

ИЗМЕНЕНИЯ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА И ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ Hsp90 ГЕЛДАНАМИЦИНОМ

© Л. Е. Козеко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев;
электронный адрес: liudmyla.kozeiko@gmail.com

Исследовали влияние антибиотика гелданамицина (ГА), ингибитора функциональной активности белков теплового шока Hsp90, на синтез белков Hsp70 и Hsp90 и теплоустойчивость проростков *Arabidopsis thaliana*. Показано, что обработка антибиотиком проростков вызывает индукцию синтеза этих стрессовых белков при нормальных условиях. При обработке семян ГА проростки характеризовались более высоким конститутивным уровнем Hsp70 и Hsp90, а также более высоким уровнем индукции их синтеза при тепловом стрессе. Влияние ГА усиливалось с ростом его концентрации. Эти изменения сопровождались повышением термоустойчивости проростков. Полученные данные рассматриваются как доказательство авторегуляции синтеза белков теплового шока и регуляции устойчивости растения к стрессу белками Hsp90.

Ключевые слова: белки теплового шока, гелданамицин, стрессовая реакция, термоустойчивость, *Arabidopsis thaliana*.

Принятые сокращения: ГА — гелданамицин, ДМСО — диметилсульфоксид, ЭТШ — элементы теплового шока, Hsp — белки теплового шока, Hsf — факторы теплового шока.

Индукция синтеза белков теплового шока (heat shock protein, Hsp) является неотъемлемой частью реакции клетки на действие различных неблагоприятных факторов среды практически у всех живущих организмов, включая растения. Активная аккумуляция этих белков приводит к повышению устойчивости к стрессам, в частности к термоустойчивости (Queitsch et al., 2000; Bowen et al., 2002; Sørensen et al., 2003). Следует отметить, что семейства Hsp отличаются высокой степенью консервативности аминокислотных последовательностей и функций. Являясь молекулярными шаперонами, эти белки при оптимальных условиях участвуют в фолдинге других белков, сборке белковых комплексов, внутриклеточном белковом транспорте. В условиях стресса они обеспечивают дезагрегацию денатурированных белков, их поддержание в нативном состоянии, рефолдинг или деградацию (Mathew, Morimoto, 1998). Расшифровка шаперонных функций и регуляции синтеза Hsp в большей мере осуществляется на животных и бактериальных системах, вместе с тем появляется все больше данных, подтверждающих существование сходных механизмов и у растений (Шарова, 2002; Agarwal et al., 2002; Козеко, 2010; Waters et al., 2013).

Изучение механизмов индукции синтеза Hsp привело к пониманию того, что инициация транскрипции их генов происходит при взаимодействии транскрипционных факторов — факторов теплового шока (heat shock factor, Hsf) с консервативными цис-регуляторными элементами в промоторной последовательности этих генов, так называемыми элементами теплового шока (ЭТШ) (Pelham,

1982; Wu, 1984; Morimoto, 1998; Schöffl et al., 1998). Функционально активной формой Hsf является тример. В отсутствие стресса клетки содержат пул Hsf в неактивной форме. Один из возможных механизмов подавления их активности первоначально был идентифицирован в животных клетках. На ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus* показано, что при физиологических условиях мономеры Hsf1 связаны с цитозольным Hsp90 (Ali et al., 1998). В стрессовых условиях, как предполагают, Hsp90 может переключаться на обслуживание возросшего количества денатурированных белков, а высвобожденные Hsf образуют тримеры, способные индуцировать экспрессию генов Hsp, в том числе и Hsp90 (Morimoto, 1998). Подтверждение этой гипотезы первоначально было получено на животных объектах (Duncan, 2005).

В последние годы появились доказательства того, что подобный механизм существует и в растительных клетках. Показано, что ингибиторы Hsp90 гелданамицин (ГА) и радицикол вызывают у проростков *Arabidopsis thaliana* активацию экспрессии целого ряда генов, большая часть которых содержит ЭТШ, в том числе генов цитозольных белков Hsp70, Hsp90 и Hsp101 (Yamada et al., 2007). Оба антибиотика с высокой аффинностью взаимодействуют с АТФ-связывающим сайтом N-терминального домена молекулы Hsp90, тем самым блокируя АТФазный цикл шаперона (Prodromou et al., 1997). Наличие специфических ингибиторов Hsp90 делает возможным более тщательное исследование роли этого семейства шаперонов в регуляции синтеза стрессовых белков и устойчивости организмов к стрессу. В связи с этим в настоящей работе изучали

влияние антибиотика ГА в широком диапазоне концентраций на синтез белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 и на термоустойчивость проростков *Arabidopsis thaliana*.

Материал и методика

Материал, обработка антибиотиком и условия теплового стресса. Работу проводили с *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотипа Columbia (Col). Семена стерилизовали с поверхности 70%-ным этанолом в течение 2 мин, затем в растворе гипохлорита (3 % Cl) в течение 10 мин, после чего отмывали стерильной дистиллированной водой 5 раз по 5 мин. Для синхронизации прорастания семян выдерживали во влажных стерильных условиях в темноте при 4 °С в течение 48 ч, после чего высаживали в чашки Петри (120 × 120 мм) на среду, содержащую половинную долю комплекса минеральных солей Мурасиге—Скуга, 1 % сахарозы и 0.8 % агара, равномерно распределяя по поверхности чашки около 115 семян. Далее чашки содержали при 24 ± 1 °С и фотопериоде 16 ч света и 8 ч темноты при интенсивности света 6 клк.

Во всех экспериментах ансамициновый антибиотик ГА (Sigma, США) применяли в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ, используя маточный раствор 1 мг/мл в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для контроля действия ДМСО растительный материал инкубировали с растворами, содержащими те же его количества, что и 1, 10 и 100 мкМ ГА.

Для обработки антибиотиком 12-суточные проростки помещали в микропробирки и инкубировали с 500 мкл раствора ГА в течение 6 ч при комнатной температуре в темноте (для предотвращения дезактивации нестойкого на свету антибиотика). После инкубации проростки просушивали, замораживали и хранили до анализа при -70 °С. Семена, стерильные и выдержанные при 4 °С, инкубировали в 500 мкл раствора ГА при комнатной температуре в темноте в течение 24 ч. В контроле проростки и семена инкубировали в 500 мкл стерильной дистиллированной воды при тех же условиях. Далее семена высаживали на среду и проращивали, как описано выше. Для анализа белков использовали 12-суточные проростки.

Для изучения влияния ГА на индукцию синтеза Hsp при тепловом стрессе 12-суточные проростки подвергали тепловому воздействию при двух режимах: 1) 45 °С, 1 ч; 2) 37 °С, 2 ч. После этого проростки замораживали и хранили до анализа при -70 °С.

Для индукции устойчивости проростки инкубировали при 37 °С в течение 2 ч с последующим 2-часовым восстановлением при 24 °С. Термоустойчивость обработанных таким образом 12-суточных проростков и необработанных сравнивали путем последующей их инкубации при 45 °С в течение 1 ч. Половину проростков каждого варианта замораживали для анализа белков сразу после стресса, вторую половину оставляли на среде и фотографировали через 2 сут.

При изучении влияния ГА на термоустойчивость 3-суточные проростки, выращенные из семян, обработанных антибиотиком, подвергали действию жесткого теплового стресса без предобработки или после индукции устойчивости. В первом случае чашки с проростками выдерживали при 45 °С в течение 30, 45 и 60 мин, после чего возвращали в нормальные условия. Далее в течение 5 сут регистрировали долю выживших проростков.

На 12-е сутки проростки фотографировали. Во втором случае после индукции устойчивости (как указано выше) проростки подвергали действию тепла при 45 °С в течение 1.5, 2 или 2.5 ч. 18-суточные проростки фотографировали и взвешивали по 25 проростков в каждом варианте.

Выделение белка. Замороженный материал гомогенизировали с буфером, содержащим 25 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ NaCl и ингибитор протеаз 1 мМ PMSF. Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 12 000 g и 4 °С. Концентрацию общего белка в супернатанте измеряли по методике Брэдфорд (Bradford, 1976). К аликвотам супернатанта добавляли равное количество буфера, содержащего 125 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 20 % глицерина, 5 % β-меркаптоэтанола и 0.1 % бромфенолового синего.

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг. Образцы белка прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 мин. Пробы, содержащие 20—30 мкг белка, разделяли методом вертикального электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле с использованием камеры Mini Dual Gel (Sigma) по методике (Laemmli, 1970). Буфером для электрофореза служил Tris-глицериновый буфер (25 мМ Tris, 250 мМ Gly и 0.1 % SDS, pH 8.3). После электрофореза гели либо окрашивали Кумасси, либо использовали для иммуноблоттинга. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Швеция) осуществляли в камере Wet Blotter (Sigma), заполненной Tris-глицериновым буфером для переноса (47.9 мМ Tris-HCl, 38.6 мМ Gly и 0.0385 % SDS) в течение 1 ч при 300 мА. Качество переноса оценивали обратным окрашиванием белков на мембране раствором PSS (2 % Ponceau S, 30 % ТХУ и 30 % сульфосалициловой кислоты). Мембрану фотографировали и помещали на ночь в блокирующий буфер (5 % сухого молока в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4) при 4 °С. Для иммунодетекции белков использовали мышиные моноклональные антитела, специфичные к Hsp70 (H5147, Sigma, США) и Hsp90 (H1775, Sigma, США) и способные связываться как с конститутивными, так и индуцибельными изоформами соответствующих семейств. Иммунохимическую реакцию проводили в течение 2 ч при комнатной температуре, антитела использовали в оптимальных концентрациях. Вторичными антителами служили антимышьи IgG, конъюгированные с биотином, в разведении 1 : 10 000 (Sigma, США). Антитела разводили в PBS, содержащем 1 % сухого молока. После каждой инкубации с антителами мембрану трижды отмывали буфером PBS, содержащим 1 % сухого молока и 0.1 % Tween 20. Для визуализации белковых зон использовали экстравадин-пероксидазную систему, выявляя активность пероксидазы с помощью SIGMA FAST™ DAB (Sigma, США). Для контроля загрузки белка использовали белковые треки на нитроцеллюлозной мембране, окрашенные Ponceau S. Количественную оценку белковых полос на блотах (в усл. ед.) проводили с помощью денситометрического анализа с использованием компьютерной программы ImageMaster™ TotalLab (Amersham, Швеция). Каждый анализ проводили не менее чем в трех биологических и двух аналитических повторностях.

Статистическая обработка. Центральная тенденция и разброс значений признаков представлены в виде среднего значения и доверительного интервала при α = 0.95. Различия между средними оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при *P* < 0.05.

Результаты и обсуждение

Влияние ГА на синтез белков теплового шока. Методом иммуноблотинга с использованием антител к белкам Hsp70 и Hsp90 у проростков *A. thaliana* детектированы две иммунореактивные зоны Hsp70, обозначенные нами Hsp70.1 и Hsp70.2, и одна зона Hsp90 (рис. 1—4). С учетом того, что прогнозируемые молекулярные массы ряда белков этих семейств у данного вида близки между собой (Krishna, Gloor, 2001; Lin et al., 2001), нельзя исключать, что в выявленных на блотах зонах может объединяться несколько изоформ белка. В таком случае описываемые далее изменения количества белка каждой зоны будут отражать суммарные изменения количества нескольких изоформ, близких по молекулярной массе.

Анализ проростков *A. thaliana*, инкубированных с ГА в течение 6 ч при 24 °С, выявил индукцию синтеза Hsp70 и Hsp90 в клетках в отсутствие стресса (рис. 1). При этом наиболее эффективной была концентрация ГА 10 мкМ. Растворитель ДМСО в соответствующих концентрациях действия не оказывал (данные не показаны). Эти результаты соответствуют данным других исследователей, определивших индукцию экспрессии ряда содержащих ЭТШ генов, в том числе *Hsp70* и *Hsp90*, у проростков *A. thaliana* в подобном эксперименте (Yamada et al., 2007). Индукцию синтеза Hsp70, Hsp90 и Hsp25 под влиянием ГА отмечали ранее и у животных клеток (Conde et al., 1997; Новоселова и др., 2008). Учитывая то, что ГА является специфичным ингибитором АТФ-зависимого функционирования шаперонов Hsp90 (Prodromou et al., 1997), а также то, что они способны поддерживать Hsf в неактивном состоянии (Ali et al., 1998), полученные данные рассматриваются нами как подтверждение гипотезы регуляции синтеза белков теплового шока белками Hsp90 по принципу обратной связи (Morimoto, 1998).

На животных клетках было показано, что повышенный уровень синтеза Hsp поддерживается в течение нескольких часов после окончания инкубации с ансамициновыми ингибиторами Hsp90 (Duncan, 2005). С другой стороны, в недавней нашей работе сообщалось, что обработка семян *A. thaliana* ГА вызывает изменения темпа роста и морфологического разнообразия проростков (Козеко, 2013). Это побудило нас проверить, оказывает ли обработка семян антибиотиком влияние на синтез Hsp в проростках. Семена инкубировали с ГА в течение 24 ч. Анализ выращенных из них 12-суточных проростков показал повышение содержания Hsp70 с возрастанием концентрации антибиотика (рис. 2, а). Уровень Hsp90 был выше контрольного при концентрациях ГА 10 и 100 мкМ. Проверка возможного действия растворителя ДМСО существенных изменений в синтезе этих белков не выявила (рис. 2, б). В целом повышение содержания Hsp в проростках после обработки семян ГА было меньшим, чем после обработки им проростков. Следует отметить, что анализ белковых спектров, окрашенных Кумасси после электрофоретического разделения в геле, не выявил заметных изменений в общем белковом спектре проростков после обработки семян ГА (данные не показаны). Таким образом, инкубация семян с антибиотиком влияет на уровень синтеза Hsp70 и Hsp90 в проростках по крайней мере на протяжении первых 12 сут их роста. Известно, что ГА при введении его в среду выращивания постепенно теряет свою биологическую активность под действием света (Queitsch et al., 2002). Если то же самое

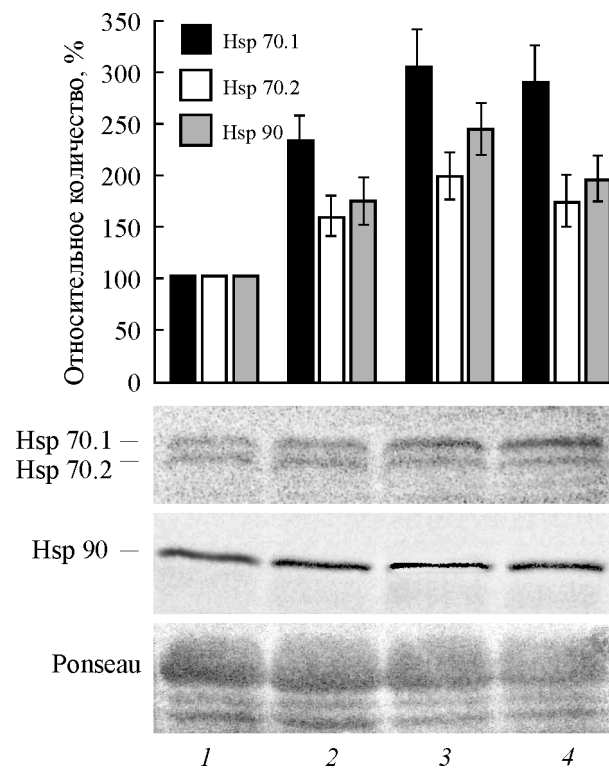


Рис. 1. Влияние гелданамицина (ГА) на синтез Hsp70 и Hsp90 в проростках *Arabidopsis thaliana* при нормальных условиях.

Здесь и на рис. 2, 3 показаны фотографии иммуноблотов (внизу) и графическое представление относительного количества белков (вверху). Доростки: 1 — контроль, 2—4 — после обработки проростков ГА в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно. Контроль загрузки белков представлен в виде фрагмента мембраны, окрашенной Ponceau S после электропереноса (внизу). Гистограммы представляют средние значения данных денситометрии иммуноблотов трех независимых экспериментов, рассчитанные в % от значений в контроле, и доверительные интервалы при $\alpha = 0.95$.

происходит с ним и в тканях семени, то период его активности будет совпадать с процессами прорастания семени и начала роста проростка. Поскольку в это время происходят гидролиз Hsp, запасенных в зрелом семени, и реактивация синтеза конститутивных Hsp (Queitsch et al., 2000; Sung et al., 2001; Kozeko, Kordyum, 2006), можно предполагать опосредованное влияние ГА на эти процессы. Не исключена также возможность того, что в клетках антибиотик в большей мере защищен от деструктивного действия света и остается активным более продолжительное время.

Следующим этапом стал анализ влияния обработки семян ГА на уровень индукции синтеза Hsp в проростках при стрессе. Проростки подвергали тепловому стрессу — сублетальному (37 °С, 2 ч) и летальному (45 °С, 1 ч). В первом случае наблюдали дозозависимое повышение уровня индукции синтеза Hsp70, особенно Hsp70.1, и активацию синтеза Hsp90 при максимальной концентрации антибиотика (рис. 3, а). При 45 °С изменения носили более сложный характер (рис. 3, б). Так, обработка семян 1 мкМ ГА практически не изменяла уровень синтеза Hsp70.1 и приводила к снижению количества Hsp70.2 и Hsp90, тогда как применение более высоких концентраций антибиотика вызывало усиление индукции синтеза всех белков. В целом степень активации синтеза была выше при 37 °С. Известно, что эта температура способствует наиболее интенсивному синтезу Hsp у *A. thaliana*

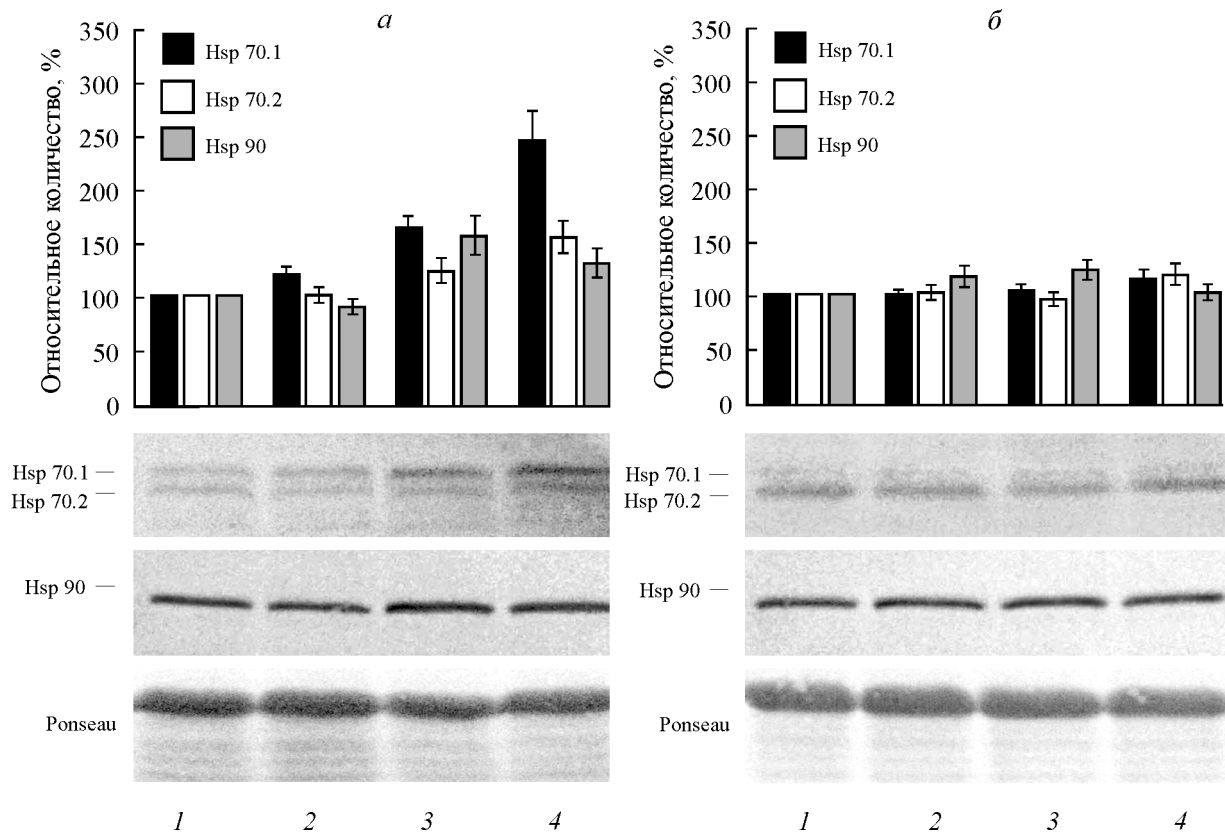


Рис. 2. Влияние обработки семян *Arabidopsis thaliana* ГА (а) и растворителем ДМСО (б) на синтез Hsp70 и Hsp90 в проростках *A. thaliana* при нормальных условиях.

Дорожки: 1 — контроль, 2—4 — после обработки семян ГА в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно (а) и ДМСО в соответствующих концентрациях (б). Остальные объяснения те же, что и к рис. 1.

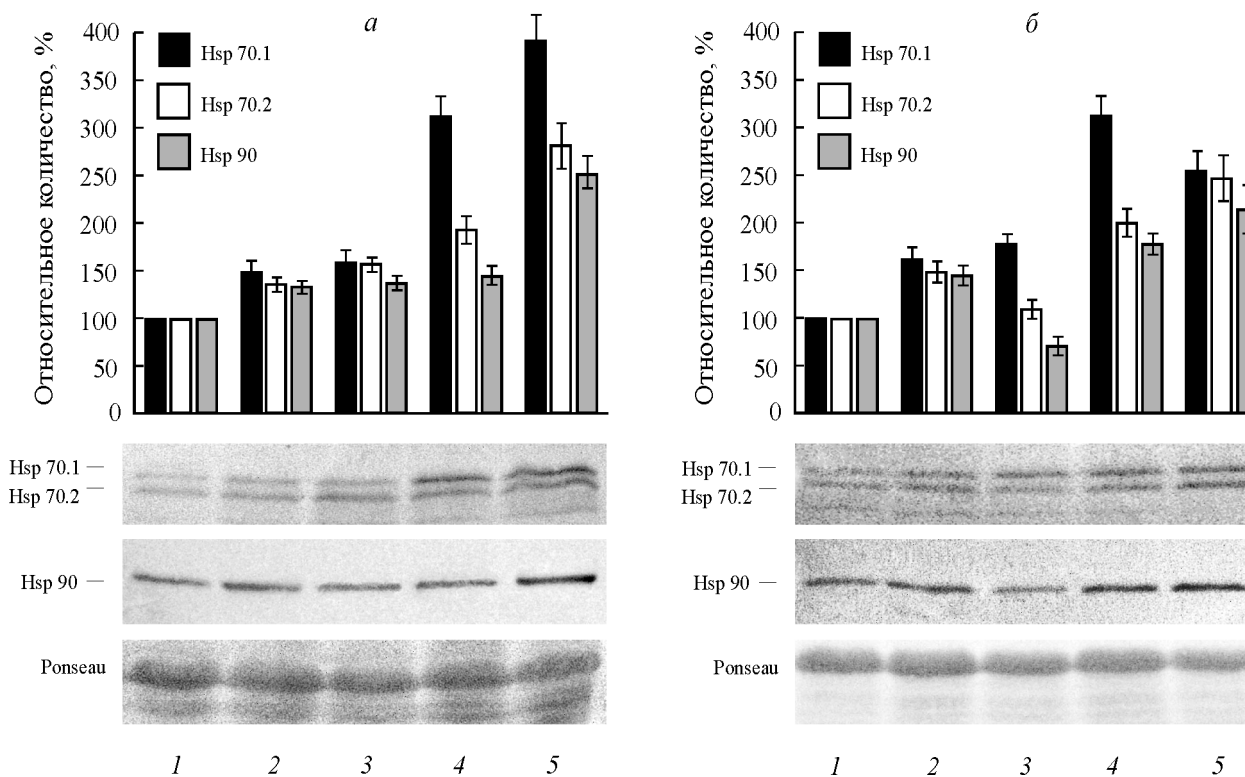


Рис. 3. Влияние обработки семян *Arabidopsis thaliana* ГА на индукцию синтеза Hsp70 и Hsp90 в проростках при тепловом стрессе — 37 °С в течение 2 ч (а) или 45 °С в течение 1 ч (б).

Дорожки: 1 — контроль, 2—5 — тепловой стресс: 2 — без обработки ГА, 3—5 — после обработки семян ГА в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно. Остальные объяснения те же, что и к рис. 1.

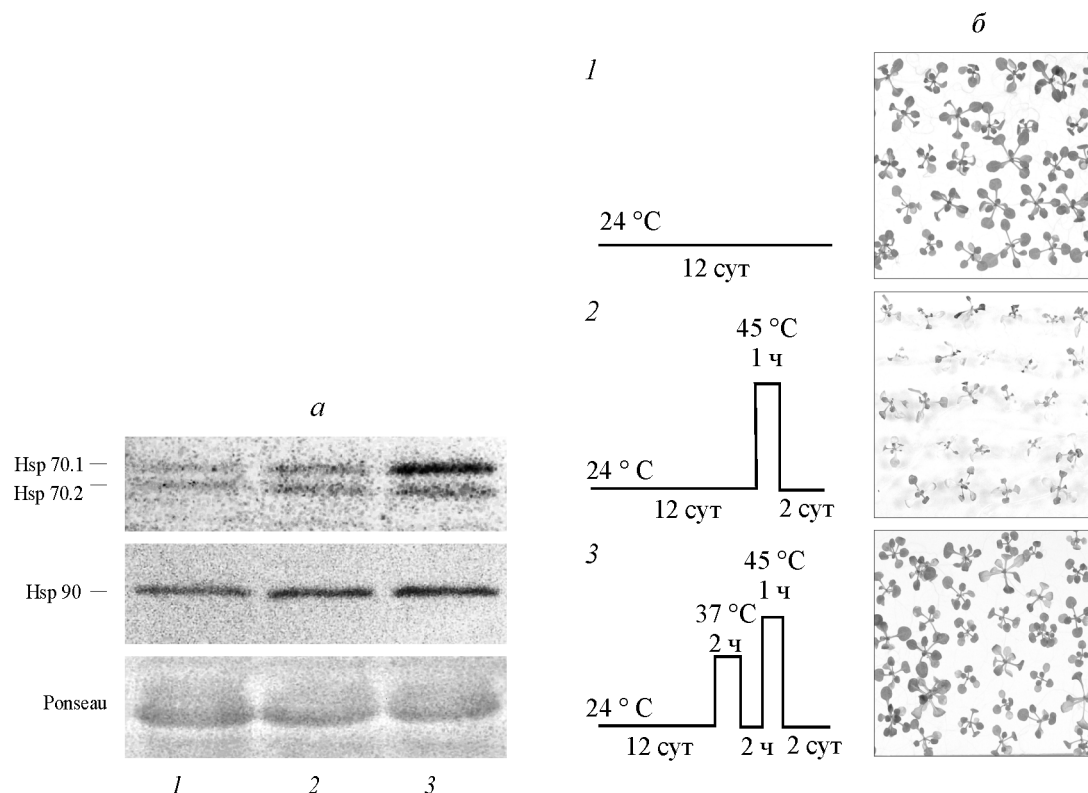


Рис. 4. Индукция синтеза Hsp70 и Hsp90 (а) и теплоустойчивость (б) проростков *Arabidopsis thaliana* в результате предварительного нагрева при сублетальной температуре.

а — фотографии иммуноблотов (анализ проводился сразу после стресса), б — фотографии проростков через 2 сут после стресса (справа) и режимы теплового стресса на схемах слева. Дорожки 1—3 на блотах (а) соответствуют вариантам 1—3 на рис. 4, б.

(Клюева, Самохвалов, 1990) и индуцирует термоустойчивость (Yamada et al., 2007).

Таким образом, ингибитор активности шаперонов Hsp90 не только вызывает индукцию синтеза Hsp70 и Hsp90, но и имеет пролонгированное влияние на интенсивность их синтеза при нормальных и стрессовых условиях. Следует отметить также, что степень этих изменений у разных белков в ответ на действие ГА была неодинаковой: в случае Hsp70 изменения были более выраженными у Hsp70.1, в то же время изменения синтеза Hsp90 происходили с некоторой задержкой и были менее значительными. Более поздние изменения в синтезе Hsp90 относительно Hsp70 наблюдали и у животных клеток (Duncan, 2005). Эта закономерность соответствует представлениям о том, что Hsp90 являются белками основного метаболизма клетки (house keeping function proteins) и их синтез реагирует на стрессовые воздействия в меньшей степени, чем синтез белков других семейств Hsp (Picard, 2000; Козеко, 2010).

Влияние ГА на термоустойчивость проростков. Известно, что накопление белков теплового шока в клетках способствует усилению устойчивости организма к стрессу. Мы наблюдали это на примере инду-

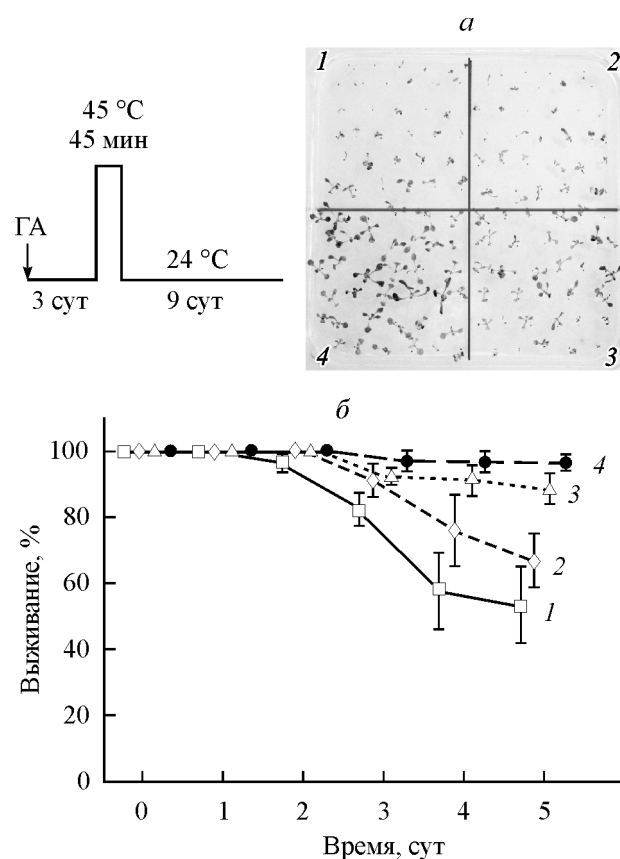


Рис. 5. Влияние обработки семян *Arabidopsis thaliana* ГА на теплоустойчивость проростков.

Фотографии 12-суточных проростков (а) и выживаемость (б) после теплового стресса (схема показана на а, слева). 1 — контроль, 2—4 — после обработки семян ГА в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно.

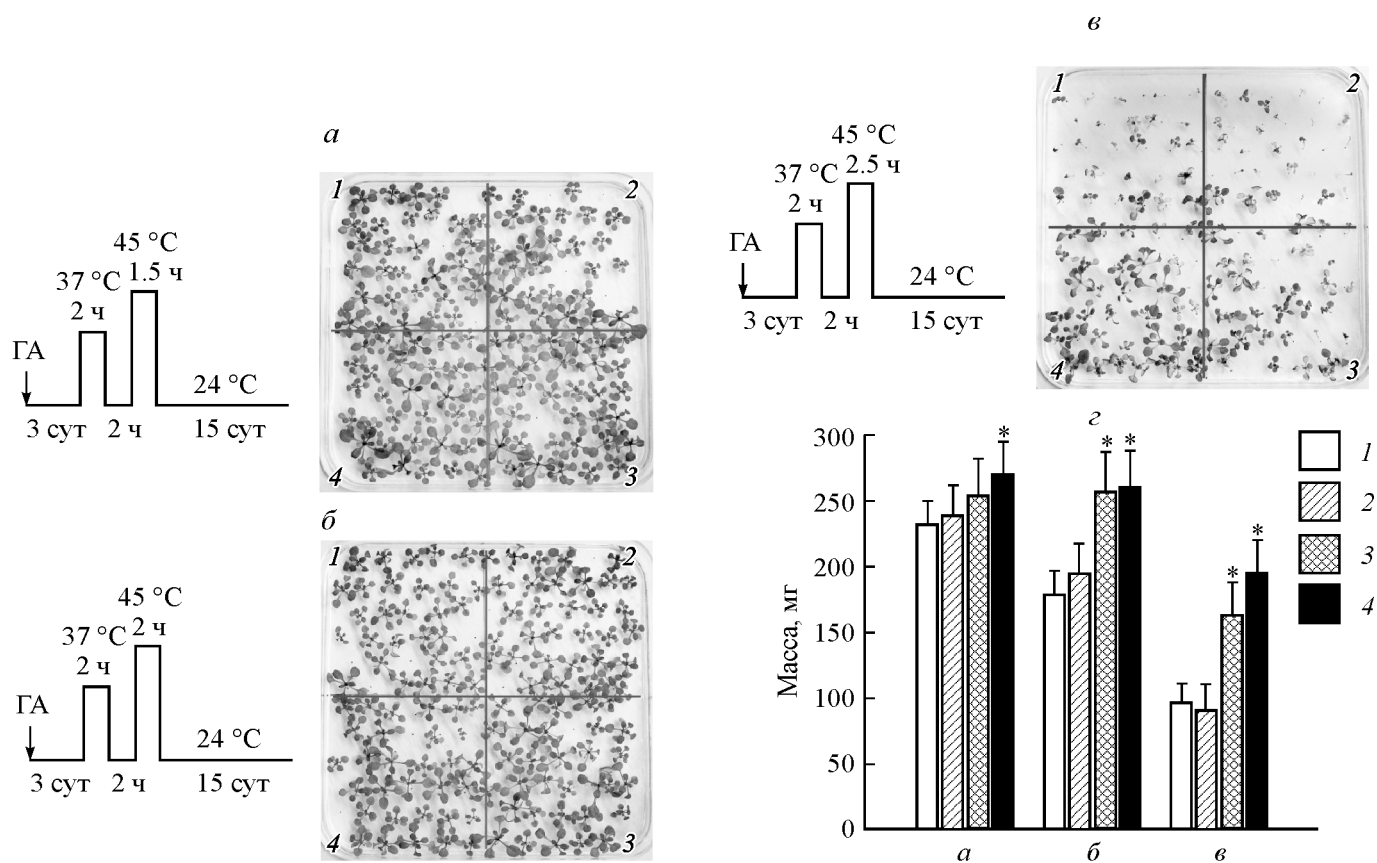


Рис. 6. Совместное влияние обработки семян *Arabidopsis thaliana* ГА и предварительного нагрева при сублетальной температуре на теплоустойчивость проростков.

a–в (слева) — фотографии 18-суточных проростков после теплового стресса на 3-и сут роста. Режимы теплового стресса представлены на *схемах* слева. *г* — масса 25 проростков (среднее и его доверительный интервал при $\alpha = 0.95$, звездочкой обозначены достоверные отличия от контроля при $P < 0.05$). 1 — контроль, 2—4 — после обработки семян ГА в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно.

цированной термоустойчивости, когда предварительная инкубация проростков при сублетальной температуре (37 °C, 2 ч) приводила к значительной активации синтеза Hsp70 и Hsp90 (рис. 4, *a*) и выживанию проростков при последующем жестком стрессе (45 °C, 1 ч) (рис. 4, *б*). Исходя из этого целесообразно было проверить, способствует ли повышенное содержание этих белков, вызванное ГА, усилению устойчивости растений. По данным литературы (Yamada et al., 2007), обработка проростков *A. thaliana* ингибиторами Hsp90 повышала их термоустойчивость, при этом тепловое воздействие следовало сразу после обработки антибиотиком.

В наших экспериментах антибиотиком обрабатывали семена, а действию теплового стресса подвергали 3-суточные проростки. Выбор срока обусловлен тем, что проростки *A. thaliana* в течение первых 2 сут роста обладают повышенной термоустойчивостью, после чего становятся чувствительными к действию высокой температуры (Queitsch et al., 2000). В частности, это связано с гидролизом Hsp, запасенных в зрелом семени. Теплоустойчивость проростков в первом эксперименте определяли по их выживанию после инкубации при 45 °C. Проростки, выдержанные при высокой температуре в течение 30 мин, оставались жизнеспособными, но отставали в росте от контрольных во всех вариантах. Увеличение продолжительности теплового стресса до 45 мин приводило в течение 5 сут к гибели около 50 % проростков в контроле (рис. 5, 1). В то же время после действия ГА доля вы-

живших проростков была выше, причем эффективность действия антибиотика повышалась с увеличением концентрации ГА (рис. 5, 2—4). Более длительная инкубация при высокой температуре приводила к гибели проростков во всех вариантах.

Во втором варианте экспериментов изучали влияние ГА на уровень индуцированной термоустойчивости. Для этого проростки выдерживали при сублетальной температуре, после чего подвергали нагреву (45 °C) разной продолжительности. У 12-суточных проростков (9 сут после стресса) отмечали общее угнетение роста во всех вариантах — как без обработки ГА, так и с обработкой. Разница между вариантами становилась заметной позже, что, по-видимому, связано с разной скоростью реактивации роста стеблевой меристемы (рис. 6, *a–в*). Определение массы 18-суточных проростков показало позитивное влияние ГА на восстановление роста проростков (рис. 6, *г*). Этот эффект становился более заметным с увеличением времени нагрева при 45 °C от 1.5 до 2.5 ч, т. е. с приближением к границе толерантности. При дальнейшем увеличении продолжительности стресса проростки погибали во всех вариантах.

Таким образом, в работе впервые показано, что обработка семян *A. thaliana* ГА, ингибитором Hsp90, имеет пролонгированное действие. ГА вызывает дозозависимое усиление синтеза Hsp70 и Hsp90 в проростках как при нормальных условиях, так и при тепловом стрессе, что приводит к их более высокой термоустойчивости. По-

добного эффекта ГА можно ожидать и для других семейств Hsp, поскольку механизм индукции генной экспрессии путем связывания Hsf с ЭТШ в промоторной последовательности генов всех семейств белков теплового шока сходный. В пользу такого предположения свидетельствует активация генной экспрессии различных семейств Hsp при обработке ингибиторами Hsp90 проростков *A. thaliana* (Yamada et al., 2007). В целом полученные результаты подтверждают гипотезу авторегуляции синтеза белков теплового шока и регуляции устойчивости к стрессу белками Hsp90. Исходя из того, что накопление Hsp в клетке способствует повышению устойчивости не только к высокой температуре, но и к другим неблагоприятным факторам (Sorensen et al., 2003), можно прогнозировать повышение устойчивости под влиянием ингибиторов Hsp90 и к другим типам стресса.

Список литературы

- Клюева Н. Ю., Самохвалов И. М. 1990. Синтез белков теплового шока в листьях *Arabidopsis thaliana*. Физиол. раст. 37 (4) : 739—747. (Klyueva N. Yu., Samokhvalov I. M. 1990. Synthesis of heat shock proteins in *Arabidopsis thaliana* leaves. Russ. J. Plant Physiol. 37 (4) : 739—747.)
- Козеко Л. Е. 2010. Белок теплового шока 90 кДа: разнообразие, структура и функции. Цитология. 52 (11) : 3—20. (Kozecko L. Ye. 2010. Heat shock proteins 90 kDa: diversity, structure, functions. Tsitologiya. 52 (11) : 3—20.)
- Козеко Л. Е. 2013. Фенотипическая вариабельность проростков *Arabidopsis thaliana* как результат ингибирования шаперонов Hsp90. Цитология и генетика. 47 (2) : 18—33. (Kozecko L. Ye. 2013. Phenotypic variability of *Arabidopsis thaliana* seedlings as a result of inhibition of Hsp90 chaperones. Cytology and Genetics. 47 (2) : 18—33.)
- Новоселова Т. В., Черенков Д. А., Хренов М. О., Глушкова О. В., Лунин С. М., Новоселова Е. Г., Фесенко Е. Е. 2008. Влияние geldanamycin на экспрессию сигнальных белков и белков теплового шока в нормальных лимфоцитах мышей. Цитология. 50 (7) : 629—635. (Novoselova T. V., Cherenkov D. A., Khrenov M. O., Glushkova O. V., Lunin S. M., Novoselova E. G., Fesenko E. E. 2008. Effect of geldanamycin on expression of signal proteins and heat-shock proteins in normal mouse lymphocytes. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 2 (4) : 366—372.)
- Шарова Е. И. 2002. Транспорт белков в клетках растений. Физиол. раст. 49 (2) : 286—301. (Sharova E. I. 2002. Protein transport in plant cells. Russ. J. Plant Physiol. 49 (2) : 255—268.)
- Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Grover A. 2002. Plant Hsp100 proteins: structure, function and regulation. Plant Sci. 163 : 397—405.
- Ali A., Bharadwaj S., O'Carroll R., Ovsenek N. 1998. Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. Mol. Cell. Biol. 18 : 4949—4960.
- Bowen J., Lay-Yee M., Plummer K., Ferguson I. 2002. The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. J. Plant Physiol. 159 : 599—606.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Conde A. G., Lau S. S., Dillmann W. H., Mestrlil R. 1997. Induction of heat shock proteins by tyrosine kinase inhibitors in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against simulated ischemia. Mol. Cell. Cardiol. 29 : 1927—1938.
- Duncan R. F. 2005. Inhibition of Hsp90 function delays and impairs recovery from heat shock. FEBS J. 272 : 5244—5256.
- Kozecko L., Kordyum E. 2006. The stress protein level under clinorotation in context of the seedling developmental program and the stress response. Microgravity Sci. Technol. XVIII (3/4) : 254—256.
- Krishna P., Gloor G. 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. Cell Stress & Chaperones. 6 : 238—246.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Lin B.-L., Wang J.-Sh., Liu H.-Ch., Chen R.-W., Meyer Y., Barakat A., Delseny M. 2001. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. Cell Stress & Chaperones. 6 : 201—208.
- Mathew A., Morimoto R. I. 1998. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 851 : 99—111.
- Morimoto R. I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Develop. 12 : 3788—3796.
- Pelham H. R. B. 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. Cell. 30 : 517—528.
- Picard D. 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. Cell. Mol. Life Sci. 59 : 1640—1648.
- Prodromou C., Roe S. M., O'Brien R., Ladbury J. E., Piper P. W., Pearl L. H. 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. Cell. 90 : 65—75.
- Queitsch C., Hong S.-W., Vierling E., Lindquist S. 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. Plant Cell. 12 : 479—492.
- Queitsch C., Sangster T. A., Lindquist S. 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. Nature. 417 : 618—624.
- Schöffl F., Prändl R., Reindl A. 1998. Regulation of the heat-shock response. Plant Physiol. 117 : 1135—1141.
- Sorensen J. G., Kristensen T. N., Loeschke V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecology Lett. 6 : 1025—1037.
- Sung D. Y., Vierling E., Guy C. L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. Plant Physiol. 126 : 789—800.
- Waters E. R. 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. J. Exp. Bot. 64 : 391—403.
- Wu C. 1984. Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. Nature. 311 : 81—84.
- Yamada K., Fukao Y., Hayashi M., Fukazawa M., Suzuki I., Nishimura M. 2007. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 282 (52) : 37 794—37 804.

CHANGES IN HEAT SHOCK PROTEIN SYNTHESIS AND THERMOTOLERANCE
OF *ARABIDOPSIS THALIANA* SEEDLINGS AS A RESULT OF INHIBITION
OF Hsp90 BY GELDANAMYCIN

L. Ye. Kozeko

Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

The influence of geldanamycin (GA), which is a specific inhibitor of heat shock protein Hsp90 activities, on synthesis of Hsp70 and Hsp90 and thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings has been studied. Incubation of seedlings with GA was shown to induce synthesis of these stress proteins under normal conditions. Treatment of seeds with the Hsp90 inhibitor resulted in the elevated constitutive levels of Hsp70 and Hsp90 in seedlings as well as increased induction of their synthesis under heat shock, at that the effect of GA increased with its concentration. These up-regulation of Hsp promoted thermotolerance of seedlings. The obtained results are considered as evidence for autoregulation of heat shock protein synthesis and regulation of plant tolerance by Hsp90.

Key words: heat shock proteins, geldanamycin, stress reaction, thermotolerance, *Arabidopsis thaliana*.
