

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

КОЗЕКО ЛЮДМИЛА ЄВГЕНІВНА



УДК 581.134:575.21:581.14+17:58.02

**РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНИХ ШАПЕРОНІВ У ФЕНОТИПІЧНІЙ
ПЛАСТИЧНОСТІ РОСЛИН**

**03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія
091-біологія**

**Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
КОРДЮМ Єлизавета Львівна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН
України, завідувач відділу клітинної
біології та анатомії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
КРАВЕЦЬ Олена Адольфівна,
Державна установа «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН України»,
провідний науковий співробітник відділу
геноміки та молекулярної біотехнології

доктор біологічних наук, професор
КРАВЕЦЬ Володимир Степанович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В.П. Кухаря НАН України,
завідувач відділу молекулярних механізмів
регуляції метаболізму клітини

доктор біологічних наук, професор
КОЛУПАЄВ Юрій Євгенович,
Харківський національний аграрний університет
ім. В.В. Докучаєва, завідувач кафедри ботаніки і
фізіології рослин

Захист дисертації відбудеться 24 червня 2019 р. об 11⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Факс: (044) 434 3777, e-mail: d26.254.01@ukr.net.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, Київ вул. Осиповського, 2А.

Автореферат розісланий 24 травня 2019 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, доцент



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 напряму 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, включаючи 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., дисертант – керівник і виконавець) та підчас

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 (кліностагування) та гіпергравітацію, оцінити вплив кліностагування 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 індукцибельних 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 індукцибельних 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 індукцибельні 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. Дисертантом 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).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 74 наукові роботи, у тому числі 26 статей (22 у фахових виданнях), 1 патент України на корисну модель, 47 тез в матеріалах всеукраїнських і міжнародних конференцій та з'їздів.

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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури включає два розділи. У розділі «Стабільність і пластичність росту і розвитку рослинного організму» наведено основні теоретичні положення і проблеми у вивченні явища фенотипічної пластичності рослин, його нерозривного зв'язку з такими характеристиками процесу формування фенотипу як стабільність до незначних флуктуацій середовища і генетичних змін, норма реакції, діапазон стійкості, а також стрес і адаптація як форми відповіді на зовнішні зміни. Охарактеризовано клітинні механізми відповіді на екологічні фактори – високу температуру, водний дефіцит, ґрунтове затоплення, а також незвичні для рослин гіпер- і мікрогравітацію, використані нами в експериментальних дослідженнях. В розділі «Молекулярні шаперони / білки теплового шоку (HSP) як система контролю якості білка рослинних клітин» представлено сучасний стан досліджень системи шаперонів рослин, її ролі у захисті клітин від несприятливих зовнішніх чинників, детально описано родини HSP70 і HSP90, їх участь у стабілізації нормального формотворення і пластичних реакцій, а також механізм авторегуляції експресії генів *HSP*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. Більшу частину досліджень проведено з *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*Brassicaceae*). Екотипи Columbia (Col-0) і Landsberg erecta (Ler) використовували для аналізу генної експресії та синтезу білків за стресових умов. Для оцінки участі окремих HSP90 і HSP70 у стабілізації росту, розвитку, формотворення, пластичних реакцій та стійкості рослин застосовували нокаут-мутанти з Т-ДНК: SALK_007612 для *AtHSP90-1*, SALK_147967 для *AtHSP90-4*, SAIL_839_A08C1 для *AtHSP70-5* і SALK_082815C для *AtHSP70-14*. Екотипи, мутанти та рослини, вирощені з насіння природних популяцій *A. thaliana*, використовували для феномного аналізу. Аналіз тканинної специфічності генної експресії проводили з трансгенними GUS-лініями: GT_3_103910 для *AtHSP90-2* та GT_5_106091 для *AtHSP70-10*. Насіння всіх ліній отримано з Європейського центру насіння *A. thaliana* (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC, Великобританія).

Одним з основних об'єктів вивчення впливу зміненої гравітації на синтез HSP був *Pisum sativum* L. (сорті Дамір та Інтенсивний).

Для аналізу зв'язку кінетики синтезу HSP з адаптаційним потенціалом виду крім *A. thaliana* (Col-0) використовували *Malva pulchella* Bernh. сорт Сильва, *M. sylvestris* L. сорт Красавка (*Malvaceae*), *Sium sisaroides* DC. (*Apiaceae*) і *Trapa natans* L. (*Trapaceae*).

Тестування стану рослин за допомогою біомаркера проводили із *Salix purpurea* L. (*Salicaceae*), *M. pulchella* сорт Сильва і *M. sylvestris* 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* (*Trapaceae*). При цьому брали рослини *S. latifolium* і *S. sisaroides* з природних популяцій навколо р. Псьол біля смт. Велика Багачка; рослини відкритого ґрунту *M. sylvestris* і *M. pulchella* 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* ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Для аналізу відбирали зелені листки рослин, що зазнавали впливу високої температури, посухи і затоплення в природних умовах або експерименті.

Умови вирощування рослинного матеріалу та експериментальні підходи. У ґрунті рослини вирощували при 21-24°C, вологості ґрунту 60-90% (від сухої маси) та фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) при інтенсивності світла 75-100 мкмоль/м²с.

В умовах стерильної культури на агаризованому середовищі експерименти проводили з *A. thaliana*. Для синхронізації проростання насіння витримували у вологих умовах на холоді. За необхідності набрякле насіння піддавали обробкам високою температурою, ультрафіолетом В (УФ-В) та інкубували з антибіотиками. Проростки вирощували на середовищі (0,5 МС, 1 % сахарози, 0,8 % агару) при 21-24°C і фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) з інтенсивністю освітлення 100-110 мкмоль/м²с.

Для інгібування функціонування HSP90 використовували антибіотики гелданаміцин (ГДА) в концентраціях 10^{-7} - 5×10^{-5} М і радицикол (РАД) в концентраціях 10^{-9} - 10^{-5} М (Sigma). Обробку насіння *A. thaliana* проводили шляхом

його інкубації з розчином антибіотика у темряві протягом 24 год; у контролі - з водним розчином розчинника диметилсульфоксиду (ДМСО) еквівалентної концентрації або дистильованою водою. Обробку проростків проводили шляхом їх інкубації з ГДА протягом 6 год у темряві.

Поліморфний матеріал *A. thaliana* отримували трьома шляхами: 1) з насіння рослин п'яти природних популяцій м. Києва і приміських територій; 2) шляхом опромінення УФ-В набряклого насіння Col-0 за допомогою лампи Philips TL20W при інтенсивності $2,35 \text{ Вт/м}^2$ в дозах 0,017; 1,7; 4,1 кДж/м²; 3) шляхом опромінення сухого насіння Col-0 і *Ler* γ -променями від радіоактивного джерела ⁶⁰Co 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; Данильченко, 2005; Гродзинський та ін., 2007) таким чином, щоб отримати живий генетично гетерогенний матеріал.

Експерименти з впливу високої температури в умовах стерильної культури. Для оцінки теплостійкості насіння набрякле насіння *A. thaliana* інкубували при 48°C протягом 20-60 хв, висаджували на агаризоване середовище та реєстрували його схожість. Для оцінки базової теплостійкості проростків *A. thaliana* в умовах стерильної культури чашки з проростками піддавали дії 45°C протягом 30-60 хв. Для аналізу індукованої теплостійкості 5- і 12-добові проростки прогрівали за температури 37°C протягом 1-2 год і витримували 1-2 год при 22-24°C, після чого піддавали дії 45°C протягом 45 хв - 2,5 год. Критеріями теплостійкості служили зміни виживаності (за кількістю зелених проростків) протягом 3-6 діб і маси проростків через 15 діб після обробки. Для біохімічного і молекулярно-біологічного аналізу ефектів високої температури проростки *A. thaliana* віком 5-12 діб інкубували при 37°C; 45°C; та 45°C після передобробки при 37°C і реадaptaції при 22-24°C.

Моделювання прогресуючого водного дефіциту в умовах стерильної культури проводили для проростків *A. thaliana* шляхом поступового підсихання агаризованого середовища протягом 5 діб, як описано (Bobrownyzky, 2006).

Експерименти з впливу зміненої гравітації. Пластичні реакції рослин на зміни гравітаційного стимулу і освітлення вивчали в культурі на агаризованому середовищі в наступних варіантах: 1) стаціонарний ріст при освітленні (контроль); 2) горизонтальне кліностатування (2 об/хв, далі «кліностатування») при освітленні; 3) стаціонарний ріст у темряві; 4) кліностатування у темряві; 5) кліностатування з точковим джерелом світла (~ 0,05 мкмоль/с); 6) гравістимуляція. Визначення довжин кореня та гіпокотила проводили шляхом прямого вимірювання або за допомогою програми Fiji (<https://imagej.net/Fiji>; Schindelin et al., 2012), кут гравітропічного вигину кореня – з використанням програми CorelDRAW X6.

Для аналізу впливу кліностатування на синтез білка в експериментах з *P. sativum* проростки вирощували в трубочках з вологого фільтрувального паперу в темряві при $20 \pm 1^\circ\text{C}$. В експериментах з довготривалим кліностатуванням на кліностат поміщали набрякле насіння, зразки проростків відбирали через 1, 2, 3, 5 і 7 діб. В експерименті з вивчення впливу короткотермінової дії чинника на кліностат поміщали 3-добові проростки, зразки відбирали через 2, 4, 6, 16 і 24 год. Ефект симульованої мікрогравітації (ефект «положення») визначали як різницю між ефектами горизонтального і вертикального (ефект «обертання») кліностатування (2 об/хв). Для вивчення впливу кліностатування на реакцію теплового шоку 5-добові

кліноостатовані проростки інкубували протягом 1-2 год при 38°C; 40°C; 45°C; та 45°C після передобробки при 38°C.

В експериментах з *A. thaliana* (Col-0) проростки вирощували в культурі на агаризованому середовищі. Для аналізу генної експресії 12-добові кліноостатовані проростки піддавали дії 37°C протягом 0,5, 1 і 2 год. Для аналізу термостійкості 5- і 12-добові кліноостатовані проростки інкубували при 45°C протягом 45 хв.

Для моделювання гіпергравітації 5-добові етіольовані проростки *P. sativum* 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.

В усіх експериментах з кліноостатуванням і гіпергравітацією контролем служили проростки, що росли стаціонарно при 1 g за інших ідентичних умов.

Для вивчення кінетики синтезу HSP70 у зв'язку з адаптаційною здатністю видів використовували вирощені в ґрунті ювенільні рослини *A. thaliana* (Col-0), *M. sylvestris*, *M. pulchella* і *S. sisaroides*. Рослини піддавали дії високої температури (37°C), ґрунтового затоплення і посухи. Теплостійкість рослин визначали за їх фізіологічним станом через 2 доби реадaptaції після теплової експозиції; стійкість до затоплення – як період часу, за який гинуло 50% рослин; посухостійкість – за вологістю ґрунту, яка спричиняла в'янення рослин. При порівнянні стану рослин мальви додатковим показником служив відсоток живих листків. Для аналізу HSP70 брали листки. В експериментах з реакцією теплового шоку використовували також природні рослини *T. natans*. В експериментах із затопленням *A. thaliana* і *S. sisaroides* додатково визначали алкогольдегідрогеназу (АДГ).

Феномний аналіз *A. thaliana*. При аналізі фенотипів оцінювали середню тенденцію та розкид значень кількісних ознак у комплексі з індивідуальними особливостями фенотипів.

У проростків визначали відсоток пророслого насіння та темпи росту проростків (стадії росту за Boyes et al., 2001) і частку проростків з морфологічними відхиленнями (відсутність / додаткова кількість органів; зміна форми і кольору гіпокотилу і листків; відхилення у просторовій орієнтації органів; значна затримка росту; деформація проростка). Кількість спостережень складала 100-350 проростків у кожному варіанті.

У дорослих рослин визначали кількісні морфологічні ознаки на двох фазах розвитку: 1) перехід до цвітіння, який ідентифікували за появою першого квітконосу висотою 1 см (показники: тривалість вегетативної фази росту; діаметр розетки; кількість листків розетки; розміри найдовшого листка); 2) кінець цвітіння першого квітконосу (показники: вік рослини; висота першого квітконосу; кількість квіток на квітконосі; кількість бокових гілок на квітконосі; кількість квітконосів розетки; варіабельність середньої довжини міжвузля між першими п'ятьма стручками першого квітконосу як показник індивідуального шуму розвитку). Проведено два експерименти; у кожному варіанті кількість спостережень складала 32-40 рослин.

Електрофоретичний розподіл білка в ПААГ і вестерн-блот-аналіз. Екстракцію розчинних білків з рослинного матеріалу проводили за (Krishna, Kanelakis, 2003), визначення концентрації білка – за (Bradford, 1976). Електрофоретичний розподіл білків здійснювали у 10% або градієнтному 10-15% вертикальному поліакриламідному гелі (ПААГ) за денатуруючих умов (Laemmli,

1970), після чого гель забарвлювали Кумасі G-250 або проводили імуноблотинг. Для імунодетекції використовували моноклональні антитіла проти цитозольних HSP70 та HSP90 (Sigma), для їх візуалізації - екстравідин-пероксидазну систему (Козеко, 2014).

Нативний електрофорез та гістохімічне забарвлення АДГ в гелі проводили за (Сантос и др., 2003). Білкові спектри аналізували за допомогою програм ImageMaster Total.Lab version 2.00 (Amersham) та GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>).

Гістохімічне забарвлення АДГ в коренях проводили за (Porterfield et al., 1997). Забарвлені корені фотографували за допомогою світлового мікроскопа Stemi SV6 (Zeiss).

Імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA). Для ІФА використовували екстракти білка у фосфатно-сольовому буфері (pH 7,4), моноклональні антитіла до цитозольних HSP70 і HSP90 і пероксидазну систему їх детекції. Оптичну щільність реєстрували за допомогою імуноферментного аналізатора (Bio-Rad) (Kozeko, Kordyum, 2006).

Метод ДНК-комет. Аналіз фрагментації ДНК індивідуальних клітин методом гель-мікроелектрофорезу проводили згідно з (Cerdea et al., 1997; Menke et al., 2001; Khan et al., 2002), зйомку ДНК-комет – за допомогою конфокального флуоресцентного мікроскопа LSM 5 PASCAL (ZEISS, Німеччина), дигітальні зображення аналізували за допомогою програми CometScore (TriTek CometScore Freeware 1.6.1.13). При цьому визначали довжину хвоста комети і % ДНК у хвості комети.

Виділення загальних ДНК і РНК. Загальну ДНК виділяли ЦТАБ-методом згідно з (Weigel, Glazebrook, 2002), загальну РНК – з використанням unniPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena) відповідно до інструкції виробника. Концентрацію ДНК і РНК вимірювали спектрофотометрично за стандартною методикою. Якість виділеної РНК перевіряли спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Зворотна транскрипція. Загальну РНК використовували для синтезу кДНК за допомогою набору реагентів RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific) і праймеру oligo(dT)₁₈ відповідно до інструкції виробника.

Полімеразна ланцюгова реакція після зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР). Ген-специфічні праймери конструювали за допомогою програми IDT PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Враховуючі високу гомологію конститутивних цитозольних HSP90, експресію трьох генів *AtHSP90-2*, *AtHSP90-3* і *AtHSP90-4* аналізували сумарно за допомогою однієї пари праймерів. Реакцію проводили з використанням набору реагентів PCR Master Mix (Thermo Scientific) і ген-специфічних праймерів згідно з інструкцією виробника. *AtUBQ5* служив референтним геном. Аналіз дигітальних зображень електрофореграм проводили за допомогою програми GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>).

Рестрикційний аналіз ампліфікованої кДНК. Ампліфіковані фрагменти кДНК чотирьох цитозольних генів HSP90, синтезовані методом ЗТ-ПЛР з використанням однієї пари праймерів за (Yamada et al., 2007), різали рестриктазами

Eco147I (StuI), XhoI і Bsu15I (ClaI) (ThermoScientific) згідно з інструкцією виробника. Фрагменти кДНК після реакції розділяли в агарозному гелі.

Кількісна ЗТ-ПЛР. Реакцію проводили з використанням набору реагентів Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific) і ген-специфічних праймерів та ампліфікатора iQ5 (Bio-Rad) за інструкцією виробника. Рівень флюоресценції вимірювали на етапі синтезу ампліконів. Після ампліфікації якість отриманого продукту перевіряли за допомогою вивчення кривої плавлення, а також електрофорезу в агарозному гелі. Експресію *AtUBQ5* використовували як внутрішній контроль для нормалізації кількості транскриптів у зразку. Відносний рівень експресії генів розраховували методом $\Delta\Delta C_t$ відносно рівня транскриптів у контрольному варіанті.

Ідентифікація вставок ДНК, відбір гомозиготних мутантів. Відбір гомозиготних ліній Т-ДНК-мутантів *A. thaliana Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* з колекцій SALK і SAIL (NASC) проводили методом ПЛР. Для реакції використовували специфічні до Т-ДНК праймери LBb1.3 (SALK) і LB3 (SAIL) та ген-специфічні праймери, що фланкують місце вставки Т-ДНК. Для їх конструювання використовували програму SALK site iSect tool (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Ідентифікацію гомозигот за вставкою проводили за допомогою ПЛР з трьома праймерами або праймерами попарно. Порушення експресії генів, за якими створено мутанти, підтверджували за допомогою ЗТ-ПЛР 10-20 проростків мутантної лінії.

Аналогічно 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. Конструювання праймерів проводили за допомогою програми John Innes Centre Genome Laboratory (<http://signal.salk.edu/database/T-DNA/SM.435.pdf>).

Цитохімічне забарвлення GUS в проростках трансгенних GUS-ліній *A. thaliana* проводили за протоколом (Weigel, Glazebrook, 2002) з модифікаціями. Проростки фотографували за допомогою камери Canon 700D з макрооб'єктивом Canon EF 100 мм та мікроскопа Axio Vision Zeiss (Німеччина).

Статистична обробка результатів експериментів. Статистичний аналіз даних здійснено згідно з (Реброва, 2002) з використанням пакета Statistica 6.0. Як міру відносного розкиду випадкової величини у вибірці використовували коефіцієнт варіації (CV). Для порівняння двох незалежних вибірок використовували *t*-критерій Ст'юдента або U-критерій Мана-Уїтні. Для виявлення лінійного взаємозв'язку між кількісними показниками визначали коефіцієнт кореляції Пірсона. Для визначення достовірності різниці між трьома і більше групами використовували одно- або двофакторний дисперсійний аналіз (One- і Two-way ANOVA). Достовірність різниць у більшості випадків розрахована на рівні значущості $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Роль HSP70 і HSP90 у стійкості рослин до змін навколишнього середовища

Кінетика експресії *HSP* в проростках *A. thaliana* за впливу високої температури і водного дефіциту. Родини HSP70 і HSP90 у рослин є багаточленними і мають ізоформи в цитозолі/ядрі, пластидах, мітохондріях і ендоплазматичному ретикулумі (ЕР). Для визначення внеску окремих членів цих родин у відповідь на зовнішні зміни ми проаналізували динаміку експресії відповідних генів у проростків *A. thaliana* за впливу високої температури і водного дефіциту в широкому діапазоні доз - до потенційно летальних. За результатами ЗТ-ПЛР виявлено специфічні до чинників особливості реакції цих генів (рис. 1).

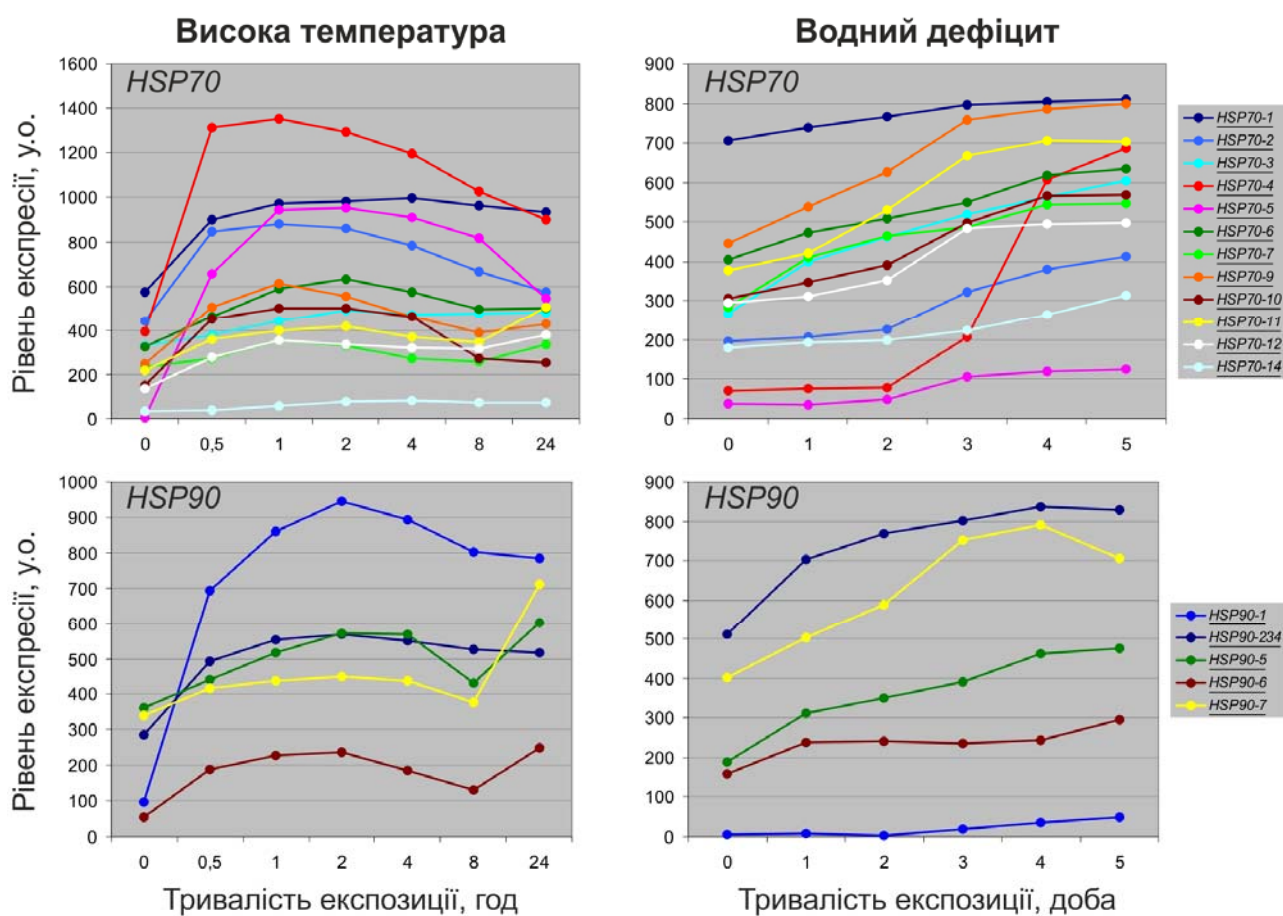


Рис. 1. Кінетика експресії генів родин *HSP70* і *HSP90* в проростках *A. thaliana* (Col-0) протягом експозиції при 37°C і розвитку водного дефіциту. Представлено середні значення двох незалежних експериментів. Різниця між максимальним і контрольним (0 год/дів) значеннями виявилась статистично значущою для всіх генів, крім *AtHSP70-14* в реакції теплового шоку і *AtHSP90-1* при водному дефіциті (*t*-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

Показано, що в реакції теплового шоку при 37°C кінетика їх експресії мала класичну для стрес-реакції параболоїдну форму. Зокрема, швидку (в перші 0,5 год) активацію відзначено у всіх 12 досліджених генів *HSP70* і 9 *HSP90*, які кодують ізоформи з різною субклітинною локалізацією, серед цитозольних – як

конститутивних, так і індукцибельних. У відповіді рослин на розвиток водного дефіциту виявлено активацію більшості генів при досягненні певного критичного рівня фактора, що відповідало початку гальмування ростових процесів. Однак, серед індукцибельних генів значну активацію за таких умов показав лише *AtHSP70-4*. Експресію трьох конститутивних цитозольних *HSP90*, враховуючи їх високу гомологію, оцінювали сумарно. Для визначення рівня мРНК кожного з цитозольних *HSP90* додатково проведено рестрикцію сумарного продукту ЗТ-ПЛР.

В профілях генної експресії виявлено особливості стосовно базового рівня транскрипції, а також швидкості та ступеня її активації, що свідчить про специфічний внесок кожного члена у функціонування клітинного пулу шаперонів як за нормальних умов, так і за впливу несприятливих чинників. Відзначено 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. Таке уявлення узгоджується з відомостями про те, що порушення експресії цих генів призводить до втрати життєздатності рослинного організму (Sangster et al., 2007; Cazalé et al., 2009). Серед генів білків органел найбільшу реактивність виявлено у мітохондріальних членів. Отже, участь HSP у неспецифічній реакції клітин на зміни факторів середовища відбувається шляхом специфічних змін експресії кожного гена.

Особливо слід відзначити диференційний характер експресії індукцибельних генів. Так, аналіз *AtHSP70-4* показав певний рівень транскрипції за нормальних умов і швидко потужну індукцію у відповідь на обидва фактори. Два інші індукцибельні гени *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* майже не експресувалися в нормі, дуже слабо реагували на посилення водного дефіциту, в той час як у реакції теплового шоку їх індукція відбувалась на високому рівні (хоча з меншою, ніж у *AtHSP70-4*, швидкістю). Такі результати дозволяють вважати *AtHSP70-4* основним індукцибельним членом двох родин шаперонів у *A. thaliana*, а *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* – додатковими компонентами, що беруть активну участь у стрес-реакції на високу температуру і на низькому рівні – в адаптації до зневоднення клітин.

Участь окремих *HSP90* і *HSP70* у забезпеченні стійкості рослин. Для з'ясування ролі окремих HSP70 і HSP90 у стійкості до високої температури і водного дефіциту нами використано нокаут-мутанти *A. thaliana* за цитозольними членами родин – конститутивними *AtHSP90-4* і *AtHSP70-14* та індукцибельними *AtHSP90-1* і *AtHSP70-5*. Оцінку їх стійкості до високої температури проводили за виживаністю насіння (при 48°C, 20-60 хв) і проростків (при 45°C, 50 хв). Стійкість до водного дефіциту визначали за ростою активністю проростків при поступовому підсушуванні агаризованого середовища протягом 5 діб. Показано, що порушення експресії індукцибельних генів призводило до зниження як тепло-, так і посухостійкості порівняно з диким типом і мутантами за конститутивними членами (рис. 2). Відмічено, що суттєвий внесок *AtHSP70-5* і *AtHSP90-1* у теплостійкість зумовлений високим рівнем їх індукції в реакції теплового шоку у рослин дикого типу. Проте участь цих генів у підтриманні ростової активності за впливу водного дефіциту відповідала вкрай низькому рівню їх експресії у дикого типу. Це свідчить про важливість навіть малих кількостей цих індукцибельних членів для захисту клітин при зневодненні. Є підстави вважати, що внесок *AtHSP70-5* у стійкість

рослин за дії обох чинників більш суттєвий, ніж *AtHSP90-1*. Отже, наявність у *A. thaliana* двох індукцибельних HSP70 при одному індукцибельному HSP90, індукція *AtHSP70-4* у відповідь на різні чинники і більший внесок *AtHSP70-5* у стійкість клітин порівняно з *AtHSP90-1* доводять більш важливу роль родини HSP70 у забезпеченні стійкості рослин цього виду. Це цілком узгоджується з думкою інших авторів про HSP70 як головну родину HSP у багатьох видів (Sørensen et al., 2003).

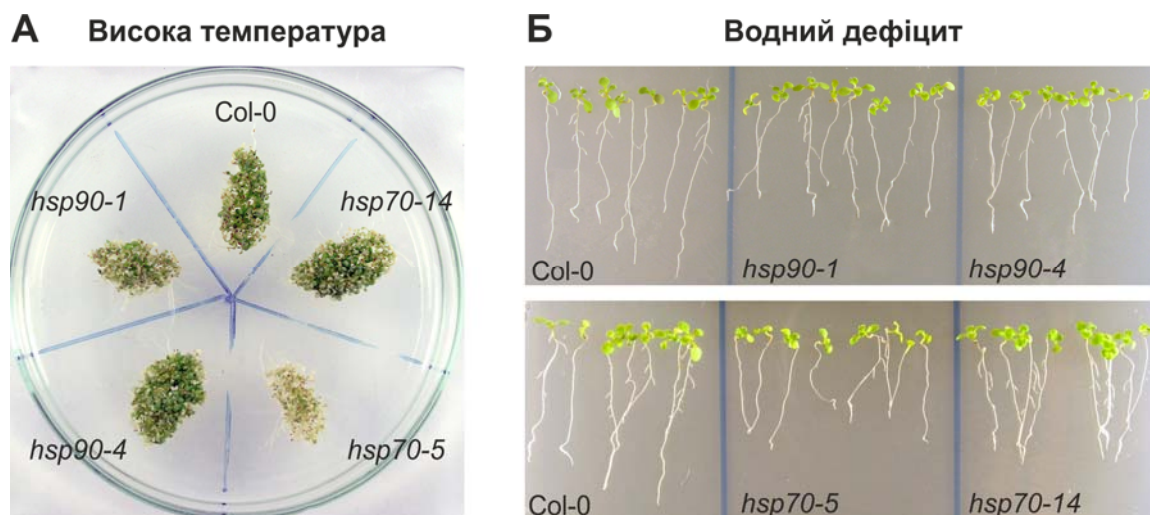


Рис. 2. Оцінка стійкості проростків *A. thaliana* нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* і дикого типу (Col-0): (А) до високої температури (проростки через 3 доби після експозиції при 45°C протягом 50 хв) і (Б) водного дефіциту (проростки на 5-ту добу росту за умов прогресуючого водного дефіциту).

Тканиноспецифічність експресії генів HSP. Для виявлення специфічності функціонування окремих HSP вивчали тканинну локалізацію експресії відповідних генів за нормальних і стресових умов. Для цього використовували дві трансгенні лінії *A. thaliana*, які містять GUS-конструкцію під контролем промоторів генів *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2*. Цитохімічне визначення продукту гена мітохондріального білка *AtHSP70-10* в проростках за нормальних умов виявило його інтенсивну експресію в гідатодах сім'ядоль і справжніх листків, прилистках, клітинах центрального циліндра кореня та слабку експресію в меристемі кореня та кореневій шийці (рис. 3, А). Продукт гена цитозольного білка *AtHSP90-2* детектували в усіх органах, у значній кількості – в провідних пучках, паренхімі, гідатодах і прилистках сім'ядоль і справжніх листків (рис. 3, Б). В листках, що ростуть, експресія цього гена розвивалась поступово від дистальної частини листкової пластинки до базальної, що може бути пов'язане з переходом клітин від поділу до розтягування (Johnson, Lenhard, 2011). Загалом такі результати свідчать про тканинну специфічність функціонування окремих HSP.

Крім того, продемонстровано варіабельність рівня конститутивної експресії *AtHSP90-2* між проростками. Припускається, що це може бути основою відмінностей між індивідуумами у рівні стійкості до варіацій довкілля.

За впливу високої температури і водного дефіциту визначено зміни інтенсивності експресії *AtHSP70-10* і *AtHSP90-2* при загальному збереженні характеру її тканинної локалізації.

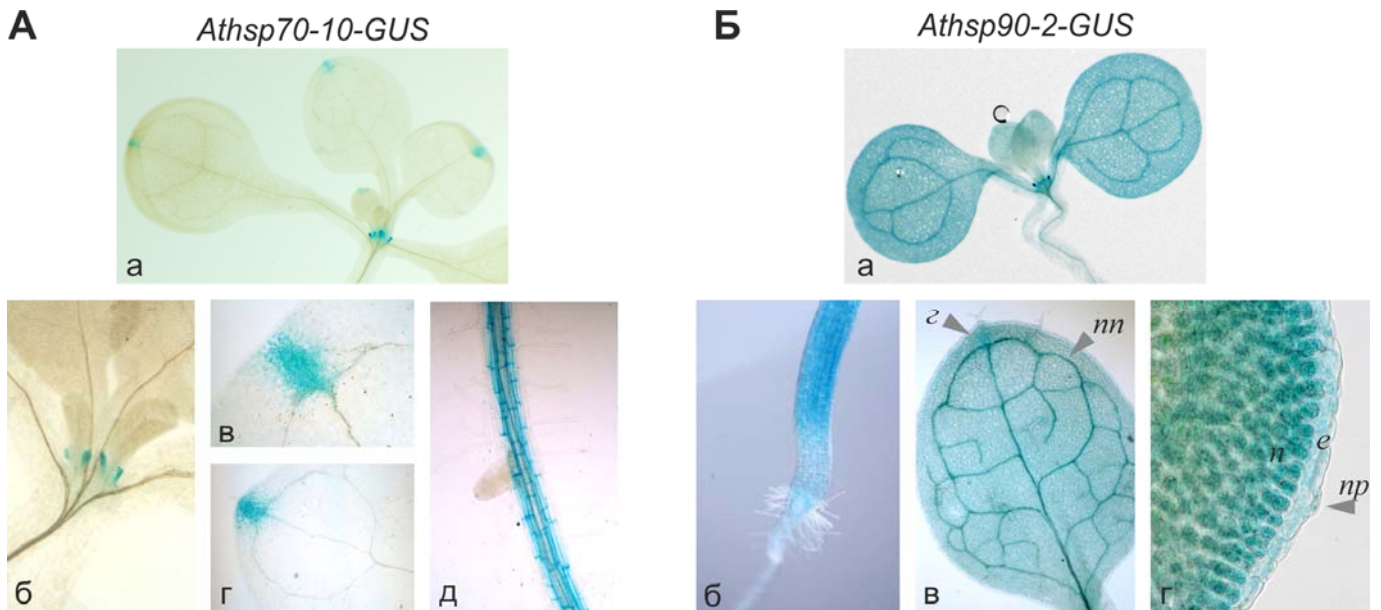


Рис. 3. Локалізація продуктів експресії *HSP70-10-GUS* (А) і *HSP90-2-GUS* (Б) в 10-12-добових проростках *A. thaliana* за нормальних умов. А: (а) стеблова частина; (б) листки з прилистками; (в, г) апікальні гідатоли сім'ядолі та листка; (д) зона диференціювання кореня. Б: (а) стеблова частина; (б) гіпокотиль; (в) листок; (г) фрагмент сім'ядольної пластинки: *z* – гідатола, *nn* – провідний пучок, *n* – паренхіма, *e* – епідерма, *np* – продох.

Особливості кінетики синтезу HSP70 у зв'язку з діапазоном стійкості рослин. Оскільки модельний вид *A. thaliana* характеризується помірними адаптаційними можливостями, було актуальним перевірити отримані для нього закономірності на видах рослин, що відрізняються за екологією і адаптивним потенціалом. Для цього нами проведено порівняльний аналіз кінетики синтезу цитозольних HSP70 в стрес-реакції та адаптації рослин за впливу високої температури, ґрунтового затоплення і ґрунтової посухи. *A. thaliana* порівнювали з пластичними мезофітами *Malva silvestris*, *M. pulchella* і *Sium sisaroidium* та гідрофітом *Trapa natans*. Для аналізу застосовували вестер-блотинг з моноклональними антитілами до консервативної ділянки цитозольних HSP70.

Визначення стійкості видів до зазначених чинників (як описано в «Матеріалах і методах досліджень») дозволило розташувати їх наступним чином: за теплостійкістю *T. natans* < *A. thaliana* < *M. pulchella* < *M. silvestris* < *S. sisaroidium*; за стійкістю до затоплення *A. thaliana* < *M. silvestris* < *M. pulchella* < *S. sisaroidium*; за посухостійкістю *S. sisaroidium* < *A. thaliana* < *M. pulchella* = *M. silvestris*.

Для створення теплового шоку використовували температуру 37°C, яка спричиняє максимальну індукцію HSP у *A. thaliana* (Клюєва, Самохвалов, 1990) і тому може вважатися такою, що відповідає адаптивному потенціалу цього модельного виду. Реакція теплового шоку рослин *A. thaliana* включала швидку (в перші 30 хв), але нетривалу активацію синтезу білка з мол. м. 71 кДа. Така динаміка

його синтезу повністю узгоджується з визначеним нами загальним характером експресії генів цієї родини при 37°C. Показано, що різке зниження вмісту білка протягом 2-ої доби експозиції супроводжувалось втратою життєздатності рослин.

Водна рослина *T. natans*, яка пристосована до малих температурних амплітуд, також характеризувалась помірною короткочасною індукцією синтезу HSP70 (73 кДа) при підвищенні температури до 37°C. На відміну від цього, висока теплостійкість мальви пов'язувалась з потужним синтезом HSP70 в верхніх листках при відмиранні нижніх. Кінетика синтезу HSP70 у обох видів мальви мала схожий характер: швидке (у перші 30 хв) збільшення вмісту конститутивного білка (78 кДа), ініціація протягом 2-ої год синтезу індукцйбельного білка (69 кДа) і подальше накопичення обох білкових зон. У найбільш теплостійкого *S. sisaroides* вміст HSP70 (72 кДа) збільшувався протягом всього періоду дії високої температури – помірно в перші 4 год, і сильно – починаючи з 6 год. Його активний синтез протягом щонайменше 48 год відповідав збереженню нормального фізіологічного стану рослин. Отже, стійкіші види характеризувалися тривалішим і потужнішим синтезом HSP70.

Схожі закономірності визначено і за умов ґрунтового затоплення, яке створює кореневу гіпоксію (рис. 4). У всіх видів відзначено системний характер стрес-реакції: активація синтезу HSP70 в листках у відповідь на затоплення кореневої системи. Найбільші відмінності цієї реакції від реакції теплового шоку спостерігали у видів мальви, нездатних адаптуватися до тривалого затоплення. У обох видів виявили помірну тимчасову активацію синтезу індукцйбельного білка на фоні невеликих змін рівня конститутивного білка.

Крім того, на прикладі двох видів, контрастних за стійкістю до затоплення, продемонстровано взаємозв'язок між реакцією шаперонів і специфічною адаптацією та визначено особливості цих процесів за наявності та відсутності у видів здатності до морфологічної адаптації (рис. 4). Для цього проведено порівняльний аналіз *A. thaliana*, спроможного витримувати лише короткочасне 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. Вона включає високу інтенсивність синтезу HSP70 (компонента неспецифічної реакції) і АДГ (ферменту специфічної анаеробної адаптації) протягом періоду утворення системи аеренхімоночних адвентивних коренів (морфологічної адаптації), а також кооперацію аеробних і анаеробних енергетичних процесів у часі та просторі. Навпаки, здатність *A. thaliana* витримувати 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 в стрес-реакції на гостру дію високої температури і затоплення стійкіші види характеризувалися активнішим синтезом конститутивних HSP70 та інтенсивнішим і тривалішим синтезом індукцибельного компонента.

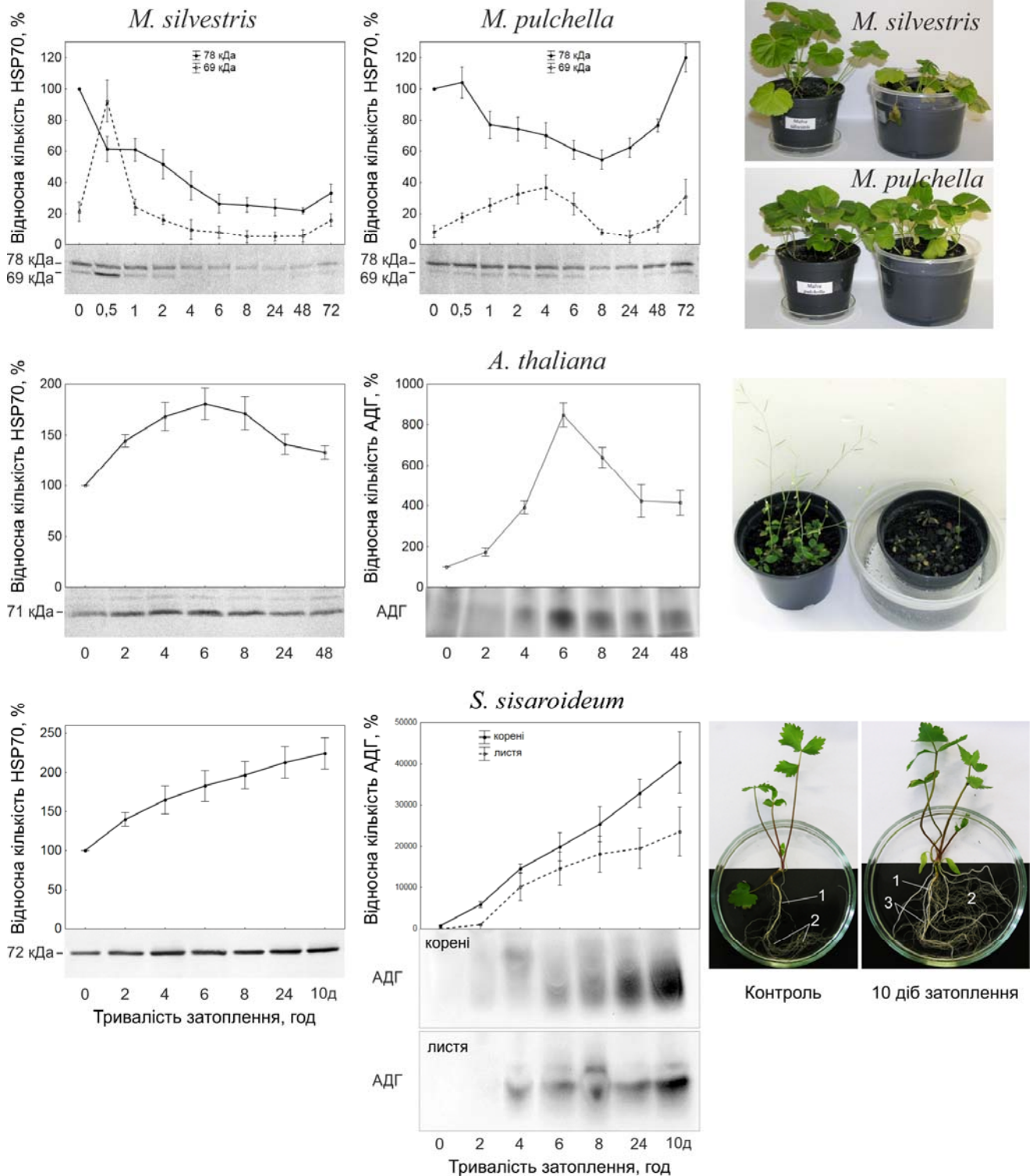


Рис. 4. Вплив затоплення ґрунту на *M. silvestris* і *M. pulchella*, *A. thaliana* і *S. sisaroides*. Вестерн-блот-аналіз HSP70 листків всіх видів рослин і нативний електрофорез АДГ листків *A. thaliana* та листків і коренів *S. sisaroides*; на графіках рівень білка у відсотках до контролю (0 діб) ($M \pm SD$). Справа – рослини в контролі та після 10 діб затоплення; у *S. sisaroides* – головний (1), латеральні (2) та адвентивні (3) корені.

При моделюванні посухи доведено, що адаптація рослин до поступового посилення інтенсивності фактора включає підтримання білкового гомеостазу клітин шляхом прогресивного накопичення HSP70. На прикладі двох видів мальви чітко показано, що протягом розвитку водного дефіциту збільшення пулу HSP70 починається за рахунок активації синтезу конститутивного компонента, а при досягненні певної дози чинника запускається синтез індукцйбельного компонента.

В цілому, результати експериментів цього підрозділу виявили як суттєві відмінності кінетики синтезу HSP70 у видів з різним адаптивним потенціалом, так і спільні закономірності. На початку впливу чинника захист протеостазу клітин відбувається за рахунок функціонування існуючого пулу цитозольних HSP70. Подальше збільшення дози чинника викликає активацію синтезу конститутивних та індукцйбельних білків. При цьому синтез індукцйбельного компонента починається після певного лаг-періоду, що свідчить про існування дозового порогу. Відзначено, що видові особливості білкових профілів стосуються кількісних і часових показників кінетики HSP70, які відповідають фізіологічним змінам.

Визначення вмісту HSP70 в клітинах листків за однакових нормальних умов також показало позитивну кореляцію базового рівня цих білків з адаптивним потенціалом рослин. Значення такої кореляції може полягати в тому, що існуючий в клітині за нормальних умов пул шаперонів забезпечує стабільний протеостаз при флуктуаціях факторів середовища нижче певного порогу.

Отримані результати доводять, що кінетика синтезу HSP70 є інформативним показником при вивченні молекулярних основ резистентності видів рослин. Підтверджено 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 зумовлюватись варіаціями в регуляторних і кодуючих ділянках генів та пов'язані з відмінностями в інших адаптивних механізмах, що потребує подальшого поглибленого вивчення.

Варто відзначити, що наявність у видів різних родин білків HSP70, афінних до одних моноклональних антитіл, свідчить про високу гомологічність цих шаперонів і вказує на їх давнє походження та консервативність функцій, що узгоджується з висновками біоінформаційного аналізу цієї родини (Gupta, Golding, 1993; Boorstein et al., 1994; Lin et al., 2001). Отримані нами дані свідчать про те, що видові особливості кінетики синтезу HSP70 та їх тісний взаємозв'язок з процесами метаболічної, фізіологічної та структурної адаптації рослин вказують на пристосування консервативної родини шаперонів HSP70 до адаптивних особливостей видів протягом філогенетичного розвитку.

Участь HSP70 і HSP90 в стрес-реакції і адаптації рослинних клітин до змін гравітаційного навантаження. Формування системи шаперонів як компонента 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, ми досліджували синтез цитозольних HSP70 і HSP90 за впливу гіпергравітації та симульованої мікрогравітації (клінонстатування).

За результатами вестерн-блот-аналізу цих білків в проростках *Pisum sativum* відповідь рослинних клітин на обидва фактори включає тимчасову активацію синтезу HSP70 і HSP90, що є індикатором стрес-реакції (рис. 5). Це узгоджується з результатами інших дослідників, які одночасно з нами виявили активацію експресії окремих *HSP* в рослинних клітинах за умов космічного польоту (Shagimardanova et al., 2010; Paul et al., 2012), та підтверджує уявлення про те, що в адаптації до незвичних умов клітини застосовують наявні в них механізми (Kordyum, 2014). Нами також з'ясовано, що за впливу гіпергравітації ступінь і тривалість активації синтезу HSP70 і HSP90 збільшується із силою тяжіння та тривалістю її дії. Методом кількісної ЗТ-ПЛР визначено, що ріст проростків *A. thaliana* за умов клінонстатування протягом тривалого періоду призводить до певного підвищення рівня генної експресії конститутивних та індукцибельних цитозольних AtHSP70 та індукцибельного AtHSP90-1. Шляхом порівняння горизонтального клінонстатування з вертикальним відокремлено ефект «положення» (власно симульованої мікрогравітації) від ефекта «обертання» згідно з (Brown et al., 1976). За допомогою ІФА вперше показано, що симульована мікрогравітація має невеликий, але статистично значущий вплив на синтез HSP70 і HSP90.

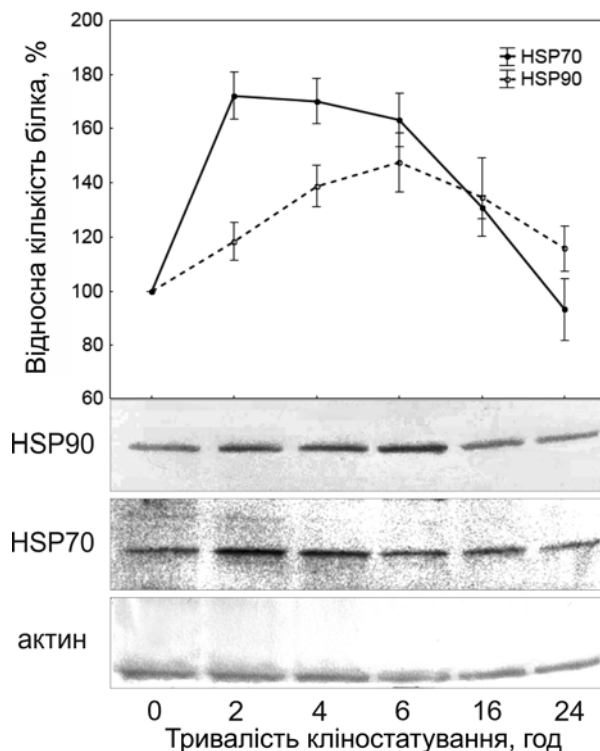


Рис. 5. Вплив клінонстатування на синтез HSP70 і HSP90 у 3-добових проростків *P. sativum* за результатами вестерн-блот-аналізу. На графіку наведено рівень HSP90 і HSP70 у відсотках до контролю (0 год) ($M \pm SD$). Вплив клінонстатування на рівень синтезу кожного з білків статистично значущий (One-way ANOVA, $p < 0,05$).

На особливу увагу заслуговують одержані нами вперше докази того, що тривале клінонстатування призводить до посилення стресової індукції генів цитозольних HSP70 і HSP90 протягом наступної теплової експозиції, а також до підвищення теплостійкості рослин. Так, за допомогою вестерн-блотингу виявлено посилення індукції синтезу цих HSP у клінонстатованих проростків *P. sativum* за різних температурних режимів (38°C-45°C). У проростків *A. thaliana* за допомогою кількісної ЗТ-ПЛР визначено, що протягом експозиції при 37°C після

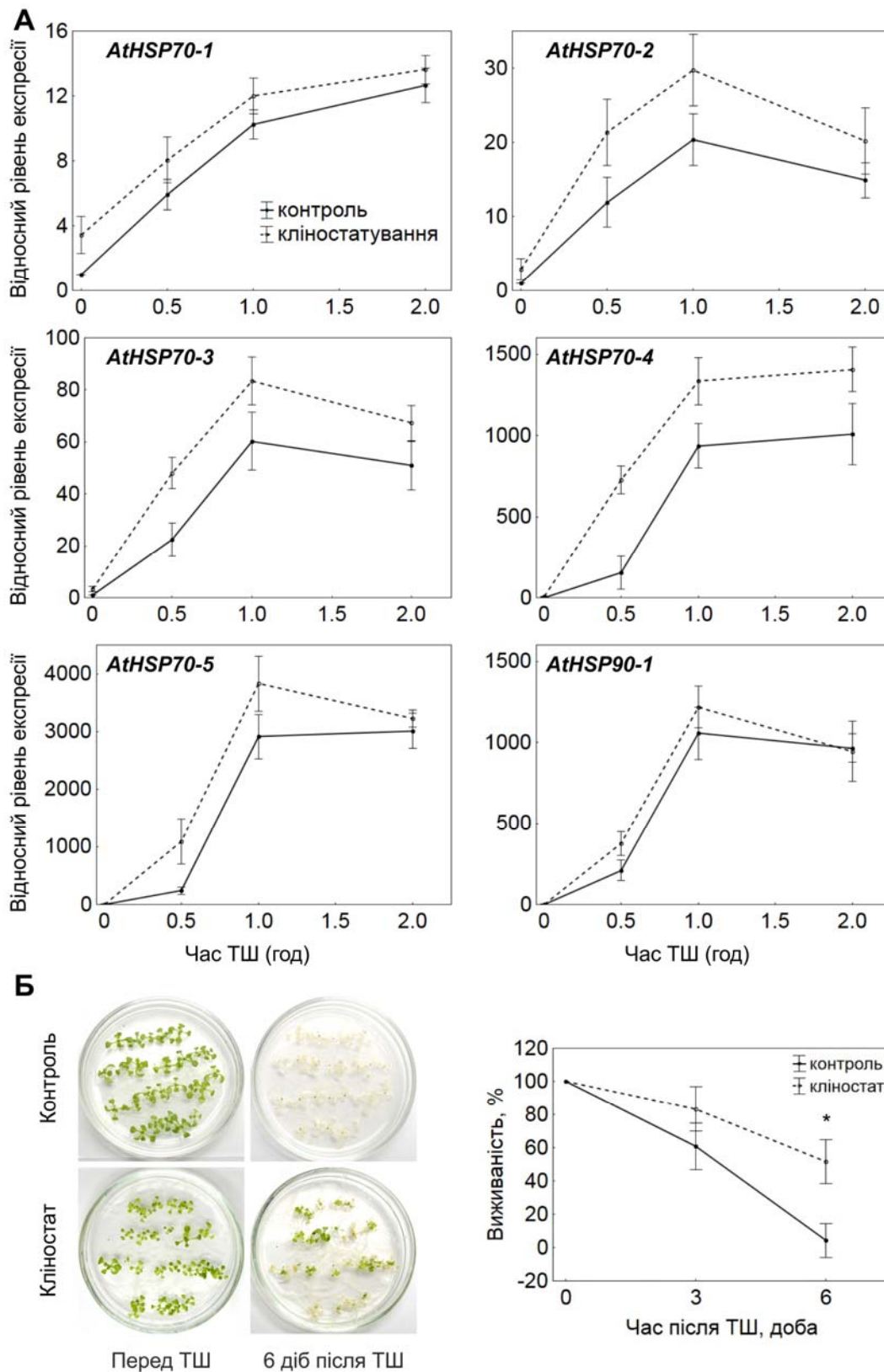


Рис. 6. Вплив кліностаування на реакцію теплового шоку (ТШ) (А) і теплостійкість (Б) проростків *A. thaliana*. А: 12-добові проростки, вирощені при кліностауванні та за стаціонарних умов (контроль), прогрівали при 37°C. На графіках – результати кількісної ЗТ-ПЛР; ефект ТШ статистично значущий для всіх HSP, ефект кліностаування – для всіх крім *AtHSP70-1* ($M \pm SD$; Two-way ANOVA, $p < 0,05$). Б: Проростки до і після ТШ (45°C, 45 хв) та їх виживаність ($M \pm SD$; * t-тест Ст'юдента, $p < 0,05$).

кліноостатування активація експресії генів цитозольних AtHSP70 і AtHSP90-1 відбувалася швидше і досягала більш високого рівня порівняно з проростками, які росли за стаціонарних умов (рис. 6). Найбільш вираженим цей ефект виявився у індукційних генів. Таке посилення індукції *HSP* супроводжувалось підвищенням теплостійкості, що свідчить про виникнення перехресної стійкості.

Загалом визначені ефекти тривалого кліноостатування ми інтерпретуємо як адаптивний акт, тобто встановлення нового фізіологічного стану, характерними ознаками якого є збільшення базового рівня цитозольних HSP70 і HSP90, посилення готовності клітин до стресової індукції цих HSP за впливу інших стресорів та підвищення стійкості організму.

У зв'язку з проблемою фенотипічної пластичності відзначено наступне. За даними літератури, при відсутності гравітаційного стимулу формотворення рослин відбувається в рамках морфогенетичної програми виду відповідно до всіх інших умов середовища (Меркис, 1990; Кордюм и др., 1994; Korδυum, 2014). Разом з тим, як за нашими спостереженнями, так і за даними літератури, формування фенотипу в таких умовах характеризується значною континуальною варіабельністю просторового розташування органів. Це призвело нас до уявлення про відсутність каналізованої програми пластичної відповіді на незвичні для рослин умови. Така ситуація кардинально відрізняється від гравітропічної реакції, яка є каналізованою пластичною відповіддю органів рослин на дію вектора гравітації. Отже, шаперони беруть участь у стрес-реакції та неспецифічної адаптації клітин до умов, до яких в рослин відсутня генетично детермінована пластична відповідь.

HSP70 як біомаркер стану рослин. На відміну від експериментальних досліджень, зазвичай спрямованих на вивчення біологічних ефектів одного чи кількох контрольованих чинників, в природних умовах організми одночасно зазнають впливу комплексу неконтрольованих факторів різної природи. Тому пошук біомаркерів стану рослин природних угруповань є одним з пріоритетних завдань сучасної біології.

На основі аналізу фактичного матеріалу літератури і власних досліджень генної експресії було з'ясовано, що: 1) швидка індукція синтезу HSP70 відбувається при дії стресорів різної природи практично в усіх організмах, включаючи рослини (Feder, Hofmann, 1999; Sørensen et al., 2003); 2) висока консервативність білків родини HSP70 дає можливість їх імунодетекції у різних видів рослин з використанням моноклональних антитіл, специфічних до консервативної ділянки. Це призвело нас до припущення, що рівень HSP70 можна використовувати як інтегральний індикатор стану рослин. Для експериментальної перевірки запропонованого підходу з використанням вестерн-блотингу проведено тестування рослин 9 видів 6 родин: *Salix purpurea* (Salicaceae), *Malva pulchella* і *M. sylvestris* (Malvaceae), *Epipremnum aureum* (Araceae), *Sium latifolium* і *S. sisaroides* (Apiaceae), *Hydrocotyle verticillata* (Apiaceae), *Pistia stratiotes* (Araceae), *Trapa natans* (Trapaceae) – за різних умов середовища в природі та експерименті. Результати тестування підтвердили афінність зазначених антитіл до HSP70 рослин різних таксонів, а також те, що більший вміст HSP70 в клітинах відповідає стресовому стану рослин і критичному рівню факторів середовища (див. приклад для *M. pulchella* і *M. sylvestris*, рис. 7). На підставі цього нами розроблено метод визначення стану рослин природних

фітоценозів та інтродукованих рослин, який включає оцінку фізіологічного стану рослини та оцінку впливу екологічних факторів на рослину за вмістом білків HSP70 у листках.

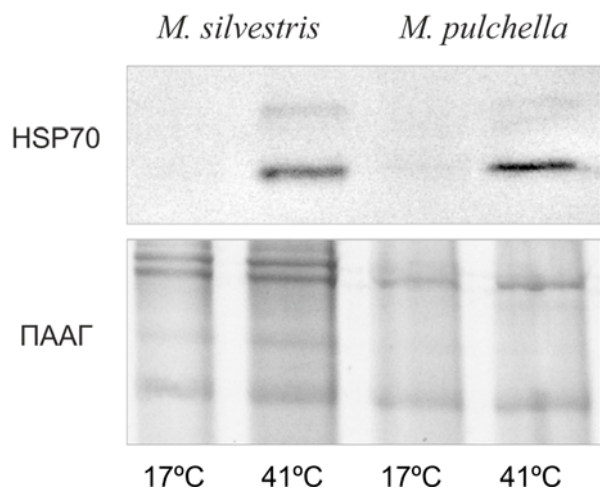


Рис. 7. Вестерн-блот-аналіз HSP70 в листках *M. pulchella* і *M. silvestris* за умов помірного зволоження ґрунту при температурі повітря 17°C і в посушливий період при температурі повітря 41°C.

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. При цьому цитозольні HSP90 репресують конститутивні транскрипційні фактори теплового шоку (HsfA1, далі HSF) за нормальних умов та вивільняють їх при стресі, контролюючи тим самим реакцію теплового шоку (Ali et al., 1998; Morimoto, 1998; Zou et al., 1998; Prodromou, 2017). Такий молекулярний механізм був описаний для тваринних клітин, проте роботи стосовно його існування у рослин були поодинокими (Yamada et al., 2007).

Вивчення здатності HSP90 регулювати експресію HSP в рослинних клітинах шляхом негативної регуляції активності конститутивних HSF ми 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 → відновлення гомеостазу. Критеріями функціонування такого механізму служили залежні від концентрації антибіотика зміни в синтезі HSP70 і HSP90 та теплостійкості організмів.

За результатами вестерн-блотингу нами показано, що обробка ГДА проростків *A. thaliana* Col-0 в концентраціях 1, 10 і 100 мкМ викликала індукцію синтезу HSP70 і HSP90 за відсутності стресу, яка посилювалась із концентрацією антибіотика. Оскільки HSF контролюють експресію генів всіх родин HSP, таку індукцію можна очікувати і для інших HSP, зокрема індучибельних sHSP і HSP100.

Вперше визначено, що нестійкий світлочутливий ГДА має пролонгований вплив на синтез HSP. По-перше, обробка антибіотиком насіння *A. thaliana* призводила до підвищення базового рівня HSP70 і HSP90 в 12-добових проростках за нормальних умов. Крім того, така обробка спричиняла посилення індукції синтезу цих білків у відповідь на високу температуру (37°C; 45°C) (рис. 8, А).

При з'ясуванні можливості впливу обробки насіння ГДА на стійкість ми виходили із загальних уявлень про те, що накопичення HSP в клітинах підвищує

виживаність організмів за впливу потенційно летальних доз чинників (Sørensen et al., 2003; Yamada et al., 2007). Спочатку позитивний зв'язок між вмістом HSP70 і HSP90 та стійкістю рослин було нами підтверджено на прикладі індукованої термостійкості без ГДА. Так, значна активація синтезу HSP70 і HSP90 (ймовірно, й інших HSP) в результаті попереднього прогріву при 37°C сприяла виживанню проростків *A. thaliana* після летальної експозиції при 45°C. Далі вперше було показано, що обробка ГДА насіння, яка підвищує рівень індукції синтезу цих білків за впливу високої температури, призводить також до посилення теплостійкості проростків (рис. 8, Б). Крім того, продемонстровано сумісний ефект обробки ГДА насіння та індукції теплостійкості в результаті обробки сублетальною температурою проростків.

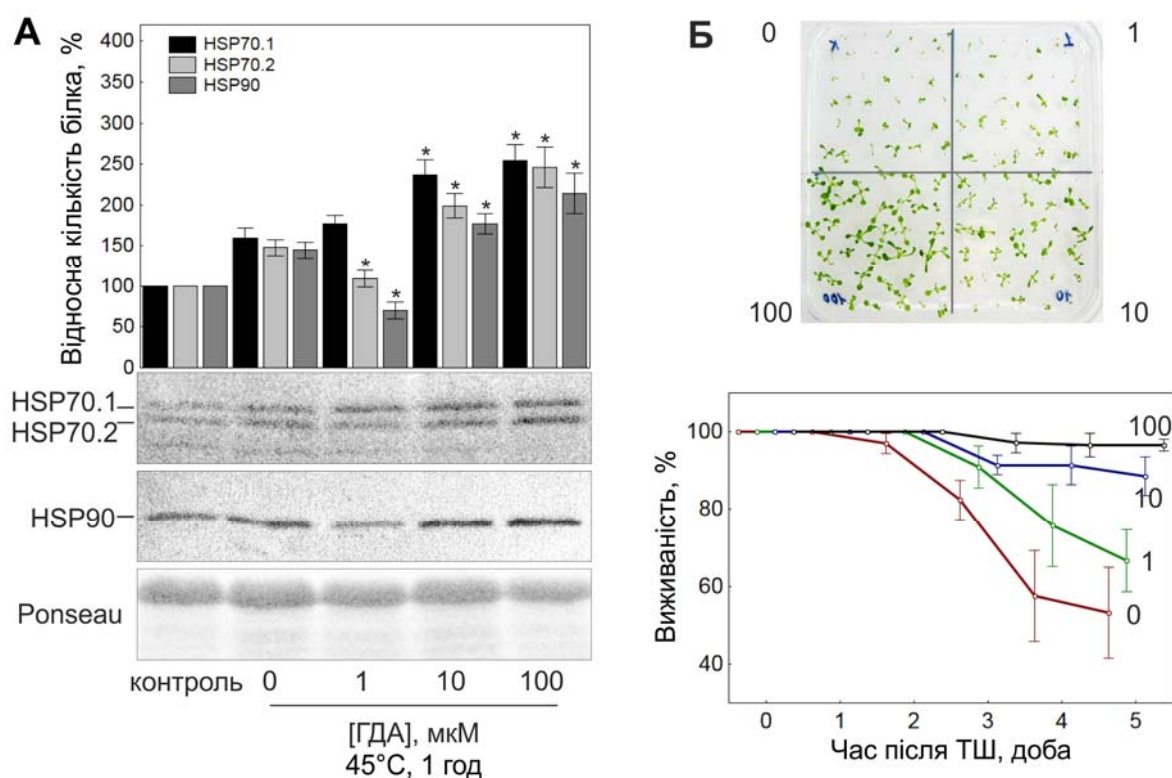


Рис. 8. Вплив обробки насіння ГДА у концентраціях 1, 10 і 100 мкМ на індукцію синтезу HSP70 і HSP90 при тепловому шоці (А) і теплостійкість проростків *A. thaliana* (Col-0) (Б). А: Вестерн-блоти та їх денситометричний аналіз ($M \pm SD$); (*) статистично значуща різниця відносно варіанту з тепловою експозицією без обробки ГДА (t -тест Ст'юдента, $p < 0,05$). Б: Проростки через 5 діб після теплової експозиції і графік їх виживаності; ефект ГДА в концентраціях 10 і 100 мкМ статистично значущий (One-way ANOVA, $p < 0,05$).

Посилену активацію синтезу HSP70 і стимуляцію ростової активності проростків *A. thaliana* в результаті обробки ГДА також визначено після γ -опромінення насіння в дозі 1 кГр.

Загалом отримані нами дані дозволили вперше встановити, що обробка насіння інгібітором HSP90 ГДА впливає на синтез HSP70 і HSP90 і стійкість проростків за впливу зовнішніх чинників, що порушують структуру білків. Існування таких довготермінових ефектів має особливе значення з огляду на нестабільність

антибіотика. Відзначено, що даний молекулярний механізм може бути основою розробки біотехнологічних підходів керування стійкістю рослин у подальшому.

Роль HSP90 і HSP70 у фенотипічній варіабельності рослин

Різноманітність фенотипів популяції є сумарним результатом прояву генетичного поліморфізму, фенотипічної пластичності кожного генотипу у варіабельному середовищі та внутрішньої нестабільності розвитку. Субстратна специфічність шаперонів HSP90 призвела до уявлення щодо їх участі в регуляції кожного з цих процесів (Rutherford et al., 2007; Samakovli et al., 2007; Mason et al., 2018). Склад білків-клієнтів HSP90 ретельно досліджено у дріжджів і тварин (Zhao et al., 2005; 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. Крім транскрипційних факторів теплового шоку, розглянутих вище, до цього списку входять модулятори білкових взаємодій і активності ферментів, компоненти внутрішньоклітинного транспорту, процесингу мРНК, біогенезу мембран, катаболізму жирних кислот, синтезу і розпаду полісахаридів, біосинтезу стиролу, кумарину і фенілпропаноїдів, ключові компоненти фітогормональної регуляції брасиностероїдів, ауксину і жасмонової кислоти, регуляції клітинного циклу, меристематичного статусу клітин і переходу їх до диференціювання, циркадних ритмів, цвітіння, епігенетичної регуляції та резистентності до патогенів. Стабілізуючи ці метастабільні білки та регулюючи їх функціональну активність, HSP90 може впливати на трансдукцію сигналів і регуляцію клітинних процесів, і в результаті, на формування фенотипу. На підставі цього розглядається три молекулярні механізми: 1) HSP90 як буфер стохастичного розвитку (Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007); 2) участь HSP90 у пластичних реакціях за змін умов середовища (Rutherford, Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002); 3) HSP90 як буфер генетичного поліморфізму, здатний протидіяти фенотипічному прояву мутацій (Rutherford, Lindquist, 1998). Активно дискутується існування цих молекулярних механізмів в рамках одного HSP90-залежного механізму (Meiklejohn, Hartl, 2002; Sangster et al., 2004), що робить доцільним їх комплексне вивчення.

Крім того, з урахуванням коеволуції шаперонів HSP90 і HSP70 (Travers, Fares, 2007) та їх функціонування у тісній кооперації (Karagöz, Rüdiger, 2015), нами висунуто гіпотезу про участь HSP70 у стабілізації росту, розвитку і формотворення рослин за нормальних умов та підтриманні пластичних реакцій на зовнішні стимули.

Дослідження цих питань ми проводили шляхом феномного аналізу *A. thaliana* при зниженні кількості/активності HSP, використовуючи два підходи:

- Інгібіторний аналіз з використанням специфічних інгібіторів HSP90, які дозволяють знизити загальний рівень активності клітинного пулу цих шаперонів;
- Інсерційні нокаут-мутанти з порушенням експресії окремих HSP90 і HSP70.

Значення загальної функціональної активності клітинного пулу HSP90 для стабілізації росту і морфогенезу рослин. Значення загальної активності шаперонів HSP90 для росту і розвитку рослин за нормальних умов нами досліджено з використанням ізогенної лінії *A. thaliana* екотипу Col-0. Насіння обробляли

інгібіторами HSP90, які блокують АТФазний цикл шаперона, але належать до різних груп антибіотиків – ГДА ($10^{-7} - 5 \times 10^{-5}$ М) і РАД ($10^{-9} - 10^{-5}$ М).

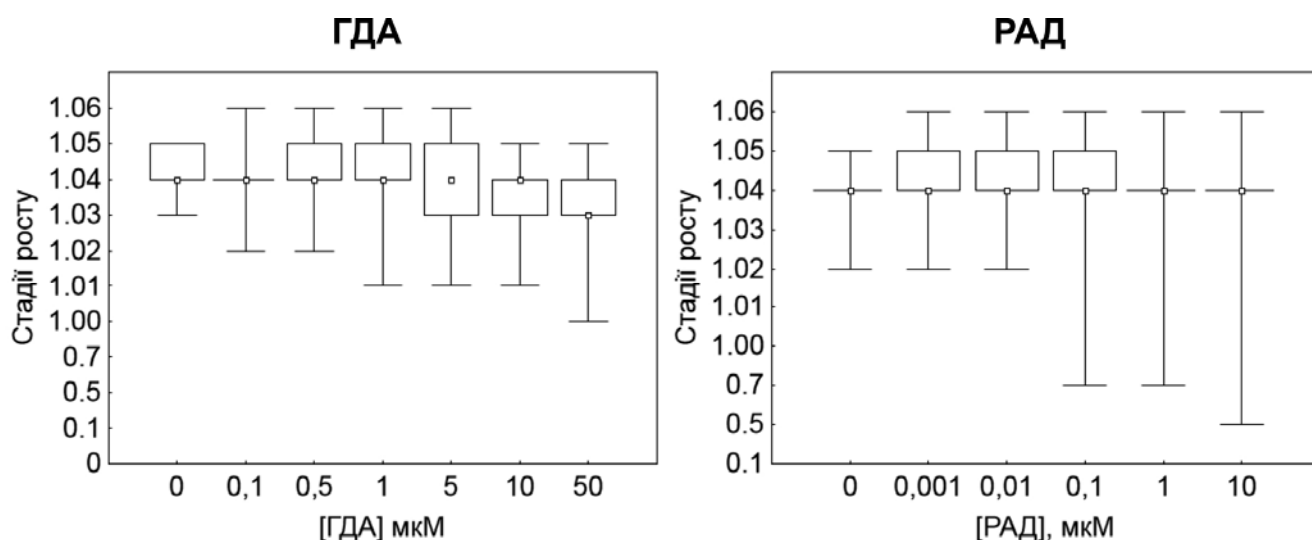


Рис. 9. Діаграма стадій росту проростків *A. thaliana* (Col-0) після обробки насіння ГДА і РАД (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення).

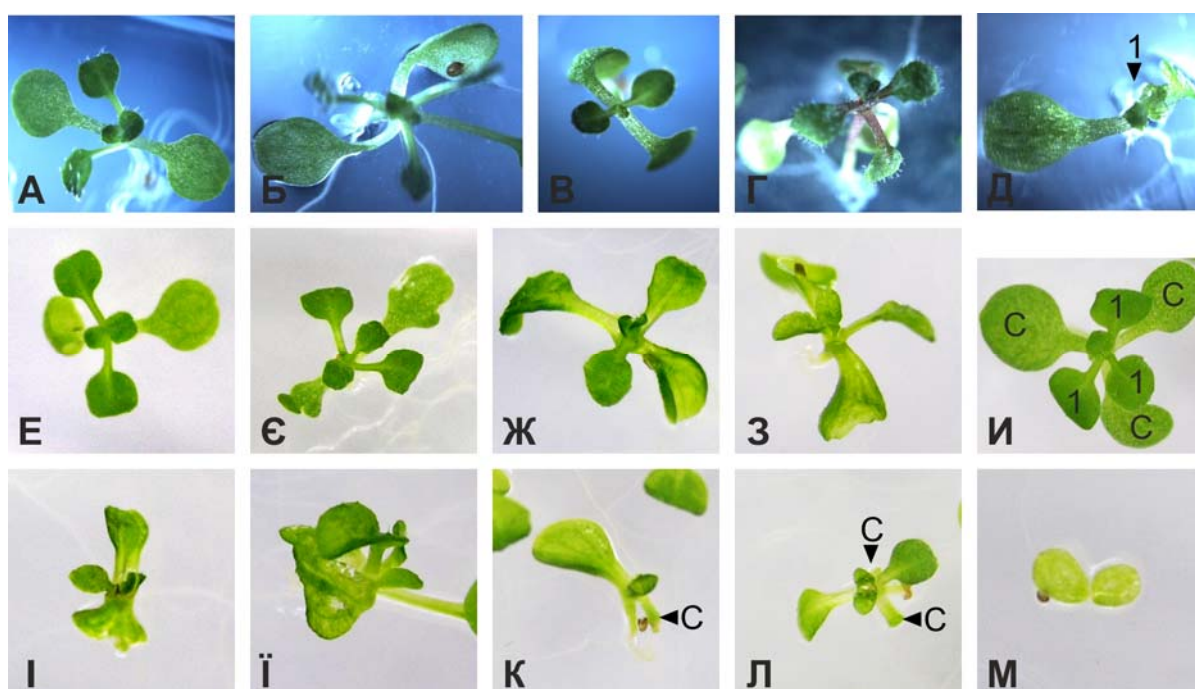


Рис. 10. Фенотипи проростків *A. thaliana* (Col-0), які з'являються після обробки насіння антибіотиками ГДА і РАД: (А) нормальний фенотип; (Б-М) фенотипи з морфологічними змінами: (Б) S-подібні сім'ядолі; (В, Е) 2 або 1 епінастичні сім'ядолі; (Г) гіпокотиль і черешки листків антоціанового кольору; (Д) 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 міжвузля розетки.

Обидва інгібітори не впливали на схожість насіння, проте викликали дозозалежну десинхронізацію росту, на що вказує розширення діапазону темпів росту (рис. 9), а також збільшення частки проростків з морфологічними відхиленнями (до ~ 40% для ГДА, до ~ 20% для РАД), підвищення їх різноманітності та складності. До визначених морфологічних змін відносились посилення асиметрії парних органів і білатеральних ознак (значна різниця у розмірах сім'ядоль або листків однієї пари, локальні порушення маргінального росту листкової пластинки, малий кут між сім'ядолями тощо), виникнення суттєвих порушень формотворення (деформація органів або всього проростка, відсутність або поява додаткових органів – наприклад, 1 або 3 сім'ядолі); збільшення числа морфологічних змін з концентрацією антибіотиків (рис. 10). При цьому десинхронізація росту і посилення варіабельності розмірів, асиметрії органів та їх просторового розташування при інгібуванні шаперона служать показником зниження рівня стабільності ростових процесів; виникнення суттєвих морфологічних аномалій – індикатором порушення нормального (каналізованого) формотворення. Важливо підкреслити, що зазначені фенотипічні зміни отримано нами в результаті обробки інгібіторами насіння, і вони узгоджуються з результатами інших дослідників, які загальну активність HSP90 знижували або внесенням інгібіторів в середовище вирощування (Queitsch et al., 2002), або за допомогою РНК-інтерференції (Sangster et al., 2007).

За результатами оцінки впливу обробки ГДА насіння на ріст і розвиток дорослих рослин нами вперше виявлено існування віддалених у часі ефектів дії антибіотика – десинхронізації утворення листків розетки і затримки переходу рослин до цвітіння (рис. 11). 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 стабілізації каналізованого розвитку і морфогенезу рослин. Однак достеменні молекулярні механізми віддаленого у часі впливу світлочутливих антибіотиків залишаються незрозумілими і потребують вивчення в подальшому.

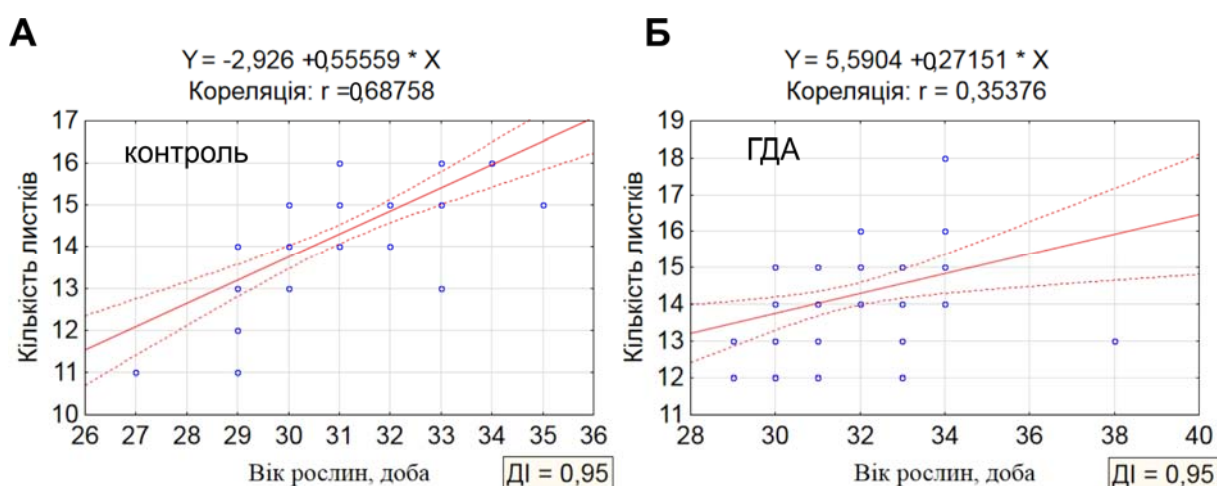


Рис. 11. Графіки розсіювання при аналізі кореляційного зв'язку між віком рослин під час переходу до цвітіння та кількістю листків розетки в контролі (А) та після обробки насіння 50 мкМ ГДА (Б) за параметричним кореляційним методом Пірсона ($n = 56$).

Отже, загальний рівень активності клітинного пулу HSP90 є важливим для підтримання стабільності росту, розвитку і формотворення рослин за впливу мікрорваріацій зовнішнього і внутрішнього середовищ, тобто стохастичних процесів.

Вплив інгібування HSP90 на ріст і морфогенез проростків *A. thaliana* з поліморфного насіннєвого матеріалу. Здатність HSP90 підтримувати нормальне формотворення за наявності генетичних змін ми вивчали на проростках *A. thaliana*, отриманих з поліморфного насіннєвого матеріалу різного походження: 1) насіння, зібраного з рослин п'яти природних популяцій, яке є гетерогенним за якістю та характеризується певним рівнем гетерозиготності внаслідок стохастичного мутаційного процесу (Abbott, Gomes, 1989; Mitchell-Olds, Schmitt, 2006); 2) насіння Col-0, опроміненого УФ-В (0,017–4,1 кДж/м²); 3) насіння Col-0 і *Ler*, опроміненого γ -радіацією (0,1–1 кГр). Контролем служили відповідні екотипи.

В істотній частці проростків, отриманих з поліморфного насіння, виявлено морфологічні аномалії, такі як локальні порушення росту, зміна форми, розмірів, кольору (антоціанові та безхлорофільні) органів та всього проростка, порушення розвитку окремих органів. В експерименті з γ -опроміненням визначено високу кореляцію між ступенем пошкодження ДНК насіння (метод ДНК-комет) та частотою аномальних фенотипів за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена: $r_s = 0,9275$ для кореляції з довжиною хвоста комети, $r_s = 0,9730$ для кореляції з % ДНК в хвості ($p < 0,05$).

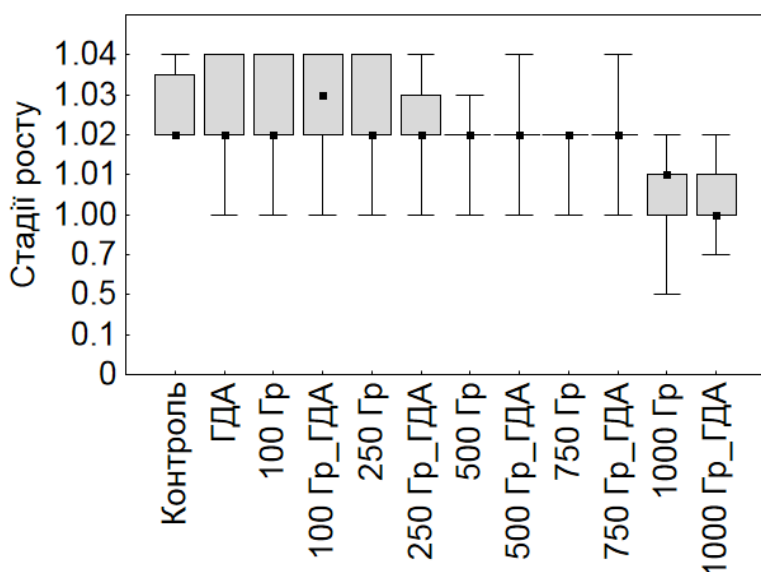


Рис. 12. Діаграма стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana* (*Ler*) у контролі та після γ -опромінення насіння і обробки 5 мкМ ГДА (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення; $n = 101-115$).

Для інгібування HSP90 насіння обробляли антибіотиками в концентраціях, які призводили до максимального різноманіття фенотипів і разом з тим не викликали суттєвих змін у темпах росту за центральною тенденцією і значних порушень морфогенезу у проростків екотипів: ГДА (2 і 5 мкМ) і РАД (10 мкМ). В результаті інгібування HSP90 у поліморфного матеріалу збільшувався відсоток непророслого насіння, чого не було у екотипів, посилювалась варіабельність темпів росту (рис. 12), в 1,5-3 рази збільшувалась частка фенотипів з морфологічними змінами. Морфологічні відхилення часто ставали більш вираженими і множинними. Відзначено, що збільшення частки непророслого насіння супроводжувалось зменшенням кількості проростків з тотальними порушеннями, несумісними з

подальшим ростом. Це може вказувати на необхідність HSP90 для підтримання вітальності рослин за наявності серйозних ушкоджень. Запропоновано використання інгібіторів HSP90 для відбракування дефектних організмів після дії генотоксичних факторів.

Загалом отримані дані свідчать про здатність HSP90 підтримувати гомеостаз та стабілізувати ріст і формотворення рослин після дії гено- і протеотоксичних факторів і підтверджують для рослин гіпотезу S. Rutherford і S. Lindquist (1998) про здатність HSP90 сприяти приховуванню генетичних змін.

Роль окремих HSP90 і HSP70 у рості та розвитку рослин. Для оцінки участі окремих представників родин HSP90 і HSP70 у формуванні фенотипу ми використовували інсерційні нокаут-мутанти *A. thaliana* за цитозольними членами: індукцибельними AtHSP90-1 і AtHSP70-5 (підродина DnaK) та конститутивними AtHSP90-4 і AtHSP70-14 (підродина HSP110/SSE); контролем служив дикий тип Col-0. Визначали фенотипічні зміни у проростків і дорослих рослин за нормальних умов, а також аналізували пластичні реакції проростків на зовнішні впливи.

Виявлено зниження схожості насіння у мутантних ліній *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* та тенденцію до цього у *Athsp90-4* у порівнянні з диким типом, що свідчить про необхідність відповідних шаперонів для формування повноцінного насіння.

Визначення ростової активності проростків за темпами росту та масою показало зниження їх центральної тенденції у лінії *Athsp70-5* та її збереження на рівні дикого типу у трьох інших мутантних ліній. Разом з тим, всі мутанти характеризувалися розширенням розкиду значень за обома показниками. При цьому більшість проростків мутантних ліній мала фенотип дикого типу, тоді як у певної частини особин виявлено морфологічні зміни від помірних до значних: 27,0% у *Athsp90-1*, 14,9% у *Athsp90-4*, 15,8% у *Athsp70-5*, 21,4% у *Athsp70-14*. До таких змін відносились посилення асиметрії парних органів і білатеральних ознак, порушення морфологічної структури окремих органів або всього проростка, поява проростків з нерозвиненими або додатковими органами (3 сім'ядолі, 3 листки одного порядку) (рис. 13). Водночас, мутантні лінії різнилися між собою за наявністю або частотою окремих фенотипів, що показує певну специфічність функціонування відповідних HSP. Загалом закономірності, виявлені для мутантів, збігаються із закономірностями, отриманими нами в результаті аналізу проростків при інгібуванні HSP90. Широкий спектр фенотипічних варіацій в обох випадках можна пояснити великою кількістю білків і відповідних клітинних процесів, функціонування яких залежить від цих шаперонів, а також імовірнісним характером молекулярних подій. Наші спостереження щодо появи аномальних фенотипів при зниженні кількості/активності HSP90 узгоджуються з даними літератури (Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2007) і доповнюють їх за ростовими показниками. Проте фенотипічні зміни при порушенні експресії окремих *HSP70* виявлено нами вперше.

Спостереження за подальшим ростом мутантних проростків із суттєвими змінами показало, що фенотипічні аномалії часто з'являються або корегуються на рівні окремого модуля (в нашому дослідженні – міжвузля з парою листків) (рис. 13), якщо вони не стосуються тотальних порушень, несумісних з розвитком організму

(рис. 13, Д). Це свідчить про те, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися дискретно на рівні модуля. На підставі цього ми припускаємо можливість існування залежного від шаперонів молекулярного механізму пластичності формотворення в рамках модульної концепції фенотипічної пластичності (de Kroon et al., 2005), що потребує подальшого ретельного вивчення.

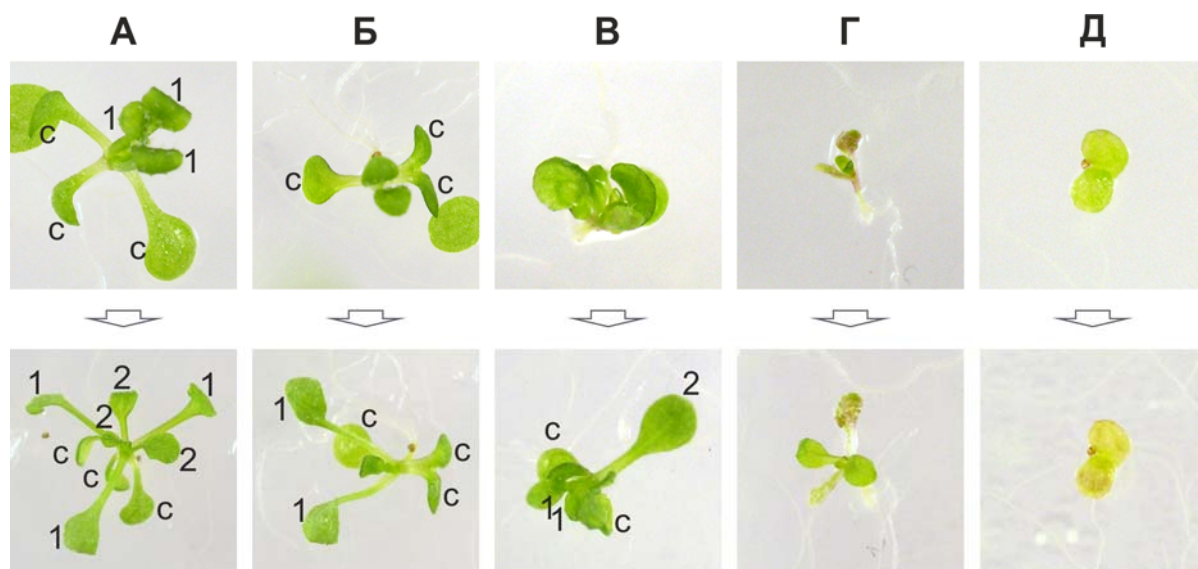


Рис. 13. Проростки нокаут-мутантів *hsp* з морфологічними відхиленнями на 9-ту добу (зверху) і 11-ту добу (внизу).

За результатами феномного аналізу дорослих рослин встановлено:

- зниження активності ростових процесів за кількома показниками у мутантних ліній в порівнянні з диким типом (менший діаметр розетки, менші розміри найдовшого листка розетки – у всіх мутантів; менша кількість листків розетки – у *Athsp70-5*; менша висота квітконоса, менша кількість бокових квітконосів і числа квіток – у *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14*);
- зниження темпів розвитку (затримка переходу до цвітіння – у *Athsp90-1*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* (рис. 14); поява невеликої частки рослин, які не перейшли до цвітіння – у всіх мутантів);
- дестабілізацію росту і розвитку (десинхронізація переходу рослин до цвітіння і закінчення цвітіння; розширення діапазону розкиду значень і збільшення коефіцієнта варіації CV за всіма неперервними кількісними ознаками – у всіх мутантів; зниження кореляційного зв'язку між кількістю листків розетки і тривалістю вегетативного періоду у мутантів *hsp90*);
- порушення нормального формотворення і розвитку невеликої частки рослин всіх мутантних ліній (порушення раннього розвитку; відсутність переходу рослин до цвітіння; порушення апікального домінування квітконосу).

Визначено, що кожна мутантна лінія має особливості за спектром і ступенем фенотипічних змін, що вказує на певну специфічність функціонування відповідних HSP90 і HSP70, ймовірно, через відмінності в субстратах і процесах, в яких вони переважно беруть участь. Слід підкреслити наявність таких змін за нормальних

умов у нокаут-мутантів за стрес-індуцибельними генами: у *Athsp90-1* – найбільша частка аномальних проростків, у *Athsp70-5* – зниження ростової активності за більшістю показників. Це свідчить про важливість навіть мізерних кількостей індуцибельних членів для нормального формотворення.

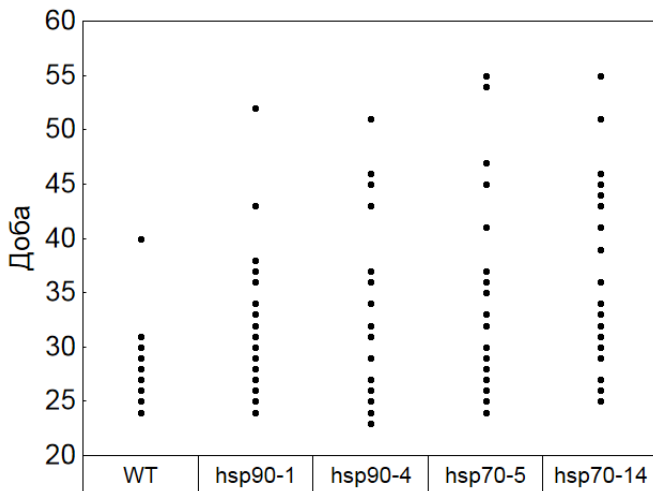


Рис. 14. Тривалість вегетативного періоду рослин *A. thaliana* дикого типу (WT, Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14* за нормальних умов.

Оцінка абсолютної величини фенотипічної мінливості (внутрішньої нестабільності) шляхом визначення коефіцієнту варіації довжини стебла між першими п'ятьма стручками квітконосу кожного індивідууму мутантних ліній показала, що відповідні HSP90 і HSP70 можуть бути необхідними для підтримки 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). Отже, отримані нами дані підтверджують для цитозольних HSP90 і вперше показують для цитозольних HSP70, що від цих шаперонів може залежати рівень внутрішньої нестабільності розвитку. Така їх роль має фундаментальне значення, оскільки підтримання оптимального рівня внутрішньої нестабільності, з одного боку, не заважає формуванню стандартного фенотипу, з іншого – дає організму перевагу при флуктуаціях зовнішнього середовища (Shahrezaei, Swain, 2008).

Загалом отримані нами результати феномного аналізу довели, що як загальна активність/наповненість пулу шаперонів HSP90, так і функціонування окремих цитозольних HSP90 і HSP70 є важливими для підтримання оптимальних темпів росту і розвитку та стабілізації нормального формотворення рослин за незначних флуктуацій внутрішнього і зовнішнього середовища протягом онтогенезу.

Роль окремих HSP90 і HSP70 у пластичних реакціях. Для з'ясування ролі окремих *HSP90* і *HSP70* у фенотипічній пластичності вивчали ростові реакції проростків нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* і *Athsp70-14* на головні фактори, які визначають напрям і ростову активність органів рослин – гравітацію та світло, у наступних варіантах:

- стаціонарні умови / освітлення (контроль);
- кліностагування / освітлення;
- стаціонарні умови / темрява;
- кліностагування / темрява;

- кліноостатування / точкове джерело світла низької інтенсивності;
- гравітропічна реакція кореня / темрява.

Кліноостатування призводило до дезорієнтації росту проростків. Відсутність світла викликала формування видовженого етіольованого гіпокотилія і вкороченого кореня. Точкове джерело світла низької інтенсивності (потік світла 0,05 мкмоль/с) при кліноостатуванні індукувало фототропізм етіольованих проростків, певне гальмування розтягу гіпокотилія та посилення росту кореня. Визначення довжини гіпокотилія і кореня та їх співвідношення за зазначених умов показало, що головним фактором, який регулює активність ростових процесів цих органів та їх координацію, є світло, тоді як гравітація їх лише модулює. Проте гравітація є рівноцінним зі світлом регулятором орієнтації росту.

Порушення експресії окремих *HSP70* і *HSP90*, не змінюючи кардинально активність ростових процесів, в багатьох варіантах викликало певне прискорення або гальмування росту органів. Крім того, мутанти характеризувались посиленою варіабельністю за багатьма ознаками, на що вказують більші коефіцієнти варіації порівняно з диким типом (табл. 1).

Таблиця 1

Варіабельність ростових характеристик проростків *A. thaliana* дикого типу (Col-0) і нокаут-мутантів

Варіант	Показник	Коефіцієнт варіації (CV), %				
		Col-0	<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 гіпокотилія; К – довжина кореня; Г/К – співвідношення довжин гіпокотилія і кореня.

У варіанті зі світлом низької інтенсивності при кліноостатуванні наочно видно, що мутантні проростки відрізнялись більшою гетерогенністю за формою та просторовим розташуванням, навіть до відсутності фототропічної реакції в окремих випадках (рис. 15).

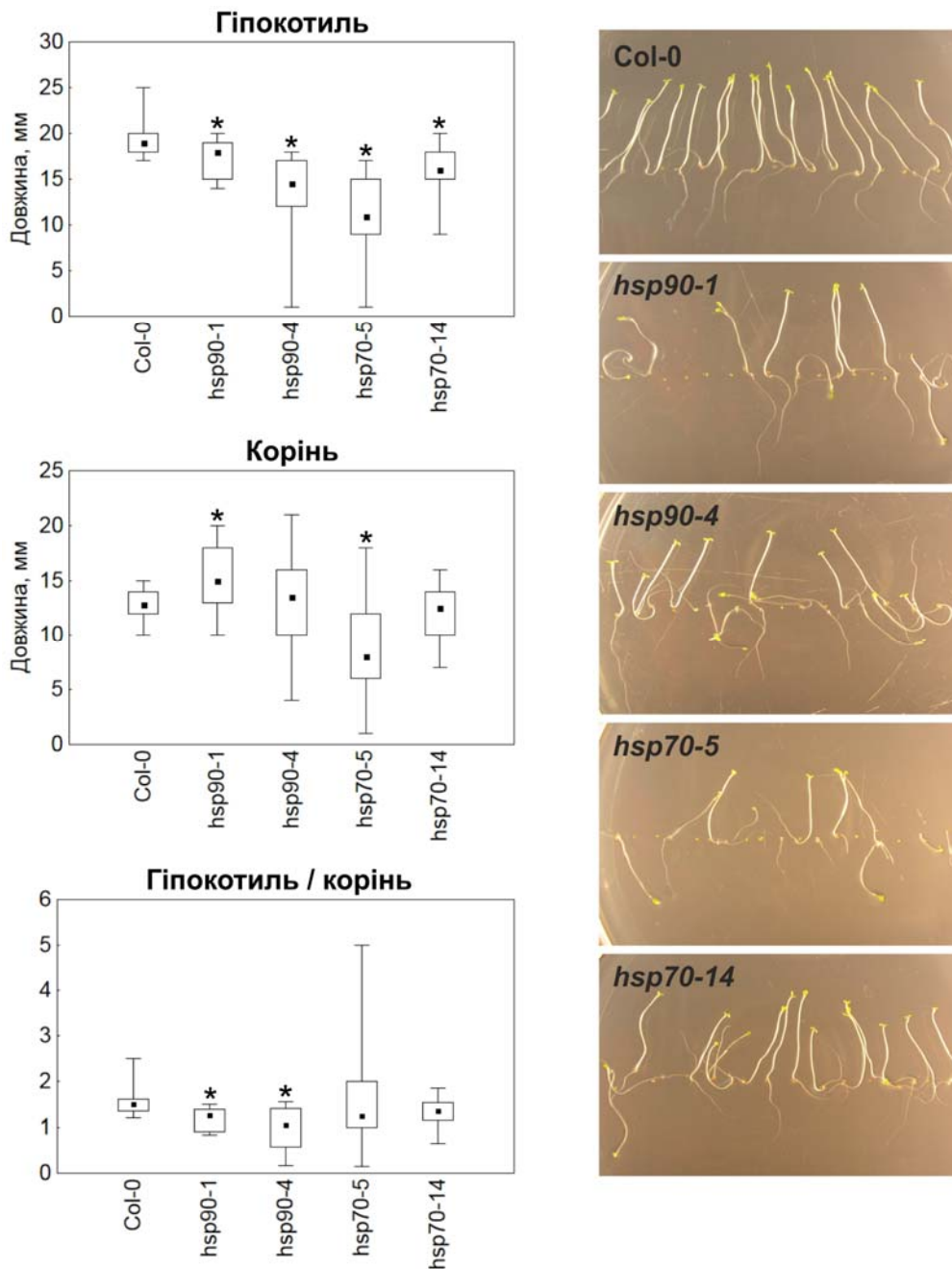


Рис. 15. Ростові характеристики та фенотипи 6-добових проростків *A. thaliana* дикого типу (Col-0) і нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5*, *Athsp70-14*, що зростали при кліноостатуванні з точковим джерелом світла (Me [25%, 75%], мінімальне і максимальне значення). (*) статистично достовірна різниця між диким типом та мутантом (U-тест Мана-Уїтні, $p < 0,05$).

Загалом отримані дані доводять участь шаперонів у забезпеченні як необхідного рівня пластичних реакцій рослин, так і певного рівня стабільності цих реакцій. Виявлено органоспецифічність впливу шаперонів на ці процеси. Відзначено, що за спектром і ступенем фенотипічних змін кожна мутантна лінія має особливості, що свідчить про 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* ми спостерігали появу

проростків з негативною гравітропічною реакцією кореня, чого не було у мутантів *hsp70*. Етіюльовані проростки *Athsp70-14* в експерименті з гравістимуляції відрізнялися від інших мутантів найбільшою варіабельністю розмірів і просторового розташування органів. У лінії *Athsp70-5* показано зниження ростової активності за більшістю показників.

Наші результати стосовно пластичних реакцій мутантів *hsp90* значно доповнюють дані інших авторів, які показали, що зниження загальної активності HSP90 за допомогою інгібіторів та RNAi у проростків *A. thaliana* призводить до змін ростової активності гіпокотила за відсутності світла та гравітропічної реакції кореня (Queitsch et al., 2002; Sangster et al., 2008). Отже, отримані нами дані переконливо доводять участь окремих цитозольних HSP90 у підтриманні стабільності пластичних реакцій за різних комбінацій умов освітлення та дії гравітації, та вперше визначають це для HSP70.

Модель взаємодії різних функцій HSP90. В результаті теоретичного узагальнення експериментальних досліджень нами запропоновано гіпотетичну модель механізму взаємодії різних функцій HSP90 за нормальних умов і при стресі (рис. 16): 1) захисту клітини від денатурованих білків; 2) фолдингу і конформаційної регуляції специфічних білків-клієнтів; та 3) регуляції активності транскрипційних факторів теплового шоку HSF.

Згідно з моделлю, за нормальних умов клітинний пул HSP90 переважно обслуговує специфічні субстрати і тим самим підтримує трансдукцію відповідних сигналів і регуляцію процесів росту і морфогенезу. 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. Участь HSP90 у підтриманні денатурованих білків за нормальних умов є мінімальною. Такий зв'язок між специфічними і неспецифічними функціями HSP90 через пул вільних шаперонів засновано на схемі, запропонованій Rutherford et al. (2007, модифіковано). Припускається, що вибір мішеней між різними специфічними субстратами і денатурованими білками регулюється їх відносною афінністю до шаперона.

Ще одним важливим напрямом функціонування цитозольних HSP90 є негативна регуляція реакції теплового шоку. За нормальних умов вони утримують HSF у формі мономерів. При накопиченні денатурованих білків внаслідок дії несприятливих чинників шаперони переключаються на зв'язування цих білків. Це веде до зменшення пулу вільних HSP90 і, відповідно, послаблення активності субстратів і залежних від них процесів. Вільні HSF утворюють активні тримери, які запускають експресію *HSP* та інших HSF-залежних генів. Новосинтезовані HSP спрямовуються на відновлення протеостазу, після чого система повертається до нормального стану.

Таким чином, якісний і кількісний склад пулу вільних HSP90 визначає ємність буферної системи HSP90, її потенціал у підтриманні білкового гомеостазу клітини, протидії стохастичному розвитку і прояву генетичного поліморфізму. При збільшенні дози фактора зниження наповненості пулу внаслідок зв'язування зростаючої кількості денатурованих білків у певний момент досягає межі, нижче якої вільних шаперонів стає недостатньо для підтримання залежних від них процесів

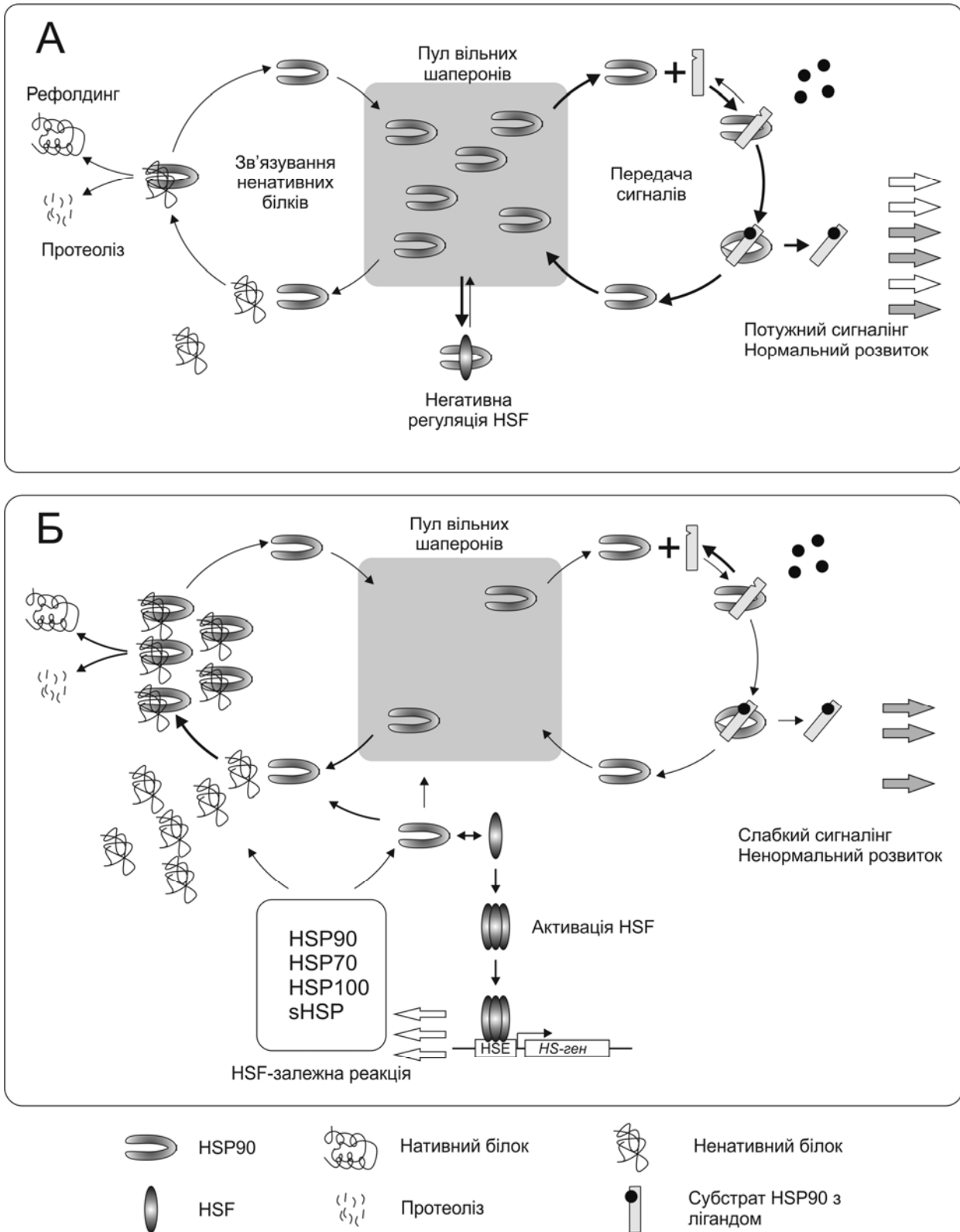


Рис. 16. Гіпотетична модель функціонування шаперонів HSP90 в умовах нормального метаболізму (А) і стресу (Б).

повною мірою. Подальше підвищення дози фактора призводитиме до посилення нестабільності цих 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 *HSP* та інших HSF-залежних генів, що також корегує програму розвитку. Отже, пул вільних HSP90 може визначати як діапазон варіацій умов середовища, що істотно не впливають 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 в 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 наближенні 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 (індуцибельного) 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 аеренхімоносних 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 індукцибельних, є важливим для стабілізації нормального формотворення рослин. Продемонстровано участь цих білків у забезпеченні стабільності пластичних реакцій, зокрема ростової активності та просторової орієнтації гіпокотила 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 – індукцибельних 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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., Kozecko 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. (Kozecko 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*. *Доповіди 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. 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. (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. *Доповіди НАН України*, 2009, 1: 140-143. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).

18. Kozeko 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. 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. (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. Kozecko 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 кліноостатування на експресію генів, що кодують цитозольні білки HSP70 і HSP90, та термостійкість 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., Талалаев 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.

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. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню функціонування молекулярних шаперонів / білків теплового шоку HSP70 і HSP90 у забезпеченні стабільності та пластичності онтогенезу рослин. На широкому експериментальному матеріалі показано, що підтримання протеостазу за зміни умов середовища відбувається шляхом якісних і кількісних змін клітинного пулу шаперонів з його збільшенням при наближенні до меж діапазону стійкості організму. Визначено специфічні для членів мультигенних родин *AtHSP70* і *AtHSP90* рівні конститутивної експресії та динаміку індукції у відповідь на підвищення температури і водний дефіцит. Виявлено тканинну специфічність експресії окремих *AtHSP70* і *AtHSP90*.

Доведено, що індукційні члени цих родин є важливим інструментом у забезпеченні стійкості - з провідною роллю HSP70. На прикладі індукованої та перехресної стійкості показано, що посилена експресія індукційних генів супроводжується розширенням діапазону стійкості організму. Вперше визначено, що імуноспоріднені цитозольні HSP70 у рослин різних таксонів характеризуються видовими особливостями кінетики синтезу за критичних змін екологічних факторів, тісно пов'язаними з процесами метаболічної, фізіологічної і структурної адаптації. Показано участь цитозольних HSP70 і HSP90 у стрес-реакції і адаптації клітин за дії незвичних для рослин чинників - гіпергравітації та симульованої мікрогравітації (кліностатування). Вперше визначено, що кліностатування призводить до виникнення перехресної стійкості до високої температури завдяки посиленню здатності клітин до стресової індукції генів цитозольних HSP70 і HSP90. Розроблено метод оцінки стану рослин з використанням HSP70 як біомаркера.

Отримано докази існування у рослинних клітин механізму регуляції синтезу HSP та стійкості цитозольними HSP90.

Показано значення загальної активності клітинного пулу HSP90 для стабілізації росту, розвитку і нормального формотворення при мікрофлуктуаціях внутрішнього і зовнішнього середовища, а також за дії гено- і протеотоксичних факторів. Отримано нові дані для HSP90 і вперше встановлено для HSP70, що функціонування окремих цитозольних ізоформ є важливим для стабілізації нормального формотворення і пластичних реакцій органів рослин за змін світла і гравітації.

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.

АННОТАЦІЯ

Козеко Л.Е. Роль молекулярних шаперонів в фенотипічній пластичності рослин. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертація на соискание ученої ступені доктора біологічних наук по спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія і гистологія. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2019.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню функціонування молекулярних шаперонів / білків теплового шоку HSP70 і HSP90 в забезпеченні стабільності і пластичності онтогенезу рослин. На широкому експериментальному матеріалі показано, що підтримка протеостаза кліток при зміні умов середовища відбувається шляхом якісних і кількісних змін клітинного пулу шаперонів з його збільшенням при наближенні до меж діапазону стійкості організму. Визначено специфічні для членів мультигенних родин *AtHSP70* і *AtHSP90* рівні конститутивної експресії і динаміка індукції в відповідь на підвищення температури і водний дефіцит. Виявлено тканинну специфічність експресії

отдельных *AtHSP70* и *AtHSP90*. Показано, что индуцибельные члены этих семейств являются важным инструментом в обеспечении стойкости – с ведущей ролью HSP70. На примере индуцированной и перекрестной стойкости продемонстрировано, что усиленная экспрессия индуцибельных генов сопровождается расширением диапазона стойкости организма. Установлено, что иммунородственные цитозольные HSP70 у растений разных таксонов характеризуются видовыми особенностями кинетики синтеза при критических изменениях экологических факторов, тесно связанных с процессами метаболической, физиологической и структурной адаптации. Показано участие цитозольных HSP70 и HSP90 в стресс-реакции и адаптации растений при действии непривычных для них факторов – гипергравитации и симулированной микрогравитации (клиностаტიрования). Впервые определено, что клиностамирование приводит к возникновению перекрестной стойкости растений к высокой температуре благодаря усилению их способности к стрессовой индукции генов цитозольных HSP70 и HSP90. Разработан метод оценки состояния растений с использованием HSP70 в качестве биомаркера.

Получены доказательства существования у растительных клеток механизма регуляции синтеза HSP и стойкости цитозольными HSP90.

Показано значение общей активности клеточного пула HSP90 для стабилизации роста, развития и нормального формообразования при микрофлуктуациях внутренней и внешней среды, а также действию гено- и протеотоксичных факторов. Получены новые данные для HSP90 и впервые определено для HSP70, что функционирование отдельных цитозольных изоформ важно для стабилизации нормального формообразования и пластических реакций органов растений при изменении света и гравитации.

Ключевые слова: молекулярные шапероны, белки теплового шока, HSP70, HSP90, фенотипическая пластичность растений, устойчивость развития, адаптация, стресс, высокие температуры, водный дефицит, затопление, измененная гравитация, экспрессия генов, синтез белка, регуляция реакции теплового шока, биомаркер состояния растений.

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. – 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 HSP70 and HSP90 at molecular, cellular and organism levels in supporting stability and plasticity of forming a plant phenotype, both under optimal and unfavorable environmental conditions. For the first time, various roles of these chaperones have been analyzed in a single complex research: 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.

Particularly, it was shown on the wide experimental material that supporting cellular proteostasis under changing environmental conditions occurs through qualitative and quantitative alterations in the cellular pool of chaperones with its increase when approaching the tolerance limits of the organism. The level of constitutive expression of 12 *HSP70s* and 9 *HSP90s* in *Arabidopsis thaliana* and dynamics of their induction in response to high temperature and water deficit revealed the specific contribution of the members with different subcellular localization. Tissue-specificity was determined for *AtHSP70-10* and *AtHSP90-2* expression. It was proved that the inducible members of these families are an important tool for tolerance - with the leading role of HSP70. It was determined that *AtHSP70-4* is the main inducible 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 these additional components in tolerance of plant cells was confirmed by the knockout mutants. Obtained data on induced and cross-tolerance showed that enhanced expression of the inducible HSPs resulted in an expansion of the tolerance range of the organism.

It was determined for the first time that immune-similar cytosolic HSP70s in plants of different taxa with different adaptive potential - *A. thaliana* (*Brassicaceae*), *Malva silvestris* i *M. pulchella* (*Malvaceae*), *Sium sisaroides* (*Apiaceae*) and *Trapa natans* (*Trapaceae*) – had species-specific kinetics of synthesis under critical changes of ecological factors (high temperature, flooding, water deficit), which were closely related to the processes of metabolic, physiological and structural adaptation. The tolerant species were characterized by higher HSP70 base level and more intensive and continuous synthesis of both constitutive and inducible proteins. It was demonstrated in the experiment with flooding 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*. A method for estimating the state of plants in natural populations and introduced plants using HSP70 as a biomarker was developed.

Participation of HSP70 and HSP90 in stress-reaction and adaptation of plants to unusual for terrestrial organisms factors, such as hypergravity and simulated microgravity (clinorotation), was revealed. The effects of rotation and position were differentiated in the effect of clinorotation, indicating that simulated microgravity has a small, but statistically significant effect on the level of these proteins. It was shown for the first time that clinorotation caused cross-tolerance to high temperature due to a faster onset and enhancement of cytosolic HSP70 and HSP90 induction.

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 induced 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).

Three HSP90-dependent molecular mechanisms, which are important for phenotypic variability of plant populations, were demonstrated on *A. thaliana*: 1) buffering stochastic development; 2) supporting plastic responses to external stimulus; 3) buffering genetic variations, counteracting their phenotypic display. At that, significance of the total activity of the cellular HSP90 pool, as well as of individual cytosolic family members - constitutive AtHSP90-4 and inducible AtHSP90-1 was shown. It was first established that HSP70 may also affect the stability of growth processes and morphogenesis. Particularly, cytosolic members - constitutive AtHSP70-14 and inducible AtHSP70-5 may stabilize / canalize growth, development and morphogenesis, as well as plastic reactions to light and gravity changes. Differences in the influence of individual HSPs on growth processes are determined. It was shown that the effect of these chaperones on the morphogenetic program may occur discretely at the modular level.

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.