

УДК 581.15:57.052:57.041

ВПЛИВ РАДІЦІКОЛУ, ІНГІБІТОРУ ШАПЕРОНІВ HSP90, НА РІСТ ПРОРОСТКІВ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПІСЛЯ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ НАСІННЯ

© 2015 р. Л. Є. Козеко

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Досліджували вплив інгібітору шаперонів HSP90 радіціколу (РАД) на ріст і морфогенез *Arabidopsis thaliana*. Обробка антибіотиком у діапазоні концентрацій 10^{-9} - 10^{-5} М насіння екотипу Col-0 призводила до дозозалежного посилення варіабельності темпів росту і фенотипів проростків. Гамма-опромінення насіння в дозах 100, 500 і 1000 Гр використовували для отримання життєздатного, але поліморфного матеріалу. Обробка опроміненого насіння РАД (10^{-5} М) спричинювала посилення гетерогенності проростків за темпами росту та збільшення кількості морфозів і в той же час певну стимуляцію росту і розвитку. На основі отриманих даних обговорюється роль HSP90 у стабілізації («каналізації») росту і формотворення рослин за дії внутрішніх стохастичних процесів, а також при гено- і цитотоксичній дії радіації.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, інгібітор HSP90, радіцікол, фенотип, гамма-опромінення

Білки теплового шоку (heat shock protein, HSP) 90 кДф як шаперони здійснюють фолдинг і підтримують функціональний стан білків у клітині. На відміну від інших родин HSP/шаперонів, HSP90 характеризуються субстратною специфічністю. Вони беруть участь у дозріванні та конформаційній регуляції певного набору білків, включаючи білки внутрішньоклітинного сигналіngu, регуляції клітинного циклу, стресової реакції тощо (Picard, 2002; Zhao et al., 2005). Останнім часом з'являються роботи, присвячені вивченню білків-клієнтів HSP90 у рослин (див. огляд: Козеко, 2010). Це вказує на важливість шаперонів цієї родини для регуляції росту і формотворення рослинного організму. Вважається, що HSP90 можуть «каналізувати» стохастичні клітинні процеси та запобігати прояву генетичної нестабільності, контролюючи активність залежних від них регуляторних білків (Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007). Крім того, існує думка, що вони можуть сприяти прихованню генетичних змін, підтримуючі функціональну конформацію мута-

тного білка-клієнта (Rutherford, Lindquist, 1998; Sangster et al., 2008). Виходячи з цього, можна очікувати, що інгібування HSP90 повинно призводити до дестабілізації росту і розвитку, а також до прояву прихованих генетичних змін у фенотипі. Таке припущення підтверджується результатами ряду робіт, в яких зниження кількості HSP90 або пригнічення його шаперонної активності шляхом застосування, відповідно, генетичних підходів і специфічних інгібіторів призводило до посилення фенотипічної варіабельності та появи ненормальних фенотипів (Rutherford, Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007; Sangster et al., 2008). Подібні результати були нещодавно одержані нами при інгібуванні HSP90 специфічним інгібітором гелданаміцином (ГДА) в *Arabidopsis thaliana* при аналізі мономорфного і поліморфного матеріалу. При цьому лабораторні лінії екотипів використовувалися як близькі до мономорфних, оскільки цей вид є самозапильним і характеризується вкрай низьким рівнем гетерозиготності (Kuittinen et al., 1997; Queitsch et al., 2002). Поліморфний матеріал отримували з насіння природних популяцій, а також шляхом опромінення насіння екотипів ультрафіолетом В (Козеко, 2013) та гамма-променями (Kozeko et al., 2015, in press). При цьому вико-

Адреса для кореспонденції: Козеко Людмила Євгенівна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул.
Терещенківська, 2, 01601, Київ, Україна;
e-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com

ВПЛИВ РАДІЦКОЛУ

ристання іонізуючої радіації для індукції генетичного поліморфізму було обумовлено тим, що вона індукує генетичну нестабільність, зокрема виникнення мутацій (Koornneef et al., 1982; Гродзинський, 1989; Гродзинський та ін., 2007; De Micco et al., 2011), а також призводить до порушення конформації поліпептидів (Горбченко и др., 2006).

Метою даного дослідження є експериментальна перевірка уявлень щодо ролі шаперонів HSP90 в стабілізації ростових процесів при проростанні насіння *Arabidopsis thaliana*, що знало генотоксичного впливу гамма-радіації, з використанням інгібітору HSP90 радіцколу (РАД). РАД, як і ГДА, інгібує шаперонну активність HSP90 шляхом блокування його N-термінального сайту зв'язування АТФ (Prodromou et al., 1997), але відрізняється за хімічною структурою (Roe et al., 1999). Тому порівняння ефектів РАД з отриманими раніше у подібному дослідженні ефектами ГДА (Kozeko et al., 2015, in press) дає можливість альтернативної оцінки ролі HSP90 в прояві генетичних змін на рівні фенотипу.

МЕТОДИКА

Роботу проводили з *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. екотипу Columbia (Col-0). Для інгібування HSP90 використовували природний макроциклічний антибіотик РАД (radicicol, Sigma, C₁₈H₁₇ClO₆, мол. м. 364,8, константа дисоціації зв'язування з HSP90 К_д = 19 нМ (Roe et al., 1999)).

Насіння стерилізували з поверхні 70% етанолом протягом 2 хв і розчином гіпохлориту (3% Cl) протягом 10 хв і відмивали стерильною дистильованою водою 5 разів по 5 хв. Далі всі маніпуляції з насінням проводили у стерильних умовах. Для синхронізації проростання насіння витримували у вологих умовах при 4°C протягом двох діб, після чого інкубували з 0,5 мл розчину РАД необхідної концентрації (див. нижче) у темряві при кімнатній температурі протягом однієї доби. У контролі насіння витримували у стерильній дистильованій воді за тих самих умов. Далі його висаджували у квадратні чашки Петрі (12 × 12 см) на середовище, яке містило половину від норми комплексу мінеральних солей Мурасіге-Скуга, 1% сахарози, 0,8% агару, розподіляючи рівномірно по площині. Чашки з насінням тримали при 24 ± 1°C і освітленні з періодом 16 год світла / 8 год темряви, інтенсивності світла ~110 мкМ м⁻²с⁻¹.

Для визначення дії різних концентрацій РАД насіння інкубували з розчинами в концен-

траціях 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ М. На 11 добу росту реєстрували схожість насіння, стадії росту проростків і морфологічні зміни стеблової частини. В кожному варіанті проаналізовано 110-115 проростків. Стадії росту проростків *A. thaliana* (Boyes et al., 2001):

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

В експерименті з радіацією сухе насіння опромінювали гамма-променями від радіоактивного джерела ⁶⁰Co у дозах 100, 500 і 1000 Гр при потужності 0,15 Гр/с. Опромінення проводили в Інституті фізики НАН України. Після опромінення насіння обробляли і пророщували як описано вище. При цьому у кожену чашку висаджували насіння, опромінене однією дозою радіації – по 50 насінин оброблених і необроблених антибіотиком. РАД використовували в концентрації 10⁻⁵ М. Неопромінене насіння служило контролем. На 12 добу росту реєстрували схожість насіння, стадії росту проростків і морфологічні зміни стеблової частини, на 24 добу – частку квітучих рослин і сиру біомасу, зважуючи по 20 рослин. Експеримент проводили в трьох біологічних повтореннях.

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft-Russia, 1999). Розподіл проростків за стадіями росту представлений у вигляді центральної тенденції (Me), нижньої та верхньої квартилей [25 і 75%] і мінімуму-максимуму. Дані з біомаси представлені у вигляді середнього (M) та середнього квадратичного відхилення (s). Достовірність різниці оцінювали за критерієм Ст'юдента ($p \leq 0,05$). Частки проростків з морфологічними відхиленнями наведені у відносних і абсолютних величинах. В цьому випадку статистичну значущість різниці між варіантами з обробкою РАД і без обробки визначали за до-

Таблиця 1. Вплив РАД на проростання насіння і фенотипічну варіабельність проростків *A. thaliana* (Col)

Показник	Концентрація РАД, М					
	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Схожість насіння	92,1% (105/114)	90,4% (103/114)	95,6% (109/114)	95,6% (109/114)	95,7% (110/115)	97,4% (111/114)
Частка проростків з морфологічними відхиленнями	4,8% (5/105)	7,8% (8/103)	13,8% * (15/109)	16,5% * (18/109)	19,1% * (21/110)	20,7% * (23/111)

Примітка: Частки представлені у відсотках (%) і абсолютних (у дужках) величинах. При цьому, схожість насіння розраховували як співвідношення кількості насінин, що дали проростки, до повної кількості насінин. Частки проростків з морфологічними відхиленнями розраховували на загальну кількість проростків у варіанті.

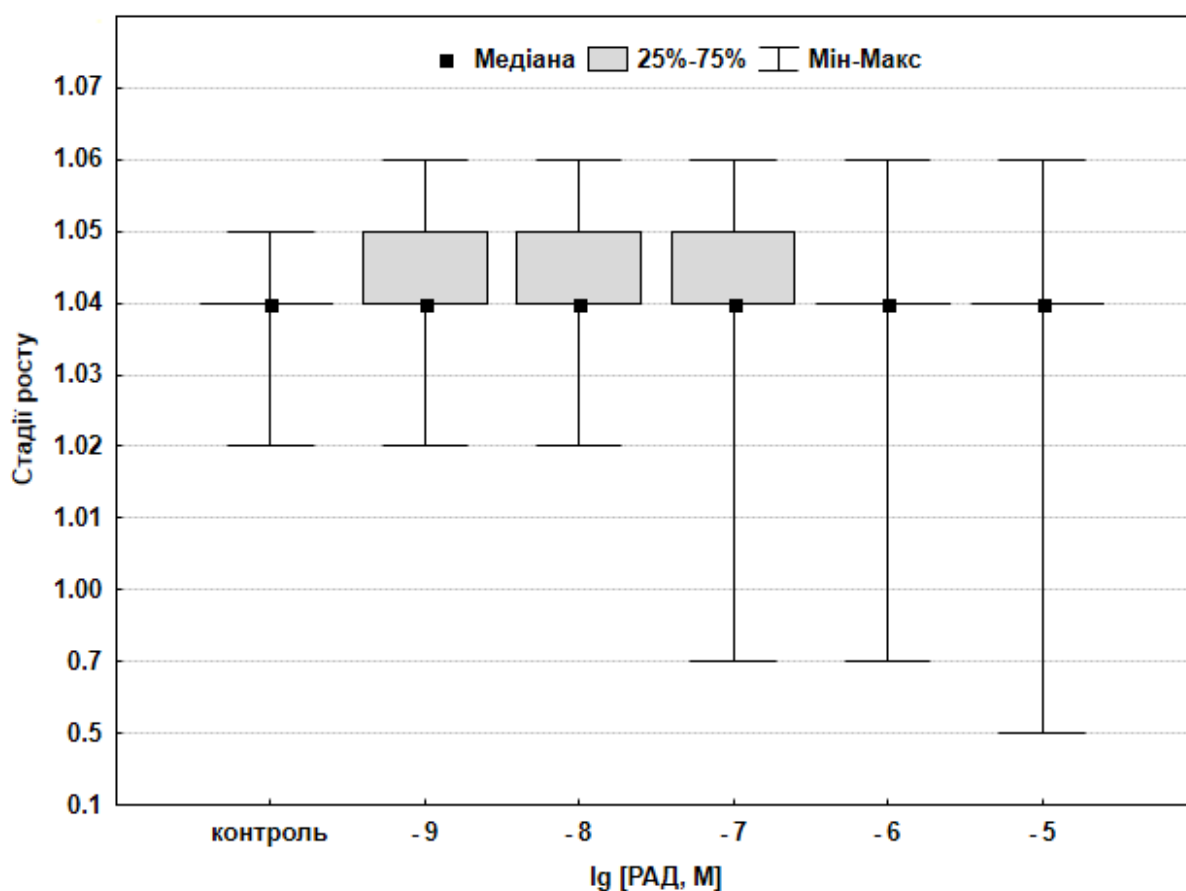


Рис. 1. Діаграма стадій росту 11-добових проростків *A. thaliana* (Col) після обробки насіння РАД у різних концентраціях.

помогою довірчого інтервалу при $p \leq 0,05$ (Реброва, 2002).

РЕЗУЛЬТАТИ

Обробка насіння Col антибіотиком у широкому діапазоні концентрацій (10^{-9} - 10^{-5} М) не впливала на проростання насіння (табл. 1). Ефективність дії різних концентрацій РАД на ріст і морфогенез проростків оцінювали за двома критеріями: відсутність суттєвого гальмування росту і максимальна фенотипічна варіабельність. Аналіз впливу антибіотика на темпи

росту проводили шляхом визначення стадії росту у 11-добових проростків за методикою, розробленою для *A. thaliana* (Boyes et al., 2001). Показано, що в контролі проростки характеризувалися досить синхронним ростом: всі 11-добові проростки перебували на стадіях росту від 1.02 до 1.05, при цьому половина проростків – на стадії 1.04, тобто мала чотири листки розетки більше 1 мм (рис. 1). Обробка РАД в усіх концентраціях призводила до посилення варіабельності темпів росту. Разом з тим, при концентраціях 10^{-9} - 10^{-7} М відзначалося прискоро-

ВПЛИВ РАДІЦКОЛУ

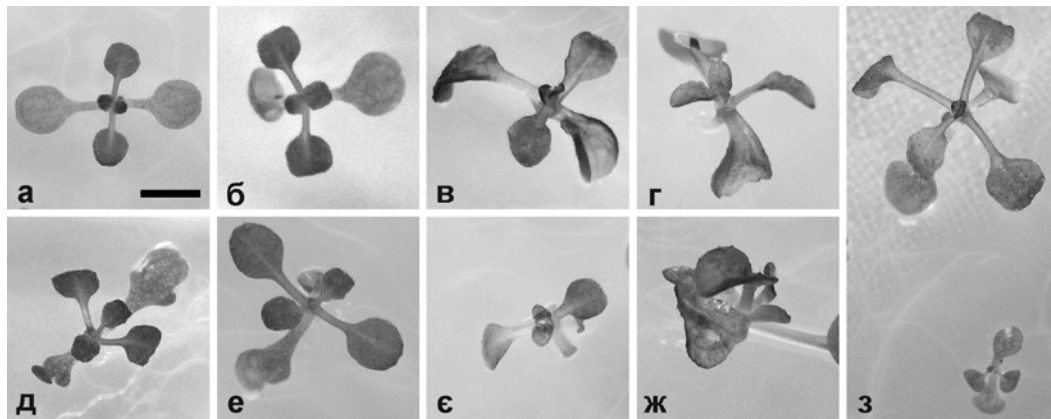


Рис. 2. Фенотипи проростків *A. thaliana* після обробки РАД насіння екотипу Col: а – нормальний фенотип; б-з – фенотипи з морфологічними змінами: б – одна епінастична сім'ядоля; в – короткий черешок сім'ядолі; г – деформовані сім'ядолі; д – сім'ядольні пластинки з дефектами краю; е – одна сім'ядоля з дефектом краю пластинки, інша менша за розміром, епінастична; є – нерозвинені сім'ядолі; ж – деформований проросток; з – гігантський та карликовий проростки. Масштабна лінійка – 5 мм.

рення росту більшої частини проростків, тоді як збільшення концентрації призводило до появи проростків зі сповільненим ростом. Максимальний діапазон темпів росту спостерігався за концентрації 10^{-5} М.

Оскільки проростки, що аналізувалися, в нормі мали сформовані сім'ядолі та першу пару листків розетки, то особливості морфології цих органів використовували для характеристики фенотипу. Показано, що в контрольному варіанті проростки Col характеризувалися слабкою фенотипічною варіабельністю в межах норми і відсутністю значних порушень розвитку (табл. 1; рис. 2, а). Поодинокі проростки мали відхилення у розмірах, формі або просторовому розташуванні сім'ядоль (рис. 2, б, в). У результаті обробки насіння РАД кількість та вираженість морфологічних змін зростала з підвищенням концентрації. З'являлися проростки з більш значними порушеннями, такими як зведені сім'ядолі (кут між черешками менше за 120°), листкова пластинка, розташована абаксіальною поверхнею догори, порушення маргінального росту пластинки, деформовані, гігантські або нерозвинені органи; а також зміни форми і розміру всього проростка (рис. 2, б–з). Застосування РАД в концентрації 10^{-5} М давало максимальну кількість проростків з морфологічними змінами. За даними Queitsch et al. (2002), подальше збільшення концентрації РАД призводить до зниження життєздатності проростків та значних порушень розвитку. Крім того, слід відзначити, що антибіотиком оброблялося насіння перед висаджуванням на середовище, для чого використовували малий об'єм розчину. Вплив

на фенотипічну варіабельність проростків при такому способі обробки виявився близьким до результатів інших авторів, які вносили антибіотик у середовище для вирощування (Queitsch et al., 2002). Тому обробка насіння є ефективною і істотно зменшує витрати дорогого антибіотика. Таким чином, на основі результатів вивчення концентраційної залежності впливу РАД на темпи росту і фенотип проростків для подальших експериментів використовували концентрацію 10^{-5} М.

Опромінення насіння *A. thaliana* гамма-радіацією в діапазоні 100-1000 Гр не викликало зниження виживаності (табл. 2), проте значно посилювало варіабельність темпів росту за даними аналізу 12-добових проростків (рис. 3). Так, опромінення в дозах 100 Гр і 500 Гр призводило як до стимуляції росту більшої частини проростків, так і до появи проростків із сповільненим ростом. При дозі 1000 Гр відзначалося істотне пригнічення ростової активності. Обробка опроміненого насіння антибіотиком розширювала діапазон темпів росту з певною тенденцією до їх посилення. Стимулюючий ефект РАД підтверджувався також результатами визначення біомаси і частки квітучих рослин на 24 добу росту (табл. 2).

Опромінення насіння також індукувало виникнення морфологічних аномалій. Кількість морфозів зростала зі збільшенням дози гамма-радіації (табл. 2). Так, в результаті опромінення в дозі 1000 Гр на фоні загального пригнічення росту більш ніж у третини 12-добових проростків виникали морфологічні зміни. При цьому спостерігались як локальні порушення росту

Таблиця 2. Вплив гамма-опромінення та РАД (10^{-5} М) на ріст та розвиток *A. thaliana* (Col)

Обробка РАД	Доза опромінення, Гр			
	0	100	500	1000
Схожість насіння				
Без РАД	93,3% (140/150)	89,3% (134/150)	94,7% (142/150)	93,3% (140/150)
РАД	89,3% (134/150)	90,0% (135/150)	93,3% (140/150)	92,6% (139/150)
Частка 12-добових проростків з морфологічними відхиленнями				
Без РАД	4,3% (6/140)	19,4% (26/134)	40,1% (57/142)	38,7% (55/142)
РАД	11,9% (16/134) *	31,1% (42/135) *	47,9% (67/140) *	60,4% (84/139) *
Маса 20-ти 24-добових рослин, мг ($M \pm s$), * $p \leq 0,05$				
Без РАД	$325 \pm 18,6$	$424 \pm 13,5$	$307 \pm 10,5$	$267 \pm 15,5$
РАД	$350 \pm 19,5$	$479 \pm 23,0$ *	$343 \pm 16,1$ *	$302 \pm 17,4$
Кількість 24-добових рослин, що цвітуть				
Без РАД	2,2% (3/139)	9,2% (12/130)	7,9% (11/139)	2,9% (4/137)
РАД	6,8% (9/132) *	33,1% (44/133) *	18,4% (25/136) *	11,2% (15/134) *

Примітка: Частки представлені у відсотках (%) і абсолютних (у дужках) величинах. При цьому, схожість насіння розраховували як співвідношення кількості насінин, що дали проростки, до повної кількості насінин. Частки проростків з морфологічними відхиленнями розраховували на загальну кількість проростків у варіанті. Частки рослин, що цвітуть, розраховували на загальну кількість рослин у варіанті.

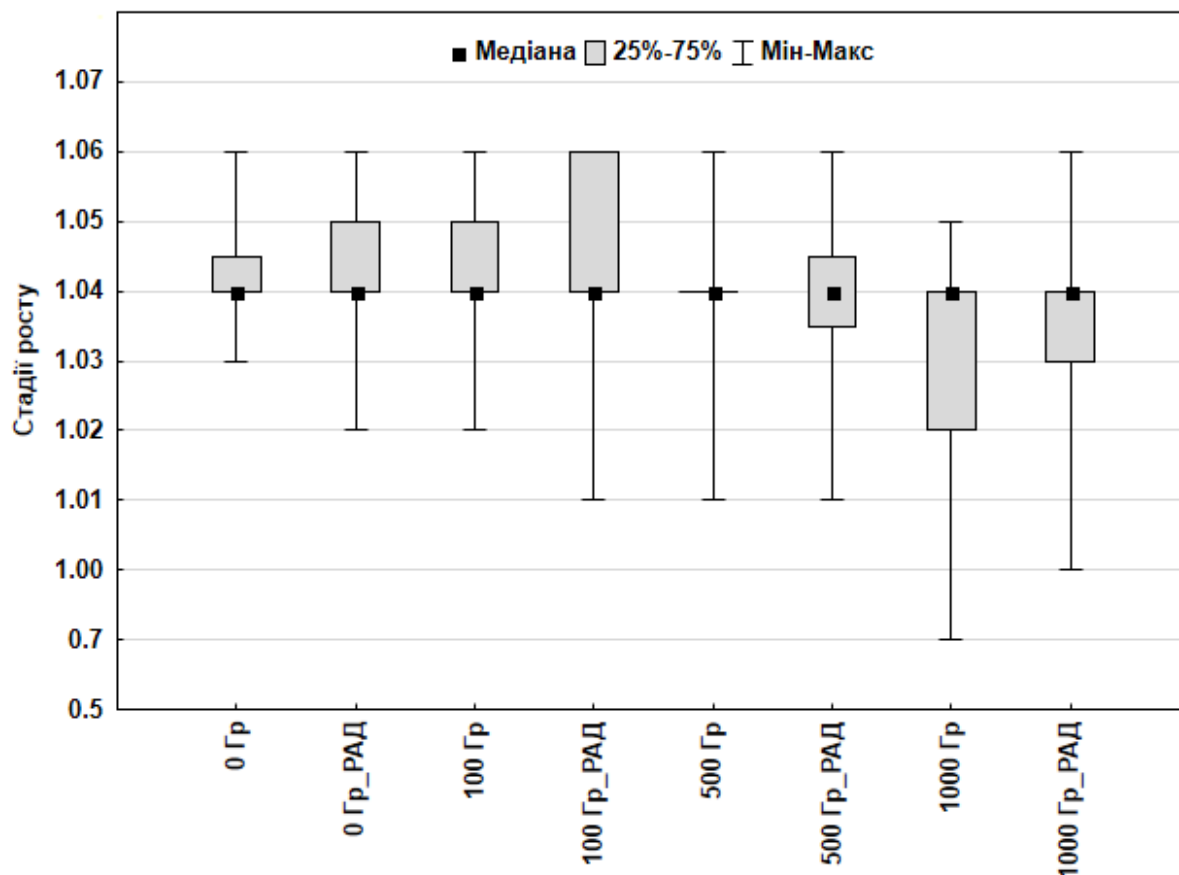


Рис. 3. Діаграма стадій росту 12-добових проростків *A. thaliana* (Col) після опромінення насіння гамма-радіацією та обробки РАД (10^{-5} М).

окремих частин проростка аж до відсутності окремих органів, так і зміна кольору (антоціанові проростки), форми, розмірів всього організму. Відзначалося також кілька випадків появи проростків з трьома сім'ядолями або трьома листками першого порядку. Обробка опроміненого насіння РАД призводила до збільшення числа морфозів в 1,2-1,6 раза. Так, при максимальній дозі радіації частка проростків з морфологічними змінами, які детектувались на 12 добу, досягала 60%.

ОБГОВОРЕННЯ

Результати, отримані в даній роботі з використанням інгібітору шаперонної активності HSP90 – РАД, дозволяють нам обговорювати два аспекти функціонування білків HSP90. По-перше, обробка інгібітором насіння екотипу Col призводила до посилення гетерогенності проростків за темпами росту і фенотипічною варіабельністю, при цьому ефект збільшувався зі зростанням концентрації. Враховуючи участь субстратів HSP90 у різноманітних процесах регуляції росту (див. Picard, 2002; Zhao et al., 2005; Козеко, 2010), можна вважати, що така дестабілізація росту в мономорфній лабораторній лінії підтверджує гіпотезу про участь шаперона у підтриманні («каналізації») стабільного росту і формотворення за дії внутрішніх стохастичних процесів організму (Queitsch et al., 2002; Samakovli et al., 2007). Ці результати узгоджуються із закономірностями, що отримані нами для іншого інгібітору HSP90 – ГДА, структурно відмінного від РАД (Козеко, 2013).

З іншого боку, виникають певні міркування з приводу того, що частка змінених фенотипів в результаті обробки інгібітором складала меншу частину проростків (в цьому дослідженні – до 20%). На нашу думку, це можна пояснити такими фактами. Відомо, що кількість HSP90 у клітині за нормальних умов складає ~ 1% від усього цитозольного білка (Lai et al., 1984). Крім того, число його потенційних білків-клієнтів може дорівнювати ~ 10% від протеому (Zhao et al., 2005). Очевидно, що використання інгібіторів дає можливість тільки знизити сумарну активність цих шаперонів у клітині. Визначення, які саме білки-клієнти та залежні від них процеси при цьому будуть заблоковані, носить імовірнісний характер. Слід також відзначити, що РАД втрачає активність під впливом світла при пролонгованій (кілька діб) інкубації (Queitsch et al., 2002). Тому отримані зміни, ймовірно, є наслідком інгібування роботи шаперона протягом проростання і перших діб росту проростків.

Можна також думати, що значення цієї функції HSP90 як стабілізатора росту і розвитку посилюється після дії радіації. Таке припущення базується на тому, що гамма-опромінення призводить до змін динаміки конформаційних переходів мультидоменних білків (Горобченко и др., 2006), до яких належать й клієнти HSP90 (Zhao et al., 2005).

Другий аспект функціонування HSP90 стосується його гіпотетичної ролі у прихованні мутацій у залежних від них білків шляхом підтримання їх функціональної конформації (Rutherford, Lindquist, 1998; Sangster et al., 2008). Відомо, що гамма-опромінення сухого насіння спричиняє пошкодження ДНК (Гродзинський, 1989; De Micco et al., 2011). У попередній роботі нами показано, що ступінь фрагментації ДНК насіння збільшується з ростом дози опромінення (Kozeko et al., 2015). Репарація цих пошкоджень протягом проростання супроводжується накопиченням генетичних змін, кількість яких збільшується з дозою опромінення (Гродзинський, 1989; De Micco et al., 2011). Виходячи з цього і використовуючи гамма-радіацію в широкому діапазоні доз, ми прогнозували дозозалежне збільшення кількості генетичних змін, зокрема в білках-клієнтах HSP90. Оскільки всі вони, як правило, є метастабільними поліпептидами та набуття ними функціональної конформації певним чином залежить від шаперону (Zhao et al., 2005), то суттєве посилення варіабельності фенотипічних ознак і збільшення кількості морфологічних порушень в результаті обробки насіння РАД, показане в цій роботі, може служити підтвердженням участі HSP90 в контролі фенотипічного прояву генетичних змін. Слід підкреслити, що закономірності ефектів РАД виявились подібними до отриманих нами раніше з використанням ГДА (Козеко, 2013; Kozeko et al., 2015, in press). При цьому широке коло морфологічних змін, що виникли внаслідок інгібування HSP90, може бути зумовленим як різноманітністю клітинних процесів, в регуляції яких беруть участь його клієнти, так і випадковим характером мішеней радіації.

Стимуляція росту та прискорення розвитку після опромінення в результаті обробки РАД, показані у даній роботі, можуть бути пов'язані з іншими протекторними функціями HSP90. За даними літератури, HSP може брати участь у репарації ДНК (Park et al., 2000; Calini et al., 2003). Крім того, вважається, що HSP90 здійснює негативну регуляцію синтезу HSP, впливаючи таким чином на рівень резистентно-

сті клітин (Morimoto, 1998). Так, інгібування HSP90 призводило до індукції синтезу HSP і теплостійкості *A. thaliana* (Yamada et al., 2007; Козеко, 2014). У даній роботі така індукція синтезу HSP під впливом РАД могла сприяти відновленню білкового гомеостазу клітин після опромінення і посиленню ростової активності.

Отримані результати також свідчать про можливість використання інгібіторів HSP90 для стимуляції росту після опромінення насіння. Крім того, прояв прихованих генетичних змін, генерованих радіацією, дає можливість для відбраковки дефектних організмів та відбору нормальних фенотипів.

Автор висловлює щире вдячність співробітникам Інституту фізики НАН України д.ф.-м.н. В.Б. Неймашу і к.ф.-м.н. В.Ю. Поварчуку за опромінення насіння.

ЛІТЕРАТУРА

- Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В. Влияние γ -облучения на термоиндуцированные конформационные переходы и гидратацию фибриногена // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, №2. – С. 162-165.
- Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. – Киев, 1989. – 384 с.
- 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., 2007. – 152 с.
- Козеко Л.Е. Белок теплового шока 90 кДа: разнообразие, структура и функции // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 11. – С. 3-20.
- Козеко Л.Е. Фенотипическая вариабельность проростков *Arabidopsis thaliana* как результат ингибирования шаперонов Hsp90 // Цитология и генетика. – 2013. – Т. 47, № 2. – С. 18-33.
- Козеко Л.Е. Изменения в синтезе белков теплового шока и термоустойчивости проростков *Arabidopsis thaliana* при ингибировании Hsp90 гелданамицином // Цитология. – 2014. – Т. 56, №6. – С. 419-426.
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – Москва, 2002. – 312 с.
- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants // Plant Cell. – 2001. – V. 13, № 7. – P. 1499-1510.
- Calini V., Urani C., Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H10T1/2 cells and protects from DNA damage // Toxicol. in Vitro. – 2003. – V. 17. – P. 561-566.
- De Micco V., Arena C., Pignalosa D., Durante M. Effects of sparsely and densely ionizing radiation of plants // Radiat. Environ. Biophys. – 2011. – V. 50. – P. 1-19.
- Koornneef M., Dellaert L.W.M., Van Der Veen J.H. EMS-induced and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Mutat. Res. – 1982. – V. 93. – P. 109-123.
- 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 (in press).
- Kuittinen H., Mattila A., Savolainen O. Genetic variation at marker loci and in quantitative traits in natural populations of *Arabidopsis thaliana* // Heredity. – 1997. – V. 79. – P. 144-152.
- Lai B.-T., Chin N.W., Stanek A.E., Keh W., Lanks K.W. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies // Mol. Cell Biol. – 1984. – V. 4. – P. 2802-2810.
- Morimoto R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // Genes Dev. – 1998. – V. 12. – P. 3788-3796.
- Park S.H., Lee S.J., Chung H.Y., Kim T.H., Cho C.K., Yoo S.Y., Lee Y.S. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response // Radiat. Res. – 2000. – V. 153. – P. 318-326.
- Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – V. 59. – P. 1640-1648.
- Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone // Cell. – 1997. – V. 90. – P. 65-75.
- Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation // Nature. – 2002. – V. 417. – P. 618-624.
- Roe S.M., Prodromou C., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin // J. Med. Chem. – 1999. – V. 42. – P. 260-266.
- Rutherford S.L., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution // Nature. – 1998. – V. 396. – P. 336-342.
- Samakovli D., Thanou A., Valmas C., Hatzopoulos P. Hsp90 canalizes developmental perturbation // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58, № 13. – P. 3515-3524.
- Sangster T.A., Salathia N., Undurraga S., Milo R., Schellenberg K., Lindquist S. HSP90 affects the expression of genetic variation and development stabil-

ВПЛИВ РАДІЦКОЛУ

- ity in quantitative traits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105, № 8. – P. 2963-2968.
- Yamada K., Fukao Y., Hayashi M., Fukazawa M., Suzuki I., Nishimura M. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. – 2007. – V. 282. – P. 37794-37804.
- 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. – V. 120. – P. 715-727.

Надійшла до редакції
03.02.2015 р.

INFLUENCE OF RADICICOL, AN INHIBITOR OF HSP90 CHAPERONS, ON GROWTH OF *ARABIDOPSIS THALIANA* AFTER GAMMA-IRRADIATION OF SEEDS

L. Ye. Kozeko

*M.G. Kholodny Institute of Botany
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
e-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

The influence of radicicol (RAD) – an inhibitor of HSP90 chaperons – on growth and morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* was investigated. Treatment of ecotype Col-0 seeds with the antibiotic (10^{-9} - 10^{-5} M) resulted in a dose-dependent increase in variation of seedling growth rate and phenotype. Gamma-irradiation of seeds at doses of 100, 500 and 1000 Gy was used to obtain viable, but polymorphic material. RAD (10^{-5} M) treatment of the irradiated seeds caused enhancing heterogeneity in seedling growth rate and a higher number of morphogenetic abnormalities. On the basis of the data obtained, a role of HSP90 in the stabilization ("canalization") of plant growth and morphogenesis under internal stochastic processes as well as geno- and cytotoxic effects of radiation is discussed.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, inhibitor of HSP90, radicicol, phenotype, gamma-irradiation

ВЛИЯНИЕ РАДИЦИКОЛА, ИНГИБИТОРА ШАПЕРОНОВ HSP90, НА РОСТ ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЯН

Л. Е. Козеко

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
e-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

Исследовали влияние ингибитора шаперонов HSP90 радицикола (РАД) на рост и морфогенез *Arabidopsis thaliana*. Обработка антибиотиком в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-5} М семян экотипа Col-0 приводила к дозозависимому усилению варибельности темпов роста и фенотипов проростков. Гамма-облучение семян в дозах 100, 500 и 1000 Гр использовалось для получения жизнеспособного и в то же время полиморфного материала. Обработка облученных семян РАД (10^{-5} М) вызывала усиление гетерогенности проростков по темпам роста и увеличение количества морфозов и в то же время определенную стимуляцию роста и развития. На основе полученных данных обсуждается роль HSP90 в стабилизации («канализации») роста и формообразования растений при действии внутренних стохастических процессов, а также при гено- и цитотоксическом действии радиации.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, ингибитор HSP90, радицикол, фенотип, гамма-облучение