиля і кореня та їх співвідношення у 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* за наступних умов: 1 – стаціонарні умови, освітлення (контроль); 2 – кліностакування, освітлення; 3 – стаціонарні умови, темрява; 4 – кліностакування, темрява; 5 – кліностакування, точкове джерело світла низької інтенсивності. (#) статистично достовірний ефект кліностакування при освітленні (різниця між варіантами 1 і 2); (*) статистично достовірний ефект кліностакування у темряві (різниця між варіантами 3 і 4); (**) статистично достовірний ефект світла низької інтенсивності при кліностакуванні (різниця між варіантами 4 і 5) (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$).

Варіабельність ростових характеристик проростків *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів

Варіант	Показник	Коефіцієнт варіації (CV), %				
		WT	<i>Athsp90-1</i>	<i>Athsp90-4</i>	<i>Athsp70-5</i>	<i>Athsp70-14</i>
1 g, світло	Г	16,4	21,0	20,1	13,1	16,4
	К	9,7	14,8	15,8	22,0	29,5
	Г/К	19,5	32,0	28,9	26,9	36,1
Кліноостатування, світло	Г	11,1	32,5	20,4	23,5	16,6
	К	20,1	31,1	17,7	45,7	36,8
	Г/К	22,8	52,1	38,0	44,2	37,9
1 g, темрява	Г	9,1	10,8	26,5	15,9	13,7
	К	12,9	15,4	24,5	24,7	29,3
	Г/К	15,1	23,5	34,0	34,3	23,0
Кліноостатування, темрява	Г	7,1	20,4	17,9	35,0	19,0
	К	9,1	18,8	20,8	14,2	28,5
	Г/К	11,8	24,9	25,0	32,1	40,4
Кліноостатування, точкове джерело світла	Г	9,6	11,0	44,1	49,7	19,2
	К	12,5	21,2	32,9	54,8	18,1
	Г/К	20,1	19,8	45,4	83,5	21,7
Гравітропічний вигин кореня	Кут	31,2	62,6	53,9	34,6	34,0

Примітка. Г – довжина гіпокотиля; К – довжина кореня; Г/К – співвідношення довжин гіпокотиля і кореня.

скоріше можна визначити як модулюючий. Так, у всіх ліній кліноостатування при освітленні призводило до формування гіпокотиля меншої довжини, порівняно із стаціонарними умовами. Можна також відмітити певну тенденцію до зменшення довжини кореня при кліноостатуванні, проте завдяки значним варіаціям показника різниця виявилась недостовірною. Достовірним ефектом при кліноостатуванні у темряві була більша довжина кореня у проростків *Athsp90-1* і *Athsp90-4*. Світло слабкої інтенсивності при кліноостатуванні викликало часткове гальмування розтягу гіпокотиля у всіх ліній і прискорення росту кореня у всіх ліній окрім *Athsp70-5*, порівняно з варіантом кліноостатування без світла. При цьому співвідношення довжин гіпокотиль/корінь виявилось меншим у всіх мутантів за виключенням *Athsp70-5*, що може вказувати на важливість останнього для підтримання ростової реакції кореня при освітленні.

З аналізу даних цього підрозділу випливає, що головним фактором, який регулює активність ростових процесів окремих органів та їх координацію, є світло, тоді як гравітація певним чином модулює ці процеси. Проте гравітація є рівноцінним зі світлом регулятором орієнтації росту. Дефіцит за окремими HSP70 і HSP90, не змінюючи кардинально регуляцію росту проростків за різного впливу гравітації та за різних умов освітлення, в багатьох варіантах призводив до зміщення центральної тенденції ростових показників, тобто викликав прискорення або гальмування росту, та, як правило, - до значного посилення варіабельності фенотипів. Про останнє свідчать більші діапазони розкиду даних та коефіцієнти варіації порівняно з диким типом (рис. 6.26–6.33, табл. 6.12). Це вказує на вагомість як *AtHSP90-1*, *AtHSP90-4*, так і *AtHSP70-5*, *AtHSP70-14* для стабілізації пластичних реакцій різних органів на необхідному (очевидно, оптимальному) рівні, їх координації між собою та орієнтації у просторі.

Результати аналізу вказують на певні особливості функціонування окремих HSP. Наприклад, зміни ростових показників у мутантів *Athsp90-1* і *Athsp90-4* були специфічними стосовно органів та зовнішніх чинників, що можна пояснити залежністю від відповідних шаперонів певних субстратів. Порушення експресії *AtHSP70-5* у більшості варіантів призводило до зниження ростової активності. Мутація по *AtHSP70-14*, навпаки, мало впливала на центральну тенденцію ростових показників, проте значно збільшувала діапазон їх розкиду.

Отримані дані також дозволяють певним чином розмежувати вплив HSP на рівень пластичних реакцій та їх здатність до стабілізації ростових процесів. Яскравим прикладом можуть служити ефекти світла низької інтенсивності при кліноостатуванні: посилення у мутантів гальмування розтягу гіпокотила під впливом світла та, разом з тим, зниження стабільності фототропічної реакції. З іншого боку, аналіз гравітропічної реакції показав, що дефіцит за окремими HSP призводив до збільшення розкиду значень, але

не викликав зміщення центральної тенденції гравітропічного вигину кореня, особливо у мутантів по HSP90.

Висновки до розділу 6

Викладені у розділі результати досліджень, у цілому, підтверджують участь шаперонів HSP90 у стабілізуванні/каналізуванні онтогенезу рослин.

На значення загальної активності HSP90, а також окремих HSP90 і HSP70 для стабілізації росту і розвитку рослин за нормальних умов, тобто за дії стохастичних процесів, вказують:

- Розширення діапазону темпів росту проростків екотипів *A. thaliana*, збільшення частки проростків з вираженими морфологічними відхиленнями, посилення їх різноманітності та складності в результаті обробки хімічно незалежними інгібіторами HSP90;
- Зниження стабільності темпів формування листків розетки в результаті обробки інгібітором HSP90;
- Затримка переходу рослин до цвітіння після обробки інгібітором HSP90 та у нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14*;
- Посилення варіабельності темпів росту, форми і розмірів проростків, а також кількості, форми, абсолютних і відносних розмірів окремих органів (в основному, в рамках нормального фенотипу) у всіх нокаут-мутантів *hsp* порівняно з диким типом;
- Збільшення розкиду значень CV довжини стебла між першими 5 стручками квітконосу (посилення абсолютного рівня внутрішньої нестабільності) у всіх нокаут-мутантів *hsp*;
- Зниження ростової активності проростків у *Athsp70-5*.

На участь окремих HSP90 і HSP70 у підтриманні пластичних реакцій вказує:

Зміни ступеню реакції (центральної тенденції)

- Менша довжина гіпокотилія і більша довжина кореня при кліностатуванні з точковим джерелом світла (посилення світлочутливості) у всіх нокаут-мутантів *hsp*;

- Менша довжина гіпокотила і більша довжина кореня, та менша величина їх співвідношення у *Athsp90-1* при кліноостатуванні у темряві;
- Менша довжина гіпокотила у *Athsp90-4* при кліноостатуванні та освітленні;
- Менша довжина осьових органів проростка у *Athsp70-5* за дії всіх чинників.

Зміни стабільності реакції (розкиду даних)

- Більша варіабельність довжин гіпокотила і кореня та їх співвідношення у всіх нокаут-мутанів *hsp* за дії всіх досліджених чинників;
- Більша варіабельність довжин гіпокотила і кореня при збереженні їх співвідношення у всіх нокаут-мутанів *hsp* при кліноостатуванні з точковим джерелом світла;
- Значне посилення варіабельності гравітропічної реакції кореня при збереженні центральної тенденції у всіх нокаут-мутанів *hsp* (в окремих проростках *hsp90* – негативна реакція);
- Поява проростків з редукованим ростом органів у *Athsp90-4* при стаціонарному рості у темряві;
- Поява проростків як з редукованим ростом гіпокотила і кореня, так і проростків з довгим корінням у *Athsp70-14* при стаціонарному рості у темряві;
- Значна варіабельність фенотипів проростків за розмірами осьових органів та їх просторовим розташуванням у *Athsp70-14* при гравістимуляції у темряві.

На значення загальної активності HSP90 для стабілізації нормального росту і розвитку рослин за наявності генетичного поліморфізму вказують:

- Розширення (в результаті обробки хімічно незалежними інгібіторами HSP90 – ГДА і РАД) діапазону темпів росту, збільшення частки особин з вираженими морфологічними відхиленнями, посилення їх різноманітності та складності у проростків *A. thaliana*, вирощених з

насіння рослин природних популяцій, а також після опромінення насіння екотипів УФ-В і γ -радіацією;

- Збільшення частки непророслого насіння в результаті обробки ГДА і одночасне зменшення частки проростків з тотальними порушеннями.

Слід також відмітити, що кожна мутантна лінія *hsp* мала особливості за спектром і ступенем фенотипічних змін, що вказує на певну специфічність функціонування відповідних HSP90 і HSP70, ймовірно, через відмінності у субстратах і процесах, в яких вони переважно беруть участь. Особливо слід підкреслити наявність фенотипічних змін у нокаут-мутантів за стрес-індуцибельними генами *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5*. Обидва мутанти характеризувалися певними фенотипічними особливостями за нормальних умов: *Athsp90-1* мав найбільшу частку аномальних проростків, *Athsp70-5* показував зниження ростової активності за більшістю показників.

Крім того, відмічено, що фенотипічні аномалії проростків мутантних ліній можуть проявлятися або корегуватися на рівні окремого модуля, що вказує на те, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися дискретно на рівні модуля.

Отримані дані показують, що обробка інгібіторами HSP90 насіння після дії генотоксичних факторів сприяє виявленню на рівні фенотипу залежного від шаперона прихованого генетичного поліморфізму та елімінуванню аберантних фенотипів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Козеко Л.Є. Шаперони HSP90 як стабілізатор росту і формотворення рослин: мікроеволюційний аспект. Фактори експериментальної еволюції організмів, 2016, 18: 42-45.

2. Kozeko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds. Life Sci. Space Res., 2015, 6: 51-58.

3. Козеко Л.Є. Вплив радіколу, інгібітору шаперонів HSP90, на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення насіння. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2015, 1 (34): 14-21.

4. Kozeko L.E. Phenotypic variability of *Arabidopsis thaliana* seedlings as a result of inhibition of Hsp90 chaperones. Cytol. Genet., 2013, 47 (2): 75-87.

5. Козеко Л.Є. Аналіз модульної природи морфозів у нокаут-мутантів *hsp Arabidopsis thaliana* // Міжнародна наукова конференція «Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках України», 25-27 лютого 2019, Київ, Україна, С. 173-174.

6. Kozeko L. HSP90 dependence of plasticity responses to clinorotation and light/darkness in *Arabidopsis* seedlings // 42nd COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2018, Pasadena, CA, USA, F1.1-0014-18, P. 1893.

7. Kozeko L. HSP90s and HSP70s stabilize root gravitropic response in *Arabidopsis* // 39th Annual ISGP Meeting & ESA Space meets Health initiative, 18-22 June 2018, Noordwijk, The Netherlands, P. 259.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В рамках дисертаційної роботи досліджено функціонування молекулярних шаперонів / білків теплового шоку родин HSP70 і HSP90 на різних рівнях – молекулярному, клітинному і організменому – у забезпеченні стабільності та пластичності процесу формування фенотипу рослин як за оптимальних, так і несприятливих умов зовнішнього середовища. Вперше в рамках єдиного комплексного дослідження проаналізовано та узагальнено різні напрямки функціонування шаперонів: 1) їх роль як системи неспецифічної стійкості за змін факторів середовища; 2) здатність цитозольних HSP90 регулювати генну експресію HSP і тим самим контролювати чисельність клітинного пулу шаперонів; 3) роль HSP90 і HSP70 у забезпеченні стабільності та пластичності росту, розвитку і формотворення. На основі отриманих даних і аналізу літературних джерел запропоновано модель, яка поєднує різні функції шаперонів HSP90.

7.1. Характеристика генної експресії HSP70 і HSP90 за різних умов зовнішнього середовища та її зв'язок зі стійкістю рослин

В результаті досліджень даного розділу визначено пластичність генної експресії на рівні транскрипції і трансляції за впливу високої температури, водного дефіциту та затоплення, а також незвичних для рослин змін гравітаційного навантаження та їх зв'язок зі стійкістю організму.

Шляхом системного аналізу кінетики генної експресії багаточленних родин *HSP70* і *HSP90* у модельної рослини *A. thaliana* виявлено специфічні до чинника (висока температура і водний дефіцит) особливості реакції окремих членів. Показано, що в реакції теплового шоку (при 37°C) кінетика експресії мала класичну для стрес-реакції параболоїдну форму залежності зі швидкою (в перші 0,5 год) активацією всіх 12 досліджених генів *HSP70* і 9 генів *HSP90*, які кодують ізоформи з різною субклітинною локалізацією,

серед цитозольних – як конститутивні, так і індукцйбельні. У відповіді рослин на поступовий розвиток водного дефіциту виявлено активацію більшості генів вище певного порогового рівня фактора, який відповідав початку гальмування ростових процесів, проте серед індукцйбельних генів значну активацію показав лише *AtHSP70-4*. В профілях генної експресії визначено особливості стосовно базового рівня, швидкості та ступеня змін, що вказує на специфічний внесок кожного члена у функціонування клітинного пулу шаперонів як за нормальних умов, так і за впливу несприятливих чинників. Зокрема, відмічено високий рівень експресії гена *AtHSP70-1* і сумарно трьох *AtHSP90*, які кодують конститутивні білки цитозолу, що вказує на їх значимість для підтримання протеостазу клітин за будь-яких умов. Такий висновок узгоджується з даними про те, що порушення експресії цих генів призводить до втрати виживаності організму (Sangster et al., 2007; Cazalé et al., 2009). Серед генів, що кодують білки органел, найбільшу реактивність виявлено у мітохондріальних членів.

Відмічено диференційний характер експресії індукцйбельних генів. Зокрема, визначно певний рівень транскрипції *AtHSP70-4* за нормальних умов і швидко потужну індукцію у відповідь на обидва фактори. Два інші індукцйбельні гени *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* майже не експресувалися за нормальних умов, дуже слабо реагували на посилення водного дефіциту, в той час як в реакції теплового шоку їх індукція відбувалась на високому рівні (хоча з меншою, ніж у *AtHSP70-4*, швидкістю). На підставі цього нами зроблено висновок, що *AtHSP70-4* можна вважати основним індукцйбельним членом цих двох родин шаперонів у *A. thaliana*, а *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* – додатковим індукцйбельним компонентом, який є важливим у захисті клітин від протеотоксичних ефектів високої температури, але слабо реагує на водний дефіцит.

Позиція щодо значення додаткового індукцйбельного компонента у забезпеченні стійкості рослинних клітин підтверджена нами за допомогою нокаут-мутантів *Athsp70-5* і *Athsp90-1*. Так, порушення експресії цих генів

призводило до зниження виживаності зародків насіння і проростків за дії потенційно летальних доз високої температури і до більшого пригнічення ростової активності за умов водного дефіциту, порівняно з диким типом і нокаут-мутантами *Athsp70-14* і *Athsp90-4* за генами з конститутивною експресією. Відмічено, що суттєвий внесок *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* у теплостійкість обумовлюється високим рівнем їх індукції в реакції на високу температуру. Проте участь у підтриманні ростової активності за впливу водного дефіциту відповідає вкрай низькому рівню їх експресії. На підставі цього зроблено висновок про важливість навіть невеликих кількостей цих індукцибельних членів для захисту клітин від зневоднення. Визначено, що вплив *AtHSP70-5* на стійкість рослин за дії обох чинників більш значимий, ніж *AtHSP90-1*. Отже, наявність у родини HSP70 *A. thaliana* двох індукцибельних членів, порівняно з одним індукцибельним HSP90, індукція *AtHSP70-4* у відповідь на різні чинники і більший внесок *AtHSP70-5* у стійкість клітин порівняно з *AtHSP90-1* привели нас до висновку про провідну роль шаперонів HSP70, порівняно з HSP90, у забезпеченні стійкості рослин цього виду. Це узгоджується з існуючими уявленнями про HSP70 як головну родину HSP у багатьох видів (Sørensen et al., 2003).

На прикладі двох генів *A. thaliana* нами доведено, що експресія окремих HSP характеризується тканинною локалізацією, що свідчить про певну специфічність функціонування відповідних шаперонів. Інтенсивну експресію гена мітохондріального білка *AtHSP70-10* виявлено в гідатодах і прилистках сім'ядоль і справжніх листків, клітинах кореневої шийки і центрального циліндра кореня. Експресія гена цитозольного білка *AtHSP90-2* детектувалася в усіх органах, на високому рівні – в провідних пучках, паренхімі, гідатодах і прилистках сім'ядоль і справжніх листків. Виявлено варіабельність інтенсивності експресії *AtHSP90-2* між індивідуумами. За впливу високої температури і водного дефіциту визначено зміни в інтенсивності експресії цих генів при загальному збереженні її тканинної локалізації.

За результатами аналізу на рівні білка, проведеного для HSP70 в реакції *A. thaliana* на високу температуру і ґрунтове затоплення, підтверджено параболоїдний характер кінетики синтезу індукцйбельного білка, який за молекулярною масою відповідає *AtHSP70-4*. Це цілком узгоджується із існуючими уявленнями про те, що стресова індукція синтезу HSP70 відбувається у перші хвилини дії фактора, значно посилюється протягом кількох годин, після чого спадає до рівня, близького до початкового, що зазвичай пов'язується з відновленням гомеостазу, тобто «фазою резистентності» стрес-реакції (Маргуліс, Гужова, 2000; Schumann, 2001; Косаківська, 2003). Однак, проведене нами тестування стану рослин після теплової експозиції показало, що в даному випадку зниження вмісту HSP70 в клітинах відповідає пригніченому стану рослин та їх загибелі, тобто «фазі виснаження». Кінетика синтезу HSP70 при затопленні у формі параболи також відповідала обмеженій стійкості рослин даного виду до цього стресора.

Оскільки модельний вид *A. thaliana* характеризується помірним адаптаційним потенціалом, видавалось доцільним перевірити отримані для нього закономірності на видах рослин з іншим діапазоном стійкості. Для цього нами проведено порівняльний аналіз динаміки синтезу цитозольних HSP70 у стрес-реакції та адаптації рослин за впливу високої температури, ґрунтового затоплення і ґрунтової посухи у видів, які відрізняються за ареалом і адаптивним потенціалом: *A. thaliana* (*Brassicaceae*) порівнювали з пластичними мезофітами *Malva silvestris*, *M. pulchella* (*Malvaceae*) і *Sium sisaroides* (*Apiaceae*) та гідрофітом *Trapa natans* (*Trapaceae*). Отримані результати свідчать про суттєві відмінності кінетики синтезу HSP70 у видів з різним адаптивним потенціалом та існування спільних закономірностей. Показано, що на початку впливу чинника захист клітин відбувається за рахунок функціонування існуючого пулу цитозольних HSP70, тоді як збільшення дози чинника викликає активацію синтезу конститутивних та індукцйбельних білків. Визначено, що синтез індукцйбельного компонента

починається після певного лаг-періоду, що вказує на існування дозового порогу. Відмічено, що видові особливості білкових профілів стосуються кількісних і часових показників кінетики HSP70, які відповідають фізіологічним змінам. В стрес-реакції на гостру дію чинника (високу температуру, затоплення) стійкіші види характеризуються активнішим синтезом конститутивних HSP70, а також більш тривалим та інтенсивним синтезом індукбельних білків. В експериментах із затопленням активація синтезу HSP70 в листках за дії кореневої гіпоксії показала системний характер відповіді на локалізовану дію чинника. В експериментах з посухи доведено, що під час адаптації рослин до поступового посилення інтенсивності фактора підтримання протеостазу клітин відбувається шляхом поступового зростання вмісту HSP70. На прикладі двох видів мальви чітко показано, що протягом розвитку водного дефіциту збільшення пулу HSP70 починається за рахунок активації синтезу конститутивного компонента, тоді як подальше збільшення дози чинника викликає ініціацію синтезу індукбельного білка. Визначено позитивний взаємозв'язок базового рівня HSP70 (їх вмісту в листках за однакових нормальних умов) з адаптивним потенціалом рослин.

Крім того, в експериментах з затопленням кореневої системи на прикладі двох контрастних за стійкістю видів показано взаємозв'язок між реакцією шаперонів і специфічною адаптацією та визначено особливості цих процесів за наявності та відсутності у видів здатності до морфологічної адаптації. Для цього проведено порівняльний аналіз *A. thaliana*, спроможного переносити лише нетривале затоплення, і *S. sisaroides*, який успішно адаптується до таких умов. Доведено, що в адаптації *S. sisaroides* вирішальну роль відіграє генетична детермінованість комплексної відповіді на кореневу гіпоксію на різних рівнях організації, яка включає високу інтенсивність синтезу HSP70 (компонента неспецифічної реакції) і АДГ (ферменту специфічної анаеробної адаптації) протягом періоду утворення системи аеренхімоносних адвентивних коренів (морфологічної адаптації), а

також кооперацію аеробних і анаеробних енергетичних процесів у часі та просторі. Навпаки, здатність *A. thaliana* переносити лише нетривале перезволоження ґрунту, за нашими даними, пов'язана з помірною тимчасовою індукцією HSP70 і АДГ, а також нездатністю до утворення розвиненої аеренхіми (Mühlenbock et al., 2007). Такі результати можна трактувати як *необхідність збільшення клітинного пулу шаперонів (зокрема, HSP70) для забезпечення протеостазу клітин під час зміни траєкторії розвитку рослинного організму, яка відбувається під впливом кореневої гіпоксії у видів, різних за генетично запрограмованими шляхами анаеробної адаптації – наявності метаболічної та структурної адаптації у *S. sisaroides* і лише метаболічної адаптації в *A. thaliana*.*

Загалом дані наших експериментів з вивчення контрастних за стійкістю видів доводять, що кінетика синтезу HSP70 є інформативним показником при вивченні молекулярних основ резистентності видів рослин, що раніше було показано для тварин (Tomanek, Somero, 2000; Tomanek, 2002; Timofeyev et al., 2009; Шатилина и др., 2010; Shatilina et al., 2011; Bedulina et al., 2013). Отримані нами результати підтверджують положення про те, що рівень неспецифічних захисних клітинних механізмів позитивно корелює з витривалістю організмів і темпами комплексної адаптації до змін зовнішніх чинників (Кузнецов, 2001; Кордюм и др., 2003; Leone et al., 2003). Специфічні для видів з різною стійкістю особливості кінетики синтезу HSP70 можуть обумовлюватись варіаціями в регуляторних і кодуючих ділянках генів (Sørensen et al., 2003) та пов'язуватись із відмінностями інших адаптивних механізмів, що потребує поглибленого вивчення в подальшому.

Варто відмітити, що для імунодетекції білків HSP70 у рослин різних видів нами використано одні моноклональні антитіла. Наявність у видів різних родин білків HSP70, споріднених до одних антитіл, підтверджує їх високу гомологічність і вказує на давнє походження та консервативність функцій. Це повністю узгоджується з висновками інших авторів, зроблених на основі даних біоінформаційного генетичного аналізу цієї родини (Gupta,

Golding, 1993; Boorstein et al., 1994; Lin et al., 2001). Отже, отримані нами результати дозволили зробити висновок про те, що *видові особливості кінетики синтезу HSP70 та їх тісний взаємозв'язок з процесами метаболічної, фізіологічної та структурної адаптації кожного виду вказують на пристосування консервативної родини HSP70 до адаптивних особливостей виду протягом філогенетичного розвитку.*

Формування системи шаперонів як системи неспецифічної стійкості клітин відбувалося в земних умовах за постійного впливу вектора гравітації 1 g. Проте з космічних експериментів відомо, що як відсутність гравітації, так і короткі періоди гіпергравітації не є критичними для існування організмів (Kordyum, 2014). Для вирішення фундаментальної проблеми, чи беруть участь шаперони в реакції рослинних клітин на незвичні для земних організмів фактори – гіпергравітацію і мікрогравітацію – нами проведено ряд наземних експериментів, що відбувалось одночасно з дослідженням цієї проблеми в польотних експериментах закордонними колегами і призвело до подібних висновків (Shagimardanova et al., 2010; Paul et al., 2012; Zupanska et al., 2013; Fengler et al., 2015).

За нашими даними, відповідь рослинних клітин як на симульовану мікрогравітацію (горизонтальне кліноостатування, 2 об/хв), так і на збільшення гравітаційного навантаження (центрифугування) проявляється у тимчасовій послідовній активації синтезу HSP70 і HSP90, що є індикатором стрес-реакції. В реакції на гіпергравітацію ступінь і тривалість такої активації збільшувались із силою тяжіння та тривалістю її дії.

Визначено, що існування рослинного організму за умов кліноостатування / симульованої мікрогравітації протягом тривалого періоду призводить до певного підвищення рівня експресії генів цитозольних HSP70 і HSP90. За допомогою ІФА в ефекті кліноостатування нами вперше відокремлено ефекти «обертання» і «положення» стосовно синтезу цитозольних HSP70 і HSP90, і показано, що симульована мікрогравітація має невеликий, але статистично значущий вплив. У цілому, отримані дані

узгоджуються з результатами інших дослідників, які показали активацію експресії окремих *HSP* в рослинних клітинах за умов космічного польоту (Shagimardanova et al., 2010; Paul et al., 2012), а також стали підґрунтям для висновку про те, що в адаптації до незвичних умов клітини застосовують наявні в них механізми (Kordyum, 2014).

Крім того, нами вперше показано, що тривале кліноостатування призводить до посилення стресової індукції генів цитозольних HSP70 і HSP90 в реакції теплового шоку на рівні як транскрипції, так і трансляції, а також до посилення теплостійкості рослин. На підставі цього зроблено висновок, що ріст рослин за умов кліноостатування спричиняє виникнення перехресної стійкості, зокрема до високої температури. Загалом визначені ефекти тривалого кліноостатування ми інтерпретуємо як адаптивний акт, тобто встановлення нового фізіологічного стандарту, характерними ознаками якого є збільшення базового рівня цитозольних HSP70 і HSP90, посилення готовності клітин до стресової індукції цих HSP за впливу інших стресорів і, відповідно, підвищення стійкості. Важливо підкреслити, що в нашому експерименті виникнення перехресної стійкості відбулося під впливом чинника, незвичного для рослин як земних організмів.

Обговорюючи ці закономірності у зв'язку з проблемою фенотипічної пластичності рослин, відмітимо наступне. З космічних експериментів відомо, що за відсутності гравітаційного стимулу формотворення рослин відбувається в рамках морфогенетичної програми виду відповідно до всіх інших умов середовища (Меркис, 1990; Кордюм и др., 1994; Kordyum, 2014). І разом з тим, як за нашими спостереженнями, так і за даними літератури, формування фенотипу за таких умов характеризується значною континуальною варіабельністю просторового розташування органів. Це призвело нас до уявлення про відсутність каналізованої програми відповіді на незвичні для земних організмів умови. Така ситуація кардинально відрізняється від гравітропічної реакції, яка є каналізованою пластичною відповіддю органів рослин на зміну напрямку вектора гравітації. Отже, нами

зроблено висновок про участь шаперонів у стрес-реакції та адаптації клітин до умов, до яких в рослин відсутня генетично детермінована пластична відповідь.

На сьогодні вже загально визнаним є положення про те, що індукція синтезу HSP є важливим молекулярним механізмом у забезпеченні стійкості клітин до несприятливих змін середовища (Feder, Hofmann, 1999; Sørensen et al., 2003). З використанням різних підходів нами отримано нові оригінальні дані, що підтверджують цю позицію. Зокрема, з використанням нокаут-мутантів *A. thaliana* визначено внесок індукцибельних AtHSP70-5 і AtHSP90-1 у забезпечення базової стійкості рослин до високої температури і водного дефіциту. Участь цитозольних HSP70 і HSP90 в індукваній стійкості проілюстрована на прикладі індукції теплостійкості рослин в результаті попередньої обробки сублетальною температурою. Участь цитозольних HSP70 і HSP90 у перехресній стійкості показана на прикладі підвищення теплостійкості рослин під впливом кліностагування. На підставі цього зроблено висновок про те, що діапазон стійкості організму є динамічним, і що індукція HSP, зокрема HSP70 і HSP90, має важливе значення у визначенні меж цього діапазона.

Стосовно базового (конститутивного) рівня HSP вище відмічалось, що порівняння рослин п'яти видів за однакових, близьких до оптимальних умов, виявило позитивний зв'язок між конститутивним рівнем HSP70 і адаптивним потенціалом рослин. Його значення може полягати в тому, що існуючий в клітині за нормальних умов пул шаперонів забезпечує стабільний протеостаз при флуктуаціях факторів середовища нижче певного порогу. Більший базовий рівень шаперонів дозволяє зв'язати більше ненативних білків і тим самим підіймає поріг індукції генів HSP при стресі. У зв'язку з цим, важливими можуть бути відмінності у рівні експресії HSP між індивідуумами, визначені нами для *AtHSP90-2-GUS*. З великою вірогідністю можна прогнозувати, що різниця між особинами у здатності до синтезу HSP

буде відбиватися на стабільності клітинного гомеостазу за нормальних умов і на стійкості до змін зовнішніх факторів.

Таким чином, отримані нами результати дослідження генної експресії свідчать, що протеостаз клітин і життєдіяльність рослинного організму за нормальних умов середовища забезпечуються конститутивним синтезом шаперонів HSP70 і HSP90 (за даними літератури – також HSP60), які формують базовий пул шаперонів. Рівень базового пулу позитивно пов'язаний з адаптивним потенціалом рослин. Значні зміни факторів середовища викликають збільшення клітинного пулу шаперонів шляхом активації експресії більшості генів *HSP70* і *HSP90* (за даними літератури – також інших родин, в першу чергу, sHSP і HSP100), що є надважливим механізмом захисту і відновлення протеостазу та забезпечення життєздатності клітин і організму за критичних умов. Показано, що провідну роль у цьому відіграють індукцйбельні члени родин. Слід підкреслити, що індукцію синтезу HSP70 і HSP90 визначено нами не тільки в реакції рослин на звичні екологічні фактори, а і на незвичні для них умови зміненої гравітації.

На основі результатів власних досліджень і даних літератури нами розроблено спосіб визначення стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин, що включає оцінку фізіологічного стану рослини та впливу на неї екологічних факторів за вмістом білків HSP70 у зразках рослинного матеріалу (листках). Важливими передумовами для застосування HSP70 як біомаркера стали наступні закономірності: 1) швидка індукція синтезу білків цієї родини відбувається при дії стресорів різної природи практично в усіх організмах, включаючи рослини (Vierling, 1991; Feder, Hofmann, 1999; Маргулис, Гужова, 2000; Sørensen et al., 2003); 2) висока консервативність білків цієї родини дає можливість їх імунодетекції у різних видів рослин з використанням моноклональних антитіл, специфічних до їх консервативної ділянки. Експериментальну перевірку запропонованого підходу проведено шляхом тестування рослин 9 видів 6 родин за різних умов

довкілля в природі та експерименті. Оформлено патент України на корисну модель.

7.2. Регуляція експресії *HSP* та стійкості рослин шаперонами *HSP90*

За результатами аналізу літературних джерел було з'ясовано, що регуляція експресії генів *HSP* відбувається за принципом авторегуляції, і що цитозольні *HSP90* негативно регулюють активність конститутивних транскрипційних факторів *HSF* (*HsfA1*) і тим самим контролюють реакцію теплового шоку (Ali et al., 1998; Morimoto, 1998; Zou et al., 1998; Prodromou, 2017). Такий молекулярний механізм описано для тваринних клітин, тоді як роботи стосовно його існування у рослин були поодинокими (Yamada et al., 2007).

З використанням інгібітора *HSP90* гелданаміцину (ГДА) нами отримано нові докази авторегуляції синтезу *HSP* за принципом зворотного зв'язку і регуляції стійкості рослинних клітин білками *HSP90* (рис. 7.1). Показано, що обробка інгібітором *HSP90* ГДА проростків *A. thaliana* викликає дозо-залежну індукцію синтезу *HSP70* і *HSP90* за відсутності стресу, що узгоджується з результатами інших дослідників (Yamada et al., 2007). Оскільки фактори транскрипції *HSF* контролюють експресію генів всіх родин *HSP*, таку індукцію можна прогнозувати також для інших *HSP*, зокрема, індукцибельних *sHSP* і *HSP100*.

Нами вперше визначено, що обробка ГДА має пролонговану дію. Так, обробка антибіотиком насіння призводила до підвищення базового рівня *HSP70* і *HSP90* в клітинах проростків, а також до посилення стресової індукції їх синтезу та стійкості рослинних клітин за впливу протеотоксичних чинників, зокрема високої температури та іонізуючої радіації. Отримані нами дані вказують на можливість підвищення стійкості клітин шляхом модулювання функціональної активності *HSP90* і, відповідно, регуляції ними експресії генів *HSP*. Вперше показано існування довготермінових ефектів обробки ГДА

насіння, що важливо у зв'язку з нестабільністю цього антибіотика. Такий молекулярний механізм може бути основою розробки біотехнологічних підходів керування стійкістю рослин у подальшому.

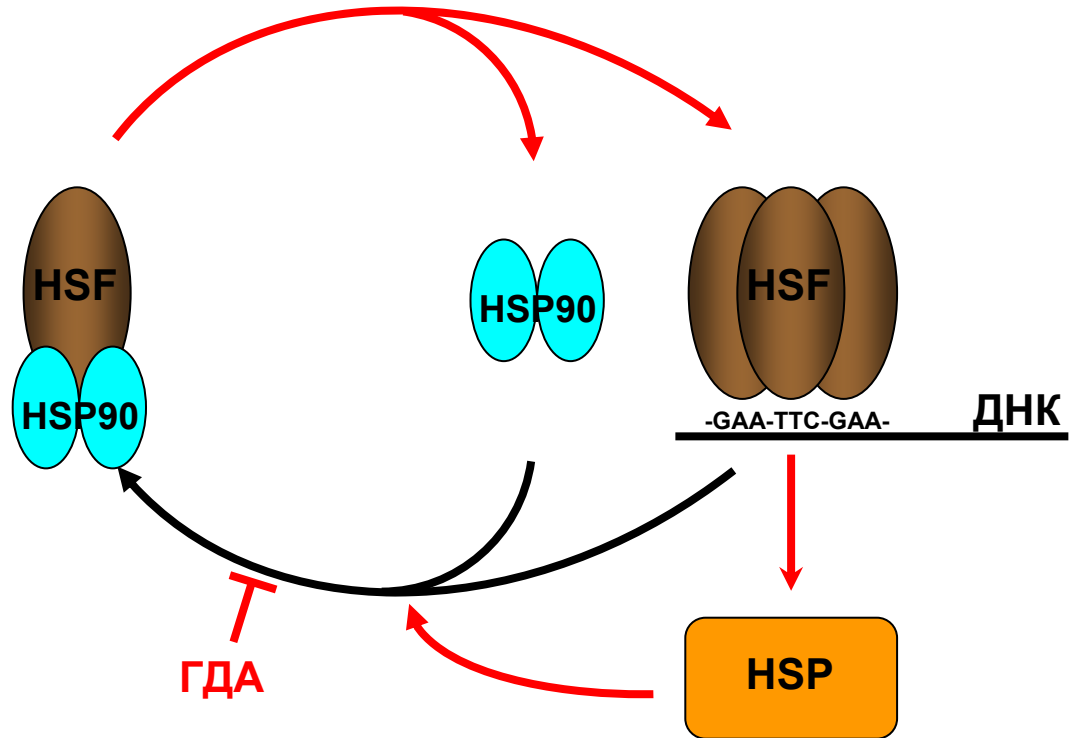


Рис. 7.1. Схема негативної регуляції синтезу шаперонів / білків теплового шоку (HSP) білками HSP90 за принципом зворотного зв'язку і модуляції цього процесу інгібітором ГДА (позначено червоним). HSP90 зв'язує мономер транскрипційного фактора теплового шоку HSF за нормальних умов. Переключення шаперона на зв'язування денатурованих білків або його інгібування призводить до вивільнення HSF, утворення активних тримерів та запуску транскрипції генів *HSP*.

7.3. Роль HSP90 і HSP70 у фенотипічній варіабельності рослин

На сьогодні ustalеним є уявлення щодо здатності шаперонів HSP90 здійснювати конформаційну регуляцію специфічного набору регуляторних білків, склад яких ретельно досліджено у дріжджів і тварин (Picard, 2002; Zhao et al., 2005; Jarosz, Lindquist, 2010; Taipale et al., 2010; Prodromou, 2017). Нами

за результатами аналізу літератури і електронної бази BioGRID складено список білків, функціонування яких залежить або може залежати від HSP90 (Додаток А). Аналіз цього списку підтверджує ідею, що стабілізуючи метастабільні білки та регулюючи їх функціональну активність, HSP90 може впливати на трансдукцію сигналів і регуляцію клітинних процесів, і в результаті, на формування фенотипу.

Це стало теоретичним підґрунтям наших експериментальних досліджень, в яких шаперони HSP90 розглядаються як основа трьох молекулярних механізмів, важливих у визначенні фенотипічної варіабельності популяцій:

1) HSP90 як буфер стохастичного розвитку (основане на їх здатності стабілізувати функціональні конформації білків-клієнтів; Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007);

2) участь HSP90 у підтриманні пластичних реакцій за змін умов середовища (основане на їх здатності асистувати у функціонуванні білків-учасників сигнальних шляхів; Rutherford, Lindquist, 1998; Queitsch et al, 2002);

3) HSP90 як буфер генетичних змін, що протидіє їх фенотипічному прояву (основане на здатності HSP90 підтримувати білок, який містить генетичні зміни, у нормальній функціональній конформації; Rutherford, Lindquist, 1998).

З використанням різних підходів нами здійснено перевірку цих механізмів і отримано нові докази їх існування у рослин. Крім того, вперше експериментально доведено можливість участі шаперонів HSP70 в перших двох механізмах.

HSP90 як буфер стохастичного розвитку. Здатність шаперонів HSP90 стабілізувати ріст і розвиток рослин за впливу мікроеваріацій зовнішнього і внутрішнього середовища, тобто бути *буфером стохастичного розвитку*, нами вивчено на ізогенних лініях *A. thaliana* за нормальних умов з використанням двох експериментальних підходів: 1) інгібіторного аналізу (оцінка значення загальної активності пулу HSP90); і 2) нокаут-мутантів за цитозольними HSP90 (оцінка ролі окремих членів родини).

Для інгібування HSP90 (тобто зниження загальної активності пулу HSP90) насіння обробляли гелданаміцином (ГДА) і радициолом (РАД), які блокують АТФазний цикл шаперона, але відносяться до різних груп антибіотиків. За результатами аналізу фенотипів проростків показано, що блокування функціонування HSP90 цими інгібіторами у широкому діапазоні концентрацій призводить до десинхронізації росту (розширення діапазону темпів росту), збільшення частки проростків з морфологічними відхиленнями (до ~40% для ГДА, до ~20% для РАД), підвищення їх різноманітності та складності, зокрема, посилення асиметрії парних органів і білатеральних ознак (флуктуюча асиметрія), виникнення суттєвих порушень формотворення (деформація проростка, відсутність або поява додаткових органів – наприклад, 1 або 3 сім'ядолі); число морфологічних змін збільшувалося з концентрацією антибіотиків. При цьому десинхронізація росту і посилення варіабельності розмірів, асиметрії органів та їх просторового розташування при інгібуванні шаперона розглядається як індикатор зниження рівня стабільності ростових процесів, а виникнення суттєвих морфологічних аномалій – як індикатор порушення нормального (каналізованого) формотворення. Важливо підкреслити, що вказані фенотипічні зміни нами отримано в результаті обробки інгібіторами насіння, і вони узгоджуються з результатами інших дослідників, які загальну активність шаперонів знижували або внесенням цих інгібіторів в середовище вирощування (Queitsch et al., 2002), або за допомогою РНК-інтерференції (Sangster et al., 2007).

За результатами аналізу впливу обробки ГДА насіння на ріст і розвиток дорослих рослин нами вперше виявлено існування віддалених у часі ефектів дії антибіотика – дестабілізації утворення листків розетки і певної затримки переходу рослин до цвітіння. Оскільки обидві ознаки в *A. thaliana* в нормі підтримуються на певному стабільному рівні, тобто є каналізованими (Hall et al., 2007; Sangster et al., 2008 b), такі зміни вказують на участь шаперонів HSP90 у підтриманні стабільності розвитку і морфогенезу рослин. Однак,

достеменні молекулярні механізми пролонгованого впливу світлочутливих антибіотиків залишаються незрозумілими і потребують подальшого вивчення.

Для з'ясування значення окремих цитозольних HSP90 у формуванні фенотипу нами використано нокаут-мутанти *Athsp90-1* і *Athsp90-4*, і дикий тип (Col-0) як контроль. Визначено зниження схожості насіння у лінії *Athsp90-1* і тенденцію до цього у *Athsp90-4*, що вказує на значення відповідних шаперонів для формування повноцінного насіння. На мутантних проростках показано десинхронізацію росту і наявність проростків з морфологічними змінами від помірних до значних (~ 27% у *Athsp90-1*, ~ 15% у *Athsp90-4*). При цьому відмічено посилення асиметрії парних органів і білатеральних ознак, деформацію окремих органів або всього проростка, появу проростків з нерозвиненими або додатковими органами (3 сім'ядолі, 3 листки першого міжвузля). Такі закономірності в цілому збігаються з нашими результатами інгібіторного аналізу проростків. Слід також відмітити, що окремі змінені фенотипи проростків, подібні до наших, описані у мутантних ліній за цитозольними HSP90 іншими дослідниками (Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2007).

За результатами аналізу дорослих рослин *Athsp90-1* і *Athsp90-4* нами встановлено:

- зниження активності ростових процесів за кількома показниками (зменшення діаметра розетки, зменшення розмірів найдовшого листка розетки, зменшення кількості бокових квітконосів і числа квіток – у обох мутантів; зменшення висоти стебла у *Athsp90-1*);
- зниження темпів розвитку (затримка переходу рослин *Athsp90-1* до цвітіння; поява невеликої частки рослин, які не перейшли до цвітіння – у обох мутантів);
- дестабілізацію росту і розвитку (розширення розкиду даних за всіма показниками, збільшення коефіцієнта варіації (CV) за всіма неперервними

кількісними ознаками, зниження кореляційного зв'язку між кількістю листків розетки і тривалістю вегетативного періоду – у обох мутантів);

- порушення нормального формотворення і розвитку невеликої частки рослин обох мутантів.

Такі дані дозволили нам зробити висновок про те, що окремі HSP90 – як конститутивний AtHSP90-4, так і індукцибельний AtHSP90-1 – беруть участь у підтриманні стабільності каналізованого росту, розвитку і формотворення рослин протягом всього онтогенезу за нормальних умов. Це значно доповнює дані інших дослідників, які в результаті аналізу нокаут-мутантів за цитозольними HSP90 виділили певні класи фенотипічних змін (Samakovli et al., 2007).

Відмічено, що обидва використані нами підходи – обробка інгібіторами і використання нокаут-мутантів – викликали подібні зміни як у проростків, так і у дорослих рослин за нормальних умов. На підставі цього зроблено висновок про значення як загальної активності /наповненості пулу шаперонів HSP90, так і окремих цитозольних членів родини для підтримання оптимальних темпів росту і розвитку та стабілізації нормального формотворення рослин протягом онтогенезу за впливу мінорних флуктуацій внутрішнього і зовнішнього середовища.

Участь HSP70 у стабілізації стохастичного розвитку. На підставі даних літератури про тісну кооперацію функціонування шаперонів HSP90 і HSP70 (Travers, Fares, 2007; Clément et al., 2011; Karagöz, Rüdiger, 2015) нами висловлено гіпотезу про те, що *шаперони HSP70 також беруть участь у підтриманні стабільності процесів росту, розвитку і формотворення рослин за нормальних умов, та їх пластичних реакцій на зовнішні стимули, прямо чи опосередковано.* Перевірку цього положення проведено з використанням нокаут-мутантів *Athsp70-5* і *Athsp70-14* за цитозольними членами родини. Визначено, що для мутантів *hsp70* характерним також було збільшення варіабельності за неперервними кількісними ознаками і

виникнення фенотипів з морфологічними порушеннями, подібно до досліджених нами *hsp90*, що підтверджує висловлену гіпотезу.

Загальний огляд результатів проведеного нами феномного аналізу при інгібуванні HSP90 і з використанням нокаут-мутантів *hsp90* і *hsp70* показує широкий спектр фенотипічних варіацій, що можна пояснити великою кількістю білків і відповідних клітинних процесів, залежних від цих шаперонів, а також імовірнісним характером молекулярних подій. Відмічено, що наявність фенотипічних змін у мутантів за індукційними членами родин за нормальних умов свідчить про їх вплив навіть у мізерних кількостях на стабільність ростових процесів.

В цілому, отримані нами результати підтверджують загальноприйняте уявлення про те, що різні фенотипічні ознаки каналізовані у різному ступені (Meiklejohn, Hartl, 2002; Hall et al., 2007). Так, число листків одного модуля детерміновано жорстко, число модулів, з яких складається організм, може варіювати у певних межах, водночас розміри органів змінюються у досить широкому діапазоні в рамках норми реакції. Визначений нами більший діапазон розкиду даних і більші значення коефіцієнтів варіації за неперервними кількісними ознаками при порушенні експресії *HSP90* і *HSP70* вказують на те, що відповідні шаперони беруть участь у підтриманні стабільності експресії локусів кількісних ознак (QTLs). Стосовно HSP90 це цілком узгоджується з висновком Sangster et al. (2008 b) про те, що практично кожна кількісна морфологічна ознака може бути залежною від шаперонів цієї родини через контроль ними регуляторних білків.

Доказом участі HSP90 і HSP70 у стабілізації дискретних ознак є збільшення CV кількості листків розетки після обробки насіння ГДА і у нокаут-мутанта *Athsp70-5*. Особливо важливо відмітити появу дефектів за дискретними ознаками, таких як зміни кількості листків одного модуля (сім'ядоль, листків першого та другого модулів розетки) як при зниженні активності HSP90, так і при порушенні експресії окремих *HSP90* і *HSP70*. Про подібні HSP90-залежні порушення формотворення *A. thaliana*

повідомлялось іншими авторами (Samakovli et al., 2007). Такі аномалії розглядаються як дефекти по гомеозисних генах. Подібне явище спостерігалось іншими авторами при інгібуванні HSP90 у тваринних об'єктів – наприклад, зміна числа органів у *Drosophila* і *Danio rerio* (Rutherford, Lindquist, 1998; Yeyati et al., 2007). Отже, отримані нами дані свідчать про здатність не тільки HSP90, але і HSP70 сприяти формуванню нормального фенотипу, тобто *каналізувати морфогенетичні процеси*, ймовірно, шляхом підтримання належного функціонування залежних від них білків-регуляторів морфогенетичних програм.

За результатами аналізу мутантних проростків із суттєвими фенотипічними змінами нами показано, що фенотипічні аномалії часто з'являються та корегуються на рівні окремого модуля (у даному випадку – міжвузля з парою листків). Такі спостереження привели нас до висновку, що *вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися дискретно на рівні модуля*. На підставі цього розглядається можливість існування залежного від шаперонів молекулярного механізму пластичності формотворення в рамках модульної концепції фенотипічної пластичності (de Kroon et al., 2005), що потребує ретельного вивчення в подальшому.

Особливий акцент треба зробити на результатах оцінки *абсолютної величини фенотипічної мінливості (внутрішньої нестабільності)*, що було здійснено нами шляхом визначення коефіцієнту варіації CV довжини стебла між першими 5 стручками квітконосу кожного індивідууму мутантних ліній. Отримані результати показали, що відповідні HSP90 і HSP70 можуть бути необхідними для підтримання певного (ймовірно, оптимального) рівня внутрішньої нестабільності ростових процесів. Посилення внутрішнього «шуму» розвитку за цим показником раніше визначалось у RNAi-ліній *A. thaliana* зі зниженим рівнем експресії генів цитозольних HSP90 (Sangster et al., 2008 b). Отже, отримані нами дані підтверджують для цитозольних HSP90 і вперше показують для цитозольних HSP70, що ці *шаперони можуть*

впливати на рівень внутрішньої нестабільності розвитку. Така їх роль має фундаментальне значення, оскільки підтримання оптимального рівня стохастичних процесів, з одного боку, забезпечує стабільне формування стандартного фенотипу, з іншого – дає організму перевагу при флуктуаціях зовнішнього середовища, тобто є адаптивним (Shahrezaei, Swain, 2008).

Роль HSP90 і HSP70 в пластичних реакціях. В серії експериментів з нокаут-мутантами *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* нами вперше показано участь відповідних цитозольних HSP90 і HSP70 у підтриманні пластичних реакцій рослин на зовнішні чинники. Визначено, що порушення експресії окремих *HSP90* і *HSP70* призводить до дестабілізації ростових реакцій та в багатьох випадках до зсуву їх центральної тенденції за різних комбінацій факторів, які визначають напрям і ростову активність органів рослин – світла (контрастні умови освітлення) і гравітації (кліностакування і гравістимуляція). Отримані дані доводять участь шаперонів як у забезпеченні необхідного рівня пластичних реакцій органів рослин (центральної тенденції), так і у підтриманні належного рівня стабільності цих реакцій (діапазону варіабельності ознак). Показано органоспецифічність впливу шаперонів. Визначено, що за спектром і ступенем фенотипічних змін кожна мутантна лінія *hsp* має особливості, що вказує на певну *специфічність функціонування* відповідних HSP90 і HSP70, ймовірно, через відмінності у субстратах і процесах, в яких вони переважно беруть участь. Наприклад, у обох мутантів *hsp90* виявлено появу проростків з негативною гравітропічною реакцією кореня, чого не було у мутантів *hsp70*. Етіюльовані проростки *Athsp70-14* при гравістимуляції характеризувалися максимальною варіабельністю розмірів і просторового розташування органів. У лінії *Athsp70-5* показано зниження ростової активності за більшістю показників.

Отримані нами дані щодо мутантів *hsp90* значно доповнюють результати інших авторів, які показали, що зниження активності цитозольних HSP90 за допомогою інгібіторів та RNAi впливає на вигин кореня при гравістимуляції та на розтяг гіпокотіля у темряві (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2008 а,

б). Результати нашого аналізу за різних комбінацій умов освітлення та дії гравітації переконливо доводять значення як окремих *HSP90*, так і *HSP70* у підтриманні стабільності відповідних пластичних реакцій.

HSP90 як буфер прояву генетичних змін. Здатність шаперонів HSP90 протидіяти фенотипічному прояву генетичного поліморфізму в рамках даної роботи вивчено з використанням гетерогенного за якістю, поліморфного насіння *A. thaliana* різного походження (насіння природних популяцій; насіння, опромінене УФ-В та γ -радіацією) шляхом інгібування шаперонів антибіотиками ГДА і РАД. За результатами дослідження визначено, що інгібування HSP90 у поліморфного матеріалу призводить, з одного боку, до збільшення частки непророслого насіння (за його наявності у зразку), з іншого – до посилення варіабельності темпів росту і морфології проростків, більш значного, ніж у ізогенної лінії екотипу. Відзначено, що після опромінення частота появи залежних від HSP90 морфозів зростала з дозою радіації. Загалом отримані нами дані доводять значення загальної активності шаперонів HSP90 для підтримання гомеостазу та стабілізації росту і формотворення рослин після дії гено- і протеотоксичних факторів і підтверджують для рослин положення S. Rutherford і S. Lindquist (1998) про здатність HSP90 сприяти приховуванню генетичних змін. Варто зазначити, що подібні до наших результати стосовно залежності прояву генерованих *de novo* мутацій від активності пулу HSP90 нещодавно визначено у RNAi-ліній *A. thaliana* зі зниженим рівнем експресії HSP90 і високим рівнем хімічно індукovanого мутагенезу (Mason et al., 2018).

Таким чином, система шаперонів / HSP представляє гомеостатичний механізм, пластичність якого відбувається на рівні транскрипції-трансляції, що забезпечує регуляцію чисельності та якісного складу шаперонного пулу клітин відповідно до умов середовища. Реакція рослин на зміни зовнішніх факторів вище певного порогу включає активацію експресії як конститутивних, так і індукцибельних *HSP* (нами показано для *HSP70* і

HSP90), що є необхідним для виживання та відновлення гомеостазу і через те важливим у визначенні діапазону стійкості організму. При цьому індукцйбельний компонент є ключовим інструментом у забезпеченні стійкості клітин. Підвищення рівня індукції генів *HSP* будь-яким шляхом призводить до розширення діапазону стійкості (індукована та перехресна стійкість). Індукція генів *HSP* контролюється цитозольними *HSP90* (за даними літератури, разом з *HSP70*), що є механізмом авторегуляції чисельності пулу шаперонів / *HSP* клітини. Первинним сигналом для запуску експресії генів *HSP* в цьому механізмі вважається критичне збільшення концентрації денатурованих білків в клітині. І разом з тим, виявлена нами системна активація синтезу *HSP70* під впливом кореневої гіпоксії вказує також на існування організаційного рівня регуляції.

Продемонстровано, що активація експресії *HSP* у відповідь на зміни умов середовища відбувається як за наявності генетично детермінованої програми морфологічної адаптації, так і за її відсутності (у випадку зміненої гравітації). Види з широким діапазоном стійкості характеризуються високим конститутивним синтезом *HSP70* та тривалою потужною активацією синтезу як конститутивних, так і індукцйбельних білків цієї родини шаперонів за несприятливого впливу зовнішніх чинників. В експериментах з ґрунтовим затопленням показано, що високий адаптивний потенціал рослин пов'язаний з їх здатністю до активного синтезу *HSP70* протягом періоду розвитку структурної адаптації.

Пул шаперонів, завдяки сприянню ним фолдингу і стабілізації структури білкового компонента клітин, забезпечує певний, ймовірно, оптимальний для конкретних умов рівень стабільності росту і розвитку. В результаті виконаного дослідження отримано нові дані, які підтверджують множинні ролі *HSP90* у рослин: стабілізацію росту, розвитку і нормального формотворення за нормальних умов (тобто за впливу мікротваріацій зовнішнього і внутрішнього середовища); стабілізацію пластичних реакцій за змін умов середовища (власно процесів фенотипічної пластичності); і

підтримання вітальності та нормального формотворення за впливу гено- і протеотоксичних факторів. При цьому продемонстровано значення як загальної активності пулу HSP90, так і окремих цитозольних членів родини. Вперше показано, що цитозольні HSP70 також можуть брати участь у перших двох механізмах, прямо чи опосередковано. Відмінності у впливі окремих HSP90 і HSP70 на ростові процеси, а також тканинна локалізація експресії доводять наявність певної специфічності функціонування членів цих родин. Отже, *пластичність шаперонної системи забезпечує стабільність і пластичність каналізованого розвитку рослин у межах діапазону стійкості.*

На підставі отриманих експериментальних даних і літературних відомостей нами створено гіпотетичну модель взаємодії різних функцій шаперонів HSP90, яка викладена далі. Слід зазначити, що ця модель показує лише функціонування HSP90 і опускає їх взаємодію з іншими регуляторними компонентами, зокрема, шаперонами HSP70. Вище згадувалось про тісну кооперацію систем HSP90 і HSP70 в їх функціонуванні взагалі (Dittmar et al., 1997; Grad, Picard, 2007; Noël et al., 2007; Clément et al., 2011; Karagöz, Rüdiger, 2015) та в регуляції експресії *HSP* зокрема (Yamada et al., 2007; Scharf et al., 2012). Крім того, нами показана участь HSP70 у стабілізації процесів росту і морфогенезу. Втім, окремі деталі взаємодії шаперонів цих родин залишаються не до кінця вивченими, а інколи й ілюзорними, тому у дану модель не увійшли.

7.4. Модель взаємодії різних функцій HSP90

Завдяки різноманіттю функцій шаперонів HSP90 у системі білкового фолдингу і регуляції активності специфічних субстратів, ця родина займає особливе місце у підтриманні білкового гомеостазу, стабільності формотворення і адаптивної пластичності рослинного організму. На рисунку 7.2 представлено гіпотетичну модель механізму взаємодії різних функцій HSP90 за нормальних умов і при стресі.

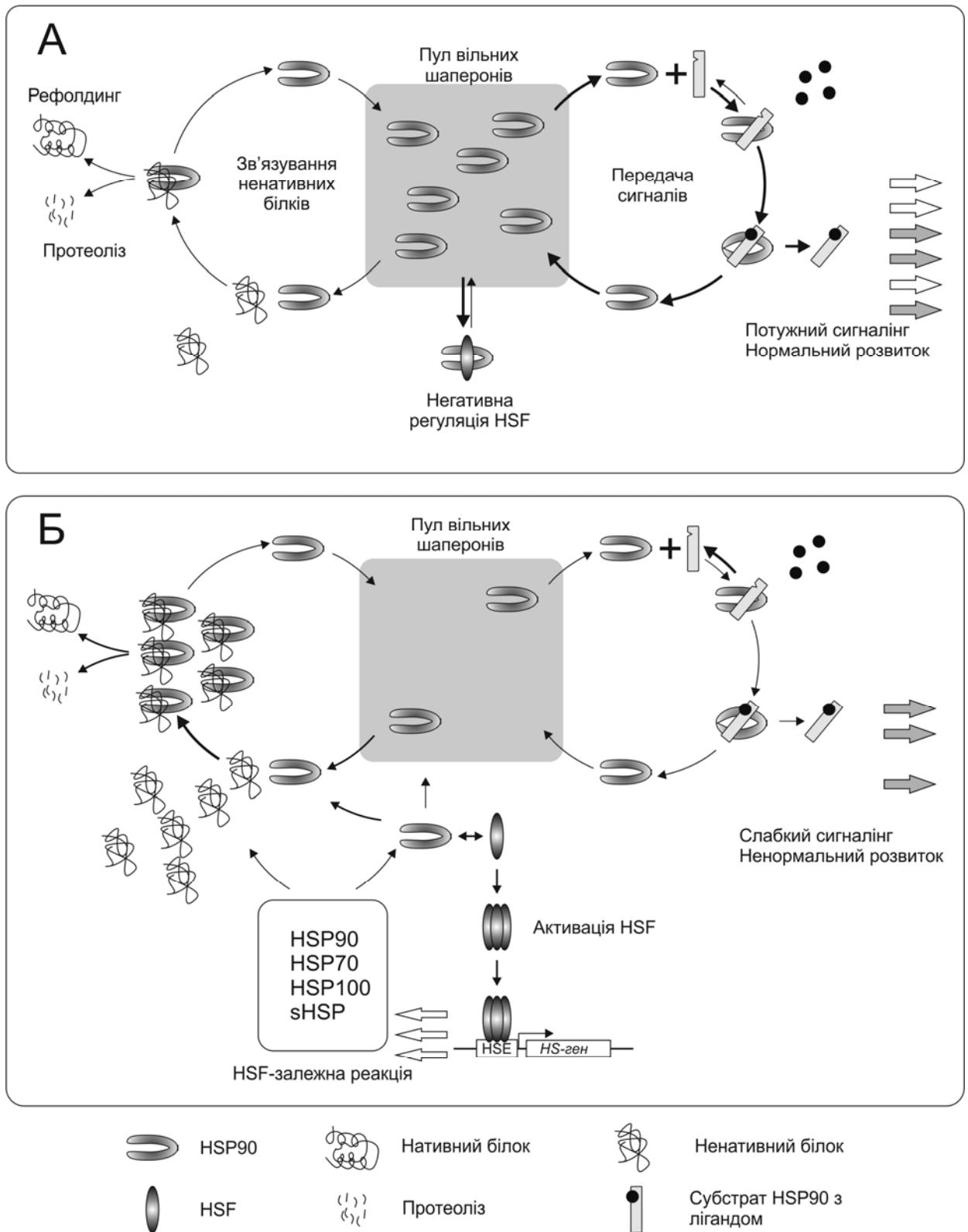


Рис. 7.2. Гіпотетична модель функціонування шаперонів HSP90 за нормального метаболізму (А) і стресу (Б): у захисті клітини від денатурованих білків; у фолдингу і конформаційній регуляції специфічних білків-клієнтів – компонентів різних регуляторних шляхів клітини; та у негативній регуляції транскрипційних факторів теплового шоку HSF. (А) За

нормальних умов клітинний пул HSP90 задіяний, головним чином, в обслуговуванні специфічних субстратів, підтримуючи тим самим трансдукцію відповідних сигналів і регуляцію процесів росту та морфогенезу, тоді як їх участь у підтриманні денатурованих білків є мінімальною. Зв'язок між специфічними і неспецифічними функціями HSP90 через пул вільних шаперонів засновано на схемі (Rutherford et al., 2007; модифіковано). Крім того, HSP90 негативно регулюють реакцію теплового шоку, зв'язуючи HSF у формі мономерів. (Б) При накопиченні денатурованих білків у результаті дії несприятливих чинників HSP90 переключаються на їх зв'язування. Пул вільних шаперонів зменшується, що послаблює активність субстратів і залежні від них процеси. Вивільнення HSF призводить до утворення активних тримерів, їх транспортування до ядра, індукції HSP та інших HSF-залежних генів. Новосинтезовані HSP спрямовуються на відновлення протеостазу, після чого система повертається до нормального стану.

Згідно з моделлю, в нормі члени родини переважно залучені до обслуговування специфічних субстратів, тоді як їх участь у зв'язуванні ненативних білків є мінімальною. Відповідаючи за дозрівання білків різних регуляторних шляхів і допомагаючи їм у функціонуванні, HSP90 підтримують трансдукцію сигналів і стабільне проходження відповідних регуляторних процесів, що забезпечує формування стандартного фенотипу. При цьому, стабілізуючи структуру метастабільних білків-клієнтів, шаперон може виконувати роль буфера, який обмежує вплив флуктуацій факторів зовнішнього і внутрішнього середовища та прояв генетичних змін. Оскільки HSP90 присутні в усіх організмах і містяться в клітинах у великій кількості за нормальних умов (Nollen, Morimoto, 2002), їх здатність до регуляції активності низки регуляторних білків може бути універсальним механізмом підтримання стабільності росту та розвитку. За дії несприятливих чинників накопичення денатурованих білків перемикає HSP90 на їх зв'язування, що призводить до ослаблення активності білків-клієнтів і залежних процесів, прояву генетичних змін та посилення внутрішньої нестабільності розвитку. Така координація специфічних і неспецифічних функцій HSP90 через пул

вільних шаперонів клітини ґрунтується на схемі, запропонованій Rutherford et al. (2007). Припускається, що вибір мішеней між різними специфічними субстратами і денатурованими білками регулюється їх відносною афінністю до шаперона.

Однак, з огляду на здатність HSP90 негативно регулювати транскрипційні фактори HSF і таким чином контролювати реакцію теплового шоку та стійкість клітин, вважаємо вкрай важливим цю специфічну функцію позначити окремо. Здатність системи HSP до авторегуляції, без сумніву, є фундаментальною властивістю клітини, яка становить основу автономного шляху забезпечення захисту її білкового гомеостазу при дії несприятливих чинників і самовідновлення після нормалізації ситуації.

Якісний і кількісний склад пулу (фонду) вільних HSP90 визначає ємність буферної системи HSP90, її потенціал у підтриманні білкового гомеостазу клітини, протидії стохастичному розвитку і приховуванні генетичного поліморфізму. Показано, що концентрація HSP90 в клітинах за нормальних умов може в кілька разів перевищувати необхідний для нормального росту рівень (Ali et al., 1998). Можна припустити, що така надмірність дає люфт, який забезпечує надійне підтримання нормальних процесів за незначних варіацій факторів середовища і невеликої кількості генетичних змін. Здатність гіпотетичної буферної системи «поглинати» слабкі варіації умов середовища і генетичної інформації без пропорційної відповіді була передбачена С. Waddington (1942). При збільшенні дози фактора поступове зниження наповненості пулу в результаті зв'язування зростаючої кількості денатурованих білків у певний момент досягає межі, нижче якої вільних шаперонів стає недостатньо для підтримання залежних процесів повною мірою. Можна припустити, що подальше підвищення дози фактора буде призводити до посилення нестабільності залежних від шаперона процесів, і, відповідно, варіабельності фенотипів, що може мати адаптивне значення за змінених умов. Наступний пороговий рівень фактора пов'язується з дисоціацією комплексу HSP90-HSF і запуском експресії генів *HSP* та інших

HSP-залежних генів, що певним чином корегує програму розвитку. Отже, пул вільних HSP90 може визначати як діапазон варіацій факторів середовища, що не впливають істотно на стабільність росту, розвитку і формотворення, так і пороговий рівень факторів, перевищення якого викликає стресову індукцію HSP і перебудову онтогенетичної програми. При цьому сенсором змін середовища є концентрація денатурованих білків у клітині.

ВИСНОВКИ

В результаті проведення комплексного дослідження ролі молекулярних шаперонів HSP70 і HSP90 у фенотипічній пластичності рослин з'ясовано особливості генної експресії представників цих мультигенних родин з різною субклітинною локалізацією, різнобічно охарактеризовано їх значення у забезпеченні стабільності та пластичності росту і розвитку рослин, показано існування HSP90-залежного механізму авторегуляції експресії *HSP* в рослинній клітині та запропоновано модель взаємодії різних функцій HSP90, що загалом створює цілісну картину функціонування системи шаперонів у забезпеченні пластичності онтогенезу, а також пропонує нові підходи для оцінки та покращення стану рослин.

1. За впливу високої температури і водного дефіциту на прикладі 12 генів *HSP70* і 9 генів *HSP90 Arabidopsis thaliana*, які кодують білки різної субклітинної локалізації, продемонстровано, що в реакції клітин на відхилення фактора середовища від оптимуму та його наближення до межі стійкості рослинного організму беруть участь всі гени – як конститутивні, так і індукцйбельні. Особливості профілів генної експресії свідчать про специфічну роль кожного члена родин у забезпеченні неспецифічної реакції шаперонної системи.

2. Створення додаткового (індукцйбельного) компонента клітинного пулу HSP70 і HSP90 *A. thaliana* за впливу високої температури і водного дефіциту відбувається шляхом диференційної активації індукцйбельних генів *AtHSP70-4*, *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1*. Провідна роль *AtHSP70-4* у цьому полягає у високому рівні його індукції за впливу обох факторів та більш швидкій активації на початку реакції теплового шоку.

3. Конститутивна експресія генів *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2* в проростках *A. thaliana* характеризується тканиноспецифічністю, що вказує на функціонування відповідних шаперонів у підтриманні специфічних

клітинних процесів. Експресія *AtHSP70-10* притаманна гідатодам і прилисткам сім'ядоль і справжніх листків, клітинам кореневої шийки і центрального циліндра кореня. Експресія *AtHSP90-2* відбувається в усіх органах, найбільш інтенсивно – в провідних пучках, паренхімі, гідатодах і прилистках сім'ядоль і справжніх листків, і характеризується варіабельністю її загального рівня між індивідуумами. За впливу високої температури і водного дефіциту локалізація експресії цих генів в цілому зберігається, зміни стосуються інтенсивності експресії.

4. Види з різним ареалом і адаптивним потенціалом – *A. thaliana* (*Brassicaceae*), *Malva silvestris*, *M. pulchella* (*Malvaceae*), *Sium sisaroides* (*Apiaceae*) і *Trapa natans* (*Trapaceae*) – мають імуноспоріднені цитозольні HSP70, базовий рівень яких і ступінь активації при стресі позитивно корелюють зі стійкістю рослин до високої температури та затоплення. Видові особливості кінетики синтезу цих HSP70 у відповідь на високу температуру, затоплення і прогресуючий водний дефіцит та їх тісний взаємозв'язок з процесами метаболічної, фізіологічної і структурної адаптації рослин свідчать про пристосування консервативної системи шаперонів до адаптивних особливостей видів протягом філогенетичного розвитку.

5. У здатності *S. sisaroides* адаптуватися до ґрунтового затоплення вирішальну роль відіграє генетична детермінованість комплексної відповіді на кореневу гіпоксію на різних рівнях організації, яка включає високу інтенсивність синтезу HSP70 (компонента неспецифічної реакції) і АДГ (ферменту анаеробної адаптації) протягом періоду утворення аеренхімононосних адвентивних коренів (морфологічної адаптації), а також кооперацію аеробних і анаеробних енергетичних процесів у часі та просторі. Навпаки, нестійкому до затоплення *A. thaliana*, який може витримувати лише тимчасове перезволоження ґрунту, притаманна нетривала помірна індукція HSP70 і АДГ при нездатності до утворення розвиненої аеренхіми.

6. Вміст цитозольних HSP70 в листках можна використовувати як інтегральний показник стану рослинного організму. Запропоновано метод

оцінки стану рослин з використанням HSP70 як біомаркера для тестування рослин природних угруповань та інтродукованих рослин.

7. Цитозольні HSP70 і HSP90 беруть участь у стрес-реакції клітин на незвичні для рослин зміни гравітаційного навантаження – гіпергравітацію і кліноостатування та в адаптації до тривалого кліноостатування, до якого в рослин відсутня генетично детермінована програма пластичної відповіді. В реакції цих шаперонів на кліноостатування визначено ефект власно симульованої мікрогравітації. Доведено, що кліноостатування призводить до виникнення перехресної стійкості до високої температури, зокрема завдяки посиленню здатності клітин до індукції генів цих HSP в реакції теплового шоку.

8. Індуцибельні цитозольні HSP70 і HSP90 є важливим інструментом у забезпеченні стійкості рослинних клітин, що підтверджено зниженням виживаності нокаут-мутантів *Athsp70-5* і *Athsp90-1* за впливу потенційно летальної температури та зниженням їх ростової активності в умовах водного дефіциту (базова стійкість); посиленням експресії індуцибельних *HSP70* і *HSP90* при виникненні індукованої стійкості (підвищення теплостійкості в результаті попередньої обробки сублетальною температурою) і перехресної стійкості (підвищення теплостійкості під впливом кліноостатування).

9. Інгібування HSP90 в клітинах проростків *A. thaliana* викликає індукцію синтезу HSP70 і HSP90 за відсутності стресу, що є підтвердженням існування у рослинних клітин механізму негативної регуляції експресії генів *HSP* цитозольними HSP90 за принципом зворотного зв'язку. Обробка насіння інгібітором HSP90 призводить до підвищення базового рівня HSP70 і HSP90 в клітинах проростків, а також до посилення їх синтезу та стійкості рослинних клітин за впливу протеотоксичних чинників (високої температури та іонізуючої радіації).

10. Посилення фенотипічної варіабельності при інгібуванні шаперонів HSP90 в лабораторних лініях екотипів *A. thaliana* при оптимальних умовах демонструє значення загальної активності клітинного пулу HSP90 для

стабілізації росту, розвитку і нормального формотворення за впливу мікрофлуктуацій внутрішнього і зовнішнього середовища.

11. Зниження виживаності генетично поліморфного насіння *A. thaliana*, десинхронізація росту та посилення фенотипічної варіабельності проростків при інгібуванні HSP90 свідчить про участь цих шаперонів у підтриманні протеостазу, стабілізації росту та формотворення рослин після дії генотоксичних факторів.

12. З використанням нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* *A. thaliana* встановлено, що функціонування окремих цитозольних ізоформ HSP90 і HSP70, як конститутивних, так і індукцйбельних, є важливим для стабілізації нормального формотворення рослин. Продемонстровано участь цих білків у забезпеченні стабільності пластичних реакцій, зокрема ростової активності та просторової орієнтації гіпокотиля та кореня проростків за змін інтенсивності світла та напрямку і величини гравітаційного стимулу. Особливості фенотипічних змін у мутантних ліній свідчать про певну специфічність функціонування відповідних HSP у підтриманні ростових процесів. Відзначено, що вплив шаперонів на визначення морфогенетичної програми рослин може відбуватися дискретно на рівні модуля.

13. Склад і загальна активність клітинного пулу шаперонів HSP90 і HSP70 є важливими для підтримання стабільності росту і розвитку рослин. Збільшення вмісту цих шаперонів при змінах факторів середовища та наближенні до межі стійкості забезпечує захист протеостазу як за наявності генетично детермінованої програми пластичної відповіді, так і за її відсутності (при змінах гравітаційного навантаження). Діапазон стійкості рослинного організму є динамічним і може розширюватись в результаті аклімації до сублетальної дози стресора за рахунок збільшення клітинного пулу HSP, перш за все – індукцйбельних членів. Отже, пластичність шаперонної системи забезпечує стабільність і пластичність каналізованого розвитку рослин у межах діапазону стійкості.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Розроблений метод оцінки фізіологічного стану рослини та впливу екологічних факторів на рослину шляхом визначення вмісту білків HSP70 за допомогою імунодетекції рекомендується використовувати для тестування стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. Ленинград: Наука, 1985, 316 с.
2. Альмейда А.М., Вризен В.Х., Ван дер Стрэттен Д. Молекулярные и физиологические механизмы избегания затопления и приобретения выносливости к нему у риса. Физиол. раст., 2003, 50 (6): 832-840.
3. Альтергот В.Ф. Действие повышенной температуры на растение в эксперименте и природе. 40-е Тимиряз. чт. М.: Наука, 1981, 57 с.
4. Барабой В.А., Жадько С.И., Кордюм Е.Л., Сидоренко П.Г. Перекисное окисление липидов растений различного уровня организации при микрогравитационном стрессе. Изв. АН СССР. Сер. Биол., 1991, 3: 368-375.
5. Барабой В.А., Жадько С.И. Ранние изменения интенсивности спонтанной хемилюминесценции корней проростков гороха при гипергравитации. Докл. Акад. наук Укр., 1992, 7: 156-158.
6. Бараненко В.В. Интенсивность свободнорадикального окисления липидов и состояния системы защиты. В: Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Е.Л. Кордюм/ - К.: Наук. думка, 2003а: 111-136.
7. Бараненко В.В. Продукція активних форм кисню в рослин гороху при кліностауванні. Доп. НАН України, 2003б, 9: 161-165.
8. Белявская Н.А. Корень: тканевый, клеточный и молекулярный урони. В: Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Е.Л. Кордюм/ - К.: Наук. думка, 2003: 137-176.
9. Бобровницький Ю.А. Експресія деяких генів, що індукуються водним стресом, у проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., вирощуваних за умов помірного водного дефіциту. Біополімери і клітина, 2011, 27 (1): 59-65.
10. Бобровницький Ю.А. Реакції проростків *Arabidopsis thaliana* L. на помірний водний дефіцит на клітинному та молекулярному рівнях. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біол., 2012, 3 (52): 55–65.
11. Бобровницький Ю.А. Реакція проростків *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на помірний водний дефіцит на клітинному та молекулярному рівнях. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Київ, 2013, 18 с.

12. Бобровницкий Ю. Образование разветвленных корневых волосков у *Arabidopsis thaliana* при прогрессирующей засухе. Цитол. генет., 2016, 50 (5): 72-78.
13. Булавін І.В. Анатомія та ультраструктура коренів *Arabidopsis thaliana* в культурі *in vitro* під впливом кліностагування. Укр. ботан. журн., 2015, 72 (2): 180–185.
14. Вартапетян Б.Б. Учение об анаэробном стрессе растений – новое направление в экологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений. 1. Становление новой научной дисциплины. Физиол. раст., 2005, 52 (6): 931–953.
15. Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С. Стресс растения. Биофизический подход. Физиол. раст., 1993, 40 (4): 553-557.
16. Гамбург К.З., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Таусон Е.Л., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Сравнение устойчивости к высокой температуре суспензионных культур Арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и Теллунгиеллы (*Thellungiella salsuginea*). Докл. РАН, 2011, 439 (3): 421-424.
17. Гамбург К.З., Коротаева Н.Е., Бадурев Б.К., Боровский Г.Б., Войников В.К. Взаимосвязь различий в устойчивости к заморозкам арабидопсиса и теллунгеллы с содержанием белков теплового шока и дегидринов. Физиол. раст., 2014, 61 (3): 343-349.
18. Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В. Влияние γ -облучения на термоиндуцированные конформационные переходы и гидратацию фибриногена. Біополімери і клітина, 2006, 22 (2): 162-165.
19. Григорьева О.В., Черданцев В.Г. О роли внутрииндивидуальной изменчивости в морфологической эволюции растений рода *Draba* L. Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. Отд. биол., 2012, 117 (6): 38-57.
20. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. К.: Наук. думка, 1989, 384 с.
21. Гродзинський Д.М., Дмитрієв О.П., Гуша М.І., Коломієць О.Д., Кравець О.А., Рашидов Н.М. УФ-В радіація і рослини: механізми ушкодження та захисту. К.: Фітосоціоцентр, 2007, 152 с.
22. Данильченко О.О. Радіоадаптивна відповідь, індукована ультрафіолетовим випроміненням, у рослин. Автореф. ... канд. біол. наук, Київ, 2005, 24 с.
23. Дубина Д.В., Кордюм Є.Л. Пластичність онтогенезу судинних рослин: молекулярні, клітинні, популяційні та ценотичні аспекти. Вісн. НАН України, 2015, 7: 32-40.
24. Жук О.І. Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води. Физиол. и биохим. культ. раст., 2011, 43 (1): 26-37.

25. Зорина А.А., Миронов К.С., Степанченко Н.С., Синетова М.А., Коробан Н.В., Зинченко В.В., Куприянова Е.В., Аллахвердиев С.И., Лось Д.А. Системы регуляции стрессовых ответов у цианобактерий. Физиол. раст., 2011, 58 (5): 643-663.
26. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты. Вісник Харківського нац. агр. ун-ту. Серія: Біологія, 2009, 1 (16): 19-38.
27. Ключева Н.Ю., Самохвалов И.М. Синтез белков теплового шока в листьях *Arabidopsis thaliana*. Физиол. раст., 1990, 37 (4): 739-747.
28. Козеко Л.Е. Изменения в спектре растворимых белков и в содержании стрессовых белков БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха в ответ на клиностатирование. Біополімери і клітина, 2006, 22 (2): 136-142.
29. Козеко Л.Е. Белок теплового шока 90 кДа: разнообразие, структура и функции. Цитология, 2010, 52 (11): 3-20.
30. Козеко Л.Є., Овчаренко Ю.В. Динаміка структурно-функціональної адаптації *Sium latifolium* (Apiaceae) до затоплення кореневої системи. Укр. ботан. журн., 2015, 72 (2): 172-179.
31. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010, 350 с.
32. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Белявская Н.А. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. Проблемы космической биологии, 1994, 73, 294 с.
33. Кордюм Є.Л. Фенотипична пластичність у рослин: загальна характеристика, адаптивне значення, можливі механізми, відкриті питання. Укр. ботан. журн., 2001, 58 (2): 141-151.
34. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В., Белявская Н.А., Климчук Д.А., Недуха Е.М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. К.: Наук. думка, 2003, 277 с.
35. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. К.: Сталь, 2003, 192 с.
36. Кравец Е.А. Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов у *Hordeum distichum* L. при воздействии облучения. Цитол. генет., 2009, 43(1): 11-22.
37. Красиленко Ю.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. Функциональная роль оксида азота у растений. Физиол. раст., 2010, 57 (4): 483-494.
38. Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды. Физиол. раст., 2013, 60 (2): 155-165.

39. Кузнецов Вл.В. Индуцибельные системы и их роль при адаптации растений к стрессорным факторам. Атореф. дис. ... докт. докт. биол. наук. Кишинев: ИФР АН РМ, 1992, 74 с.
40. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция. Физиол. раст., 1999, 46 (2): 321-336.
41. Кузнецов Вл.В. Общие системы устойчивости и трансдукция стрессорного сигнала при адаптации растений к абиотическим факторам. Вестн. Нижегород. ун-та. Сер. Биология, 2001, 1: 65–69.
42. Кузнецов Вл.В. Растение и стресс или жизнь на грани жизни. Вестник РАН, 2002, 72 (7): 659-662.
43. Кузнецова И.М., Форже В., Туроверов К.К. Структурная динамика, стабильность и фолдинг белков. Цитология, 2005, 47 (11): 943-951.
44. Маргулис Б.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке. Цитология, 2000, 42 (4): 323–342.
45. Марфенин Н.Н. Концепция модульной организации в развитии. Журн. общ. биол., 1999, 60 (1): 6-17.
46. Марфенин Н.Н. Фундаментальные закономерности модульной организации в биологии. Вестник ТвГУ. Сер. Биология и экология, 2008, 9: 147-161.
47. Меркис А.И. Сила тяжести в процессах роста растений. М.: Наука, 1990, 185 с.
48. Недуха О.М. Гетерофілія у рослин. К.: Альтерпрес, 2011, 192 с.
49. Новиков Е.А., Мошкин М.П. Роль стресса в модификации онтогенетических программ. Усп. совр. биол., 2009, 129 (3): 227-238.
50. Новоселова Т.В., Черенков Д.А., Хренов М.О., Глушкова О.В., Лунин С.М., Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е. Влияние гелданамицина на экспрессию сигнальных белков и белков теплового шока в нормальных лимфоцитах мышей. Цитология, 2008, 50 (7): 629-635.
51. Одум Ю. Экология, т. 1. М.: Мир, 1986, 328 с.
52. Панчук І.І. Закономірності експресії генів антиоксидантної системи та білків-шаперонів рослин в онтогенезі та за дії стресу. Атореф. дис. ... докт. біол. наук. Київ, 2015, 44 с.
53. Панчук І.І., Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А. Експресія сигнального гену *Gus* під контролем промотору *APX2* у трансгенних рослинах арабідопсису. В: Геном рослин. Збірник наукових статей. Одеса, 2008: 108-110.
54. Петрова С.Е., Барыкина Р.П. Сравнительный биоморфологический анализ *Sium latifolium* и *Sium sisaroides* (*Apiaceae*). Бот. журн., 2005, 90 (12): 1836–1847.

55. Рахметов Д.Б. Кормовые мальвы в агрофитоценозах лесостепи Украины: интродукция, биология, сорта, возделывание. К.: Фитосоциоцентр, 2000, 288 с.
56. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва, 2002, 312 с.
57. Рикар Б. Ответ корней проростков на аноксию у сортов риса, различающихся по устойчивости к затоплению. Физиол. раст., 2003, 50 (6): 891-900.
58. Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Боровской Г.Б., Войников В.К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе. Физиол. раст., 2014, 61 (2): 155-169.
59. Руденко С.С., Филипчук Т.В., Ємельянов І.Г. Деякі особливості перебігу закону толерантності Шелфорда у рослинних організмів. Доп. НАН України, 2009, 2: 196-200.
60. Сантос Д. М., Рихо Ж., Якобс М. Использование аллилового спирта для отбора регуляторных АДН1 мутантов *Arabidopsis*. Физиол. раст., 2003, 50 (6): 852-864.
61. Смуров А.О., Подлипаева Ю.И., Скарлато С.О., Гудков А.В. Связь между степенью солеустойчивости инфузорий и конститутивным уровнем содержания Hsp70 в клетках. Цитология, 2010, 52 (12): 1041-1044.
62. Сцик-Миранда К., Джаячандран С., Там А., Вернер-Фрачек Дж., Вильямс А.Дж., Бейли-Серрес Дж. Механизмы трансляционного контроля, действующие в растениях кукурузы при недостатке кислорода. Физиол. раст., 2003, 50 (6): 865-878.
63. Сытник К.М., Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Сидоренко П.Г., Фомичева В.М. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. К.: Наукова думка, 1984, 136 с.
64. Таирбеков М.Г. Молекулярные и клеточные основы гравитационной чувствительности. М.: Наука, 2002, 104 с.
65. Талалаєв О.С. Експресія низкомолекулярних білків теплового шоку у проростках *Pisum sativum* L. за умов зміненої гравітації. Biopolymers and Cell, 2013, 29 (6): 493–498.
66. Таран Н.Ю. Адаптаційний синдром рослин в умовах посухи. Атореф. дис. ... докт. біол. наук. Київ, 2001, 42 с.
67. Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Бацманова Л.М., Мусієнко М.М. Вторинний оксидний стресс як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля. Физиол. и биохим. культ. раст., 2004, 36 (1): 3-14.

68. Тарасенко В.А. Ультраструктура клеток колумеллы в корневом чехлике арабидопсиса в условиях клиностатирования и микрогравитации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1985, 35 с.
69. Тарчевский И.А. Сигнальные системы растений. М.: Наука, 2002, 294 с.
70. Тимофеев М.А., Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Колесниченко А.В. Особенности применения белков теплового шока в качестве стресс-маркеров у водных организмов на примере байкальских эндемичных амфипод. Прикладная биохимия и микробиология, 2008, 44 (3): 343-346.
71. Туроверов К.К., Уверский В.Н., Кузнецова И.М. Нативные глобулярные и нативные частично или полностью неупорядоченные белки. Фолдинг, образование надмолекулярных комплексов, агрегация. Цитология, 2009, 51 (3): 190-203.
72. Холодный Н.Г. Гормоны роста и тропизмы у растений. Заметки Киев. ин-та нар. образования, 1927, 2: 69.
73. Холодный Н.Г. Очерки по физиологии гормональных явлений в растительном организме. Киев: Изд-во АН УССР, 1939, 264 с.
74. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977, 384 с.
75. Шатилина Ж.М., Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Павличенко В.В., Тимофеев М.А. Белки теплового шока в механизмах стресс-адаптации у байкальских амфипод и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars: I. Семейство БТШ70. Сибирский экологический журнал, 2010, 1: 57–67.
76. Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). М.-Л. АН СССР, 1946, 396 с
77. Юрина Н.П. Устойчивость к окислительному стрессу у зеленых водорослей: корреляция с содержанием HSP70B/шаперона хлоропластов. В: Растение и стресс: Тез. докл. Всероссийского симп. (Москва, Россия, 9–12 нояб. 2010). М., 2010: 404.
78. Яворська В.К., Драговоз І.В. Реакція аденілатциклазної система в проростках жита на зміну сили тяжіння. Физиол. и биохим. культ. раст., 2005, 37 (3): 242-248.
79. Aarrouf J., Schoëvaërt D., Maldiney R., Perbal G. Changes in hormonal balance and meristematic activity in primary root tips in the slowly rotating clinostat and their effect on the development of the rapeseed root system. *Physiol. Plant.*, 1999, 105: 708-718.
80. Abbott R.J., Gomes M.F. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Heredity*, 1989, 62 (3): 411-418.

81. Ahuja, S., Singh, B., Gupta, V.K., Singhal, R.K., Venu Babu, P. Very low dose gamma irradiation stimulates gaseous exchange and carboxylation efficiency, but inhibits vascular sap flow in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014, 90 (2): 179-186.
82. Åkerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11: 545–555.
83. Akshatha, Chandrashekar K.R. Effect of gamma irradiation on germination growth and biochemical parameters of *Pterocarpus santalinus*, an endangered species of Eastern Ghats. *Euro. J. Exp. Bio.*, 2013, 3 (2): 266-270.
84. Ali A., Bharadwaj S., O'Carroll R., Ovsenek N. Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 4949–4960.
85. Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J. et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, 301 (5633): 653-657.
86. Alvim F.C., Carolino S.M., Cascardo J.C., Nunes C.C., Martinez C.A., Otoni W.C., Fontes E.P. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 1042–1054.
87. Ambrosone A., Giacomo M., Leone A., Grillo M.S., Costa A. Identification of early induced genes upon water deficit in potato cell culture by cDNA-AFLP. *J. Plant Res.*, 2013, 126: 169-178.
88. Ananthan J., Goldberg A.L., Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 1986, 232 (4749): 522-524.
89. Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973, 181 (4096): 223-230.
90. Antonsen F., Johnsson A. Effects of microgravity on the growth of *Lepidium* roots. *J. Gravitational Physiol.*, 1998, 5 (2): 13-21.
91. Anwar A., Siegel D., Kapa J.K., Ross D. Interaction of the molecular chaperone Hsp70 with human NAD(P) H:quinone oxidoreductase 1. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 14060–14067.
92. Aoki K., Kragler F., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 10: 16342–16347.
93. Arakawa T., Mizuno K., Kishitani S. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulation. *Pharm. Res. Commun.*, 1991, 8: 285-291.
94. Augustine S.M., Narayan J.A., Syamaladevi D.P., Appunu C. Chakrvarthi M., Ravichandran V., Subramonian N. *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Plant Sci.*, 2015, 232: 23-34.

95. Bae M.S., Cho E.J. Choi E-Y., Park O.K. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.*, 2003, 36: 652-663.
96. Banti V., Loreti E., Novi G., Santaniello A., Alpi A., Perata P. Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 2008, 31: 1029-1037.
97. Bader M.V., Bardwell J.C.A. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in *Escherichia coli*. *Adv. Prot. Chem.*, 2002, 59: 283-301.
98. Bandura J.L., Jiang H., Nickerson D.W., Edgar B.A. The molecular chaperone Hsp90 is required for cell cycle exit in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.*, 2013, 9 (9): e1003835.
99. Barjaktović Ž., Nordheim A., Lamkemeyer T., Fladerer C., Madlung J., Hampf R. Time-course of changes in amounts of specific proteins upon exposure to hyper-g, 2-D clinorotation, and 3-D random positioning of *Arabidopsis* cell cultures. *J. Exp. Bot.*, 2007, 58 (15-16): 4357-4363.
100. Barjaktović Ž., Schütz W., Madlung J. Changes in the effective gravitational field strength affect the state of phosphorylation of stress-related proteins in callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60: 779-789.
101. Barros M.D. Czarnecka E., Gurley W.B. Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol. Biol.*, 1992, 19: 665-675.
102. Basha E., Jones C., Wysocki V., Vierling E. Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285: 11489–11497.
103. Becker J., Craig E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 219: 11-23.
104. Bedulina D.S., Zimmer M., Timofeyev M.A.. Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. *CBP Part B*, 2010a, 155, 413–418.
105. Bedulina D.S., Timofeyev M.A., Zimmer M., Zwirnmann E., Menzel R., Steinberg C.E.W. Different natural organic matter isolates cause similar stress response patterns in the fresh water amphipod, *Gammarus pulex*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2010b, 17: 261–269.
106. Bedulina D.S., Evgen'ev M.B., Timofeyev M.A., Protopopova M.V., Garbuz D.G., Pavlichenko V.V., Luckenbach T., Shatilina Z.M., Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A.N., Sokolova I.M., Zatsepina O.G. Expression patterns and organization of the *hsp70* genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal. *Mol. Ecol.*, 2013, 22: 1416–1430.
107. Beysens D., Carotenuto L., van Loon J.J.W.A., Zell M. Laboratory science with space data. Accessing and using space-experiment data. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 213 p.

108. Billi D., Potts M. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.*, 2002, 153: 7–12.
109. Bobrownyzky J. A method for the imitation of drought stress in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. *Інтродукція рослин*, 2006, 1: 98-105.
110. Bokszczanin K.L., Fragkostefanakis S. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Front. Plant Sci.*, 2013, 4: 315.
111. Boorstein W.R., Ziegelhoffer T., Craig E.A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.*, 1994, 38: 1–17.
112. Borkovich K.A., Ferrelly F.W., Finkelstein D.B., Tauliey J., Lindquist S. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, 9: 3919–3930.
113. Bowen J., Lay-Yee M., Plummer K., Ferguson I. The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. *J. Plant Physiol.*, 2002, 159: 599-606.
114. Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 2001, 13 (7): 1499-1510.
115. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248–254.
116. Bradshaw A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, 1965, 13 (2): 115-155.
117. Bray E.A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann. Bot.*, 2002, 89: 803-811.
118. Brodsky J.L. Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal. *Trends Biochem. Sci.*, 1996, 21: 122–126.
119. Brown A.H., Dahl A.O., Chapman D.K. Morphology of *Arabidopsis* grown under chronic centrifugation and on the clinostat. *Plant Physiol.*, 1976, 57 (2): 358-364.
120. Buchner J. Hsp90 & Co.—a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, 24: 136–141.
121. Calini V., Urani C., Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol. In Vitro*, 2003, 17: 561-566.
122. Candela H., Martínez-Laborda A., Micol J.L. Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Developmental Biol.*, 1999, 205: 205–216.

123. Cao D., Lin Y., Cheng C.L. Genetic interactions between the chlorate-resistant mutant *cr88* and the photomorphogenic mutants *cop1* and *hy5*. *Plant Cell*, 2000, 12: 199-210.
124. Cazalé A.C., Clément M., Chiarenza S., Roncato M.A., Pochon N., Creff A., Marin E., Leonhardt N., Noël L.D. Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60 (9): 2653-2664.
125. Cerda H., Delincée H., Haine H., Rupp H. The DNA ‘comet assay’ as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.*, 1997, 375: 167-181.
126. Chakrabortee S., Tripathi R., Watson M., Kaminski Schierle G.S., Kurniawan D.P., Kaminski C.F., Wise M.J., Tunnacliffe A. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Mol. Biosyst.*, 2012, 8 (1): 210–219.
127. Chang Y., Liu H., Liu N., Chi W., Wang C., Chang S., Wang T. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquire thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2007, 143: 251-262.
128. Chen Y., Chen X., Wang H., Bao Y., Zhang W. Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death in maize. *Proteome sci.*, 2014, 12: 33.
129. Cho E.K., Hong C.B. Molecular cloning and expression pattern analyses of heat shock protein 70 genes from *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Biol.*, 2004, 47: 149-159.
130. Choi W.-G., Barker R.J., Kim S.-H., Swanson S.J., Gilroy S. Variation in the transcriptome of different ecotypes of *Arabidopsis thaliana* reveals signatures of oxidative stress in plant responses to spaceflight. *Am. J. Bot.*, 2019, 106 (1): 123–136.
131. Clément M., Leonhardt N., Droillard M., Reiter I., Montillet J., Genty B., Laurière C., Nussaume L., Noël L.D. The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2011, 156: 1481-1492.
132. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell*, 2011, 23: 1219–1230.
133. Colville L., Kranner I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation*, 2010, 62 (3): 241-255.
134. Conde A.G., Lau S.S., Dillmann W.H., Mestril R. Induction of heat shock proteins by tyrosine kinase inhibitors in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against simulated ischemia. *Mol. Cell. Cardiol.*, 1997, 29: 1927-1938.

135. Conlet T.R., Sharp R.E., Walker J.C. Water deficit rapidly stimulated the activity of a protein kinase in the elongating zone of the maize primary root. *Plant Physiol.*, 1997, 113 (2): 219—226.
136. Correl M.J., Kiss J.Z. Interactions between gravitropism and phototropism in plants. *J. Plant Growth Regul.*, 2002, 21 (2): 89-101.
137. Correll M.J., Pyle T.P., Millar K.D., Sun Y., Yao J., Edelman R.E., Kiss J.Z. Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes. *Planta*, 2013, 238: 519-533.
138. Craig A., Ewan R., Mesmar J., Gudipati V., Sadanandom A. E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60 (4): 1123–1132.
139. Csermely P. Proteins, RNAs and chaperones in enzyme evolution: a folding perspective. *Trends Biochem. Sci.*, 1997, 22: 147–149.
140. Cuming A.C. LEA proteins. In: *Seed Proteins* / Eds. P.R. Shewry, R. Casey – Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1999: 753-780.
141. Daqing-chen, Yunfeng-zhu, Gongqing-wu, Yanan-li. Characterization analysis of response of alcohol dehydrogenase gene (ADH1) in *Coix lacryma-jobi* L. to waterlogging stress. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 2012, 4: 417–425.
142. Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27: 1151–1161.
143. De Jong L., Moreau X., Jean S., Scher O., Thiery A. Expression of the heat shock protein Hsp70 in chloride target cells of mayfly larvae from motorway retention pond: a biomarker of osmotic shock. *Sci. Total Environ.*, 2006, 366 (1), 164-173.
144. de Kroon H., Huber H., Stuefer J.F., van Groenendael J.M. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, 2005, 166: 73-82.
145. De Micco V., Arena C., Pignalosa D., Durante M. Effects of sparsely and densely ionizing radiation of plants. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2011, 50: 1-19.
146. Dennis E.S., Dolferus R., Ellis M., Rahman M., Wu Y., Hoeren F.U., Grover A., Ismond K., Good A.G., Peacock W.J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J. Exp. Bot.*, 2000, 51: 89–97.
147. DeRocher A., Vierling E. Cytoplasmic HSP70 homologues of pea: differential expression in vegetative and embryonic organs. *Plant Mol. Biol.*, 1995, 27: 441–456.
148. Dittmar K.D., Demady D.R., Stancato L.F., Krishna P., Pratt W.B. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 21213–21220.

149. Donnelly P.M., Bonetta D., Tsukaya H., Dengler R.E., Dengler N.G. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Developmental Biol.*, 1999, 215: 407–419.
150. Duncan R.F. Inhibition of Hsp90 function delays and impairs recovery from heat shock. *FEBS J.*, 2005, 272: 5244–5256.
151. Dunker A.K., Cortese M.S., Romero P., Iakoucheva L.M., Uversky V.N. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.*, 2005, 272: 5129-5148.
152. Dutta R., Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, 2000, 25: 24–28.
153. Dwivedi R.S., Breiman A., Herman E.M. Differential distribution of the cognate and heat-stress-induced isoforms of high Mr cis-trans prolyl peptidyl isomerase (FKPB) in the cytoplasm and nucleoplasm. *J. Exp. Bot.*, 2003, 54: 2679–2689.
154. Earley K.W., Poethig R. S. Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286 (44): 38184-38189.
155. Elefant F., Palter K.B. Tissue-specific expression of dominant negative mutant *Drosophila* HSC70 causes developmental defects and lethality. *Mol. Biol. Cell*, 1999, 10: 2101-2117.
156. Ellis J. Protein as molecular chaperones. *Nature*, 1987, 328 (6129): 378-379.
157. Ellis R.J., van der Vies S.M., Hemmingsed S.M. The molecular chaperone concept. *Biochem. Soc. Symp.*, 1989, 55: 145-153.
158. Ellis M.H., Dennis E.S., Peacock W.J. *Arabidopsis* roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol.*, 1999, 199: 57–64.
159. Esposito S., Sorbo S., Conte B., Basile A. Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70s induction in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* Hedw. *Int. J. Phytoremediation*, 2012, 14 (4): 443-455.
160. Evgen'ev M.B., Garbuz D.G., Shilova V.Y., Zatsepina O.G. Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. *J. Biosci.*, 2007, 32: 489-499.
161. Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 1999, 61: 243-282.
162. Feldman D.E., Frydman J. Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Str. Biol.*, 2000, 10: 26–33.
163. Fengler S., Spierer I., Neef M., Ecke M., Nieselt K., Hampp R. A whole-genome microarray study of *Arabidopsis thaliana* semisolid callus cultures

- exposed to microgravity and nonmicrogravity related spaceflight conditions for 5 days on board of Shenzhou 8. *BioMed Res. Int.*, 2015, ID 547495, 15 p.
164. Fernandes M., O'Brien T., Lis J.T. Structure and regulation of heat shock gene promoters. In: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* / Eds. R.I. Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopolis – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 375-393.
 165. Falconer D.S. *Introduction to quantitative genetics.* L., 1981, 420 p.
 166. Forde G.B. Is it good noise? The role of developmental instability in the shaping of a root system. *J. Exp. Bot.*, 2009, 60 (14): 3989-4002.
 167. Foyer C.H., Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.*, 2000, 146 (2): 359—388.
 168. Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70: 603–647.
 169. Gallardo K., Job C., Groot S.P.C., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job D. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 835-848.
 170. Gao F., Zhou Y., Zhu W., Li X., Fan L., Zhang G. Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in *Thellungiella* rosette leaves. *Planta*, 2009, 230: 1033-1046.
 171. Gärtner K. A third component causing random variability beside environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year long effort to standardize laboratory animals? *Laboratory Animal*, 1990, 24: 71–77.
 172. Glover J.R., Lindquist S. Hsp104, hsp70 and hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 1998, 94: 73–82.
 173. Goloubinoff P., Mogk A., Zvi A.P., Tomoyasu T., Bukau B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 13732–13737.
 174. Grad I., Picard D. Glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinology*, 2007, 275: 2–12.
 175. Gupta R.S., Golding G.B. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J. Mol. Evol.*, 1993, 37: 573–582.
 176. Gupta R.S. Phylogenetic analysis of the 90kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants and fungi species. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, 12: 1063–1073.
 177. Guy C.L., Li Q.B. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, 1998, 10, 539–556.

178. Hahn A., Bublak D., Schleiff E., Scharf K.D. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell*, 2011, 23: 741–755.
179. Hall M.C., Dworkin I., Ungerer M.C., Purugganan M. Genetics of microenvironmental canalization in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104: 13717–13722.
180. Hampp R., Hoffmann E., Schönherr K., Johann P., Filippis L.E. Fusion and metabolism of plant cells as affected by microgravity. *Planta*, 1997, 203: 42–53.
181. Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal. Behav.*, 2011, 6: 1503-1509.
182. Haralampidis K., Miliony D., Rigas S., Hatzopoulos P. Combinatorial interaction of cis elements specify the expression of the *Arabidopsis AtHsp90-1* gene. *Plant Physiol.*, 2002, 129: 1138-1149.
183. Harper J.L. *Population biology of plants*. L.: Acad. Press, 1977, 892 p.
184. Harper J.L. *Plant demography and ecological theory*. *Oikos*, 1980, 35: 244-253.
185. Hausmann N., Fengler S., Hennig A., Franz-Wachtel M., Hampp R., Neef M. Cytosolic calcium, hydrogen peroxide and related gene expression and protein modulation in *Arabidopsis thaliana* cell cultures respond immediately to altered gravitation: parabolic flight data. *Plant Biology*, 2014, 16 (Suppl. 1): 120–128.
186. Hendrick J.P., Hartl F.U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62: 349-384.
187. Hill J.E., Hemmingsen S.M. *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6 (3): 190-200.
188. Hilton G.R., Lioe H., Stengel F., Baldwin A.J., Benesch J.L.P. Small heat-shock proteins: paramedics of the cell. *Top. Curr. Chem.*, 2012, 328: 69-98.
189. Höhfeld J., Cyr D. M., Patterson C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.*, 2001, 2: 885–890.
190. Holt S.E., Aisner D.L., Baur J., Tesmer V.M., Dy M., Ouellette M., Trager J.B., Morin G.B., Toft D.O., Shay J.W., Wright W.E., White, M.A. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Development*, 1999, 13 (7): 817–826.
191. Hong S.W., Vierling E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 4392–4397.

192. Hong S.W., Vierling E. Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.*, 2001, 27 (1): 25-35.
193. Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M.C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Meshi T., Ishikawa M. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell*, 2010, 39: 282–291.
194. Imai J., Maruya M., Yashiroda H., Yahara I., Tanaka K. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J.*, 2003, 22: 3557–3567.
195. IPCC (2012). Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change / Eds. C.B. Field, V. Barros, T.F. Stocker, D. Qin, D.J. Dokken, K.L.M.D. Ebi, et al. – Cambridge: Cambridge University Press, 2012, 582 p.
196. Ireland H.E., Harding S.J., Bonwick G.A., Jones M., Smith C.J., Williams J.H.H. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers*, 2004, 9 (2): 139-155.
197. Ishiguro S., Watanabe Y., Ito N., Nonaka H., Takeda N., Sakai T., Kanaya H., Okada K. SHEPHERD is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *EMBO J.*, 2002, 21: 898–908.
198. Ishikawa H., Evans M. Novel software for analysis of root gravitropism: comparative response patterns of *Arabidopsis* wild-type and *axr1* seedlings. *Plant Cell Environ.*, 1997, 20: 919-928.
199. Jackson M.B. Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *J. Exp. Bot.*, 2002, 53: 175-181.
200. Jackson M.B. Plant survival in wet environments: resilience and escape mediated by shoot systems. In: *Wetlands: functioning, biodiversity conservation, and restoration* / Eds. Bobbink R. et al. – Springer, Berlin Heidelberg, 2006: 15–36.
201. Jackson M.B., Ricard B. Physiology, biochemistry and molecular biology of plant root systems subjected to flooding of the soil. In: *Root ecology* / Eds. de Kroon H., Visser E.J.W. – Springer, Berlin Heidelberg, 2003: 193–213.
202. Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15: 405–414.
203. Jahn T.R., Radford S.E. The yin and yang of protein folding. *FEBS J.*, 2005, 272: 5962-5970.
204. Jan S., Parween T., Siddiqi T.O., Mahmooduzzafar. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environ. Rev.*, 2012, 20: 17-39.

205. Jarosz D.F., Lindquist S. Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science*, 2010, 330 (6012): 1820-1824.
206. Johnson B.D., Chadli A., Felts S.J., Bouhouche I., Catelli M.G., Toft D.O. Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 32499–32507.
207. Johnson K., Lenhard M. Genetic control of plant organ growth. *New Phytol.*, 2011, 191: 319–333.
208. Jackson-Constan D., Akita M., Keegstra K. Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1541: 102–113.
209. Jia D., Zhang B., Zhang P.P., Zhang J.Y., Liu Y.H., Wang J.S., Ma R.Y. Identification of differentially expressed genes in *Alternanthera philoxeroides* under drought stress using suppression subtractive hybridization. *Физиол. раст.*, 2015, 62 (1): 103-110.
210. Johnson C.M., Subramanian A., Pattathil S., Correll M.J., Kiss J.Z. Comparative transcriptomics indicate changes in cell wall organization and stress response in seedlings during spaceflight. *Am. J. Bot.*, 2017, 104: 1219–1231.
211. Jungkuntz I., Link K., Vogel F., Voll L.M., Sonnewald S., Sonnewald U. AtHsp70-15-deficient Arabidopsis plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV. *Plant J.*, 2011, 66: 983-995.
212. Kacperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiol. Plant.*, 2004, 122: 159-168.
213. Kampinga H.H., Craig E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11 (8): 579-592.
214. Kang G., Li G., Xu W., Peng X., Han Q., Zhu Y., Guo T. Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *J. Proteome Res.*, 2012, 11: 6066–6079.
215. Karagöz G.E., Rüdiger S.G.D. Hsp90 interaction with clients. *Trends Biochem. Sci.*, 2015, 40 (2): 117–125.
216. Kelly S.A., Panhuis T.M., Stoehr A.M. Phenotypic plasticity: molecular mechanisms and adaptive significance. *Compr. Physiol.*, 2012, 2: 1417-1439.
217. Khan A.A., Khan H.M., Delincée H. Identification of irradiated spices using the novel technique of DNA comet assay. *J. Food Sci.*, 2002, 67 (2): 493-496.
218. Kim T.-S., Jang C.-Y., Kim H. D., Lee J. Y., Ahn B.-Y., Kim J. Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation. *Mol. Biol. Cell.*, 2006, 17: 824–833.

219. Kim T.-S., Kim W.-Y., Fujiwara S., Kim J., Cha J.-Y., Park J.H., Lee S.Y., Somers D.E. HSP90 functions in the circadian clock through stabilization of the client F-box protein ZEITLUPE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108 (40): 16843-16848.
220. Kim S.H., Lee J.H., Seo K.I., Ryu B., Sung Y., Chung T., Deng X.W., Lee J.H. Characterization of a novel DWD protein that participates in heat stress response in *Arabidopsis*. *Mol. Cells*, 2014, 37 (11): 833-840.
221. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge, NY: Cambridge Univ. Press, 1983: 367 p.
222. Kiss J.Z. Plant biology in reduced gravity on the Moon and Mars. *Plant Biol.*, 2014, 16 (Suppl. 1): 12-17.
223. Kitano H. Biological robustness. *Nat. Rev. Genet.*, 2004, 5: 826–836.
224. Klymchuk D.O., Kordyum E.L., Vorobyova T.V., Chapman D.K., Brown C.S. Changes in vacuolation in the root apex cells of soybean seedlings in microgravity. *Adv. Space Res.*, 2003, 31 (10): 2283-2288.
225. Kochubey S.M., Adamchuk N.I., Kordyum E.L., Guikema J.A. Microgravity effects the photosynthetic apparatus of *Brassica rapa* L. *Plant Biosystems*, 2004, 138: 1-9.
226. Kolupaev Yu.E., Oboznyi A.I., Shvidenko N.V. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russian J. Plant Physiol.*, 2013, 60 (2): 227-234.
227. Komatsu S., Makino T., Yasue H. Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding-stressed soybean plants. *PLOS ONE*, 2013, 8 (6): e65301.
228. Koornneef M., Dellaert L.W.M., Van Der Veen J.H. EMS-induced and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Mutat. Res.*, 1982, 93: 109–123.
229. Kordyum E.L., Guikema J.A. An active role of the amyloplasts and nuclei of root statocytes in graviperception. *Adv. Space Res.*, 2001, 27: 951-956.
230. Kordyum E.L. Plant cells in microgravity and under clinostating. *Int. Rev. Cytol.*, 1997, 171: 1-78.
231. Kordyum E.L. Calcium signaling in plant cells in altered gravity. *Adv. Space Res.*, 2003, 32 (8): 1621-1630.
232. Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *Plant Biol.*, 2014, 16 (Suppl. 1): 79-90.
233. Kordyum Ye.L., Kozeko L.Ye., Ovcharenko Yu.V. Phenotypic plasticity of aerial-aquatic plants *Alisma plantago-aquatica* L. and *Sium latifolium* L.: structural and molecular aspects. *Терноп. нац. пед. ун-ту ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біол.*, 2012, 52 (3): 11-16.

234. Kordyum E., Kozeko L., Ovcharenko Y., Brykov V. Assessment of alcohol dehydrogenase synthesis and aerenchyma formation in the tolerance of *Sium* L. species (Apiaceae) to water-logging. *Aquat. Bot.*, 2017, 142: 71-77.
235. Kovalchuk O., Arkhipov A., Barylyak I., Karachov I., Titov V., Hohn B., Kovalchuk I. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit higher frequency of homologous recombination than acutely irradiated plants. *Mutat. Res.*, 2000, 449: 47-56.
236. Kozeko L.E., Musatenko L.I. Gene expression regulation in *Phaseolus vulgaris* L. seeds by water status, abscisic and jasmonic acids. 4th Intl. Workshop of Seeds "Basic and Applied Aspects of Seed Biology" (Angers, France, July 20-24, 1992), 1992. IV.5.
237. Kozeko L., Kordyum E. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response. *Microgravity sci. technol.*, 2006, XVIII-3/4: 254-256.
238. Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P., Seal C.E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.*, 2010, 188: 655–673.
239. Krishna P., Sacco M., Cherutti J.F., Hill S. Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, 1995, 107: 915-923.
240. Krishna P., Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 238–246.
241. Krishna P., Kanelakis K.C. The 70-kDa protein bound to hsp90 in wheat germ lysate is a plant homologue of animal Hop. *Physiol. Plant.*, 2003, 119: 456-462.
242. Kuittinen H., Mattila A., Savolainen O. Genetic variation at marker loci and in quantitative traits in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Heredity*, 1997, 79: 144-152.
243. Kumar S.V., Wigge P.A. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 2010, 140: 136–147.
244. Kwon T., Sparks J.A., Nakashima J., Allen S.N., Tang, Blancaflor E.B. Transcriptional response of *Arabidopsis* seedlings during spaceflight reveals peroxidase and cell wall remodeling genes associated with root hair development. *Am. J. Bot.*, 2015, 102: 21–35.
245. Lachowiec J., Lemus T., Thomas J.H., Murphy P.J.M., Nemhauser J.L., Queitsch C. The protein chaperone HSP90 can facilitate the divergence of gene duplicates. *Genetics*, 2013, 193: 1269–1277.
246. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680-685.

247. Lai B.-T., Chin N. W., Stanek A. E., Keh W., Lanks K. W. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, 4: 2802–2810.
248. Lajus D, Graham JH, Kozhara A. Developmental instability and the stochastic component of total phenotypic variance. In: *Developmental instability: causes and consequences* / Ed. Polak M. – NY: Oxford University Press, 2003: 343–363.
249. Lamech L.T., Haynes C.M. The unpredictability of prolonged activation of stress response pathways. *J. Cell Biol.*, 2015, 209 (6): 781-787.
250. Larcher W. Streß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*, 1987, 74: 158-167.
251. Larkindale J., Hall J.D., Knight M.R., Vierling E. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.*, 2005, 138: 882–897.
252. Larkindale J., Vierling E. Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol.*, 2008, 146: 748–761.
253. Leborgne-Castel N., Jelitto-Van, Dooren E.P.W.M., Crofts A.J., Denecke J. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell*, 1999, 11: 459–469.
254. Lee A.S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical application. *Trends Biochem.*, 2001, 26: 504–510.
255. Lee J.H., Schöffl F. An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 1996, 252: 11–19.
256. Lee U., Rioflorido I., Hong S., Larkindale J., Waters E.R., Vierling E. The *Arabidopsis* ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J.*, 2006, 49: 115–127.
257. Lee S., Lee D.W., Lee Y., Mayer U., Stierhof Y.D., Lee S., Jurgens G., Hwang I. Heat shock protein cognate 70-4 and an E3 ubiquitin ligase, CHIP, mediate plastid-destined precursor degradation through the ubiquitin–26S proteasome system in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 3984–4001.
258. Lee K.-W., Cha J.-Y., Kim K.-H., Kim Y.-G., Lee B.-H., Lee S.-H. Overexpression of alfalfa mitochondrial HSP23 in prokaryotic and eukaryotic model systems confers enhanced tolerance to salinity and arsenic stress. *Biotechnology Letters*, 2012, 34: 167-174.
259. Leone A., Perrotta C., Maresca B. Plant tolerance to heat stress: current strategies and new emergent insights. In: *Abiotic stresses in plants* / Eds. L. Sanita di Toppi, B. Pawlik-Skowronska. – Kluwer Academic Publishers, 2003: 1-22.

260. Leshem Y.Y., Kuiper P.J., Erdei L., Lurie S., Perl-Treves R. Do Selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998, 851: 199-208.
261. Levinskikh M.A., Sychev V.N., Derendyaeva T.A., Signalova O.B., Salisbury F.B. Campbell W.F., Bingham G.E., Budenheim D.L., Jahns G. Analysis of the space-flight effects on growth and development of super dwarf wheat grown on the Space Station Mir. *J. Plant Physiol.*, 2000, 156: 522-529.
262. Li Q.B., Haskell D.W., Guy C.L. Coordinate and noncoordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol. Boil.*, 1999, 39: 21-34.
263. Li Q.B., Guy C.L. Evidence for non-circadian light/dark-regulated expression of Hsp70s in spinach leaves. *Plant Physiol.*, 2001, 125: 1633-1642.
264. Li X., Yu Y., Gorshkov B., Haigh S., Bordan Z., Weintraub D., Rudic R.D., Chakraborty T., Barman S.A., Verin A.D., Su Y., Lucas R., Stepp D.W., Chen F., Fulton D. Hsp70 suppresses mitochondrial reactive oxygen species and preserves pulmonary microvascular barrier integrity following exposure to bacterial toxins. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 1309.
265. Li H.S., Lu J.Y., Zhao H., Sun Q., Yu F.T., Pan Y., Chen Y., et al. The impact of space environment on gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Sci. China*, 2017, 60: 902–910.
266. Lichtenthaler H.K. The stress concept in plants: an introduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998, 851: 187–198.
267. Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.*, 2008, 27: 328–335.
268. Lin Y., Cheng C.L. A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines a new *HY* locus. *Plant Cell*, 1997, 9: 21-35.
269. Lin B., Wang J., Liu H., Chen R., Meyer Y., Barakat A., Delseny M. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6 (3): 201-208.
270. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, 55: 1151-1191.
271. Liu Y., Wu J., Sun N., Tu C., Shi X., Cheng H., Liu S., Li S., Wang Y., Zheng Y., Uversky V.N. Intrinsically disordered proteins as important players during desiccation stress of soybean radicles. *J. Proteome Res.*, 2017, 16 (7): 2393-2409.
272. Liu J., Pang X., Cheng Y., Yin Y., Zhang Q., Su W., Hu B., Guo Q., Ha S., Zhang J., Wan H. The *Hsp70* gene family in *Solanum tuberosum*: genome-wide identification, phylogeny, and expression patterns. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 16628.

273. Loreti E., Poggi A., Novi G., Alpi A., Perata P. A genomewide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia. *Plant Physiol.*, 2005, 137: 1130–1138.
274. Maiklejohn C.D., Hartl D.L. A single mode of canalization. *Trends Ecol. Evol.*, 2002, 17 (10): 468-473.
275. Majoul T., Bancel E., Triboui E., Hamida J.B., Branland G. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fractions. *Proteomics*, 2004, 4: 505-513.
276. Makhnevych T., Houry W.A. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1823: 674–682.
277. Martínez-Ruiz A., Villanueva L., González de Orduña C., López-Ferrer D., Higuera M. A., Tarín C., Rodríguez-Crespo I., Vázquez J., Lamas S. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 2005, 102: 8525–8530.
278. Martzivanou M., Hampp R. Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome. *Physiol. Plant.*, 2003, 118: 221-231.
279. Mason G.A., Carlson K.D., Press M.O., Bubb K.L., Queitsch C. HSP90 buffers newly induced mutations in massively mutated plant lines. *bioRxiv.*, 2018, doi: <https://doi.org/10.1101/355735>
280. Masson P.H., Tasaka M., Morita M.T., Guan C., Chen R., Boonsirichai K. *Arabidopsis thaliana*: A model for the study of root and shoot gravitropism. *The Arabidopsis Book*, 2002, 1: e0043.
281. Mathew A., Morimoto R.I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998, 851: 99-111.
282. Matia I., Gonzallez-Camacho F., Marco R., Kiss J.Z., Gasset G., Medina F.J. Nucleolar structure and proliferation activity of *Arabidopsis root* cells from seedlings germinated on the International Space Station. *Adv. Space Res.*, 2005, 36: 1244-1253.
283. Matia I., Gonzallez-Camacho F., Herranz R. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *J. Plant Physiol.*, 2010, 167: 184-193.
284. Matouschek A., Pfanner N., Voos W. Protein unfolding by mitochondria: the hsp70 import motor. *EMBO Rep.*, 2000, 1: 404–410.
285. Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62: 670–684.
286. McLellan C.A., Turbyville T.J., Wijeratne E.M., Kerschen A., Vierling E., Queitsch C., Whitesell L., Gunatilaka A.A. A rhizosphere fungus enhances

- Arabidopsis thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor. *Plant Physiol.*, 2007, 145: 174–182
287. McManmon M., Crawford R.M.M. A metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behavior. *New Phytol.*, 1971, 70: 299–306.
288. Medina F.J., Mancuso S., Hampp R. Plant Sciences. In: *Laboratory Science with Space Data. Accessing and Using Space-Experiment Data/* Eds. D. Beysens, L. Carotenuto, J.J.W.A. van Loon, M. Zell. - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011: 117-122.
289. Merkys A., Darginaviciene J. Plant gravitropic response. *Adv. Space Biol. Med.*, 1997, 6: 213–230.
290. Medina F.J., Harranz R. Microgravity environment uncouples cell growth and cell proliferation in root meristematic cells: the mediator role of auxin. *Plant Signaling and Behav.*, 2010, 5: 176-178.
291. Meiri D., Breiman A. Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs. *Plant J.*, 2009, 59: 387–399.
292. Menke M., Chen I-P., Angelis K., Schubert I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutat. Res.*, 2001, 493: 87-93.
293. Miernyk J.A. Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol.*, 1999, 121: 695-703.
294. Milioni D., Hatzopoulos P. Genomic organization of *hsp90* gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 1997, 35: 955–961.
295. Millar K.D.L., Johnson C.M., Edelmann R.E., Kiss J.Z. An endogenous growth pattern of roots is revealed in seedlings grown in microgravity. *Astrobiology*, 2011, 11: 787-797.
296. Milton C.C., Huynh B., Batterham P., Rutherford S.L., Hoffmann A.A. Quantitative trait symmetry independent of Hsp90 buffering: Distinct modes of genetic canalization and developmental stability. *PNAS*, 2003, 100 (23): 13396–13401.
297. Minami M., Nakamura M., Emori Y., Minami Y. Both the N-and C-terminal chaperone sites of Hsp90 participate in protein refolding. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268: 2520–2524.
298. Mitchell-Olds T., Schmitt J. Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature*, 2006, 441: 947–952.
299. Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. How do plants feel the heat? *Trends Biochem. Sci.*, 2012, 37: 118–125.

300. Miwa H., Kinoshita A., Fukuda H., Sawa S. Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *J. Plant Res.*, 2009, 122: 31–39.
301. Molas M.K., Kiss J.Z. Phototropism and gravitropism in plants. *Adv. Bot. Res.*, 2009, 49: 1-34.
302. Montero-Barrientos M., Hermosa R., Cardoza R.E., Gutiérrez S., Nicolás C., Monte E. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 2010, 167 (8): 659-665.
303. Morimoto R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.*, 1998, 12: 3788–3796.
304. Morimoto R.I. Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell*, 2002, 110: 281–284.
305. Moussa H.R. Low dose of gamma irradiation enhanced drought tolerance in soybean. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 2011, 17: 63-72.
306. Mühlenbock P., Plaszczyca M., Plaszczyca M., Mellerowicz E., Karpinski S. Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by *LESION SIMULATING DISEASE1*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3819-3830.
307. Mukhopadhyay I., Nazir A., Saxena D.K., Chowdhuri K.D. Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. *J. Biochem. Mol. Toxicology.*, 2003, 17 (5): 249-254.
308. Musgrave M.E., Kuang A., Xiao Y. Stout S.C., Bingham G.E., Briarty L.G., Levinskikh M.A., Sychev V.N., Podolski I.G. Gravity-independence of seed-to-seed cycling. *Planta*, 2000, 210: 400-406.
309. Nam M.H., Heo E.J., Kim J.Y., Kim S.I., Kwon K.H., Seo J.B. Kwon O., Jong S.Y., Park Y.M. Proteome analysis of the responses of *Panax ginseng* C.A.Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data. *Proteomics*, 2003, 3 (12): 2351-2367.
310. Nedukha E.M. Effects of microgravity on the structure and function of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.*, 1996, 170: 39-77.
311. Nelson R.J., Ziegelhoffer T., Nicolet C., Werner-Washburne M., Craig E.A. The translation machinery and 70 kDa heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, 1992, 71: 97–105.
312. Nemoto T., Ohara-Nemoto Y., Ota M., Takagi T., Yokoyama K. Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 233: 1–8.
313. Neumann D., Lichtenberger O., Tschiersh K., Nover L. Heat shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*, 1994, 194 (2): 360-367.

314. Nicoglou A. Phenotypic plasticity: From microevolution to macroevolution. In: Handbook of evolutionary thinking in the sciences. Springer, 2014.
315. Nieto-Sotelo J., Martinez L.M., Ponce G., Cassab G.I., Alagon A., Meeley R.B., Ribaut J.M., Yang R. Maize hsp101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell*, 2002, 14: 1621–1633.
316. Noël L.D., Cagna G., Stuttmann J., Wirthmüller L., Betsuyaku S., Witte C., Bhat R., Pochon N., Colby T., Parker J.E. Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *Plant Cell*, 2007, 19: 4061–4076.
317. Nollen E.A., Brunsting J.F., Roelofsen H., Weber L.A., Kampinga H.H. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19: 2069–2079.
318. Nollen E.A.A., Morimoto R.I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing ‘heat shock’ proteins. *J. Cell Sci.*, 2002, 115: 2809–2816.
319. Nover L., Bharti K., Döring L., Mishra S.K., Ganguli A., Scharf K.D. *Arabidopsis* and the Hsf world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 177–189.
320. Obermann W.M.J., Sondermann H., Russo A.A., Pavletich N.P., Hartl F.U. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.*, 1998, 143: 901–910.
321. Oh S.E., Yeung C., Babaei-Rad R., Zhao R. Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *BMC Research Notes*, 2014, 7: 643.
322. Ottaviano E., Sari-Gorla M., Pe’ E., Frova C. Molecular markers (RFLPs and HSPs) for the genetic dissection of thermotolerance in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 1991, 81: 713–719.
323. Park S.H., Lee S.J., Chung H.Y., Kim T.H., Cho C.K., Yoo S.Y., Lee Y.S. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat. Res.*, 2000, 153: 318–326.
324. Park S.J., Suetsugu S., Takenawa T. Interaction of Hsp90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *EMBO J.*, 2005, 24: 1557–1570.
325. Paul A.L., Popp M.P., Gurley W.B., Guy C., Norwood K.L., Ferl R.J. *Arabidopsis* gene expression patterns are altered during spaceflight. *Adv. Space Res.*, 2005, 36: 1175–1181.
326. Paul A.L., Zupanska A.K., Ostrow D.T., Zhang Y., Sun Y., Li J.L., Shanker S., Farmerie W.G., Amalfitano C.E., Ferl R.J. Spaceflight transcriptomes: unique responses to a novel environment. *Astrobiology*, 2012, 12: 40–56.

327. Pazos F., Pietrosevoli N., García-Martín J.A., Solano R. Protein intrinsic disorder in plants. *Front. Plant Sci.*, 2013, 4: 363.
328. Pearl L.H., Prodromou C. Structure and *in vivo* function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2000, 10: 46–51.
329. Pearl L.H., Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75: 271–294.
330. Pelham H.R.B. Speculations on the function of major heat shock and glucose–regulated proteins. *Cell*, 1986, 46: 959-961.
331. Perbal G. From ROOTS to GRAVI-1: twenty-five years for understanding how plants sense gravity. *Microgravity Sci Technol.*, 2009, 21: 3-10.
332. Piastuch W.C., Brown C.S. Protein expression in *Arabidopsis thaliana* after chronic clinorotation. *J. Plant Physiol.*, 1995, 146: 329-332.
333. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, 59: 1640-1648.
334. Pigliucci M. Phenotypic plasticity: Beyond nature and nurture. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2001, 328 p.
335. Pilot G., Stransky H., Bushey D.F., Pratelli R., Ludewig U., Wingate V.P.M., Frommer W.B. Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from hydathodes of *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 2004, 16: 1827-1840.
336. Pires H.R.A., Franco A.C., Piedade M.T.F., Scudeller V.V., Kruijt B., Ferreira C.S. Flood tolerance in two tree species that inhabit both the Amazonian floodplain and the dry Cerrado savanna of Brazil. *AoB PLANTS*, 2018, 10: ply065; doi: 10.1093/aobpla/ply065.
337. Popova A.F. Comparative characteristic of mitochondria ultrastructural organization in *Chlorella* cells under altered gravity. *Adv. Space Res.*, 2003, 31 (10): 2253-2259.
338. Porterfield D.M., Matthews S.W., Daugherty C.J., Musgrave M.E. Spaceflight exposure effects on transcription, activity, and localization of alcohol dehydrogenase in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 1997, 113: 685–693.
339. Porterfield D.M., Monje O., Stutte G.W., Musgrave M.E. Root zone hypoxic responses result from inhibition of gravity-dependent oxygen transport in microgravity. *Gravit. Space Biol. Bull.*, 2000, 14: 50.
340. Prasinos C., Krampis K., Samakovli D., Hatzopoulos P. Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic *Hsp90* genes during embryo development. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56 (412): 633-644.
341. Pratt W.B., Toft D.O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 1997, 18: 306–360.

342. Pratt W.B., Krishna P., Olsen L. Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6: 54–58.
343. Pratt W.B., Morishima Y., Osawa Y. The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 22885–22889.
344. Prodromou C., Roe S. M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997, 90: 65–75.
345. Prodromou C., Panaretou B., Chohan S., Siligardi G., O'Brien R., Ladbury J.E., Roe S.M., Piper P.W., Pearl L.H. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.*, 2000, 19: 4383–4392.
346. Prodromou C. Regulatory Mechanisms of Hsp90. *Biochem. Mol. Biol. J.*, 2017, 3 (1): 8 p.
347. Qin D., Wu H., Peng H., Yao Y., Ni Z., Li Z., Zhou C., Sun Q. Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics*, 2008, 9: 432.
348. Queitsch C., Hong S.-W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2000, 12: 479-492.
349. Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 2002, 417: 618-624.
350. Rahman M., Grover A., Peacock W.J., Dennis E.S., Ellis M.H. Effects of manipulation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *Aust. J. Plant Physiol.*, 2001, 28: 1231-1241.
351. Rassow J., Ahsen O., Bömer U., Pfanner N. Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends Cell Biol.*, 1997, 7: 129-133.
352. Reddy R.A., Kurek K.I., Silverstein A.M., Chinkers M., Breiman A., Krishna P. High-molecular weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant Physiol.*, 1998, 118: 1395–1401.
353. Ribeiro A.S., Smolander O., Rajala T., Häkkinen A., Yli-Harja O. Delayed stochastic model of transcription at the single nucleotide level. *J. Computational Biol.*, 2009, 16 (4): 539-553.
354. Richter K., Muschler P., Hainzl O., Buchner J. Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 33689–33696.

355. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18: 571-573.
356. Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler, R. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.*, 2004, 134: 1683–1696.
357. Roberts J.K.M., Wemmer D., Ray P.M., Jardetsky O. Regulation of cytoplasmic and vacuolar pH in maize root tips under different experimental conditions. *Plant Physiol.*, 1982, 69: 1344–1347.
358. Roe S.M., Prodromou C., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.*, 1999, 42 (2): 260-266.
359. Roy S., Begum Y., Chakraborty A., Raychaudhuri S. Radiation-induced phenotypic alterations in relation to isozymes and RAPD markers in *Vigna radiate* (L.) Wilczek. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2006, 82: 823-832.
360. Rutherford S., Hirate Y., Swala B.J. The Hsp90 capacitor, developmental remodeling, and evolution: The robustness of gene networks and the curious evolvability of metamorphosis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2007, 42: 355-372.
361. Rutherford S.L., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 1998, 396: 336-342.
362. Sachs M.M., Freeling M., Okimoto R. The anaerobic proteins of maize. *Cell*, 1980, 20 (3): 761-767.
363. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013, 14: 630–642.
364. Saidi Y., Finka A., Muriset M., Bromberg Z., Weiss Y.G., Maathuis F.J., Goloubinoff P. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *Plant Cell*, 2009, 21: 2829-2843.
365. Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol.*, 2011, 190: 556–565.
366. Salgado R.M., White A.C., Schneider S.M., Mermier C.M. A novel mechanism for cross-adaptation between heat and altitude acclimation: The role of heat shock protein 90. *Physiology*, 2014, 121402.
367. Samakovli D., Thanou A., Valmas C., Hatzopoulos P. Hsp90 canalizes developmental perturbation. *J. Exp. Bot.*, 2007, 58: 3515–3524.
368. Samakovli D., Margaritopoulou T., Prassinis C., Milioni D., Hatzopoulos P. Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytol.*, 2014, 203: 743–757.

369. San C.; Sun-Hee K.; Sung Oh I.; Won-Joong J.; Mi Sook H.; Eun-Jeong P., Dong-Woog C. The heat shock protein 70a from 'Pyropia seriata' increases heat tolerance in 'Chlamydomonas'. *Plant Omics*, 2015, 8 (4): 327-334.
370. Sanders B.M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.*, 1993, 23 (1): 49-75.
371. Sangster T.A., Lindquist S., Queitsch C. Under cover: Causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. *BioEssays*, 2004, 26: 348–362.
372. Sangster T.A., Queitsch C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2005, 8: 86–92.
373. Sangster T.A., Bahrami A., Wilczek A., Watanabe E., Schellenberg K., McLellan C., Kelley A., Kong S.W., Queitsch C., Lindquist S. Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS ONE*, 2007, 7: 1–15.
374. Sangster T.A., Salathia N., Undurraga S., Milo R., Schellenberg K., Lindquist S., Queitsch C. HSP90 affects the expression of genetic variation and development stability in quantitative traits. *PNAS*, 2008a, 105 (8): 2963-2968.
375. Sangster T.A., Salathia N., Lee H.N., Watanabe E., Schellenberg K., Morneau K., Wang H., Undurraga S., Queitsch C., Lindquist S. HSP90-buffered genetic variation is common in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 2008b, 105 (8): 2969-2974.
376. Sarkar N.K., Kundnani P., Grover A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell stress chaperones*, 2012, 18 (4): 427-37.
377. Sato S., Fujita N., Tsurui T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 10832–10837.
378. Sato Y., Yokoya S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.*, 2008, 27: 329-334.
379. Sawarkar R., Sievers C., Paro R. HSP90 globally targets paused RNA polymerase to regulate gene expression in response to environmental stimuli. *Cell*, 2012, 149: 807–818.
380. Scharf K.D., Berberich T., Ebersberger I., Nover L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1819: 104-119.
381. Scheiner S.M., Lyman R.F. The genetics of phenotypic plasticity. II. Response to selection. *J. Evol. Biol.*, 1991, 4: 23-50.
382. Schlichting C.D., Pigliucci M. Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sunderland, USA: Sinauer, 1998, 387 p.

383. Scheibel T., Siegmund H. I., Jaenicke R., Ganz P., Lilie H., Buchner J. The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1999, 96: 1297–1302.
384. Schiene-Fischer C., Habazettl J., Schmid F.X., Fischer G. The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase. *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 9: 419–424.
385. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 2012, 9 (7): 676–682.
386. Schmid F.X. Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.*, 2002, 59: 243–282.
387. Schöffl F., Prändl R., Reindl A. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.*, 1998, 117: 1135–1141.
388. Schramm F., Larkindale J., Kiehlmann E., Ganguli A., English G., Vierling E., von Koskull-Doring P. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 2008, 53: 264–274.
389. Schroda M., Vallon O., Wollman F.A., Beck C.F. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell*, 1999, 11: 1165–1178.
390. Schumann W. Heat shock response. eLS, 2001: DOI: [10.1038/npg.els.0000395](https://doi.org/10.1038/npg.els.0000395)
391. Seago J.L., Marsh L.C., Stevens K.J., Soukup A., Vortubová O., Enstone D.E. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. *Ann. Bot.*, 2005, 96: 565–579.
392. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agent. *Nature*, 1936, 138: 32–34.
393. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.*, 1946, 6: 117–230.
394. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *British medical journal*, 1950, 17: 1383–1392.
395. Selye H. *Stress without distress*. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Co., 1974, 171 p.
396. Senthil-Kumar M., Kumar G., Srikanthbabu V., Udayakumar M. Assessment of variability in acquired thermotolerance: Potential option to study genotypic response and the relevance of stress genes. *J. Plant Physiol.*, 2007, 164: 111–125.
397. Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Sychev V.N., Levinskikh M.A., Sharipova M.R., Il'inskaya O.N., Bingham G., Sugimoto M. Expression of stress

- response genes in barley *Hordeum vulgare* in a spaceflight environment. *Mol. Biol.*, 2010, 44 (5): 734-740.
398. Shahrezaei V., Swain P.S. The stochastic nature of biochemical networks. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008, 19: 369–374.
399. Shatilina Z.M., Riss H.W., Protopopova M.V., Trippe M., Meyer E.I., Pavlichenko V.V., Bedulina D.S., Axenov-Gribanov D.V., Timofeyev M.A. The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) for the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats. *Journal of thermal biology*, 2011, 36: 142-149.
400. Sheffield W.P., Shore G.C., Randall S.K. Mitochondrial precursor protein: effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide folding, aggregation, and import competence. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265: 11069–11076.
401. Shelford V.E. Animal communities in temperate America, as illustrated in the Chicago Region; a study in animal ecology. *Bull. Geogr. Soc. Chicago*, 1913, 5, 362 p.
402. Sheppard S.C., Evenden W.G. Factors controlling the response of field crops to very low doses of gamma irradiation of the seed. *Can. J. Plant Sci.*, 1986, 66: 431-441.
403. Shi Y., Mosser D.D., Morimoto R.I. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.*, 1998, 12: 654–666.
404. Shigeta T., Zaizen Y., Asami T., Yoshida S., Nakamura Y., Okamoto S., Matsuo T., Sugimoto Y. Molecular evidence of the involvement of heat shock protein 90 in brassinosteroid signaling in *Arabidopsis* T87 cultured cells. *Plant Cell Rep.*, 2014, 33 (3): 499-510.
405. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 2007, 58 (2): 221-227.
406. ShuiFeng Y.E., ShunWu Y.U., LieBo S.H.U., JinHong W.U., AiZhong W.U., LiJun L.U.O. Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. *Chinese Sci. Bull.*, 2012, 57 (4): 336-343.
407. Sievers A. From gravitational to space biology in Bonn. *Newsletter ASGSB*, 2000, 16: 18-25.
408. Sigworth F.J. Open channel noise. I. Noise in acetylcholine receptor currents suggests conformational fluctuations. *Biophys. J.*, 1985, 47: 709-720.
409. Silva-Correia J., Freitas S., Tavares R.M., Lino-Neto T., Azevedo H. Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods*, 2014, 10, 7 p.
410. Silvertown J., Charlesworth D. Introduction to plant population biology. 4th edition. Blackwell Science, 2001, 347 p.

411. Singh G.P., Ganapathi M., Dash D. Role of intrinsic disorder in transient interactions of hub proteins. *Proteins*, 2007, 66: 761-765.
412. Singh A., Grover A. Plant Hsp100/ClpB-like proteins: poorly-analyzed cousins of yeast ClpB machine. *Plant Mol. Biol.*, 2010, 74 (4-5): 395-404.
413. Slack J.M.W. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature rev. Genet.*, 2002, 3: 889-895.
414. Smith H. Signal perception, differential expression within multigene families and the molecular basis of phenotypic plasticity. *Plant Cell Environ.*, 1990, 13 (7): 585-594.
415. Smith D.F. Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the deactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol. Endocrinol.*, 1993, 7: 1418-1429.
416. Smith M.R., Willmann M.R., Wu G., Berardini T.Z., Moller B., Weijers D., Poethig R.S. Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106: 5424-5429.
417. Soga K. Gravity resistance in plants. *Biol. Sci. Space*, 2010, 24: 129-134.
418. Song Y.H., Estrada D.A., Johnson R.S., Kima S.K., Leed S.Y., MacCoss M.J., Imaizumi T. Distinct roles of FKF1, GIGANTEA, and ZEITLUPE proteins in the regulation of CONSTANS stability in *Arabidopsis* photoperiodic flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111 (49): 17672-17677.
419. Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 2003, 6: 1025-1037.
420. Stutte G.W., Monje O., Goins G.D., Tripathy B.C. Microgravity effects on thylakoid, single leaf, and whole canopy photosynthesis of dwarf wheat. *Planta*, 2005, 223: 46-56.
421. Stutte G.W., Monje O., Hatfield R.D., Paul A.L., Ferl R.J., Simone G.G. Microgravity effect on leaf morphology, cell structure, carbon metabolism and mRNA expression of dwarf wheat. *Planta*, 2006, 224: 1038-1049.
422. Sun B, Ito T. Regulation of floral stem cell termination in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.*, 2015, 6: 17.
423. Sung D.Y., Kaplan F., Guy C.L. Plant Hsp70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. *Physiol. Plant.*, 2001a, 113: 443-451.
424. Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol.*, 2001b, 126: 789-800.
425. Sung D.Y., Guy C.L. Physiological and molecular assessment of altered expression of *Hsc70-1* in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol.*, 2003, 132 (2): 979-987.

426. Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 2007, 8: 125.
427. Taipale M., Jarosz D., Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11: 515–528.
428. Takabe T., Uchida A., Shinagawa F., Terada Y., Kajita H., Tanaka Y., Takabe T., Hayashi T., Kawai T., Takabe T. Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances growth rate as well as abiotic stress tolerance of poplar plants. *Plant Growth Regul.*, 2008, 56 (3): 265-273.
429. Talalaev A. Expression of small heat shock proteins in pea seedlings under gravity-altered conditions. *J. Plant Physiol.*, 2005, 12: 203-204.
430. Talalaiev A. Expression of messenger RNA of two cytosolic small heat shock proteins under clinorotation. *J. Plant Physiol.*, 2006, 13: 115-116.
431. Talalaiev A., Kordyum E. Expression of small heat shock protein (sHSP) genes in the garden pea (*Pisum sativum*) under slow horizontal clinorotation. *Plant Signal. Behav.*, 2014, 9: e29035
432. Tang T., Yu A., Li P., Yang H., Liu G., Liu L. Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 33650.
433. Tartaglia G.G., Pechmann S., Dobson C.M., Vendruscolo M. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 2007, 32: 204–206.
434. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol. Cell Proteom*, 2005, 4: 1122-1133.
435. Tepfer D., Leach S. Plant seeds as model vectors for the transfer of life through space. *Astrophys. Space Sci.*, 2006, 306: 69-75.
436. Timofeyev M., Shatilina Z.M., Protopopova M.V., Bedulina D.S., Pavlichenko V.V., Kolesnichenko A.V., Steinberg C.E.W. Thermal stress defense in freshwater amphipods from contrasting habitats with emphasis on small heat shock proteins (sHSPs). *J. Thermal Biol.*, 2009, 34: 281–285.
437. Tissières A., Mitchell H.K., Tracy U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 1974, 84: 389-398.
438. Tomanek L., Somero G.N. Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different tidal heights. *Physiol. Biochem. Zool.*, 2000, 73 (2): 249-256.

439. Tomanek L. The heat-shock response: its variation, regulation and ecological importance in intertidal gastropods (genus *Tegula*). *Integrat. Compar. Biol.*, 2002, 42: 797–807.
440. Tomanek L., Zuzow M.J. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J. Exp. Biol.*, 2010, 213, 3559–3574.
441. Travers S.A.A., Fares M.A. Functional coevolutionary networks of the Hsp70-Hsp90 system revealed through computational analyses. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, 24: 1032–1044.
442. Trewavas A. Aspects of plant intelligence. *Ann. Bot.*, 2003, 92: 1-20.
443. Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11 (11): 777-788.
444. Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, 17: 113–122.
445. Uversky V.N. What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269: 2-12.
446. Uversky V.N., Oldfield C.J., Dunker A.K. Showing your ID: Intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J. Mol. Recognit.*, 2005, 18: 343–384.
447. Van Der Vyver C., Vorster B.J., Kunert K.J., Cullis C.A. Analysis of radiation-induced genome alterations in *Vigna unguiculata*. *Res.Rep. Biol.*, 2011, 2: 89-99.
448. van Loon J.J.W.A., van Laar M.C., Korterik J.P. Segerink F.B., Wubbels R.J., de Jong H.A.A., Van Hulst N.F. Gravity changes cell shape. *ELGRA News*, 2005, 24: 85.
449. Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1991, 42: 579-620.
450. Volkman D., Behrens H.M., Sievers A. Development and gravity sensing of cress roots under microgravity. *Naturwissenschaften*, 1986, 73 (7): 438–441.
451. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schöffl F. Heat stress-induced H(2)O(2) is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 2006, 61: 733–746.
452. von Koskull-Döring P., Scharf K.D., Nover L. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.*, 2007, 12: 452-457.
453. Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 1942, 150 (3811): 563–565.

454. Wandinger S.K., Richter K., Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 18473–18477.
455. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.*, 2004, 9 (5), 244-252.
456. Wang H., Zheng H., Sha W., Zeng R., Xia Q.C. A proteomic approach to analyzing responses of *Arabidopsis thaliana* callus cells to clinostat rotation. *J. Exp. Bot.*, 2006, 57: 827-835.
457. Wang X.Q., Yang P.F., Liu Z., Liu W.Z., Hu Y., Chen H., Kuang T.Y., Pei Z.M., Shen H.S., He Y.K. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy. *Plant Physiol.*, 2009, 149: 1739-1750.
458. Wang R., Zhang Y., Kieffer M., Yu H., Kepinski S., Estelle M. HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in *Arabidopsis* by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nat. Commun.*, 2016, 7: 10269.
459. Watanabe E, Mano S, Nomoto M., Tada Y., Hara-Nishimura I., Nishimura M., Yamada K. HSP90 stabilizes auxin-responsive phenotypes by masking a mutation in the auxin receptor TIR1. *Plant Cell Physiol.*, 2016, 57 (11): 2245-2254.
460. Watanabe E, Mano S, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Yamada K. HSP90 stabilizes auxin receptor TIR1 and ensures plasticity of auxin responses. *Plant Signal Behav.*, 2017, 12 (5): e1311439.
461. Waters E.R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.*, 2013, 64 (2): 391-403.
462. Wehmeyer N., Hernandez L. D., Finkelstein R. R., Vierling E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the development program of late seed maturation. *Plant Physiol.*, 1996, 112: 747-757.
463. Weigel D., Glazebrook J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, 354 p.
464. Went F.W. Reflections and speculations. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1974, 25: 1-26.
465. Werner I., Hinton D.E. Field validation of hsp70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers*, 1999, 4 (6): 473-484.
466. Wiech H., Buchner J., Zimmermann R., Jakob U. Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, 1992, 358: 169–170.
467. Wong C.E., Li Y., Whitty B.R., Diaz-Camino C., Akhter S.R., Brandle J.E., Golding G.B., Weretilnyk E.A., Moffatt B.A., Griffith M. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in

- response to cold, drought and salinity shows little overlap. *Plant Mol. Biol.*, 2005, 58: 561-574.
468. Wu S.H., Wang C., Chen J., Lin B.L. Isolation of a cDNA encoding a 70 kDa heat-shock cognate protein expressed in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 1994, 25: 577–583.
469. Yabe N., Takahashi T., Komeda Y. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* Hsp90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol.*, 1994, 35: 1207–1219.
470. Yamada K., Fukao Y., Hayashi M., Fukazawa M., Suzuki I., Nishimura M. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 37794–37804.
471. Ye T., Shi H., Wang Y., Chan Z. Contrasting changes caused by drought and submergence stresses in bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Front. Plant Sci.*, 2015, 6: 951.
472. Yer, E.N., Baloglu, M.C., Ziplar, U.T., Ayan S., Unver T. Drought-responsive *Hsp70* gene analysis in *Populus* at genome-wide level. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2016, 34: 483.
473. Yeyati P.L., Bancewicz R.M., Maule J., van Heyningen V. Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. *PLoS Genet.*, 2007, 3 (3): 0431-0447: e43.
474. Yin Y., Wang Z.Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 2002, 109: 181–191.
475. Yost H.J., Petersen R.B., Lindquist S. RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *Trends Genet.*, 1990, 6: 223-227.
476. You Y., Sawikowska A., Neumann M., Posé D., Capovilla D., Langenecker T., Neher R. A., Krajewski P., Schmid M. Temporal dynamics of gene expression and histone marks at the *Arabidopsis* shoot meristem during flowering. *Nat. Commun.*, 2017, 8: 15120.
477. Young J.C., Schneider C., Hartl F.U. *In vitro* evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.*, 1997, 418: 139–143.
478. Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.*, 2001, 154: 267–273.
479. Yousef H.A., Afify A., Meguid A.A., Hassan H.M. Heat shock proteins development in different stages of *Schistocerca gregaria* as response to heavy metals intoxication. *Natural Science*, 2011, 3 (3): 218-226.
480. Yung T.E., Ling J., Geisler-Lee C.J., Tanguay R.L., Caldwell C., Gallie D.R. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101. *Plant Physiol.*, 2001, 127: 777-791.

481. Zabinsky R.A., Mason G.A., Queitsch C., Jarosz D.F. It's not magic—Hsp90 and its effects on genetic and epigenetic variation. *Seminars in cell developmental biology*, 2018, 5: S1084-9521(17)30367-1.
482. Zabinsky R.A., Mares J., Shel R., Zeman M.K., Silvers T.R., Jarosz D.F. A stress response that allows highly mutated eukaryotic cells to survive and proliferate. *bioRxiv*, 2019, <http://dx.doi.org/10.1101/515460>.
483. Zhang X.P., Glaser E. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.*, 2002, 7: 14–21.
484. Zhang X., Guo S.L., Yin H.B., Xiong D.J., Zhang H., Zhao Y.X. Molecular cloning and identification of a heat shock cognate protein 70 gene, *ThHSC70*, in *Thellungiella halophila*. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46: 1212-1219.
485. Zhang X.-C., Millet Y.A., Cheng Z., Bush J., Ausubel F.M. Jasmonate signalling in *Arabidopsis* involves SGT1b–HSP70–HSP90 chaperone complexes. *Nat. Plants*, 2015, 1: pii 15049.
486. Zhao R., Davey M., Hsu Y.-C., Kaplanek P., Tong A., Parsons A.B., Krogan N., Cagney G., Mai D., Greenblatt J., Boone C., Emili A., Houry W.A. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone. *Cell*, 2005, 120: 715-727.
487. Zhu J.K. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6: 66-71.
488. Zimmerman S.B., Trach S.O., Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 1991, 222 (3): 599-620.
489. Zou J., Guo Y., Guettouche T., Smith D. F., Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 1998, 94: 471–480.
490. Zou J., Liu A., Chen X., Zhou X., Gao G., Wang W., Zhang X. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *J. Plant Physiol.*, 2009, 166: 851-861.
491. Zupanska A.K., Denison F.C., Ferl, R.J., Paul, A.-L. Spaceflight engages heat shock protein and other molecular chaperone genes in tissue culture cells of *Arabidopsis thaliana*. *Am. J. Bot.*, 2013, 100 (1): 235–248.

Додаток А

Білки-клієнти шаперонів HSP90 в рослин

Білки-клієнти HSP90	Процес	Фенотипічні зміни при порушенні експресії гена	Вид	Залежність від HSP90	Посилання
1	2	3	4	5	6
Транскрипційні фактори теплового шоку, HSF					
HsfA1	Головні регулятори експресії <i>HSP</i>	Зміни базової та індукованої ТС; на морфологію не впливає	Рослини	Зв'язується комплексом HSP90/HSP70 за н. у.	Hahn et al., 2011; Scharf et al., 2012
AtHsfA1d	Регулятор експресії <i>HSP</i> (К/І)	Зниження ТС при одночасному вимиканні ще 2-3 HsfA1, в останньому випадку – множинні порушення фенотипу	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-2 за н. у.	Yamada et al., 2007; Liu et al., 2011
AtHsfA2	Підсилювач експресії <i>HSP</i> (І)	Скорочення тривалості індукованої ТС; на морфологію не впливає; пригнічення росту калюсу	<i>A. thaliana</i>	Залежить від AtHSP90-1 і ко-шаперонів ROF1/FKBP6 2 ROF2/FKBP6 5	Charng et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Meiri, Breiman, 2009; Meiri et al., 2010
HsfA2	Компонент гранул теплового шоку	—	Рослини	Вивільнення з гранул залежить від HSP90 та інгібується ГДА	Scharf et al., 1998
AtHsfA7a	Регулятор експресії <i>HSP</i> (І)	Слабка індукція ТС; на морфологію не впливає	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-2 за н. у.	Yamada et al., 2007
HsfB	Синергічний ко-активатор HsfA1 / репресор експресії <i>HSP</i> (К/І)	На морфологію не впливає	Рослини	Асоційований з комплексом HSP90/HSP70 за н. у.	Hahn et al., 2011; Scharf et al., 2012

1	2	3	4	5	6
AtHsfB1	Синергічний ко-активатор HsfA1/ репресор експресії <i>HSP</i> (K/I)	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-2 за н. у.	Yamada et al., 2007
Інші HSP90-залежні білки					
HTD1, компонент убіквітин-лігаз CRL4	Негативна регуляція ТС	Зниження ТС	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-1	Kim et al., 2014
BIN2 кіназа	БР-сигналінг рослин	Затримка росту і розвитку, порушення архітектури ксилеми гіпокотила	<i>A. thaliana</i>	Ядерна/ цитозольна локалізація і активність залежить від AtHSP90-1 і AtHSP90-3	Yin et al., 2002; Samakovl i et al., 2014
BES1, транскрипційний фактор	БР-сигналінг рослин	Карликовість, листя з довгими черешками і вузькими епінастичними пластинками, зміна довжини гіпокотила, реакції на червоне світло, темряву, ГДА	<i>A. thaliana</i>	Негативний контроль біосинтезу БР гетеро-комплексом HSP90-BES1	Yin et al., 2002; Lachowiec et al., 2013; Shigeta et al., 2014
SCF E3, убіквітин-лігазний комплекс	Протеоліз білків клітинного циклу	—	<i>A. thaliana</i>	Зборка комплексу регулюється HSP90 і ко-шапероном SGT1	Kim et al., 2011
TIR1, F-бох-білок, ко-рецептор ауксину, субодиниця убіквітин-лігази SCF E3	Протеоліз Аух/ІАА забезпечує трансдукцію сигналу ауксину; регуляція ростових процесів	Втрата чутливості до ауксину, менша кількість латеральних коренів, зміна ростової реакції на підвищену температуру	<i>A. thaliana</i>	Стабілізація TIR1 в ядрі залежить від HSP90–SGT1	Wang et al., 2016; Watanabe et al., 2016, 2017

1	2	3	4	5	6
COI1, F-box-білок, рецептор жасмонової кислоти, субодиниця убіквітин-лігази SCF E3	Сигналінг жасмонової кислоти	Втрата чутливості до жасмонової кислоти	<i>A. thaliana</i>	Підтримка стабільності комплексом SGT1b–HSP70–HSP90	Zhang et al., 2015
ZTL, F-box-білок, фоторецептор синього світла, субодиниця убіквітин-лігази SCF	Протеоліз білків циркадних ритмів	Подовження циркадного періоду	<i>A. thaliana</i>	Дозрівання і стабілізація залежать від цитозольних HSP90	Kim et al., 2011
CCA1/LHY, PRR7, підсилювачі сигналу	Циркадні ритми	Дефект циркадного ритму	<i>A. thaliana</i>	Залежність функціонування від HSP90-2, за припущенням	Davis et al., 2018
FKF1, флавін-залежний F-box-білок	Участь в регуляції цвітіння	Пізнє цвітіння	<i>A. thaliana</i>	Стабілізація залежить від AtHSP90-3	Song et al., 2014
RISC, РНК-білковий комплекс	РНК-інтерференція	—	Протопласти тютюну	Збірка і функціонування комплексу залежить від HSP90	Smith et al., 2009; Iki et al., 2010
AGO1, компонент комплексу RISC	РНК-інтерференція	Збільшені еліптичні перші листки розетки, затримка ініціації та зростання наступних листків, менше число розеткових і більше число стеблових листків, нерегулярне розташування квіток на квітконосі	<i>A. thaliana</i>	Регулюється цитозольними HSP90 з кошапероном SQN	Smith et al., 2009; Earley, Poethig, 2011
GRF2, GRF10, родина шаперонів 14-3-3	Модуляція білкових взаємодій і активності ферментів	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-2	Chang et al., 2009; Swatek et al., 2011

1	2	3	4	5	6
Тос64, компонент транслокону зовнішньої мембрани хлоропластів	Пост- трансляцій- ний імпорт білка до хлоропластів	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується цитозольними HSP90	Aronson et al., 2007; Schweige r et al., 2013
Тіс40, компонент транслокону внутрішньої мембрани хлоропластів	Пост- трансляцій- ний імпорт білка до хлоропластів	Хлороз, порушення розвитку хлоропластів, відставання в рості (як у <i>Athsp90-5</i>)	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-5 (HSP90C)	Inoue et al., 2013; Kovache va et al., 2005
Тіс110, компонент транслокону внутрішньої мембрани хлоропластів	Пост- трансляцій- ний імпорт білка до хлоропластів	Зупинка розвитку зародка на стадії глобули	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-5 (HSP90C)	Inoue et al., 2013; Kovache va et al., 2005
VIPP1/PTAC4	Біогенез мембран тилакоїдів пластид	Хлороз, порушення біогенезу тилакоїдів	<i>A. thaliana, Chlamido monas</i>	AtHSP90-5 (HSP90C) зв'язує і допомагає в розбиранні VIPP1 у мембрано- генезі	Kroll et al., 2001; Heide et al., 2009; Feng et al., 2014
CLV1/CLV2/C LV3, комплекс транс мембран- них рецептор- подібних білків з кіназною активністю в CLV1	Визначення меристема- тичного статусу клітин, перехід до диференцію- вання	Дезорганізація стеблової, флоральної і кореневої меристем, пучкоподібне розходження стебла, збільшена кількість органів квітки, коротке коріння, порушення розтягування пилкових трубок	<i>A. thaliana</i>	Для фолдингу і активації комплексу потрібний AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Ishiguro et al., 2002
SYP22, SYP31, SYP32, SYP41, SYP42, SYP43, SYP111, SYP121, SYP132, рецептори SNARE	Злиття транспортних везикул з плазмалеомою або органелами	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Fujiwara et al., 2014

1	2	3	4	5	6
F22K18.70, кальціневрін- подібна метало-фосфо- діестераза	Процесинг мРНК, фосфорилю- вання білків	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Chong et al., 2015
SMT2, стирол метил- трансфераза	Біосинтез стиролу	Дефекти провідних пучків сім'ядоль і флоральних органів, менші розміри організму	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Chong et al., 2015; Carland et al., 2002
PRXR1, пероксидаза	Антиоксидант на активність; біосинтез кумарину і фенілпропа- ноїду	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Chong et al., 2015
F6I7.12, пектатліаза	Розщеплення пектину	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Chong et al., 2015
T27E13.12, УДФ- глікозил- трансфераза	Синтез і розпад полісахаридів	—	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Chong et al., 2015
АТАСХ1, ацил-коензим А оксидаза 1 пероксисом	Катаболізм жирних кислот	Порушення біосинтезу жасмонової кислоти при пораненні, коріння меншої довжини	<i>A. thaliana</i>	Зв'язується AtHSP90-7 (GRP94, SHD)	Chong et al., 2015; Hooks et al., 1999
NLR-білки (NBS-LRR-білки), R-білки					
RPM1	Активация реакції гіпер- чутливості до <i>Pseudomonas syringae</i>	Зниження стійкості до патогену	<i>A. thaliana</i>	Стабільність і специфічність функціону- вання залежить від цитозольних HSP90	Hubert et al., 2003
NDR1, білок з глікозил- фосфатидил- інозитольним якорем	Компонент RPM1- сигналіngu (див. вище)	—	<i>A. thaliana</i>	Залежить від цитозольних HSP90	Hubert et al., 2003
RPS2	Активация реакції гіпер- чутливості до <i>Pseudomonas syringae</i>	Зниження стійкості до патогену	<i>A. thaliana</i>	Активация залежить від AtHSP90-1	Takahash i et al., 2003

1	2	3	4	5	6
Pto	Резистентність до <i>Pseudomonas syringae</i>	Зниження стійкості до патогену	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Залежить від HSP90	Lu et al., 2003
Rx	Резистентність до вірусу картоплі X	Зниження стійкості до патогену	<i>Nicotiana benthamiana</i> , трансген по Rx	Залежить від HSP90	Lu et al., 2003
N	Резистентність до вірусу тютюнової мозаїки	Зниження стійкості до патогену	<i>Nicotiana benthamiana</i> , трансген по N	Залежить від HSP90	Lu et al., 2003; Liu et al., 2004
MLA1, MLA6	Активація реакції гіперчутливості до <i>Blumeria graminis</i> f sp <i>hordei</i>	Зниження стійкості до патогену	<i>Hordeum vulgare</i>	Залежить від HSP90	Bieri et al., 2004
RPP	Активація реакції гіперчутливості до <i>Peronospora parasitica</i>	Зниження стійкості до патогену	<i>A. thaliana</i>	Компетентність до сприйняття сигналу залежить від HSP90 з кошаперонами	Holt et al., 2005
OsCERK1, рецептор хітину, і OsRac1, рослинна ГТФаза Rho-типу	Імунна відповідь, ініційована хітином	Зниження стійкості до патогенних грибів	<i>Oryza sativa</i>	Утворення комплексу, транспортування з ER до плазмалеми і підтримання компетентності залежить від HSP90 і кошаперона Нор	Chen et al., 2010

Примітка. БР - брасиностероїди, ГДА - гелданаміцин, ER – ендоплазматичний ретикулум, І - індукцибельний, К - конститутивний, н. у. - нормальні умови, ТС –теплостійкість.

Додаток Б

Фенотипи з морфологічними відхиленнями в 12-добових проростків *A. thaliana* (Col-0) після обробки насіння ГДА у різних концентраціях

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над ризкою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під ризкою)						
		Контроль	0,1 мкМ ГДА	0,5 мкМ ГДА	1 мкМ ГДА	5 мкМ ГДА	10 мкМ ГДА	50 мкМ ГДА
1 сім'ядоля S-подібна	–	<u>0,9%</u> 1/114	<u>1,7%</u> 2/116	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	–	–	<u>0,9%</u> 1/115	–	–	–	–
Сім'ядолі S-подібні	–	<u>1,8%</u> 2/114	<u>1,7%</u> 2/116	<u>3,5%</u> 4/115	<u>1,7%</u> 2/116	<u>1,8%</u> 2/112	<u>6,8%</u> 8/118	<u>3,6%</u> 4/112
	1 сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	–	<u>0,9%</u> 1/116	–	–	–	–	–
	Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	–	<u>0,9%</u> 1/115	<u>0,9%</u> 1/116	–	–	–
	Черешки листків з плоскими крилами	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/116	–	–	–
	Листки епінастичні	–	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112
	Листки S-подібні	–	–	<u>0,9%</u> 1/115	–	–	–	–
Кут між сім'ядолями менше 120°	–	–	<u>0,9%</u> 1/116	<u>0,9%</u> 1/115	<u>1,7%</u> 2/116	–	–	–
Черешки сім'ядоль епінастичні	–	<u>0,9%</u> 1/114	–	–	<u>2,6%</u> 3/116	<u>1,8%</u> 2/112	–	<u>0,9%</u> 1/112

Продовж. дод. Б

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над рискою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під рискою)						
Відхилення	Супутні відхилення	Контроль	0,1 мкМ ГДА	0,5 мкМ ГДА	1 мкМ ГДА	5 мкМ ГДА	10 мкМ ГДА	50 мкМ ГДА
1 сім'ядольна пластинка епінастична	–	<u>0,9%</u> 1/114	<u>1,7%</u> 2/116	<u>3,5%</u> 4/115	<u>1,7%</u> 2/116	<u>4,5%</u> 5/112	<u>3,4%</u> 4/118	<u>5,4%</u> 6/112
	Друга сім'ядоля S-подібна	–	–	–	–	–	<u>1,7%</u> 2/118	–
	Друга сім'ядоля та листки S-подібні	–	–	<u>0,9%</u> 1/115	–	–	–	–
Сім'ядолі епінастичні	–	<u>0,9%</u> 1/114	<u>1,7%</u> 2/116	<u>0,9%</u> 1/115	<u>3,4%</u> 4/116	<u>2,7%</u> 3/112	<u>4,2%</u> 5/118	<u>8,0%</u> 9/112
	Епінастія різного ступеню	<u>0,9%</u> 1/114	–	<u>1,7%</u> 2/115	<u>1,7%</u> 2/116	<u>1,8%</u> 2/112	<u>0,8%</u> 1/118	<u>1,8%</u> 2/112
	1 сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	–	<u>0,9%</u> 1/116	–	–	–	–	–
	Сім'ядольні пластинки опуклі	–	–	–	–	–	–	<u>2,7%</u> 3/112
	1 листок нерозвинений	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	<u>0,9%</u> 1/112
	2 листки нерозвинені	–	–	<u>0,9%</u> 1/115	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Гіпокотиль короткий	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/116	<u>0,9%</u> 1/112	–	–
	Гіпокотиль лежить на середовищі	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	<u>0,9%</u> 1/112
	2 листки нерозвинені, гіпокотиль короткий, проросток лежить	–	–	–	–	–	<u>1,7%</u> 2/118	–
	2 листки епінастичні	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	<u>2,7%</u> 3/112

Продовж. дод. Б

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над рискою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під рискою)						
Відхилення	Супутні відхилення	Контроль	0,1 мкМ ГДА	0,5 мкМ ГДА	1 мкМ ГДА	5 мкМ ГДА	10 мкМ ГДА	50 мкМ ГДА
Сім'ядолі епінастичні	2 листки S-подібні	–	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112
	2 листки S-подібні, гіпокотиль короткий	–	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112
	Пластинка одного листка орієнтована вертикально	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–
	1 листок перевернутий абаксальною поверхнею догори	–	–	<u>0,9%</u> 1/115	–	–	–	–
	Черешки листків короткі, потовщені	–	–	–	–	–	–	<u>2,7%</u> 3/112
	Сім'ядолі жовті, черешки листків короткі, потовщені	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	<u>0,9%</u> 1/112
	Сім'ядолі світлі, безхлорофільні	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Сім'ядолі світлі, безхлорофільні, листки епінастичні	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Сім'ядолі світлі, безхлорофільні, листки епінастичні, проросток лежить	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Гіпокотиль антоціанового кольору	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Гіпокотиль антоціанового кольору, сім'ядолі світлі, безхлорофільні	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Черешки листків антоціанового кольору	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/116	–	<u>1,7%</u> 2/118	–
	Черешки листків антоціанового кольору, потовщені	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	<u>0,9%</u> 1/112

Продовж. дод. Б

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над рискою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під рискою)						
Відхилення	Супутні відхилення	Контроль	0,1 мкМ ГДА	0,5 мкМ ГДА	1 мкМ ГДА	5 мкМ ГДА	10 мкМ ГДА	50 мкМ ГДА
Сім'ядолі епінастичні	Сім'ядолі світлі, безхлорофільні, черешки листків антоціанового кольору	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
	Проросток карликовий	–	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112
Одна сім'ядоля >> за другу	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/116	<u>0,9%</u> 1/112	<u>1,7%</u> 2/118	–
	1 сім'ядольна пластинка епінастична	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–
	Листки епінастичні	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
Черешок однієї сім'ядолі короткий	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–
Черешок одного листка короткий	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–
1 сім'ядоля світла, безхлорофільна	–	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
Гіпокотиль та черешки листіків антоціанового кольору	–	–	–	–	–	–	<u>2,5%</u> 3/118	–

Продовж. дод. Б

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над рискою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під рискою)						
Відхилення	Супутні відхилення	Контроль	0,1 мкМ ГДА	0,5 мкМ ГДА	1 мкМ ГДА	5 мкМ ГДА	10 мкМ ГДА	50 мкМ ГДА
Проросток антоціанового кольору	–	–	–	–	–	–	<u>2,5%</u> 3/118	–
	Проросток лежить на середовищі	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
1 сім'ядольна пластинка з дефектом краю	–	–	<u>0,9%</u> 1/116	–	<u>0,9%</u> 1/116	–	–	–
Сім'ядолі нерозвинені, гіпокотиль лежить	–	–	–	–	–	–	–	<u>1,8%</u> 2/112
1 сім'ядоля і перша пара листіків редуковані	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/112
Проросток деформований	–	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/118	–
Проросток великий	–	–	–	<u>1,7%</u> 2/115	<u>1,7%</u> 2/116	<u>2,7%</u> 3/112	<u>0,8%</u> 1/118	<u>1,8%</u> 2/112
Всього проростків з відхиленнями		<u>6,1%</u> 7/114	<u>10,3%</u> 12/116	<u>17,4%</u> 20/115	<u>19,8%</u> 23/116	<u>23,2%</u> 26/112	<u>40,8%</u> 47/118	<u>39,3%</u> 44/112

Примітка: «Листки» – перша пара листків розетки.

Додаток В

Фенотипи з морфологічними відхиленнями в 12-добових проростків *A. thaliana*, вирощених з насіння природних популяцій після обробки 2 мкМ ГДА

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над ризкою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під ризкою)											
		Col-0		Популяція 1		Популяція 2		Популяція 3		Популяція 4		Популяція 5	
Відхилення	Супутні відхилення	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА
1 сім'ядоля S-подібна	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/121	–	–	–
	Друга сім'ядоля епінастична	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/140	–	–
	Гіпокотиль короткий	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/140	–	<u>0,7%</u> 1/141
Сім'ядолі S-подібні	–	<u>0,8%</u> 1/120	<u>0,7%</u> 1/143	–	–	<u>0,9%</u> 1/113	<u>0,8%</u> 1/122	–	–	<u>0,8%</u> 1/121	<u>0,7%</u> 1/140	–	<u>0,7%</u> 1/141
	Кут між сім'ядолями менше 120°	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/140	–	–
	1 сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	–	<u>0,7%</u> 1/143	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/122	–	–	–	–	–	–
	Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	<u>0,7%</u> 1/143	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/147
Кут між сім'ядолями менше 120°	–	–	<u>1,4%</u> 2/143	–	–	<u>0,9%</u> 1/113	<u>0,8%</u> 1/122	<u>0,8%</u> 1/130	–	–	–	–	–
	Сім'ядольні пластинки епінастичні	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/147	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/133	–	–	–	–

Продовж. дод. В

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями											
		Col-0		Популяція 1		Популяція 2		Популяція 3		Популяція 4		Популяція 5	
Відхилення	Супутні відхилення	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА
Сім'ядолі опущені	–	<u>0,8%</u> 1/120	<u>2,1%</u> 3/143	–	<u>0,7%</u> 1/147	–	–	<u>0,8%</u> 1/130	<u>1,5%</u> 2/133	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/147
1 сім'ядоля опущена	–	<u>0,8%</u> 1/120	<u>2,1%</u> 3/143	–	–	–	–	<u>1,5%</u> 2/130	<u>1,5%</u> 2/133	–	<u>1,4%</u> 2/140	–	<u>1,4%</u> 2/141
Сім'ядольні пластинки епінастичні	–	<u>1,7%</u> 2/120	<u>2,8%</u> 4/143	<u>0,8%</u> 1/120	<u>1,4%</u> 2/147	<u>0,9%</u> 1/113	–	<u>1,5%</u> 2/130	<u>0,8%</u> 1/133	<u>0,8%</u> 1/121	<u>1,4%</u> 2/140	<u>0,9%</u> 1/114	<u>1,4%</u> 2/141
	Епінастія різного ступеню	–	<u>0,7%</u> 1/143	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/133	–	–	–	–
	1 сім'ядоля жовта	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/133	–	–	–	–
Одна сім'ядоля >> за другу	–	–	<u>0,7%</u> 1/143	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/133	–	<u>0,7%</u> 1/140	–	–
	Сім'ядолі деформовані	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/133	–	–	–	–
1 сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	–	<u>0,8%</u> 1/120	<u>0,7%</u> 2/143	<u>0,8%</u> 1/120	<u>1,4%</u> 2/147	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/133	<u>0,8%</u> 1/121	<u>1,4%</u> 2/140	<u>2,6%</u> 3/114	<u>2,8%</u> 4/141
Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	–	<u>0,7%</u> 1/143	<u>0,8%</u> 1/120	<u>1,4%</u> 2/147	<u>0,9%</u> 1/113	<u>1,6%</u> 2/122	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/141
1 сім'ядоля перевернута абаксіальною поверхнею догори	–	–	–	–	<u>2,7%</u> 4/147	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/121	–	–	–
	Гіпокотиль короткий	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/140	–	–

Продовж. дод. В

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями											
		Col-0		Популяція 1		Популяція 2		Популяція 3		Популяція 4		Популяція 5	
Відхилення	Супутні відхилення	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА
Сім'ядольні пластинки з дефектом краю	Карликовий проросток	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/113	<u>1,6%</u> 2/122	–	–	–	–	–	–
Гіпокотиль короткий	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/147	–	–	–	–	–	<u>0,7%</u> 1/140	–	<u>0,7%</u> 1/141
Проросток великий	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/113	<u>1,6%</u> 2/122	–	<u>0,8%</u> 1/133	–	–	<u>0,9%</u> 1/114	<u>1,4%</u> 2/141
Проросток карликовий	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/120	<u>1,4%</u> 2/147	<u>0,9%</u> 1/113	<u>2,5%</u> 3/122	<u>1,5%</u> 2/130	<u>3,8%</u> 5/133	<u>1,7%</u> 2/121	<u>6,4%</u> 9/140	<u>1,8%</u> 2/114	<u>5,0%</u> 7/141
Деформований проросток	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/130	–	–	–	–	–
Проросток складається з сім'ядолі	–	–	–	–	–	<u>0,9%</u> 1/113	–	–	–	–	–	–	–
Всього проростків з відхиленнями		<u>5,0%</u> 6/120	<u>14,6%</u> 21/143	<u>6,7%</u> 8/120	<u>19,7%</u> 29/147	<u>12,4%</u> 14/113	<u>20,5%</u> 25/122	<u>7,7%</u> 10/130	<u>18,0%</u> 24/133	<u>7,4%</u> 9/121	<u>20,0%</u> 28/140	<u>7,9%</u> 9/114	<u>20,6%</u> 29/141

Примітка: «Листки» – перша пара листків розетки.

Додаток Г

**Фенотипи з морфологічними відхиленнями в 12-добових проростків *A. thaliana* (Col-0) після опромінення насіння
УФ-В і обробки 5 мкМ ГДА**

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над ризикою) і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (під ризикою)							
		Контроль		0,017 кДж/м ²		1,7 кДж/м ²		4,1 кДж/м ²	
Відхилення	Супутні відхилення	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА
1 сім'ядоля S-подібна	-	<u>0,9%</u> 1/114	-	-	<u>0,5%</u> 1/190	-	-	-	<u>0,5%</u> 1/188
Сім'ядолі S-подібні	-	-	<u>0,7%</u> 1/143	-	<u>0,5%</u> 1/190	-	-	-	-
	Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально, кут між сім'ядолями менше 120°	-	<u>0,7%</u> 1/143	-	-	-	-	-	<u>0,5%</u> 1/188
	Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально, листки S-подібні	-	-	-	-	-	-	-	<u>0,5%</u> 1/188
Кут між сім'ядолями менше 120°	Сім'ядолі увігнуті, 1 пластинка з дефектом краю, друга пара листків деформована	-	-	-	-	-	-	-	<u>0,5%</u> 1/188
	Сім'ядолі увігнуті, епінастичні, перша пара листків гігантські	-	-	-	-	-	-	-	<u>0,5%</u> 1/188
	1 сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	-	-	-	<u>0,5%</u> 1/190	-	-	-	-

Продовж. дод. Г

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями							
		Контроль		0,017 кДж/м ²		1,7 кДж/м ²		4,1 кДж/м ²	
Відхилення	Супутні відхилення	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА
Кут між сім'ядолями менше 120°	Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	–	–	<u>1,1%</u> 2/190	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
	1 сім'ядоля перевернута абаксіальною поверхнею догори	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
1 сім'ядоля опущена	–	–	–	<u>1,1%</u> 2/186	<u>2,1%</u> 4/190	<u>1,0%</u> 1/104	–	<u>0,5%</u> 1/192	–
	Сім'ядольна пластинка увігнута	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
	Друга сім'ядольна пластинка епінастична	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
Сім'ядолі опущені	–	<u>0,9%</u> 1/114	<u>1,8%</u> 2/112	–	–	–	–	–	–
	Сім'ядольні пластинки увігнуті	–	–	<u>1,6%</u> 3/186	<u>3,7%</u> 7/190	–	–	<u>0,5%</u> 1/192	–
	Сім'ядольні пластинки увігнуті, черешки листків антоціанового кольору	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
	Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	–	–	<u>1,1%</u> 2/190	–	–	–	–
	1 листок епінастичний	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
	Проросток лежить	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–

Продовж. дод. Г

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями							
		Контроль		0,017 кДж/м ²		1,7 кДж/м ²		4,1 кДж/м ²	
Відхилення	Супутні відхилення	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА
1 сім'ядольна пластинка епінастична	–	<u>0,9%</u> 1/114	<u>4,5%</u> 5/112	<u>3,2%</u> 6/186	<u>4,2%</u> 8/190	–	<u>5,0%</u> 6/119	<u>1,6%</u> 3/192	<u>4,8%</u> 9/188
	Друга сім'ядоля абаксіальною поверхнею догори	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
Сім'ядольні пластинки епінастичні	–	<u>0,9%</u> 2/114	<u>2,7%</u> 5/112	<u>3,2%</u> 6/186	<u>4,2%</u> 8/190	<u>2,9%</u> 3/104	<u>4,2%</u> 5/119	<u>3,6%</u> 7/192	<u>3,2%</u> 6/188
	Пластинка листка орієнтована вертикально	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
	Перша пара листків гігантська	–	–	–	–	–	–	–	<u>1,1%</u> 2/188
1 сім'ядольна пластинка орієнтована вертикально	–	–	–	<u>1,1%</u> 2/186	<u>2,6%</u> 5/190	<u>1,9%</u> 2/104	<u>5,0%</u> 6/119	<u>1,0%</u> 2/192	<u>1,6%</u> 3/188
Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	–	–	–	<u>1,6%</u> 3/190	<u>1,0%</u> 1/104	<u>5,8%</u> 7/119	–	<u>1,6%</u> 3/188
1 сім'ядоля перевернута абаксіальною поверхнею догори	–	–	–	<u>1,6%</u> 3/186	<u>1,1%</u> 2/190	<u>6,7%</u> 7/104	<u>10,8%</u> 13/119	<u>1,0%</u> 2/192	<u>1,6%</u> 3/188

Продовж. дод. Г

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями							
		Контроль		0,017 кДж/м ²		1,7 кДж/м ²		4,1 кДж/м ²	
Відхилення	Супутні відхилення	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА
Сім'ядолі перевернуті абаксіальною поверхнею догори	–	–	–	<u>1,1%</u> 2/186	<u>4,7%</u> 9/190	<u>1,0%</u> 1/104	<u>4,2%</u> 5/119	–	<u>0,5%</u> 1/188
	Гіпокотиль короткий	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
	Одна сім'ядоля >> за другу, черешок листка розрісся	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
Сім'ядолі перевернуті	Перша пара листків гігантська	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
1 сім'ядольна пластинка з дефектом краю	–	–	–	<u>1,6%</u> 3/186	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
	Перша пара листків нерозвинена	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
	Проросток лежить гіпокотилем догори	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
Одна сім'ядоля >> за другу	–	–	<u>1,8%</u> 2/112	<u>2,1%</u> 4/186	<u>4,7%</u> 9/190	–	<u>2,5%</u> 3/119	<u>2,1%</u> 4/192	<u>2,7%</u> 5/188
	1 листок з дефектом краю	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
	Перша пара листків гігантська	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188
Черешок сім'ядолі короткий	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–	–	<u>0,8%</u> 1/119	–	–
Гіпокотиль і сім'ядолі антоціанового кольору	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
	Проросток деформований	–	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/188

Продовж. дод. Г

Морфологічні відхилення		Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями							
		Контроль		0,017 кДж/м ²		1,7 кДж/м ²		4,1 кДж/м ²	
Відхилення	Супутні відхилення	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА
Сім'ядолі гігантські	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
Черешок листка розрісся	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/190	–	–	–	–
Проросток карликовий	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/186	<u>1,1%</u> 2/190	<u>1,0%</u> 1/104	<u>4,2%</u> 5/119	<u>2,6%</u> 5/192	<u>3,2%</u> 6/188
Проросток великий	–	–	<u>0,9%</u> 1/112	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/192	<u>2,2%</u> 4/188
3 сім'ядолі, 3 перших листки	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/186	–	<u>1,0%</u> 1/104	–	<u>0,5%</u> 1/192	–
Проросток деформований, сім'ядолі з некротичними плямами	–	–	–	–	–	–	–	<u>1,0%</u> 2/192	–
Проросток складається з двох сім'ядоль	Гіпокотиль і корінь відсутні	–	–	–	–	–	–	<u>1,6%</u> 3/192	<u>0,5%</u> 1/188
	Замість гіпокотिला і кореня калусний нарост	–	–	–	–	–	–	<u>0,5%</u> 1/192	–
Всього проростків з відхиленнями		<u>4,4%</u> 5/114	<u>17,0%</u> 19/112	<u>17,6%</u> 33/186	<u>40,0%</u> 76/190	<u>16,3%</u> 17/104	<u>42,9%</u> 51/119	<u>17,2%</u> 33/192	<u>30,3%</u> 57/188

Примітка: «Листки» – перша пара листків розетки.

Додаток Д

Фенотипи з морфологічними відхиленнями в проростків *A. thaliana* (Col-0) після γ -опромінення і обробки 5 мкМ ГДА

Морфологічні відхилення	Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями в процентах і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (у дужках)											
	0 Гр		0,1 кГр		0,25 кГр		0,5 кГр		0,75 кГр		1 кГр	
	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА
Кут між сім'ядолями менше 90°	–	1,3% (3/225)	0,5% (1/222)	1,8% (4/223)	–	0,5% (1/220)	–	–	–	–	–	0,5% (1/220)
Кут між листками менше 90°	–	0,4% (1/225)	–	–	–	0,5% (1/220)	–	–	–	0,5% (1/211)	–	–
Сім'ядольні пластинки орієнтовані вертикально	–	–	1,4% (3/222)	0,4% (1/223)	0,9% (2/226)	1,4% (3/220)	0,4% (1/225)	1,3% (3/223)	0,5% (1/210)	0,5% (1/211)	–	–
Одна сім'ядоля >> за другу	–	0,4% (1/225)	0,5% (1/222)	0,9% (2/223)	0,9% (2/226)	1,4% (3/220)	–	0,9% (2/223)	1,0% (2/210)	1,9% (4/211)	2,7% (6/223)	5,0% (11/220)
Черешок сім'ядолі короткий	0,5% (1/220)	0,9% (2/225)	0,5% (1/222)	0,9% (2/223)	0,4% (1/226)	1,4% (3/220)	2,2% (5/225)	4,5% (10/223)	3,3% (7/210)	6,6% (14/211)	4,5% (10/223)	6,8% (15/220)
1 сім'ядольна пластинка з дефектом краю	0,5% (1/220)	0,4% (1/225)	–	0,4% (1/223)	–	0,9% (2/220)	0,9% (2/225)	1,8% (4/223)	–	–	0,4% (1/223)	1,4% (3/220)
Деформовані сім'ядолі				0,9% (2/223)								
1 сім'ядоля нерозвинена						0,5% (1/220)	0,4% (1/225)	0,9% (2/223)	0,5% (1/210)	0,5% (1/211)	0,4% (1/223)	0,9% (2/220)
Нерозвинені сім'ядолі	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,9% (2/211)	1,3% (3/223)	2,3% (5/220)

Продовж. дод. Д

Морфологічні відхилення	Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями в процентах і абсолютній кількості по відношенню до загальної кількості проростків (у дужках)											
	0 Гр		0,1 кГр		0,25 кГр		0,5 кГр		0,75 кГр		1 кГр	
	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА	–	ГДА
1 листок деформований	–	–	–	–	0,4% (1/226)	–	0,4% (1/225)	0,4% (1/223)	–	0,5% (1/211)	0,4% (1/223)	1,0% (2/220)
2 листки деформовані	–	–	–	–	–	–	0,4% (1/225)	0,9% (2/223)	0,5% (1/210)	0,9% (2/211)	–	1,8% (4/220)
1 листок нерозвинений	–	–	–	–	–	–	–	0,9% (2/223)	7,1% (15/210)	8,5% (18/211)	7,6% (17/223)	11,4% (25/220)
2 листки нерозвинені	–	–	–	–	–	–	–	–	1,0% (2/210)	1,9% (4/211)	3,6% (8/223)	6,8% (15/220)
Проросток складається з сім'ядолі	–	–	–	–	–	–	–	–	0,5% (1/210)	–	1,3% (3/223)	0,5% (1/220)
3 сім'ядолі, 3 перших листки	–	–	0,5% (1/222)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3 перших листки	–	–	0,5% (1/222)	–	1,3% (3/226)	0,5% (1/220)	0,4% (1/225)	–	–	–	–	–
Всього проростків з відхиленнями	0,9% (2/220)	3,6% (8/225)	3,6% (8/222)	5,4% (12/223)	4,0% (9/226)	6,8% (15/220)	5,3% (12/225)	11,7% (26/223)	14,3% (30/210)	22,7% (48/211)	22,4% (50/223)	38,2% (84/220)
Гігантські проростки	4,5% (10/220)	7,1% (16/225)	12,6% (28/222)	18,8% (42/223)	8,0% (18/226)	13,6% (30/220)	–	–	–	–	–	–
Карликові проростки	0,9% (2/220)	0,4% (1/225)	1,4% (3/222)	0,4% (1/223)	0,4% (1/226)	1,4% (3/220)	4,0% (9/225)	2,2% (5/223)	7,1% (15/210)	6,2% (13/211)	15,7% (35/223)	14,1% (31/220)

Примітка: «Листки» – перша пара листків розетки. Для аналізу фенотипів використовували 12-добові проростки. Частку карликових проростків визначали на 14-ту добу росту.

Додаток Е

**Фенотипи з морфологічними відхиленнями в 10-добових проростків
нокаут-мутантів *hsp A. thaliana***

Відхилення у розвитку проростка	Частка фенотипів з морфологічними відхиленнями у процентах (над ризикою) і абсолютній кількості по відношенню до кількості посаджених насінин (під ризикою)				
	WT (Col)	<i>Athsp90-1</i>	<i>Athsp90-4</i>	<i>Athsp70-5</i>	<i>Athsp70-14</i>
1	2	3	4	5	6
1 сім'ядоля з дефектом краю	3,8% (5/131)	4,6% (11/240)	1,4% (4/295)	2,1% (5/240)	3,0% (9/299)
Сім'ядолі з дефектом краю	—	4,6% (11/240)	0,7% (2/295)	1,7% (4/240)	2,7% (8/299)
1 сім'ядоля з діркою	—	—	0,3% (1/295)	—	—
1 справжній лист з дефектом краю	—	—	0,3% (1/295)	—	—
Черешок однієї сім'ядолі короткий	3,1% (4/131)	2,5% (6/240)	2,0% (6/295)	4,2% (10/240)	2,7% (8/299)
1 сім'ядоля менша за другу, часто деформована	0,8% (1/131)	3,8% (9/240)	2,4% (7/295)	3,8% (9/240)	5,7% (17/299)
Деформовані сім'ядолі	—	0,4% (1/240)	2,0% (6/295)	0,4% (1/240)	0,7% (2/299)
Сім'ядолі широкі опущені	—	2,1% (5/240)	1,4% (4/295)	—	0,7% (2/299)
Кут між черешками сім'ядоль ~ 90°	—	0,4% (1/240)	—	—	—
1 сім'ядоля нерозвинена	—	0,8% (2/240)	—	—	0,7% (2/299)
Сім'ядолі нерозвинені, проросток маленький	—	1,7% (4/240)	1,4% (4/295)	—	0,3% (1/299)
1 лист нерозвинений	—	—	0,3% (1/295)	0,4% (1/240)	—
Перша пара листків нерозвинена	—	0,8% (2/240)	—	—	—
Сім'ядолі та 1 лист нерозвинені	—	—	—	—	0,3% (1/299)
3 сім'ядолі	—	—	—	0,4% (1/240)	0,3% (1/299)
3 сім'ядолі, 3 перших листки	—	0,4% (1/240)	—	—	—

Продовж. дод. Е

1	2	3	4	5	6
Деформований проросток	—	—	0,3% (1/295)	—	0,3% (1/299)
Карликові ненормальні проростки, часто антоціанового кольору	0,8% (1/131)	3,3% (8/240)	2,0% (6/295)	2,5% (6/240)	2,7% (8/299)
Проросток складається з двох сім'ядоль	—	2,1% (5/240)	0,3% (1/295)	—	—
Проросток складається з сім'ядолі	—	—	—	0,4% (1/240)	1,3% (4/299)
Частка проростків з морфологічними відхиленнями	8,4% (11/131)	27,0% (65/240) *	14,9% (44/295) *	15,8% (38/240) *	21,4% (64/299) *

Примітка. Частки представлено у відносних (%) і абсолютних (у дужках) величинах. Частки проростків з морфологічними відхиленнями розраховували на загальну кількість проростків варіанта в трьох експериментах. (*) Достовірна різниця за показником між мутантом і диким типом.

Додаток Ж

Список публікацій здобувача

Статті у фахових і міжнародних журналах:

1. Kozeko L.Ye., Buy D.D., Pirko Ya.V., Blume Ya.B., Kordyum E.L. Clinorotation affects induction of the heat shock response in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Gravitational Space Res.*, 2018, 6 (1): 2-9. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту; разом з іншими співавторами – аналіз генної експресії, опрацювання і аналіз отриманих даних; написання статті).

2. Козеко Л.Е. Участие цитозольных белков теплового шока HSP70 и HSP90 в адаптации к водному дефициту проростков *Arabidopsis thaliana*. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2018, 2 (44): 41-49. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

3. Kordyum E., Kozeko L., Ovcharenko Y., Brykov V. Assessment of alcohol dehydrogenase synthesis and aerenchyma formation in the tolerance of *Sium* L. species (*Apiaceae*) to water-logging. *Aquatic Bot.*, 2017, 142: 71-77. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення лабораторного експерименту з *Sium sisaroides*, опрацювання і аналіз відповідних даних; разом з іншими співавторами – узагальнення результатів, участь у підготовці статті).

4. Козеко Л.Є. Синтез білка теплового шоку HSP70 і алкогольдегідрогенази у листках *Arabidopsis thaliana* і *Sium sisaroides* у відповідь на затоплення ґрунту. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2017, 3 (42): 46-51. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

5. Козеко Л.Є. Шаперони HSP90 як стабілізатор росту і формотворення рослин: мікроеволюційний аспект. Фактори експериментальної еволюції

організмів, 2016, 18: 42-45. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих результатів, написання статті).

6. Козеко Л.Є., Рахметов Д.Б. Особливості динаміки синтезу білків теплового шоку HSP70 у *Malva silvestris* і *M. pulchella* (Malvaceae) у зв'язку зі стійкістю до високої температури, затоплення та посухи. Укр. Ботан. Журн., 2016, 73 (2): 194-203. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавтором – аналіз результатів, написання статті).

7. Kozeko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds. Life Sci. Space Res., 2015, 6: 51-58. (Особистий внесок здобувача: феномний аналіз і вестерн-блот-аналіз, написання статті; разом зі співавторами – планування і постановка експерименту, аналіз цілісності ДНК, аналіз отриманих даних).

8. Козеко Л.Є., Овчаренко Ю.В. Динаміка структурно-функціональної адаптації *Sium latifolium* (Apiaceae) до затоплення кореневої системи. Укр. Ботан. Журн., 2015, 72 (2): 172-179. (Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз білків, написання статті; разом зі співавтором – постановка експерименту, гістохімічний аналіз, аналіз отриманих даних).

9. Козеко Л.Є. Вплив радіціколу, інгібітору шаперонів HSP90, на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення насіння. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, 2015, 1 (34): 14-21. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

10. Козеко Л.Є. Изменения в синтезе белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином. Цитология, 2014, 56 (6): 419-426. (Kozeko L.Ye. Changes in heat-shock protein synthesis and thermotolerance of *Arabidopsis*

thaliana seedlings resulting from Hsp90 inhibition by geldanamycin. Cell Tissue Biology, 2014, 8 (5): 416-422.) (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

11. Kozeko L.E. Phenotypic variability of *Arabidopsis thaliana* seedlings as a result of inhibition of Hsp90 chaperones. Cytol. Genet., 2013, 47 (2): 75-87. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

12. Козеко Л.Е. Влияние гелданамицина на синтез белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana*. Доповіді НАН України, 2013, 2: 152-157. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті).

13. Kordyum Ye.L., Kozeko L.Ye., Ovcharenko Yu.V. Phenotypic plasticity of aerial-aquatic plants *Alisma plantago-aquatica* L. and *Sium latifolium* L.: structural and molecular aspects. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: біологія, 2012, 52 (3): 11-16. (Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавторами – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).

14. Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух Г.Я., Рахметов Д.Б., Мартинюк Г.М., Дідух Я.П., Кордюм Є.Л. Оцінка стану рослин при несприятливих змінах екологічних факторів з використанням білка теплового шоку 70 кДа (Hsp70). Укр. Ботан. Журн., 2011, 68 (6): 890-900. (Особистий внесок здобувача: опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – планування експерименту, аналіз білків, аналіз отриманих результатів, написання статті).

15. Козеко Л.Е. Белок теплового шока 90 кДа: разнообразие, структура и функции. Цитология, 2010, 52 (11): 3-20. (Особистий внесок здобувача:

аналіз літературних джерел, порівняння даних літератури з результатами власних досліджень, написання статті).

16. Kozecko L., Kordyum E. Effect of hypergravity on the level of heat shock proteins 70 and 90 in pea seedlings. *Microgravity Sci. Technology*, 2009, 21 (1): 175-178. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

17. Козеко Л.Е. Количественные изменения белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в реакции проростков гороха на кратковременное действие гипергравитации. *Доповіді НАН України*, 2009, 1: 140-143. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

18. Kozecko L. Effects of simulated microgravity on thermotolerance of pea seedlings. *J. Gravitational Physiol.*, 2008, 15 (1): 173-174. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

19. Kozecko L.Ye., Kordyum E.L. Heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings under clinorotation of different duration. *J. Gravitational Physiol.*, 2007, 14 (1): 115-116. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

20. Kozecko L.Ye., Kordyum E.L. Altered gravity effect on the heat shock protein level in plants. *J. Gravitational Physiol.*, 2006, 13(1): 117-118. *(Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

21. Козеко Л.Е. Изменения в спектре растворимых белков и в содержании стрессовых белков БТШ90 и БТШ70 в проростках гороха в ответ на клиностатирование. *Біополімери і клітина*, 2006, 22(2): 136-142. *(Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

22. Kozeko L., Kordyum E. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response. *Microgravity sci. technol.*, 2006, XVIII-3/4: 254-256. (*Особистий внесок здобувача: аналіз білків; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті*).

Статті в наукових збірниках і журналах:

23. Кордюм Є.Л., Дідух Я.П., Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Заславський В.А., Дідух А.Я. Розробка та підготовка до впровадження методу оцінки стану рослин у несприятливих умовах зовнішнього середовища. *Наука та інновації*, 2011, 7 (5): 73-78. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – планування експерименту, аналіз білків, аналіз отриманих результатів, написання статті*).

24. Козеко Л.Е. Влияние реальной и моделированной микрогравитации на генную экспрессию белков теплового шока. *Космична наука і технологія*, 2007, 13 (2): 57-61. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, порівняння даних літератури з результатами власних досліджень, написання статті*).

25. Козеко Л.Е. Синтез Hsp70 при ингибировании Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana* (доказательство авторегуляции синтеза белков теплового шока). Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», 10-13 июня 2013, Иркутск, Россия. - Иркутск, 2013: 119-121. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання і аналіз отриманих даних, написання статті*).

26. Козеко Л.Е., Кордюм Е.Л. Белок теплового шока Hsp70 как индикатор состояния и резистентности растений. Материалы Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», 10-13 июня 2013, Иркутск, Россия. - Иркутск, 2013: 458-461. (*Особистий внесок здобувача: проведення*

експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавтором – планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).

Патент на корисну модель:

27. Козеко Л.Є., Кордюм Є.Л., Дідух Я.П., Артеменко О.А., Дідух А.Я., Заславський В.А. Спосіб визначення стану рослин природних екоценозів та інтродукованих рослин. Патент України на корисну модель № 65170, 25.11.2011, Бюл. №22. (*Особистий внесок здобувача: участь в патентному пошуку, проведені експериментальних досліджень та оформленні патенту*).

Тези:

28. Козеко Л.Є. Аналіз модульної природи морфозів у нокаут-мутантів *hsp Arabidopsis thaliana* // Міжнародна наукова конференція «Стратегії збереження рослин у ботанічних садах та дендропарках України», 25-27 лютого 2019, Київ, Україна, С. 173-174.

29. Kozeko L. HSP90 dependence of plasticity responses to clinorotation and light/darkness in *Arabidopsis* seedlings // 42nd COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2018, Pasadena, CA, USA, F1.1-0014-18, P. 1893.

30. Kozeko L. HSP90s and HSP70s stabilize root gravitropic response in *Arabidopsis* // 39th Annual ISGP Meeting & ESA Space meets Health initiative, 18-22 June 2018, Noordwijk, The Netherlands, P. 259.

31. Kozeko L. Simulated microgravity affects heat-shock response in *Arabidopsis thaliana* seedlings // ISPS-7 & ELGRA-25 Joint Conference, 2-6 October 2017, Juan-les-Pins, France, P. 100-101.

32. Козеко Л. Регуляція стійкості і пластичності розвитку рослин шаперонами HSP90 // IV Міжнародна конференція “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти”, 4–6 жовтня 2017, Львів, Україна / Біологічні студії, 2017, 11 (3-4), С. 67-68.

33. Козеко Л. Динаміка синтезу HSP70 у зв'язку з адаптивною здатністю видів рослин // IV Міжнародна конференція “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти”, 4–6 жовтня 2017, Львів, Україна / Біологічні студії, 2017, 11 (3-4), С. 25-26.
34. Козеко Л.Є., Буй Д.Д., Пірко Я.В., Блюм Я.Б., Кордюм Є.Л. Вплив кліностаування на експресію генів, що кодуєть цитозольні білки HSP70 і HSP90, та терmostійкість проростків *Arabidopsis thaliana* // 17-та Українська конференція з космічних досліджень, 22-27 серпня 2017, Одеса, С. 63.
35. Козеко Л.Є. Регуляція пластичності, каналізації розвитку та стійкості рослин шаперонами HSP90 // XIV з'їзд Українського ботанічного товариства, 25-26 квітня 2017, Київ, С. 152.
36. Kozeko L. Heat shock proteins as a protective system in seeds against space conditions // 16-та Українська конференція з космічних досліджень, 22-27 серпня 2016, Одеса, С. 49.
37. Kozeko L. Treatment of *Arabidopsis thaliana* seeds with an HSP90 inhibitor increases plant resistance // 41st COSPAR Scientific Assembly, 30 July - 7 August 2016, Istanbul, Turkey, F4.7-0008-16.
38. Kordyum E.L., Kozeko L.E. Cellular and molecular aspects of plant adaptation to microgravity // 41st COSPAR Scientific Assembly, 30 July - 7 August 2016, Istanbul, Turkey, F1.1-0013-16.
39. Kozeko L. Enhancement of *Arabidopsis thaliana* resistance by inhibition of HSP90 function // ELGRA Biennial Meeting “From Pythagoras to free fall”, 29 September – 1 October 2015, Corfu, Greece / ELGRA News, 2015, 29, P. 136.
40. Kozeko L., Ivanenko G., Kordyum E. Whole-mount GUS staining analysis of heat shock proteins HSP90 and HSP70 expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings // International Conference “Advances in Cell Biology and Biotechnology”, 11-13 October 2015, Lviv, Ukraine, P. 28.
41. Kozeko L. Dynamics of HSP70 synthesis as an indicator of plant tolerance: high temperature and flooding // 10th International Conference "Plant

Functioning Under Environmental Stress”, 16-19 September 2015, Cracow, Poland, P. 33.

42. Kozeko L., Ovcharenko Yu. Dynamics of adaptive responses in *Sium latifolium* subjected to soil flooding // 10th International Conference "Plant Functioning Under Environmental Stress” 16–19 September 2015, Cracow, Poland, P. 94.

43. Кордюм Є.Л., Бриков В.О., Козеко Л.Є. Клітинні та молекулярні аспекти пристосування рослин до умов мікрогравітації // 15-та Українська конференція з космічних досліджень, 24-28 серпня 2015, Одеса, С. 44.

44. Козеко Л. Вплив інгібіторів шаперонів HSP90 на резистентність *Arabidopsis thaliana* // 15-та Українська конференція з космічних досліджень, 24-28 серпня 2015, Одеса, С. 41.

45. Козеко Л.Є. Авторегуляція синтезу протеїнів теплового шоку протеїнами HSP90 у проростках *Arabidopsis thaliana* // XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014, Київ / The Ukrainian Biochem. J., 2014, 86, N 5 (Supplemental 1), С. 102-103.

46. Козеко Л. A role of HSP90 chaperones in regulation of plant stress response // 4-ий з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17-20 вересня 2014, Ужгород, С. 119.

47. Козеко Л., Талалаєв О., Неймаш В., Поварчук В. Вплив інгібіторів Hsp90 на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення насіння // 14-та Українська конференція з космічних досліджень, 8-12 вересня 2014, Ужгород, С. 55.

48. Kozeko L.Ye. Regulation of heat shock protein synthesis and thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings by Hsp90 // Международная конференция по биологии и биотехнологии растений, 28-30 мая 2014, Алматы, Казахстан / Алматы: ИББР, 2014, С. 138.

49. Kordyum E.L., Kozeko L.E., Talalaiev A.S. Plant cell responses to microgravity as readjustment // ELGRA Biennial Meeting “In the spirit of discovery”, 11-14 September 2013, Rome, Italy / ELGRA News, 2013, 26, P. 56.

50. Kozeko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of Hsp90 chaperones in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds // ELGRA Biennial Meeting “In the spirit of discovery”, 11-14 September 2013, Rome, Italy / ELGRA News, 2013, 26, P. 190.

51. Кордюм Є., Козеко Л., Талалаєв О. Адаптивні реакції рослин на дію реальної та модельованої мікрогравітації // 13-та Українська конференція з космічних досліджень, 2-6 вересня 2013, Євпаторія, С. 87.

52. Козеко Л., Талалаєв А., Неймаш В., Поварчук В. Защитная роль шаперонов Hsp90 при облучении семян *Arabidopsis thaliana* гамма-радиацией // 13-та Українська конференція з космічних досліджень, 2-6 вересня 2013, Євпаторія, С. 86.

53. Kozeko L. Heat shock proteins 90 kDa conceal cryptic genetic variations in *Arabidopsis thaliana* generated by UV-B irradiation // 9th International Conference “Plant functioning under environmental stress”, 12-15 September 2012, Cracow, Poland, P. 56-57.

54. Козеко Л.Е., Талалаєв А.С., Неймаш В.Б. Роль белков Hsp90 в проявлении генетических нарушений, генерированных УФ-В и γ -радиацией в семенах *Arabidopsis thaliana* // 12-та Українська конференція з космічних досліджень, 3-7 вересня 2012, Євпаторія, С. 83.

55. Kozeko L. Hsp90 chaperones stabilize development of *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Biology Congress 2012, 29 July – 3 August 2012, Freiburg, Germany, P. 603.

56. Kozeko L., Kordyum E. Evaluation of the plant state in space flight using a stress biomarker // Plant Biology Congress 2012, 29 July – 3 August 2012, Freiburg, Germany, P. 212.

57. Kozeko L. Hsp90 chaperones are essential for maintaining of viability and morphogenesis of damaged plants // 39th COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2012, Mysore, India, 2012, F2.1-0015-12.

58. Kozeko L., Kordyum E. Evaluation of the plant state in space flight using a stress biomarker // 39th COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2012, Mysore, India, 2012, F4.4-0021-12.

59. Козеко Л.Є. Шаперони Hsp90 контролюють фенотипічне проявлення генетичного поліморфізму проростків *Arabidopsis thaliana* // 3-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16-20 травня 2012, Ялта, С. 158.

60. Козеко Л.Е. Шаперон Hsp90 контролирует фенотипическое проявление скрытых генетических нарушений, вызванных УФ-В // Космический форум 2011, посвященный 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина «Пилотируемые полеты в космос. Биомедицина и жизнеобеспечение», 18-21 октября 2011, Москва, Россия / М.: ИМБП РАН, 2011, С. 171.

61. Kozeko L.Ye., Kordyum Ye.L. Evaluation of the plant state in space flight using a stress biomarker // 11-та Українська конференція з космічних досліджень, 29 серпня-2 вересня 2011, Євпаторія, С. 93.

62. Козеко Л.Є., Артеменко О.А., Дідух А.Я., Заславський В.А., Кордюм Є.Л. Білок теплового шоку Hsp70 як молекулярний маркер стресового стану рослин // Всеукраїнська наукова конференція «Ботаніка та мікологія: проблеми і перспективи на 2011-2020 роки», 6-8 квітня 2011, Київ, С. 245-246.

63. Козеко Л.Е., Артеменко О.А., Дидух А.Я., Заславский В.А., Дидух Я.П., Кордюм Е.Л. Использование белка теплового шока 70 кДа для оценки негативного влияния факторов среды на растения // Всероссийский симпозиум «Растение и стресс», 9-12 ноября 2010, Москва, Россия, С. 188-189.

64. Козеко Л.Е. Модель для анализа генетических вариаций, фенотипическое проявление которых контролируется шапероном Hsp90 // 10-та Українська конференція з космічних досліджень, 30 серпня -3 вересня 2010, Євпаторія, С. 39.

65. Kozeko L.E. A model for monitoring of Hsp90-buffered genetic variations / 38th COSPAR Scientific Assembly, 18-25 July 2010, Bremen, Germany, F44.

66. Kozeko L. Stress proteins Hsp70 and Hsp90 in adaptation of aerial-aquatic *Sium latifolium* species to different water environments // 8th International Conference "Eco-physiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors", 14-19 September 2009, Cracow, Poland, S-66.

67. Kozeko L. Molecular chaperone Hsp90 in the development of *Arabidopsis thaliana* seedlings under clinorotation // ELGRA Biennial Meeting, 1-4 September 2009, Bonn, Germany / ELGRA News, 2009, 26, P. 236.

68. Kozeko L. Expression of Hsp70 and Hsp90 in aerial-aquatic *Sium latifolium* L. plants under different water environments // Keystone Symposia "Plant Sensing, Response and Adaptation to the Environment", 11-16 January 2009, Big Sky, Montana, USA, #210, P. 59.

69. Kozeko L. Effects of simulated microgravity on thermotolerance of pea seedlings // 29th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 22-27 June 2008, Anger, France, P. 100.

70. Kozeko L. Hsp70 level in *Sium latifolium* leaves in different water environments // PISA Conference 2008 "Responses of plants to environmental stresses", 12-18 May 2008, Elena, Bulgaria, P. 43.

71. Kozeko L.Ye., Talalaev A.S., Kordyum E.L. Heat shock protein expression in response of pea seedlings to altered gravity // 23st Annual Meeting of American Society for Gravitational and Space Biology, 25-28 October 2007, Ames Research Park, Moffett Field, CA, USA / Gravitational and Space Biology Bulletin, 2007, #55, P 28.

72. Козеко Л.Є. Рівень Hsp90 у рослин в умовах зміненої гравітації // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології, 23-26 жовтня 2007, Київ, С. 247.

73. Kozeko L., Kordyum E. The level of heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in pea seedlings in response to altered gravity // ELGRA Biennial Meeting, 4-7 September 2007, Florence, Italy / ELGRA News, 2007, 25, P. 166.

74. Kozeko L., Kordyum E. Heat shock proteins HSP90 and HSP70 in pea seedlings under clinorotation of different duration // 28th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 8-13 April 2007, San Antonio, TX, USA, P. 119.