

КОЗЕКО Л.Є.

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
Україна, 01601, м. Київ, вул. Терещенківська, 2,
e-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com, (044) 272-32-36, (050) 901-04-42

ШАПЕРОНИ HSP90 ЯК СТАБІЛІЗАТОР РОСТУ І ФОРМОТВОРЕННЯ РОСЛИН: МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИЙ АСПЕКТ

Нейтральні генні мутації не підпадають під тиск природного добору та здатні накопичуватися в популяції. Проте за певних умов вони можуть проявлятися на рівні фенотипу і впливати на життєздатність, морфологічну та часову гетерогенність організмів, змінюючи тим самим їх адаптивність.

Одним з еволюційних механізмів, який активно досліджується останнім часом, є гіпотетичне приховання і накопичення мовчазних генетичних змін за участю білків теплового шоку HSP90. Ця родина шаперонів відповідає за дозрівання та конформаційну регуляцію широкого набору регуляторних білків, включаючи білки передачі сигналів, регуляції клітинного циклу тощо [1–3]. Відповідно до гіпотези S. Rutherford і S. Lindquist HSP90 можуть запобігати фенотипному прояву генетичних змін, підтримуючи функціональну конформацію мутантного білка-клієнта, і через те сприяти стабілізації росту і нормальному формотворенню («the HSP90 capacitor hypothesis») [4].

На модельних видах, включаючи *Drosophila* і *Arabidopsis thaliana*, показано, що зниження шаперонної активності HSP90 призводить до посилення фенотипової варіабельності та появи аберантних фенотипів. При цьому такі фенотипи пов'язані з певною генетичною основою [4–6]. Крім того, на *Drosophila* доведено, що залежні від HSP90 морфологічні зміни можуть швидко ставати незалежними від нього та закріплюватися у нащадках [4]. В результаті генні мутації можуть накопичуватися за допомогою HSP90, проявлятися за певних умов довкілля і ставати предметом природного добору.

Результати наших нещодавніх досліджень природного та індукованого іонізуючою радіацією поліморфізму *A. thaliana*, залежного від HSP90, в цілому підтверджують цю гіпотезу [7–9]. Метою нашої роботи є аналіз здатності шаперона впливати на життєздатність і морфогенез проростків *A. thaliana*, вирощених з гетерогенного за якістю насіння, що може відбиватися на темпах змін генофонду популяцій.

Матеріали і методи

Роботу проводили з *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*Brassicaceae*). Лабораторна лінія екотипу Columbia (Col-0) служила контролем. Поліморфне насіння отримували: 1) з природної популяції на території м. Києва; 2) опроміненням УФ-В набряклого стратифікованого насіння Col; 3) гамма-опроміненням сухого насіння Col. Опромінення ультрафіолетом В (УФ-В) проводили з використанням лампи Philips TL20W в дозі 4,1 кДж/м² за інтенсивності 2,35 Вт/м². Гамма-опромінення проводили з використанням радіоактивного джерела ⁶⁰Co в дозі 1 кГр з потужністю дози 0,17 Гр/с. Для інгібування HSP90 використовували гелданаміцин (ГДА, geldanamycin, Sigma).

Стерилізація насіння, синхронізація його проростання шляхом витримання при +4 °С у вологих умовах і посадка на середовище проводились, як описано нами раніше [7, 8]. Після холодової обробки насіння інкубували з 5 μМ ГДА або у стерильній дистильованій воді (у варіантах без ГДА) у темряві при кімнатній температурі протягом 1 доби. Далі насіння висаджували в чашки Петрі (12 × 12 см) на середовище, яке містило 0,5 комплексу мінеральних солей Мурасіге–Скуга, 1% цукрози, 0,8% агару, рівномірно розподіляючи по поверхні 50–60 насінин. Чашки з насінням тримали при 24 ± 1 °С і освітленні з періодом 16 год світла / 8 год темряви, при інтенсивності світла ~110 мкМ м²с⁻¹. Через 12 діб реєстрували схожість насіння, стадії росту проростків і морфологічні зміни стеблової частини. Стадії росту визначали за методикою [10]: 0 – непроросле насіння, 0.1 – поява зародкового кореня, 0.5 – ріст зародкового кореня, 0.7 – поява гіпокотилі і сім'ядолей, 1.0 – повне розкриття сім'ядолей, 1.01–1.06 – відповідно 1–6 листків розетки > 1 мм.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакета STATISTICA 6.0. В кожному варіанті проаналізовано 100–350 проростків. Частки проростків з морфологічними відхиленнями представлені у вигляді відносних і абсо-

лютних величин. Статистичну значущість різниці між варіантами визначали за допомогою довірчого інтервалу для різниці відносних частот при $p \leq 0,05$ [11].

Результати та обговорення

Досліджено фенотипну різноманітність проростків *A. thaliana*, вирощених з мономорфного і поліморфного насіння. Оскільки цей вид є самозапилюючим, лабораторну лінію екотипу Col використовували як мономорфну. Гетерогенне за якістю насіння отримували із застосуванням трьох підходів: 1) насіння природної популяції, яке за якістю більш гетерогенне, імовірно, внаслідок варіабельних умов середовища під час його формування і дозрівання, а також низького рівня гетерозиготності й ауткросінгу [12]; 2) в результаті опромінення набряклого насіння екотипу Col УФ-В у дозі 4,1 кДж/м²; 3) в результаті опромінення сухого насіння гамма-променями в дозі 1 кГр. Використання УФ-В і гамма-радіації обумовлене їх здатністю

викликати генетичну нестабільність, порушення конформації білків і індукувати меристемогенні та мутагенні морфологічні аномалії, які можуть мати як морфозний, так і спадковий характер [13, 14]. Дози іонізуючої радіації обирали таким чином, щоб отримати поліморфний матеріал, але без значної втрати виживаності насіння [7–9].

Як показано раніше, обробка ГДА у широкому діапазоні концентрацій не впливає на схожість якісного насіння [7, 9], що підтверджено для екотипу Col у цій роботі (рис. А, обведено овалом). У поліморфного насіння, частина якого виявилася нежиттєздатною, обробка антибіотиком призводила до збільшення кількості непророслого насіння у 2–3 рази (рис. Б–Г).

Ріст проростків Col у контролі характеризувався достатньою синхронністю: всі 12-добові проростки знаходилися на стадіях росту від 1.03 до 1.05, при цьому ~70% – на стадії 1.04, тобто мали чотири листки розетки більше 1 мм (рис. А). У варіантах з поліморфним насінням

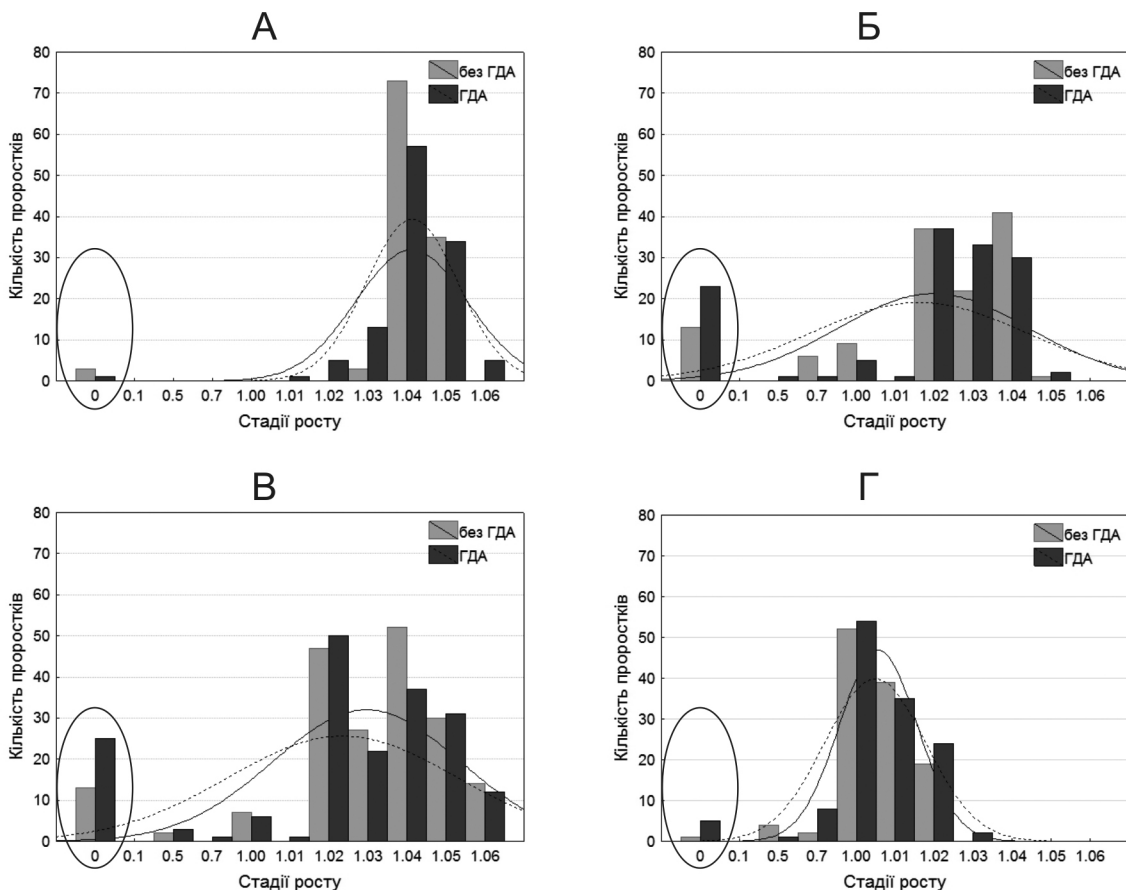


Рис. Гістограма розподілу стадій росту (за Boyes et al., 2001) 12-добових проростків *A. thaliana* після обробки насіння ГДА та без неї: А – лабораторна лінія екотипу Col (контроль); Б – проростків, вирощених з насіння природної популяції; В – після опромінення УФ-В набряклого насіння Col; Г – після гамма-опромінення сухого насіння Col. Овалом виділено гістограми кількості нежиттєздатного насіння

Вплив ГДА на появу морфологічних відхилень у проростків *A. thaliana*

Показник	Лабораторна лінія еко-типу Col		Насіння природної популяції		Опромінення УФ-В на-бряклого насіння Col		Гамма-опромінення су-шого насіння Col	
	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА	без ГДА	ГДА
Частка проростків з морфологічними відхиленнями*	5,1% 18/350	15,4% 52/337 #	8,6% 10/116	22,7% 25/110 #	17,2% 33/192	30,3% 57/188 #, ##	21,7% 26/120	37,9% 47/124 #, ##

П р и м і т к и: * – частка проростків з морфологічними відхиленнями представлена у відносних (%) і абсолютних величинах (кількість проростків з відхиленнями / загальна кількість проростків); # – різниця між варіантами без обробки та з обробкою ГДА статистично значима ($p \leq 0,05$); ## – різниця відносно лабораторної лінії еко типу Col з обробкою ГДА статистично значима ($p \leq 0,05$).

ріст проростків характеризувався певною десинхронізацією, причому у варіанті з гамма-опроміненням це відбувалося на фоні загального пригнічення ростової активності (рис. Б–Г). У результаті обробки ГДА гетерогенність темпів росту посилювалася в усіх варіантах.

Морфологічний аналіз стеблової частини проростків Col виявив незначну варіабельність у межах норми (табл.). Поодинокі проростки мали відхилення у розмірах, формі або просторовому розташуванні сім'ядолей і листків розетки. В той же час проростки, вирощені з поліморфного насіння, характеризувалися посиленою фенотипічною варіабельністю й утворенням значних морфологічних аномалій, особливо після опромінення, зокрема: локальні порушення росту, зміна форми, розмірів та кольору (антоціанові та безхлорофільні) проростків, значна деформація проростків та відсутність у них окремих органів (фото фенотипів з морфологічними змінами див. [7, 9]). У результаті обробки ГДА частка змінених фенотипів збільшувалась у 2–3 рази і разом з тим зменшувалась кількість проростків зі значними порушеннями, несумісними з подальшим нормальним ростом. Слід також відзначити, що такий ефект ГДА виявився достовірно більшим для опроміненого насіння порівняно з еко типом Col.

Отже, зниження функціональної активності HSP90 призводило до посилення варіабельності темпів росту і морфології проростків. Цей ефект був більш вираженим у поліморфного матеріалу, отриманого в результаті опромінення, що вказує на значний вклад пошкоджених меристем та індукованих генетичних змін. Слід також відзначити збільшення під впливом ГДА частки непро-рослого насіння та одночасне зменшення кількості проростків зі значним порушенням росту і морфогенезу в поліморфного матеріалу. Можна припускати, що інгібування шаперону призво-

дить до елімінації частини організмів, що зазнали значних пошкоджень, несумісних з нормальним розвитком. Такі результати підтверджують уявлення про роль шаперонів HSP90 у стабілізації («каналізації») росту і формотворення рослинних організмів.

У ряді робіт показано, що подібна десинхронізація росту і прояв прихованих мутацій можуть відбуватися за змін умов середовища, наприклад при відхиленні температури від оптимального значення [4, 5]. Припускається, що при цьому шаперон може переключатися з обслуговування специфічних білків-клієнтів на неспецифічне зв'язування і рефолдинг денатурованих білків, концентрація яких за впливу несприятливих факторів збільшується вище певного порогу.

Посилення морфологічної та вікової гетерогенності рослин у популяції за змін екологічних факторів підвищує її адаптивність завдяки виживанню більш пристосованих особин і елімінації слабких. Отримані результати свідчать на користь важливої ролі шаперонів HSP90 у цьому процесі. Вважається, що HSP90 сприяють стабілізації процесів росту і морфогенезу, підтримуючи функціональну конформацію білків-клієнтів, більшість з яких задіяна в регуляції цих процесів [4–6]. Запобігання шапероном морфологічному прояву мутацій у таких білках, з одного боку, важливо для підтримки морфологічної індивідуальності виду, а з іншого – сприяє їх накопиченню за нормальних умов без змін фенотипу, тим самим тимчасово виводячи з-під тиску природного добору. За змін факторів навколишнього середовища або при потраплянні організму до нової екологічної ніші активність специфічних шаперонних функцій HSP90 може знижуватися. Це, як показано, сприяє елімінації особин з низькою життєздатністю та посиленню фенотипічної варіабельності інших. При цьому окремі морфо-

логічні зміни можуть виявитись адаптивними у зміненому довкіллі. Накопичення таких потенційно адаптивних генетичних змін за допомогою HSP90 і прояв їх за певних умов можуть розглядатися як механізм дискретності виникнення нових форм у виду.

Висновки

Зниження виживаності гетерогенного за якістю, генетично поліморфного насіння та посилення варіабельності темпів росту і морфології проростків *A. thaliana* при інгібуванні функціональної активності шаперонів HSP90 свідчать про участь білків цієї родини в підтримці

гомеостазу та стабілізації («каналізації») росту і формотворення рослин. Це дозволяє припускати вплив HSP90 на приховання та прояв генетичних змін, що може відобразитися на темпах добору корисних, адаптивних ознак та елімінації сильно пошкоджених організмів.

Автор висловлює подяку співробітникам відділу біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за консультації та допомогу в опроміненні ультрафіолетом і співробітникам лабораторії радіаційних технологій Інституту фізики НАН України за консультації та допомогу в опроміненні гамма-радіацією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – 59. – P. 1640–1648.
2. Zhao R., Davey M., Hsu Y.-C., Kaplanek P., Tong A., Parsons A.B., Krogan N., Cagney G., Mai D., Greenblatt J., Boone C., Emili A., Houry W.A. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone // *Cell.* – 2005. – 120. – P. 715–727.
3. Козеко Л.Е. Белок теплового шока 90 кДа: разнообразие, структура и функции // *Цитология.* – 2010. – 52, № 11. – С. 3–20.
4. Rutherford S.L., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution // *Nature.* – 1998. – 396. – P. 336–342.
5. Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation // *Nature.* – 2002. – 417. – P. 618–624.
6. Sangster T.A., Salathia N., Undurraga S., Milo R., Schellenberg K., Lindquist S. HSP90 affects the expression of genetic variation and development stability in quantitative traits // *PNAS.* – 2008. – 105, № 8. – P. 2963–2968.
7. Козеко Л.Е. Фенотипическая вариабельность проростков *Arabidopsis thaliana* как результат ингибирования шаперонов Hsp90 // *Цитология и генетика.* – 2013. – 47, № 2. – С. 18–33.
8. Козеко Л.Е. Вплив радіколу, інгібітору шаперонів HSP90 на ріст проростків *Arabidopsis thaliana* після гамма-опромінення насіння // *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія «Біологія».* – 2015. – 1, № 34. – С. 14–21.
9. Kozeko L., Talalaiev O., Neimash V., Povarchuk V. A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds // *Life Sciences in Space Research.* – 2015. – 6. – P. 51–58.
10. Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants // *The Plant Cell.* – 2001. – 13, № 7. – P. 1499–1510.
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
12. Kuitinen H., Mattila A., Savolainen O. Genetic variation at marker loci and in quantitative traits in natural populations of *Arabidopsis thaliana* // *Heredity.* – 1997. – 79. – P. 144–152.
13. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. – К.: Наукова думка, 1989. – 384 с.
14. Гродзинський Д.М., Дмитрієв О.П., Гуца М.І., Коломієць О.Д., Кравець О.А., Рашидов Н.М. УФ-В радіація і рослини: механізми ушкодження та захисту. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 152 с.

KOZEKO L.YE.

M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Ukraine, 01601, Kyiv, Tereshchenkivska str., 2, e-mail: liudmyla.kozeiko@gmail.com

CHAPERONES HSP90 AS A STABILIZER OF PLANT GROWTH AND MORPHOGENESIS: A MICROEVOLUTIONARY ASPECT

Aim. Chaperones HSP90 have been considered as a mechanism for buffering and accumulating genetic changes which could be important for developmental networks. An analysis of polymorphic *Arabidopsis thaliana* seeds was carried out to test this hypothesis. **Methods.** Seeds from a natural population as well as Col seeds irradiated with UV-B and gamma-rays and non-irradiated (control) were treated with an inhibitor of HSP90 geldanamycin (GDA). Seed germinability and seedling growth rates and morphological variation were analyzed. **Results.** GDA enhanced the growth rate and morphological diversity in polymorphic material and, at the same time, eliminated a part of the weaker organisms. **Conclusions.** The role of HSP90 in the concealment and release of genetic polymorphism, support of homeostasis and stabilization («canalization») of plant growth and morphogenesis may be an important mechanism for morphological evolution.

Keywords: heat shock protein 90, *Arabidopsis thaliana*, polymorphism, phenotype, morphological evolution.