

■ ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.15

РОЛЬ ШАПЕРОНОВ HSP90 В УСТОЙЧИВОСТИ И ПЛАСТИЧНОСТИ ОНТОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ ПРИ НОРМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ И СТРЕССЕ (*ARABIDOPSIS THALIANA*)

Л.Е. КОЗЕКО

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com

*Рассмотрены особенности функционирования шаперонов HSP90 в системе белкового фолдинга и регуляции специфических субстратов, участвующих в трансдукции сигналов и регуляции различных клеточных процессов. Описана тройная роль HSP90 при стрессе: связывание поврежденных белков и направление их на рефолдинг или деградацию; регуляция стрессовой индукции генов теплового шока; и изменение программы генной экспрессии. На основе результатов исследований модельного вида *Arabidopsis thaliana* показана роль HSP90 в поддержании стабильности роста и морфогенеза растений, пластичности развития и механизмах стойкости. Представлена модель взаимодействия функций HSP90 при нормальных условиях и стрессе.*

Ключевые слова: шапероны HSP90, белковый гомеостаз, фенотипические вариации, стабильность развития, реакция теплового шока, *Arabidopsis*.

Введение. Белки теплового шока 90кДа (heat-shock protein 90, HSP90) являются частью системы молекулярных шаперонов, отвечающей за приобретение и поддержание белками клетки функциональной структуры. При этом HSP90, в отличие от других шаперонов, характеризуются субстратной специфичностью [1]. У многоклеточных содержание HSP90 при нормальных условиях составляет до 1–2 % растворимых белков клетки и в некоторой степени увеличивается при стрессе [2].

HSP90 функционирует в виде димера в коопérationи с шапероном HSP70, ко-шаперонами и ко-факторами. АТФазный цикл обеспечивает функциональную активность димера, тогда как HSP70, ко-шапероны и ко-факторы определяют конфигурацию молекулярной машины HSP90, а также

клеточные процессы и субстраты, на которые направлена его активность [1, 3–6]. Связывание АТФ индуцирует контакт между АТФ-связывающими сайтами двух субъединиц димера HSP90, вторичную димеризацию и изменение конформации самого шаперона и конформации связанного белка. Сайт связывания АТФ в N-терминальном домене молекулы имеет необычное строение и связывает АТФ аденоzinом вниз ко дну, а γ-фосфатом – к поверхности глубокого «кармана» [3]. Это дало возможность подобрать ряд высокоспецифичных ингибиторов функционирования HSP90, таких как гелданамицин (ГДА), радицикол (РАД), моноциллин I, новобиоцин и др. (geldanamycin, radicicol, monocillin I, novobiocin). Обработка ингибиторами дает возможность снижения функциональной активности всех HSP90 клетки, что широко используется исследователями как инструмент изучения базовых клеточных функций шаперонов и зависящих от них процессов. Кроме того, для изучения функций членов семейства широко используются мутанты с нарушенной экспрессией генов и РНК-интерференция.

Значительный прогресс в изучении особенностей функционирования HSP90 в последние два десятилетия (сначала с использованием дрожжей и животных систем, позже – растений) привел к формированию двух фундаментальных направлений. Более традиционное направление, связанное с участием системы HSP/шаперонов в стрессовой реакции, дополнилось представлением о HSP90-зависимом механизме ее авторегуляции [7, 8]. Другая часть исследований привела к пониманию значения данного семейства в регуляции стабильности и пластичности роста и развития [9–13]. Предложены модели канализации развития, представляющие HSP90 как «хаб» (центральный узел, от англ. hub) регуляторных

© Л.Е. КОЗЕКО, 2019

путей, буфер против стохастических процессов и генетических изменений [6, 11, 14, 15].

Выявленные закономерности имеют универсальный характер и, вместе с тем, специфические особенности у разных групп организмов. У растений большая часть исследований проводится с использованием модельного вида *Arabidopsis thaliana*. Семейство HSP90 у этого вида включает 7 членов: 4 из них локализованы в цитозоле и ядре, и по одному — в пластидах, митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) [16]. Цитозольные AtHSP90-2, AtHSP90-3 и AtHSP90-4 высоко гомологичны, их синтез поддерживается в клетках на высоком уровне при нормальных условиях и может усиливаться при стрессе, тогда как AtHSP90-1 является индуцируемым [17, 18].

В данном обзоре автор обсуждает данные литературы и оригинальных исследований и предлагает модель, объединяющую различные роли HSP90 в процессах роста и развития растений при нормальных условиях и стрессе.

Участие в общем фолдинге белка. При нормальных условиях система шаперонов отвечает за фолдинг новосинтезированных белков, поддержание развернутых полипептидных цепей при транспортировке между клеточными компартментами, сборку олигомеров, моделирование белковых комплексов, направление на протеолиз и другие функции, обеспечивающие поддержание качества белка клетки. Роль шаперонов HSP90 в созревании белков состоит в избирательном связывании определенных субстратов на последних стадиях фолдинга в близком к нативному или нативном состоянии [19]. Вместе с тем, у эукариот фолдинг новосинтезированных белков не является главной функцией данного семейства. Способность HSP90 образовывать ассоциаты с определенными белками привела к пониманию их субстратной специфиности.

Субстратная специфичность. К субстратам HSP90 относят белки, созревание, стабилизация и конформационная регуляция которых требуют участия шаперона. Масштабный анализ протеома и генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показал, что 10–20 % белков могут прямо или опосредовано зависеть в своем функционировании от HSP90 [4, 6]. У более изученных дрожжевых и животных путей значительную часть субстратов HSP90 составляют белки различных систем трансдукции сигналов, регуляции клеточного цикла, генной экспрессии и др., в том числе определенные рецепторы, транскрипционные факторы, протеинкиназы, протеинфосфатазы, гистоны, G-белки, NO-синтаза, цитохром P450, эпигенетические факторы [1, 4–6]. Особое место в этом ряду занимают транскрипционные факторы

теплового шока, что обсуждается в отдельном разделе обзора.

От HSP90 также зависит стабилизация компонентов, сборка и функционирование ряда сложных белковых комплексов, в том числе: 26S-протеасомы [20], актин-организующего белка N-WASP [21], теломеразы [22], кинетохора, мякРНК (snoRNA), комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [23], субединицы рибосом 40S [24], а также комплекса NELF (negative elongation factor complex), отвечающего за поддержание транскрипционной паузы РНК-полимеразы II [25].

Субстраты HSP90 — высокомолекулярные мультидоменные белки, характерной особенностью которых является наличие структурно неупорядоченных, конформационно динамичных участков. Структурная лабильность таких белков необходима для выполнения ими широкого спектра функций, взаимодействия с различными партнерами, передачи сигналов, контроля и регуляции внутриклеточных процессов [26]. Как правило, такие белки являются короткоживущими [2]. Ассоциация с HSP90 приводит к их стабилизации, защите от деградации и приобретению компетентности к восприятию сигнала путем связывания лиганда (стериоидные гормоны, АТФ, циклины, геммы, Ca^{2+} -кальмодулин и др.) и/или взаимодействия с другими белками-партнерами [1, 6].

Способствуя созреванию и осуществляя конформационную регуляцию белков-клиентов, HSP90 оказывается вовлеченым в регуляцию множества процессов, таких как трансдукция сигналов, remodeling хроматина, транскрипция, трансляция, внутриклеточный транспорт, деление клеток, метаморфоз, стрессовая реакция, reparация поврежденных молекул, протеолиз, старение, иммунный ответ и т.д. [1, 5, 6, 15]. В результате, шаперон становится «регулировщиком на перекрестке» путей различных процессов роста и развития организма.

Список белков-клиентов HSP90 у растений на данный момент значительно короче, очевидно, вследствие меньших усилий растительных биологов в этом направлении. Тем не менее, он уже содержит целый ряд метастабильных белков, играющих важную роль в жизнедеятельности растительной клетки и организма. Их перечень, составленный на основе данных литературы и электронной базы BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) приведен в таблице (<http://cytgen.com/articles/5320056.pdf>). Анализ таблицы показывает, что белки-клиенты HSP90 у растений участвуют в регуляции стрессовой реакции, переходе меристематических клеток к дифференцировке, процессинге мРНК, эпигенетических механизмах, внутриклеточном транспорте, модуляции активности белков и ферментов, протео-

сом-зависимой деградации белков клеточного цикла и циркадных ритмов, биогенезе мембран, метаболизме полисахаридов и жирных кислот, гормональном сигналинге, восприятии и передаче сигнала патогенов. Такое разнообразие процессов свидетельствует о важности HSP90 в определении пути развития и резистентности растительного организма. Рассмотрим несколько примеров.

Шаперон AtHSP90-7 (GRP94, SHD), локализованный в ЭР, необходим для функционирования рецепторного комплекса с киназной активностью CLV1/CLV2/CLV3, где CLV1/CLV2 – трансмембранные белки с внеклеточными доменами, CLV3 – секретируемый лиганд [56]. Участвуя в межклеточных коммуникациях, комплекс играет важную роль в определении идентичности меристематических клеток, в частности, стеблевого апекса и определении времени цветения [67, 68]. Мутации по соответствующим генам приводят к морфологическим дефектам стебля и корня, разрастанию флоральной меристемы и множественным нарушениям строения цветков, в частности, увеличению количества цветочных органов. Подобные нарушения наблюдали также при мутации по гену шаперона *shd* [56]. Кроме того, на гомеостаз стеблевой меристемы могут влиять цитозольные HSP90 (с ко-шапероном SQN) через взаимодействие с ARGONAUTE1 (AGO1) [46, 69]. Контролируя активность AGO1, HSP90-SQN оказывается вовлеченным в эпигенетическую регуляцию морфогенеза [48]. Еще одним примером HSP90-зависимого эпигенетического механизма является комплекс RISC [46, 47].

Получены доказательства участия HSP90 в трансдукции гормональных сигналов брацциностероидов (БР), ауксина и жасмоновой кислоты. Так, от шаперона зависит внутриклеточная локализация и активность киназы BIN2 и транскрипционного фактора BES1 – ключевых компонентов регуляторного пути БР [36–39]. Нарушение БР-регуляции приводит к существенным фенотипическим изменениям – карликовости растений, изменению формы, размеров и цвета листьев, изменению реакции на красный свет и темноту [37, 70]. Показательно, что фенотипические изменения, подобные изменениям у мутантов *bin2* и *bес1*, встречались у растений, дефицитных по отдельным цитозольным HSP90 [11, 12, 36] и при ингибиции шаперона с помощью антибиотиков [10, 71, 72].

Недавно полученные результаты исследований ауксин-зависимых процессов указывают на то, что HSP90 совместно с ко-шапероном SGT1 стабилизирует ко-рецептор ауксина TIR1 [41–43]. Рецепторный комплекс TIR1/AFB2 после связывания гормона запускает разрушение препрессоров транс-

крипции ауксин-зависимых генов Aux/IAA. Ингибирование шаперона предотвращает ядерную локализацию TIR1, приводит к его деградации и нарушению ростового ответа. Подобный механизм с участием шаперонного комплекса SGT1b–HSP70–HSP90 предполагается и для рецептора жасмоновой кислоты COI1 [44].

От HSP90 зависит также сборка и активность некоторых компонентов убиквитин-протеасомного пути протеолиза [20, 35, 40]. Известно, что убиквитинирование вовлечено во многие процессы метаболизма, трансляции, внутриклеточного транспорта, передачи сигналов, стрессового и иммунного ответов. Например, мутации по генам убиквитин-протеасомного механизма у *A. thaliana* блокируют развитие, циркадные ритмы, фотоморфогенез, флоральный гомеозис, гормональный ответ и старение [73].

К субстратам HSP90 также относится ряд R (resistance)-белков, обеспечивающих устойчивость растений к патогенам, в том числе NLR-белки, называемые так из-за содержащихся в них консервативных доменов (nucleotide binding domain, leucine-rich repeat, NBD-LRR) [60, 63, 74]. LRR-домены этих белков узнают эффекторы патогенов, что приводит к запуску защитного механизма. HSP90 совместно с ко-шаперонами RAR1 и SGT1 осуществляют регуляцию внутриклеточного содержания, стабильности и функционирования этих белков [61, 63]. Ингибирование шаперона приводит к быстрой деградации R-белков и снижению иммунитета растений.

Таким образом, исходя из многочисленности и разнообразия белков-клиентов, становится очевидным, что снижение функциональной активности HSP90 должно приводить к нарушению множества регуляторных путей и соответствующих процессов роста, развития и резистентности.

Роль в канализации развития. Доказательством того, что развитие организмов канализовано, может служить постоянство фенотипа дикого типа [75]. Нормальное формообразование является результатом морфогенетической программы, соответствующей условиям среды. Тем не менее, исследования многоклеточных организмов показывают, что генетически идентичные особи (клоны одного организма, изогенные линии) даже при строгой стандартизации условий выращивания дают существенные вариации формы и размеров в рамках нормального фенотипа, которые графически можно представить в виде кривой нормального распределения [76]. Это явление особенно выражено у растений в связи с непрерывным ростом на протяжении всего онтогенеза, вариабельностью численности, размеров, темпов образования и взаимного расположения модулей и составляющих их элемен-

тов [77, 78]. Нестабильность развития является фундаментальным свойством всех развивающихся систем, контролируется и используется клеткой [79]. Считается, что определенная внутренняя нестабильность дает организму преимущество при флуктуациях внешней среды, т.е. является адаптивной. Тем не менее, природа этого явления, как и механизмы поддержания определенного уровня стохастичности остаются мало изученными.

Рассматривают два источника нестабильности развития: внешний – случайные локальные флуктуации среды и внутренний – вероятностный характер событий на всех уровнях организации биологической системы [76, 79]. Внутренняя стохастичность обусловлена такими явлениями, как тепловые флуктуации структуры молекул, хаотичность диффузии, случайный характер изменений концентрации молекул и молекулярных взаимодействий во времени и пространстве, флуктуации мембранныго потенциала, ко-адаптированность метаболических путей и т.д. К внутренним стохастическим процессам можно также отнести стохастичность генной экспрессии [80] и отдельных молекулярных событий биохимических процессов [79], динамичный характер белок-белковых взаимодействий [7], а также конформационные флуктуации белковых молекул [81].

В контексте рассматриваемой проблемы важной особенностью белков-клиентов HSP90 является их высокая конформационная лабильность. Способность шаперонов стабилизировать структуру регуляторных белков позволила рассматривать их в качестве буферной системы, ограничивающей влияние минорных вариаций внутренней и внешней среды и тем самым стабилизирующей процессы роста и развития [10–12]. Такая роль HSP90 может быть выявлена через повышение чувствительности к пертурбациям среды и нестабильности развития при снижении активности шаперона – естественной или вынужденной. При этом в качестве меры нестабильности используются различные качественные и количественные признаки, такие как повышение фенотипической вариабельности, появление морфозов, десинхронизация роста и развития особей, снижение точности формирования повторяющихся и симметричных структурных элементов, увеличение коэффициента вариации количественных морфологических признаков и физиологических ответов и др.

Изучение зависящих от HSP90 процессов путем подавления их функциональной активности с помощью специфических ингибиторов у растений, как правило, проводится на проростках из-за быстрой дезактивации антибиотиков на свету. На *A. thaliana* показано, что ингибиторы ГДА и РАД

вызывают усиление фенотипической гетерогенности проростков изолированных линий [10]. Добавление антибиотиков в среду для выращивания приводило к появлению наряду с нормальными фенотипами некоторой доли проростков со значительными морфологическими отклонениями. Выявленные отклонения затрагивали форму, размеры, взаимное расположение и цвет семядолей и первых настоящих листьев; форму, длину, ориентацию и цвет гипокотиля; направление роста корня, количество корневых волосков; форму и размеры всего проростка. При этом структурно независимые ГДА и РАД вызывали схожие изменения. В наших экспериментах усиление вариабельности фенотипов при ингибировании HSP90 регистрировалось как по дозозависимому увеличению доли проростков с выраженным морфологическим отклонениями и их разнообразию, так и по расширению диапазона темпов роста [71, 72].

Для анализа функций белка на протяжении всего онтогенеза используются RNAi-линии и мутанты *A. thaliana* с нарушением генной экспрессии членов семейства. Поскольку гены, кодирующие цитозольные HSP90, высоко гомологичны между собой, РНК-интерференция с использованием двухцепочечной интерферирующей РНК (RNAi) дает возможность уменьшить количество нескольких изоформ в клетке [12, 82]. При этом конструкции RNAi с разной степенью идентичности к разным *HSP90* позволяли снизить уровень их экспрессии в 1,5–2 раза. Попытки получить трансформанты с RNAi, максимально интерферирующей с экспрессией всех 4-х цитозольных изоформ *A. thaliana*, оказались неудачными [12]. По-видимому, жесткое подавление синтеза всех цитозольных HSP90 приводит к потере жизнеспособности растительного организма, что согласуется с представлением о существенности HSP90 для эукариот. Так, гомозиготные мутации по обоим генам *HSP82* у *S. cerevisiae* или единственному *HSP83* у *Drosophila* являются летальными [83, 84].

Трансгенные Т-ДНК-линии (инсерционные мутанты) с нарушением функционирования одного из четырех цитозольных HSP90 в целом сохраняли жизнеспособность. Вместе с тем, отмечалось увеличение доли непроросших семян: около 40 % у мутанта по индуцильному *Athsp90-1* и 15 % у мутантов по генам, экспрессируемым конститутивно [11]. Анализ зародышей непроросших семян выявил значительные нарушения морфологии, которые включали такие aberrации, как дезорганизованный рост и разрывы центральной части корня, появление второго зародышевого корня, нарушение строения семядолей и организации проводящих пучков, два сросшихся зародыша с одной семядолей [11]. Учи-

тывая активную экспрессию этих генов в ходе формирования зародыша и созревания семени [85], можно предполагать их необходимость для нормального эмбриогенеза.

Проросшие семена всех RNAi- и Т-ДНК-линий в основном продуцировали здоровые проростки с фенотипом дикого типа. Вместе с тем, часть проростков имела нарушения от слабых до значительных [11, 12]. Сравнение Т-ДНК- и RNAi-линий выявило типичные для обоих типов линий изменения [12]. Вместе с тем, спектр фенотипов и частота их появления имели определенную специфику у разных линий. Так, у *Athsp90-2* и *Athsp90-3* отмечали частое появление проростков с замедленным развитием и узкими листьями [12], у *Athsp90-4* – дефекты корней [11]. У *Athsp90-1* измененные фенотипы характеризовались широким разнообразием отклонений без преобладания каких-либо из них [12].

Анализ взрослых RNAi- и Т-ДНК-растений показал, что от HSP90 зависят различные процессы формообразования на разных стадиях онтогенеза. Так, снижение наполненности клеточного пула HSP90 у RNAi-линий приводило к некоторой задержке цветения и снижению семенной продуктивности, изменению количества листьев розетки, их размеров, высоты растений, количества стручков и других количественных признаков [12, 82]. Практически половина растений имела нарушения апикального доминирования. У небольшой части особей формировались цветоносы, сросшиеся в нижней части и расходящиеся вверху [12]. В наших экспериментах нарушение апикального доминирования наблюдалось и у Т-ДНК-линий *Athsp90-1* и *Athsp90-4* (неопубликованные данные).

Феномный анализ растений *Athsp90.2-3* с точечной мутацией в АТФ-связывающем домене выявил большее по сравнению с диким типом количество листьев розетки и стеблевых листьев, а также появление цветков с увеличенным количеством чашелистиков [46]. В работе Samakovli et al. [11] у взрослых фенотипов Т-ДНК-линий по цитозольным HSP90 выделено несколько классов отклонений в развитии и морфогенезе. Классы включали такие изменения, как маленький размер растения вплоть до карликовости; изменение количества и формы розеточных листьев; изменение размеров и формы розетки; отсутствие или задержка развития цветоноса, короткий цветонос, большое число коротких цветоносов у одной особи, ползущий цветонос, растущий не из центра розетки. У некоторых особей розеточные листья были сильно деформированы и развивались на разных уровнях, наблюдалась значительная задержка развития и низкая семенная продуктивность. Примечательно, что у

взрослых особей мутантов *hsp90* по разным генам также наблюдались как схожие фенотипические изменения, так и специфические. Анализ нескольких поколений Т-ДНК-линий показал, что выделенные в отдельные классы фенотипические изменения не закреплялись генетически. Из семян, собранных с растений выделенных классов, получали весь спектр фенотипов, характерных в целом для данной линии [11].

Особый интерес вызывает единственный у *A. thaliana* индуцибельный член AtHSP90-1. Линия *Athsp90-1* характеризовалась большой долей нежизнеспособных семян и дефектных зародышей в них, по сравнению с мутантами по конститутивным HSP90, а также ранней гибелю части проростков и некоторой задержкой роста и развития [11]. Этот ген отличается низким уровнем конститутивной экспрессии в период активного роста и вместе с тем интенсивно экспрессируется в зародыше созревающего семени [85]. В целом, это указывает на то, что индуцибельный AtHSP90-1 даже в низких концентрациях является существенным для стабильного роста и нормальног о формообразования растения, но особенно необходим в период эмбриогенеза и созревания семени.

Изучение HSP90 органелл также продемонстрировало их влияние на рост и морфогенез растений через их взаимодействие с локальными субстратами. При этом фенотипические последствия выключения синтеза шаперонов органелл имели свои особенности. В частности, гомозиготные нокаут-мутации пластидного AtHSP90-5 у *A. thaliana* приводили к нарушению эмбриогенеза и потере жизнеспособности семян. Косупрессия соответствующего гена, не влияя на закладку органов, вызывала уменьшение размеров листовой розетки, изменение метаболизма крахмала, нарушение формирования хлоропластов [86].

AtHSP90-7, локализованный в ЭР, влияет на определение размера меристемы и ее организацию, участвует в биогенезе мембран и различных биосинтетических процессах (таблица). Мутация *shepherd* по этому белку приводила к значительным нарушениям корневой, стеблевой и флюральной меристем, а также к потере fertилности пыльцы [56].

Таким образом, снижение активности HSP90, генетически или с помощью ингибиторов, вызывает у практически изогенных линий при оптимальных условиях увеличение фенотипической вариабельности, вплоть до существенных отклонений от стандартного фенотипа, на протяжении всего онтогенеза. Это подтверждает участие данного семейства в определении морфогенетической программы развития и способность противодействовать стохастическим процессам. Широкий спектр морфологи-

ческих вариаций при снижении активности/количества HSP90 может объясняться разнообразием белков-клиентов и соответствующих клеточных процессов, а также вероятностным характером молекулярных событий. Часто фенотипы, появляющиеся при подавлении активности HSP90, можно рассматривать как копии мутантов по белкам-клиентам (таблица). Особое внимание привлекают морфологические нарушения, напоминающие дефекты по гомеозисным генам, такие как изменение числа и архитектуры структурных компонентов (изменение числа семядолей и розеточных листьев одного порядка, флоральных органов, многоуровневые розетки и др.). Примечательно, что появление дефектов, схожих с дефектами при гомеозисных мутациях, также наблюдали при ингибировании HSP90 у животных *Drosophila* и *Danio rerio* [9, 87].

Следует подчеркнуть, что различные линии *A. thaliana*, дефицитные по HSP90, большей частью формировали фенотипы дикого типа и фенотипы со схожими отклонениями. Это может быть результатом частичного перекрывания функций отдельных изоформ, т.е. определенной избыточности цитозольных HSP90 у растений, что, очевидно, обеспечивает «запас прочности» данной буферной системы. С другой стороны, появление специфических фенотипов у отдельных линий позволяет предположить, что выбор субстрата и поддержание соответствующего клеточного процесса может определяться как особенностями функционирования отдельных HSP90, так и уровнем их суммарной активности.

Отдельная серия экспериментов касается изменения уровня внутренней нестабильности. Для этого, в основном использовались умеренные изменения температурных условий, не вызывающие стрессовой индукции HSP. Результаты показали, что при температуре 27 °C у проростков дикого типа *A. thaliana* появлялись фенотипические отклонения, подобные тем, которые наблюдались при ингибировании HSP90 антибиотиками [10] и описаны в данном разделе выше. Кроме того показано, что обработка проростков при 27 °C и 32 °C различной продолжительности индуцировала образование разнообразных морфологических изменений у взрослых растений, подобных изменениям у мутантов *hsp90*, описание которых также приведено выше [11]. Такие результаты привели к выводу, что повышенная температура сама по себе может вызывать формирование HSP90-зависимых фенотипов [10, 11]. Это может быть связано с переключением HSP90 с обслуживания специфических субстратов на связывающие денатурированных белков, в избытке накапливающихся в клетке под влиянием высокой температуры [7, 88]. При этом, гипотетически, ослабленный

сигнал может в большей мере интерферировать с внутренней нестабильностью [15]. Можно предположить, что усиление стохастичности снижает способность HSP90 связывать и стабилизировать субстраты, тем самым внося дисбаланс в соответствующие регуляторные процессы. Кроме того, от температуры зависит конформационная лабильность нативно неструктурированных белков, обусловленная низким содержанием гидрофобных аминокислотных остатков и большим суммарным (некомпенсированным) зарядом. Повышение температуры в физиологическом диапазоне может вызывать у таких белков обратимое образование вторичных структур [89], что, в свою очередь, должно существенно влиять на их взаимодействие с шаперонами и другими партнерами.

Если увеличение фенотипической вариабельности при повышенной температуре связано со снижением количества молекул HSP90, способных обслуживать субстратные белки, то искусственное уменьшение наполненности клеточного пула HSP90 должно вызывать усиление эффекта. Подтверждение этому получено с использованием Т-ДНК- и RNAi-линий. Так, тепловая обработка мутантов, дефицитных по отдельным HSP90, приводила к тому, что морфологические изменения появлялись в большем количестве и были более выражеными по сравнению с диким типом [11]. Примечательно, что, чем раньше растения подвергались действию высокой температуры, и чем более значительной была доза воздействия, тем больше измененных фенотипов появлялось: до ~30 % у дикого типа и до ~85 % у *Athsp90-1*. Обработка проростков при 32 °C вызывала задержку развития, гипертрофированный полиморфизм фенотипов и раннюю гибель. Фенотипические изменения у проростков RNAi-линий также зависели от температуры выращивания – повышенной или пониженной. Частота возникновения одних фенотипов возрастила при 27 °C (например, узкие листья, отсутствие стеблевой меристемы или одного из настоящих листьев), других – при 17 °C (например, накопление фиолетового пигмента) [12]. Таким образом, снижение активности клеточного пула HSP90 усиливает дестабилизирующее действие температурных изменений. Такие результаты демонстрируют взаимодействие HSP90 со средой в определении уровня (не)стабильности развития и жизнеспособности растительного организма. Считают, что повышение фенотипического разнообразия при изменениях среды дает возможность отбора раскрывшихся адаптивных форм без генетической изменчивости [11].

Роль в фенотипической пластичности. Поскольку понятие «фенотип» обозначает совокупность внут-

ренних и внешних признаков и свойств особи, формирующихся в процессе взаимодействия генотипа с внешней средой, любые изменения в ответ на внешние стимулы — метаболические, физиологические, морфологические — являются проявлением фенотипической пластичности [90, 91]. Согласно сложившимся представлениям флуктуации внешних факторов ниже определенного порога гасятся буферными системами клетки, и развитие идет по выбранной траектории [75, 92]. Изменение фактора(-ов), превышающее порог восприятия, вызывает адекватный ответ чувствительных к сигналу компонентов клеток и адаптивные изменения (например, индуцирует изменение метаболических путей, пластические реакции, образование тканей и органов). Таким образом, выбор траектории развития организма в определенный момент времени определяется пребыванием соответствующей сигнальной системы определенных клеток организма в состоянии готовности к восприятию внешнего сигнала выше порогового уровня.

Представление о том, что шапероны HSP90 ассирируют целому ряду белков различных сигнальных путей и могут определять компетентность последних к восприятию и передаче сигнала, привело к предположению, что данное семейство может опосредовать влияние среды на рост и развитие растительного организма. Исходя из этого, снижение количества/активности HSP90 должно приводить к системным изменениям зависимых путей трансдукции клеточных сигналов и экспрессии соответствующих генетических программ, и в результате, к изменению физиологических и морфогенетических реакций. Широкомасштабный анализ транскриптов RNAi- и Т-ДНК-линий *A. thaliana* подтвердил такие представления, показавши, что у растений со сниженным уровнем HSP90 преимущественно изменяется экспрессия генов, обеспечивающих ответы на внешние стимулы [12]. В частности, определено увеличение количества транскриптов, участвующих в реакции растения на водный дефицит, механизмах действия АБК, биосинтеза жасмоновой кислоты, а также ослабление экспрессии генов биосинтеза салициловой кислоты. При этом у RNAi-линий с редуцированным уровнем экспрессии генов цитозольных HSP90 изменения были более значительными по сравнению с мутантами, несущими нарушения по отдельным генам. Анализ локусов количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTLs) у RNAi-линий со сниженным на треть уровне цитозольных HSP90 выявил также локусы, зависимые от шаперона [82]. У мутанта *cr88*, дефицитного по пластидному AtHSP90-5, отмечали снижение уровня экспрессии генов, кодирующих ряд белков фотосинтеза [93].

Изучение физиологических ответов *A. thaliana* на внешние стимулы при снижении активности HSP90 продемонстрировало существенность шаперона для таких пластических адаптивных реакций, как рост гипокотиля и корня в темноте, гравитропическая реакция корня, позеленение семядолей после перенесения этиолированных проростков на свет [10]. Например, обработка ГДА приводила к замедленному росту гипокотиля в темноте и изменяла степень выраженности или даже направление гравитропической реакции корня. Формирование длинного гипокотиля при красном свете у *cr88* с нарушенным синтезом шаперона пластид свидетельствует о его существенности для фотоморфогенеза [94]. Таким образом, контролируя различные регуляторные пути, шаперон участвует в регуляции пластических ответов на внешние стимулы.

Стабилизация развития при генетических изменениях. Считается, что фенотип достаточно устойчив к небольшому (ниже определенного порога) количеству генетических изменений [95]. Вероятность фенотипических изменений увеличивается в случае, если новые варианты генов относятся к регуляторным белкам. Даже минимальные изменения аминокислотной последовательности у таких белков могут существенно влиять на их структуру, активность, на зависимые от них процессы и, в результате, на рост и развитие организма. Вместе с тем, генетические изменения могут находиться в скрытом состоянии и проявляться на уровне фенотипа только при определенных условиях [96].

Согласно гипотезе Rutherford и Lindquist [9], при генетической изменчивости существует возможность того, что шаперон HSP90, взаимодействуя с белком-клиентом с частично измененной аминокислотной последовательностью, будет поддерживать его в нормальной функциональной конформации и тем самым способствовать сокрытию генетических изменений и формированию нормального фенотипа. Такая гипотетическая способность шаперона представляет собой молекулярный механизм сокрытия и накопления генетических изменений. Первые доказательства существования подобного механизма у *Drosophila* показали, что генетические изменения могут оставаться в скрытом состоянии при нормальном функционировании HSP83 и проявляться при снижении его активности в случае либо гетерозиготной мутации по гену шаперона (гомозиготы летальны), либо при ингибировании [9].

Впоследствии способность HSP90 противодействовать проявлению генетического полиморфизма была выявлена у разных организмов, включая растения. Несмотря на то, что *A. thaliana* является самоопылителем, природные популяции этого вида обнаруживают некоторые генетические вариации и

фенотипические различия [97], что позволило выделить ряд экотипов. Сравнение экотипов и созданных на их основе рекомбинантных инбредных (РИ) линий подтвердило генетическую детерминированность спектра зависимых от HSP90 морфологических изменений у растений [10, 82, 98]. Так, экотипы и РИ-линии отличались друг от друга по HSP90-зависимым фенотипам и частоте их появления [10]. Диапазон зависимой от шаперона фенотипической вариабельности у РИ-линий оказался шире, чем у родительских линий. Новые комбинации генотипов давали наряду с родительскими новые HSP90-зависимые фенотипические признаки и более широкий, чем у родителей, диапазон физиологических реакций. Следует также отметить, что зависимые от шаперона изменения пластических реакций — прорастание семян, рост гипокотиля и корня в темноте, позеленение семядолей, гравитропическая реакция корня — у РИ-линий сегрегировали независимо друг от друга. Анализ удлинения гипокотиля в темноте у РИ-линий при обработке ГДА показал, что полиморфизм по полигенному количественному признаку также может зависеть от HSP90 [98]. На основании полученных данных сделан вывод о том, что зависимые от HSP90 аллели не являются редкостными в природных популяциях и могут вносить существенный вклад в их фенотипическое разнообразие. Прямые доказательства возможности скрытия генетических изменений шаперонами HSP90 получены недавно с использованием мутантов *A. thaliana* по белкам-клиентам. Так, из двух компонентов БР-сигналинга аккумуляция несинонимичных мутаций была выше у зависимого от шаперона BES1, чем у независимого BZR1 [38]. Продемонстрирована также способность шаперона маскировать точечную мутацию у рецептора ауксина TIR1 и поддерживать нормальный ауксиновый ответ [42]. Исходя из этого, ингибирование HSP90 предлагается использовать для ускорения идентификации генетических изменений [10].

В наших исследованиях способность HSP90 стабилизировать формообразование при наличии генетических изменений изучалась на проростках *A. thaliana* с использованием полиморфного материала различного происхождения и ингибиторов ГДА и РАД. В серии экспериментов использовались семена, собранные с природных популяций. Гетерогенность такого семенного материала может быть частично обусловлена генетическим полиморфизмом, уровень которого в природных популяциях *A. thaliana* составляет около 0,3 % [99]. Кроме того, в качестве полиморфного материала использовались семена экотипов, облученные различными дозами ультрафиолета В (УФ-В) и гамма-радиации. Как из-

вестно, наиболее чувствительными мишениями радиации являются ДНК и белки, что приводит к генетической нестабильности, возникновению мутаций и нарушению структуры белков [100–102]. Кроме того, радиация вызывает изменение динамики конформационных переходов у мультидоменных белков [103], к которым относятся субстраты HSP90. Используя радиацию в широком диапазоне доз, мы прогнозировали дозозависимое увеличение генетических и структурных изменений, в частности у субстратов шаперона. В подтверждение такому предположению, во всех вариантах обработка семян ингибитором приводила к расширению диапазона темпов роста проростков, увеличению количества морфозов в 1,2–3 раза, возрастанию разнообразия и сложности морфологических нарушений [71, 72, 104, 105]. В частности, отмечалось появление проростков с нарушенной пространственной ориентацией, гигантскими семядолями и первичными листьями, разросшимися черешками, антоциановой окраской, часто морфологические отклонения становились множественными. Такие зависимые от HSP90 изменения в полиморфных образцах были более значительными, чем у изогенных линий экотипов, которые служили контролем. Таким образом, показанное на полиморфном материале существенное усиление вариабельности фенотипических признаков и увеличение количества морфологических нарушений при снижении активности HSP90 может служить подтверждением его способности стабилизировать рост при действии гено- и протеотоксических факторов.

Следует также отметить, что в тех вариантах наших экспериментов, в которых часть семян оказалась нежизнеспособной (семена природных популяций; семена после высокой дозы УФ-В), обработка ГДА приводила к еще большему увеличению числа непроросших семян, что коррелировало со снижением доли проростков с тотальными повреждениями, не совместимыми с нормальным ростом [71, 105]. Такие данные могут указывать на необходимость HSP90 для поддержания витальности клеток в случае серьезных повреждений, угрожающих нормальному развитию организма. Это может происходить как путем скрытия шапероном генетических изменений, так и через его участие в защите клеток от протеотоксических эффектов. Полученные данные указывают на возможность использования ингибиторов HSP90 для отбраковки дефектных организмов после гено- и протеотоксических воздействий.

Приведенные результаты демонстрируют, что снижение активности клеточного пула HSP90 повышает уровень соответствия фенотипа генотипу, что

дало основание для обсуждения гипотетического HSP90-зависимого механизма морфологической эволюции [9, 10, 13–15]. Согласно этой модели скрытые с помощью шаперона генетические изменения накапливаются и при достижении определенного порога могут высвобождаться, приводить к фенотипическим изменениям и подвергаться естественному отбору. Существование такого механизма подтверждается рядом экспериментов. Например, на *Drosophila* впервые показано, что частота появления измененного признака при снижении функциональной активности HSP90 может увеличиваться от поколения к поколению, и со временем он может становиться независимым от шаперона, т.е. закрепляться [9]. У *A. thaliana* отдельные рецессивные мутантные аллели также проявлялись и начинали доминировать при подавлении активности HSP90 [14]. Показана возможность повышения частоты HSP90-зависимых признаков путем селективного скрещивания [10].

На отрицательный отбор HSP90-зависимых изменений может указывать элиминация особей *A. thaliana* с тотальными морфологическими нарушениями после обработки ингибитором [71, 105]. Кроме того, эволюционный аспект функционирования шаперона также включает содействие реализации новоприобретенных генетических изменений и быстрому появлению фенотипических признаков [13], участие в эпигенетической наследственности [106] и мутагенезе [107], найденные у нерастительных систем.

Важным моментом является то, что повышенная температура, как и ингибирование HSP90, также способствует проявлению генетических вариаций и повышению корреляции между генотипом и фенотипом [9, 10]. Это связывает HSP90-зависимый механизм повышения пенетрантности признака с изменениями условий среды. Представление о таком механизме появления новых наследуемых признаков с участием HSP90 объясняет две проблемы эволюционного учения: стабильность фенотипов в течение долгого периода времени, несмотря на аккумуляцию генетических вариаций и быстрое появление новых наследуемых признаков при изменении условий среды [13–15].

Роли в стресс-реакции. Существенное отклонение факторов среды от оптимальных значений в сторону предельных значений диапазона устойчивости организма прямо или опосредованно приводит к нарушению белкового гомеостаза, в частности, нарушению функциональной структуры белков, выходу на поверхность молекулы гидрофобных участков и образованию белковых агрегатов [108]. Ключевую роль в защите от протеотоксических нарушений выполняют шапероны, связывая гидрофобные участ-

ки аминокислотных последовательностей, поддерживая ненативные белки, предотвращая их агрегацию, высвобождая из уже образовавшихся агрегатов и, как конечный этап, подвергая рефолдингу или направляя к протеасомам для деградации [109, 110]. Поэтому индукция синтеза HSP (реакция теплового шока) является одним из ключевых компонентов стрессовой реакции, направленным на восстановление качества белка клетки.

Результаты исследований указывают на то, что HSP90 могут играть в стресс-реакции различные роли. В экспериментах *in vitro* показана их способность самостоятельно предотвращать агрегацию белков с незрелой или нарушенной структурой [111]. Это дало основание предполагать, что нарушение белкового гомеостаза может переключать HSP90 на связывание денатурированных белков [2, 7, 8, 15, 88]. Связанные белки шаперон может направлять на рефолдинг или деградацию [109, 110]. С другой стороны, такое изменение вектора его активности должно приводить к ослаблению контроля над специфическими субстратами.

Особая роль HSP90 при стрессе обусловлена тем, что клиентами цитозольных изоформ являются факторы теплового шока (heat shock transcription factor, HSF), отвечающие за транскрипцию генов целого ряда стрессовых белков, в том числе и HSP [7, 17, 88]. Запуск экспрессии HSP происходит в результате взаимодействия активной формы HSF с элементами теплового шока (heat shock element, HSE) в промоторной зоне генов. HSE представляет собой множественный пентануклеотидный мотив 5'-nGAA-n-3' в прямой и обратной итерации [112].

Исследование регуляции экспрессии HSP в животных и дрожжевых клетках позволило установить ряд закономерностей, на основе чего предложен механизм авторегуляции экспрессии HSP по принципу обратной связи [113]. Согласно этому механизму, поддержание HSF1 в неактивном состоянии при нормальных условиях обеспечивается ассоциацией его мономеров с цитозольными HSP90 (в кооперации с HSP70). При стрессе переключение шаперонов на связывание возросшего количества ненативных белков приводит к высвобождению HSF1, их тримеризации, транспортировке в ядро, связыванию с HSE и запуску транскрипции различных HSP, в том числе, и HSP90. Восстановление белкового гомеостаза увеличивающимся количеством HSP приводит к высвобождению HSP90 и их реассоциации с HSF1. При этом основным сигналом, регулирующим синтез HSP, является накопление денатурированных белков выше некого порогового уровня.

В последнее время появляется все больше доказательств того, что у растений регуляция экспрессии HSP происходит по тем же основным прин-

ципам [12, 17, 114]. Важным является тот факт, что ингибирование HSP90 вызывает в растительных клетках активацию транскрипции целого ряда HSF-зависимых генов, индуцируемых высокой температурой [17]. Таким образом, регулируя активность конститутивных HSF, HSP90 контролирует экспрессию не только *HSP*, но и других стрессовых генов.

Кроме того, получены доказательства того, что ингибирование HSP90 приводит к повышению теплоустойчивости растительных клеток [12, 17, 115]. В наших экспериментах обработка антибиотиком семян *A. thaliana* вызывала активацию синтеза HSP70 и HSP90 у 12-суточных проростков при нормальных условиях и значительное усиление их индукции в ответ на высокую температуру. При этом повышалась как базовая, так и индуцированная теплоустойчивость растений [115]. Повышенный уровень HSP70 и стимуляция роста проростков наблюдалась также в случае, когда антибиотиками обрабатывали семена после гамма-облучения, оказывавшего значительное гено- и протеотоксическое действие [72, 104]. Однако, учитывая быструю потерю активности фоточувствительных ингибиторов ГДА и РАД [10], механизм таких отдаленных во времени эффектов остается неясным.

Приведенные данные принципиально подтверждают регуляцию экспрессии *HSP* цитозольными HSP90 в растительных клетках, что не исключает существования независимых от HSP90 регуляторных путей. Вместе с тем, этот механизм и роль HSP90 в нем у растений, по-видимому, имеют свои особенности. Прежде всего, семейства HSP и HSF отличаются большим, чем у других организмов, количеством членов. Выше отмечалось, что у *A. thaliana* семейство HSP90 включает 4 цитозольных гомолога [16]. Семейство HSF у растений также характеризуется значительно большей численностью по сравнению с дрожжами и животными, имеющими от одного до нескольких гомологов: у *Ricinus* найдено 19 HSF, у *A. thaliana* – 21, у *Solanum lycopersicum* – 27, у *Glycine max* – 53. Исходя из особенностей доменной структуры, HSF растений разделены на 3 подсемейства или класса – А, В и С [28, 116]. Различные HSF синтезируются конститутивно и/или индуцируются при стрессе, имеют структурные и функциональные различия и характеризуются определенной специфичностью к стрессорам и ролью в регуляции реакции [28]. Очевидно, все это обеспечивает повышенный запас прочности и тонкую многоуровневую настройку функционирования системы, что особенно важно для прикрепленных организмов, вынужденных постоянно реагировать на изменения условий среды.

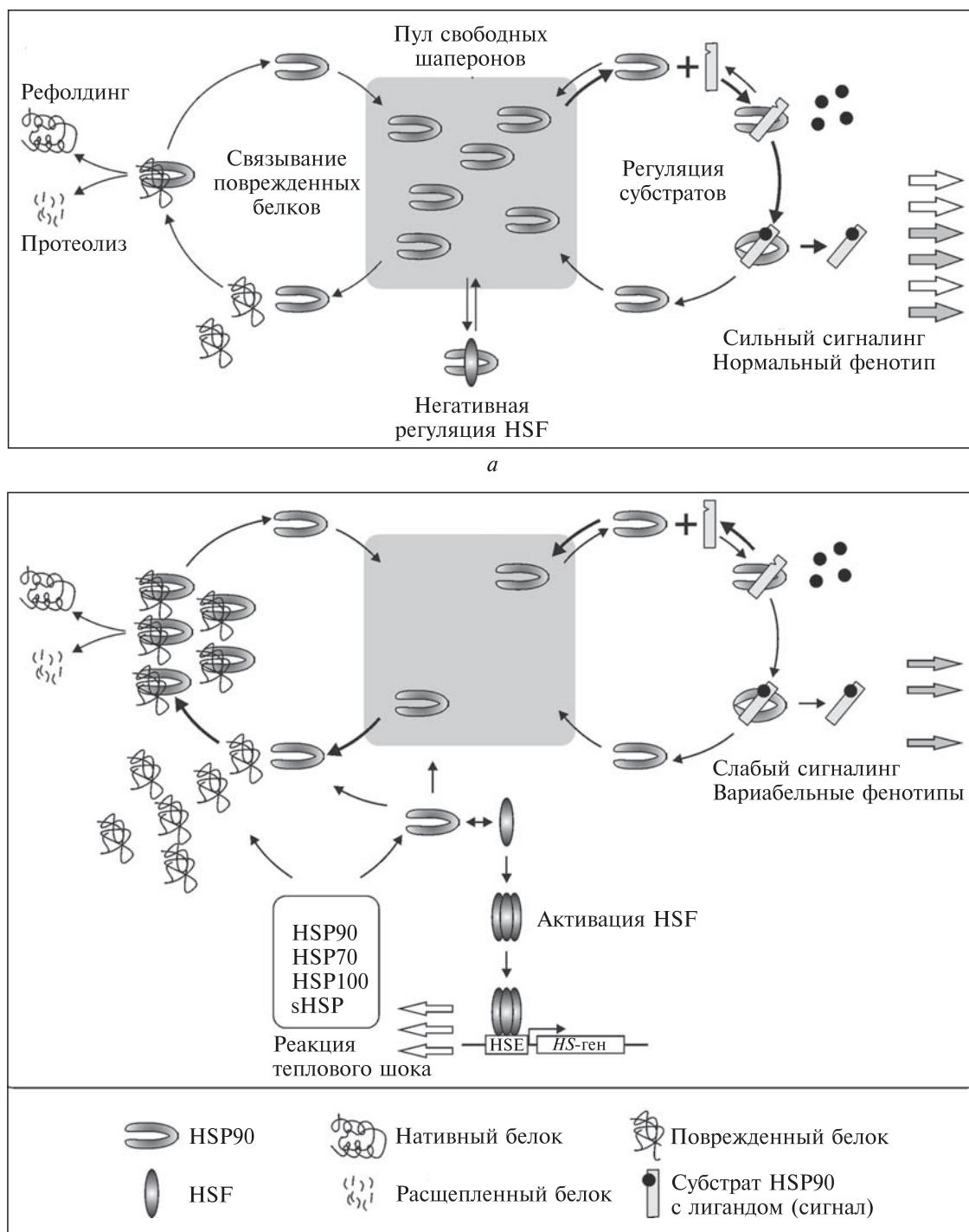
Считается, что индукция *HSP* в ответ на высокую температуру осуществляется транскрипционными

факторами HsfA1 и HsfB1 [28, 116]. При этом главными индукторами являются члены подсемейства HsfA1, тогда как HsfB1 модулирует их активность. Найдено, что HsfA1 и HsfB1 при нормальных условиях ассоциированы с комплексом HSP90/HSP70 (таблица). HSP90 поддерживает низкий уровень HsfB1, направляя излишки на протеасомную деградацию. В ходе стресс-реакции шапероны переключаются на связывание поврежденных белков и высвобождают HsfA1 и HsfB1, которые запускают генную экспрессию HSP и ряда HSF. Подавление их экспрессии осуществляется путем ассоциации HsfA1 с HSP70 и HsfB1 с HSP90. В результате, HsfA1 переходит в неактивную форму, а HsfB1 направляется на деградацию.

За усиление стрессовой реакции отвечают индуцированные HsfA2 и HsfA3 [28, 116]. HsfA2 формирует с HsfA1 суперактивный гетероолигомерный комплекс, обеспечивающий усиление стрессовой реакции при длительном или повторяющемся действии неблагоприятного фактора [30–33]. Часть молекул HsfA2 и вновь синтезированных HSP70 и HSP17 резервируются в виде высокомолекулярных агрегатов – гранул теплового шока [34], предназначенных, по всей видимости, для восстановления белкового гомеостаза после действия стрессора. Получены доказательства связывания AtHsfA2 индуцируемым AtHSP90-1 [32]. Разборка гранул теплового шока также осуществляется с участием комплекса HSP90/HSP70 [27, 28].

HsfA3 индуцируется при высокой температуре и водном дефиците, что контролируется транскрипционным фактором DREB2A (dehydration-responsive element binding protein 2A). Мутация, нарушающая экспрессию *AtHsfA3*, предотвращала индукцию *HSP101* и *sHSP*, необходимых для противодействия агрегации денатурированных белков и выживания клеток [117]. Показано, что *AtDREB2A* и *AtHsfA3* индуцировались при ингибировании HSP90 [17].

В целом, приведенные факты демонстрируют, что цитозольные HSP90 не только контролируют стрессовую индукцию *HSP*, но и участвуют в регуляции ее развития при высокой дозе стрессора и завершения при нормализации условий, что является важным механизмом стабилизации гомеостаза растительного организма при существенных отклонениях факторов среды от оптимальных значений. Учитывая то, что ингибирование HSP90 индуцирует транскрипцию не только *HSP*, но и других регулируемых HSF генов [17], цитозольные HSP90 можно рассматривать как регулятор значительной части стрессовой реакции. Суммируя все это, можно сделать вывод о тройной роли HSP90 при стрессе: 1) связывание денатурированных белков, т.е. пря-



Гипотетическая модель функционирования шаперонов HSP90 при нормальном метаболизме (а) и стрессе (б): в защите клетки от денатурированных белков; в фолдинге и конформационной регуляции специфических белков-клиентов – компонентов различных регуляторных путей клетки (основано на схеме Rutherford et al. [15], модифицировано); в негативной регуляции транскрипционных факторов теплового шока HSF

мое противодействие нарушению белкового гомеостаза; 2) контроль стрессовой индукции *HSP*; 3) масштабные изменения программы генной экспрессии путем ослабления HSP90-зависимых путей нормального развития и включения регулируемой HSF генной экспрессии при стрессе.

Взаимодействие различных функций HSP90. Благодаря множеству функций, выполняемых HSP90 в системе белкового фолдинга и регуляции активности специфических субстратов, это семейство может играть центральную роль в поддержании белкового гомеостаза, оптимального уровня стабильности развития и адаптивной пластичности растительного организма. На рисунке представлена гипотетическая модель механизма взаимодействия различных функций HSP90 при нормальных условиях и стрессе.

Согласно модели, в норме члены семейства преимущественно вовлечены в обслуживание специфических субстратов, при этом их участие в связывании ненативных белков минимально. Отвечая за созревание и ассирию в функционировании белков различных регуляторных путей, HSP90 поддерживает трансдукцию сигналов и стабильное прохождение соответствующих регуляторных процессов, что обеспечивает формирование стандартного фенотипа. При этом, стабилизируя структуру метастабильных белков-клиентов, шаперон может выполнять роль буфера, ограничивающего влияние флуктуаций внешней и внутренней среды и проявление генетических изменений. Поскольку HSP90 присутствуют у всех организмов и содержатся в клетке в большом количестве при нормальных условиях [2], такая их способность может быть универсальным механизмом стабилизации развития. При действии неблагоприятных факторов накопление денатурированных белков переключает HSP90 на их связывание, что приводит к ослаблению активности белков-клиентов, проявлению генетических изменений, перенастройке зависимых процессов и увеличению внутренней нестабильности развития. Такая координация специфических и неспецифических шаперонных функций HSP90 через пул свободных шаперонов клетки основана на схеме, предложенной Rutherford et al. [15]. Предполагается, что выбор мишени между различными специфическими субстратами и денатурированными белками регулируется их относительной аффинностью к шаперону.

Однако, учитывая способность HSP90 негативно регулировать HSF и таким образом контролировать реакцию теплового шока и устойчивость клеток к стрессу, представляется крайне важным эту специфическую функцию вынести в отдельное направление. Способность системы HSP к авто-

регуляции, без сомнения, является фундаментальным свойством клетки, представляющим в высокой степени автономный путь обеспечения защиты белкового гомеостаза при действии неблагоприятных факторов и самовосстановления после нормализации ситуации. О важности последнего говорит то, что сверхэкспрессия *HSP* приводит к замедлению развития, как полагают, из-за чрезмерной стабилизации структуры белков [2].

Количество молекул, образующих пул (фонд) свободных HSP90, определяет емкость буферной системы HSP90, ее потенциал в поддержании белкового гомеостаза клетки, противодействии стохастичности развития и сокрытии полиморфизма. Показано, что количество HSP90 в клетках при нормальных условиях может в несколько раз превышать необходимое для нормального роста [88]. Можно предполагать, что такая избыточность дает люфт, обеспечивающий поддержание нормальных процессов при незначительных изменениях фактора и генетическом полиморфизме. Способность гипотетической буферной системы «поглощать» слабые вариации среды и генетической информации без пропорционального ответа была предсказана Waddington [75]. При увеличении дозы фактора постепенное снижение наполненности пула в результате связывания возрастающего количества денатурированных белков в определенный момент достигает порогового уровня, ниже которого свободных шаперонов становится недостаточно для поддержания зависимых процессов в полной мере. Можно предполагать, что дальнейшее увеличение дозы фактора будет вызывать усиление стохастичности зависимых от шаперона процессов, и, соответственно, вариабельности фенотипов, что может иметь адаптивное значение в изменившихся условиях. Следующий пороговый уровень фактора связан с диссоциацией комплекса HSP90-HSF и запуском экспрессии *HSP* и других HSF-зависимых генов, что связано с изменением программы развития. Таким образом, величина пула свободных HSP90, а также изменение его наполненности в зависимости от изменений качества белка в клетке могут определять как диапазон отклонений фактора, не влияющих существенно на стабильность роста и формообразования, так и изменения фактора, вызывающие стрессовую индукцию *HSP* и перестройку онтогенетической программы.

A ROLE OF HSP90 CHAPERONES
IN STABILITY AND PLASTICITY
OF ONTOGENESIS OF PLANTS UNDER
NORMAL AND STRESSFUL CONDITIONS
(*ARABIDOPSIS THALIANA*)

L.Y. Kozeko

M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
01601 Kyiv, Tereschenkivska st. 2, Ukraine
E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com

The functions of HSP90 chaperones in the protein folding system, as well as regulation of specific substrates effecting multiple signal pathways and cellular processes were considered. The triple role of HSP90 in stress was described: binding damaged proteins and directing them for refolding or degradation; regulation of the heat shock gene induction; and alteration in the gene expression program. Based on the results of studies of the model species *Arabidopsis thaliana*, the function of HSP90 in maintenance of growth and morphogenesis stability, developmental plasticity and mechanisms of stress tolerance was shown. A model for the interaction of the HSP90 functions under normal and stressful conditions is presented.

РОЛЬ ШАПЕРОНІВ HSP90 У СТІЙКОСТІ
ТА ПЛАСТИЧНОСТІ ОНТОГЕНЕЗУ РОСЛИН
ЗА НОРМАЛЬНИХ І СТРЕСОВИХ УМОВ
(*ARABIDOPSIS THALIANA*)

Л.Є. Козеко

Розглянуто особливості функціонування шаперонів HSP90 в системі білкового фолдингу і регуляції специфічних субстратів, які беруть участь в трансдукції сигналів і регуляції різних клітинних процесів. Описана потрійна роль HSP90 у стресі: зв'язування пошкоджених білків та їх спрямування на рефолдинг і деградацію; регуляція стресової індукції генів теплового шоку; і зміна програми генної експресії. На основі результатів досліджень модельного виду *Arabidopsis thaliana* показана роль HSP90 у підтримці стабільності росту і морфогенезу рослин, пластичності розвитку і механізмах стійкості. Представлена модель взаємодії функцій HSP90 за нормальних умов і стресу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Picard, D., Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, vol. 59, no. 10, pp. 1640–8. doi: 10.1007/PL00012491.
- Nollen, E.A.A., Morimoto, R.I., Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing ‘heat shock’ proteins, *J. Cell Sci.*, 2002, vol. 115, no. 14, pp. 2809–16.
- Pearl, L.H., Prodromou, C., Structure and *in vivo* function of Hsp90, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2000, vol. 10, no. 1, pp. 46–51. doi: 10.1016/S0959-440X(99)00047-0.
- 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., and Hough, W.A., Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone, *Cell*, 2005, vol. 120, no. 5, pp. 715–27. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.024.
- Kozeko, L.Ye. Heat shock proteins 90 kDa: diversity, structure, functions, *Tsitologiya*, 2010, vol. 52, no. 11, pp. 3–20.
- Taipale, M., Jarosz, D., and Lindquist, S., HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, vol. 11, no. 7, pp. 515–28. doi: 10.1038/nrm2918.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., and Voellmy, R., Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1, *Cell*, 1998, vol. 94, no. 4, pp. 471–80. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81588-3.
- Morimoto, R.I., Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators, *Gen. Develop.*, 1998, vol. 12, no. 24, pp. 3788–96. doi: 10.1101/gad.12.24.3788.
- Rutherford, S.L., Lindquist, S., Hsp90 as a capacitor for morphological evolution, *Nature*, 1998, vol. 396, no. 6709, pp. 336–42. doi: 10.1038/24550.
- Queitsch, C., Sangster, T.A., and Lindquist, S., Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation, *Nature*, 2002, vol. 417, no. 6889, pp. 618–24. doi: 10.1038/nature749.
- Samakovli, D., Thanou, A., Valmas, C., and Hatzopoulos, P., Hsp90 canalizes developmental perturbation, *J. Exp. Bot.*, 2007, vol. 58, no. 13, pp. 3515–24. doi: 10.1093/jxb/erm191.
- Sangster, T.A., Bahrami, A., Wilczek, A., Watanabe, E., Schellenberg, K., McLellan, C., Kelley, A., Kong, S.W., Queitsch, C., and Lindquist, S., Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels, *PLoS ONE*, 2007, no. 7, e648. doi: 10.1371/journal.pone.0000648.
- Jarosz, D.F., Lindquist, S., Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation, *Sci.*, 2010, vol. 330, no. 6012, pp. 1820–4. doi: 10.1126/science.1195487.
- Sangster, T.A., Lindquist, S., and Queitsch, C., Under cover: Causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance, *BioEssays*, 2004, vol. 26, no. 4, pp. 348–62. doi: 10.1002/bies.20020.
- Rutherford, S., Hirate, Y., and Swala, B.J., The Hsp90 capacitor, developmental remodeling, and evolution: The robustness of gene networks and the curious evolvability of metamorphosis, *Critical Rev. Bio-*

- chem. Mol. Biol.*, 2007, vol. 42, no. 5, pp. 355–72. doi: 10.1080/10409230701597782
16. Krishna, P., Gloor, G., The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Cell Stres. Chaper.*, 2001, vol. 6, no. 3, pp. 238–246. doi: 1379/1466-1268 (2001)006<0238:THFOPI>2.0.CO;2.
 17. Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, I., and Nishimura, M., Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 52, pp. 37794–804. doi: 10.1074/jbc.M707168200.
 18. Cha, J.Y., Ahn, G., Kim, J.Y., Kang, S.B., Kim, M.R., Su’udi, M., Kim, W.Y., and Son, D., Structural and functional differences of cytosolic 90-kDa heat-shock proteins (Hsp90s) in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, vol. 70, pp. 368–73. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.039.
 19. Karaguz, G.E., Rüdiger, S.G.D. Hsp90 interaction with clients, *Trend. Biochem. Sci.*, 2015, vol. 40, no. 2, pp. 117–25. doi: 10.1016/j.tibs.2014.12.002.
 20. Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I., and Tanaka, K., The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome, *EMBO J.*, 2003, vol. 22, no. 14, pp. 3557–67. doi: 10.1093/emboj/cdg349.
 21. Park, S.J., Suetsugu, S., and Takenawa, T., Interaction of Hsp90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation, *EMBO J.*, 2005, vol. 24, no. 8, pp. 1557–70. doi: 10.1038/sj.emboj.7600586.
 22. Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., Wright, W.E., and White, M.A., Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes, *Gen. Develop.*, 1999, vol. 13, no. 7, pp. 817–26. doi: 10.1101/gad.13.7.817.
 23. Makhnevych, T., Houry, W.A., The role of Hsp90 in protein complex assembly, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1823, no. 3, pp. 674–82. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.001.
 24. Kim, T.S., Jang, C.Y., Kim, H.D., Lee, J.Y., Ahn, B.Y., and Kim, J., Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation, *Mol. Biol. Cell*, 2006, vol. 17, no. 2, pp. 824–33. doi: 10.1091/mbc.e05-08-0713.
 25. Sawarkar, R., Sievers, C., and Paro, R., HSP90 globally targets paused RNA polymerase to regulate gene expression in response to environmental stimuli, *Cell*, 2012, vol. 149, no. 4, pp. 807–18. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.061.
 26. Uversky, V.N., Oldfield, C.J., and Dunker, A.K., Showing your ID: Intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling, *J. Mol. Rec.*, 2005, vol. 18, no. 5, pp. 343–84. doi: 10.1002/jmr.747.
 27. Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E., and Scharf, K.D., Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato, *Plant Cell*, 2011, vol. 23, no. 2, pp. 741–55. doi: 10.1105/tpc.110.076018.
 28. Scharf, K.D., Berberich, T., Ebersberger, I., and Nover, L., The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1819, no. 2, pp. 104–19. doi: 10.1016/j.bbaprm.2011.10.002.
 29. Liu, H.C., Liao, H.T., and Charng, Y.Y., The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*, *Plant, Cell Environ.*, 2011, vol. 34, no. 5, pp. 738–51. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x.
 30. Charng, Y., Liu, H., Liu, N., Chi, W., Wang, C., Chang, S., and Wang, T., A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquire thermotolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 2007, vol. 143, no. 1, pp. 251–62. doi: 10.1104/pp.106.091322.
 31. Ogawa, D., Yamaguchi, K., and Nishiuchi, T., High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth, *J. Exp. Bot.*, 2007, vol. 58, no. 12, pp. 3373–83. doi: 10.1093/jxb/erm184.
 32. Meiri, D., Breiman, A., *Arabidopsis* ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs, *Plant J.*, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 387–99. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03878.x.
 33. Meiri, D., Tazat, K., Cohen-Peer, R., Farchi-Pisanty, O., Aviezer-Hagai, K., Avni, A., and Breiman, A., Involvement of *Arabidopsis* ROF2 (FKBP65) in thermotolerance, *Plant Mol. Biol.*, 2010, vol. 72, no. 1–2, pp. 191–203. doi: 10.1007/s11103-009-9561-3.
 34. Scharf, K.D., Heider, H., Hirschfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., and Nover, L., The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, vol. 18, no. 4, pp. 2240–51. doi: 10.1128/MCB.18.4.2240.
 35. Kim, S.H., Lee, J.H., Seo, K.I., Ryu, B., Sung, Y., Chung, T., Deng, X.W., and Lee, J.H., Characterization of a novel DWD protein that participates in heat stress response in *Arabidopsis*, *Mol. Cells*, 2014, vol. 37, no. 11, pp. 833–40. doi: 10.14348/molcells.2014.0224.
 36. Samakovli, D., Margaritopoulou, T., Prassinos, C., Milioni, D., and Hatzopoulos, P., Brassinosteroid nuc-

- lear signaling recruits HSP90 activity, *New Phytologist*, 2014, vol. 203, no. 3, pp. 743–57. doi: 10.1111/nph.12843.
37. Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J., BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation, *Cell*, 2002, vol. 109, no. 2, pp. 181–91. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00721-3.
38. Lachowiec, J., Lemus, T., Thomas, J.H., Murphy, P.J.M., Nemhauser, J.L., and Queitsch, C., The protein chaperone HSP90 can facilitate the divergence of gene duplicates, *Genetics*, 2013, vol. 193, no. 4, pp. 1269–77. doi: 10.1534/genetics.112.148098.
39. Shigeta, T., Zaizen, Y., Asami, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Okamoto, S., Matsuo, T., and Sugimoto, Y., Molecular evidence of the involvement of heat shock protein 90 in brassinosteroid signaling in *Arabidopsis* T87 cultured cells, *Plant Cell Rep.*, 2014, vol. 33, no. 3, pp. 499–510. doi: 10.1007/s00299-013-1550-y.
40. Kim, T.S., Kim, W.Y., Fujiwara, S., Kim, J., Cha, J.Y., Park, J.H., Lee, S.Y., and Somers, D.E., HSP90 functions in the circadian clock through stabilization of the client F-box protein ZEITLUPE, *PNAS*, 2011, vol. 108, no. 40, pp. 16843–8. doi: 10.1073/pnas.1110406108.
41. Wang, R., Zhang, Y., Kieffer, M., Yu, H., Kepinski, S., and Estelle, M., HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in *Arabidopsis* by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1, *Nature Commun.*, 2016, vol. 7, 10269. doi: 10.1038/ncomms10269.
42. Watanabe, E., Mano, S., Nomoto, M., Tada, Y., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Yamada, K., HSP90 stabilizes auxin-responsive phenotypes by masking a mutation in the auxin receptor TIR1, *Plant Cell Physiol.*, 2016, vol. 57, no. 11, pp. 2245–54. doi: 10.1093/pcp/pcw170.
43. Watanabe, E., Mano, S., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Yamada, K., HSP90 stabilizes auxin receptor TIR1 and ensures plasticity of auxin responses, *Plant Signal. Behav.*, 2017, vol. 12, no. 5, e1311439. doi: 10.1080/15592324.2017.1311439.
44. Zhang, X.C., Millet, Y.A., Cheng, Z., Bush, J., and Ausubel, F.M., Jasmonate signalling in *Arabidopsis* involves SGT1b–HSP70–HSP90 chaperone complexes, *Nat. Plants*, 2015, vol. 1, 15049. doi: 10.1038/nplants.2015.49.
45. Song, Y.H., Estrada, D.A., Johnsonc, R.S., Kima, S.K., Leed, S.Y., MacCoss, M.J., and Imaizumia, T., Distinct roles of FKF1, GIGANTEA, and ZEITLUPE proteins in the regulation of CONSTANS stability in *Arabidopsis* photoperiodic flowering, *PNAS*, 2014, vol. 111, no. 49, pp. 17672–7. doi: 10.1073/pnas.1415375111.
46. Smith, M.R., Willmann, M.R., Wu, G., Berardini, T.Z., Moller, B., Weijers, D., and Poethig, R.S., Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*, *PNAS*, 2009, vol. 106, no. 13, pp. 5424–9. doi: 10.1073/pnas.0812729106.
47. Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhasha, I., Meshi, T., and Ishikawa, M., In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90, *Mol. Cell*, 2010, vol. 39, no. 2, pp. 282–91. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.014.
48. Earley, K.W., Poethig, R.S., Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*, *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 44, pp. 38184–9. doi: 10.1074/jbc.M111.290130.
49. Chang, I.F., Curran, A., Woolsey, R., Quilici, D., Cushman, J., Mittler, R., Harmon, A., and Harper, J., Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*, *Proteomics*, 2009, vol. 9, no. 11, pp. 2967–85. doi: 10.1002/pmic.200800445.
50. Swatek, K.N., Graham, K., Agrawal, G.K., and Thelen, J.J., The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing *Arabidopsis* seed, *J. Prot. Res.*, 2011, vol. 10, no. 9, pp. 4076–87. doi: 10.1021/pr200263m.
51. Schweiger, R., Soll, J., Jung, K., Heermann, R., and Schwenkert, S., Quantification of interaction strengths between chaperones and tetratricopeptide repeat domain containing membrane proteins, *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 42, pp. 30614–25. doi: 10.1074/jbc.M113.493015.
52. Inoue, H., Li, M., Schnell, D.J., An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts, *PNAS*, 2013, vol. 110, no. 8, pp. 3173–8. doi: 10.1073/pnas.1219229110.
53. Kovacheva, S., Bédard, J., Patel, R., Twell, D., Ríos, G., Koncz, C., and Jarvis, P., In vivo studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import, *Plant J.*, 2005, vol. 41, no. 3, pp. 412–28. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02307.x.
54. Heide, H., Nordhues, A., Drepper, F., Nick, S., Schulz-Raffelt, M., Haehnel, W., and Schröda, M., Application of quantitative immunoprecipitation combined with knockdown and cross-linking to *Chlamydomonas* reveals the presence of vesicle-inducing protein in plastids 1 in a common complex with chloroplast HSP90C, *Proteomics*, 2009, vol. 9, no. 11, pp. 3079–89. doi: 10.1002/pmic.200800872.
55. Feng, J., Fan, P., Jiang, P., Lv, S., Chen, X., and Li, Y., Chloroplast-targeted Hsp90 plays essential roles

- in plastid development and embryogenesis in *Arabidopsis* possibly linking with VIPP1, *Physiol. Plant.*, 2014, vol. 150, no. 2, pp. 292–307. doi: 10.1111/ppl.12083.
56. Ishiguro, S., Watanabe, Y., Ito, N., Nonaka, H., Takeda, N., Sakai, T., Kanaya, H., and Okada, K., SHEPHERD is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins, *EMBO J.*, 2002, vol. 21, no. 5, pp. 898–908. doi: 10.1093/emboj/21.5.898.
 57. Fujiwara, M., Uemura, T., Ebine, K., Nishimori, Y., Ueda, T., Nakano, A., Sato, M.H., and Fukao, Y., Interactomics of Qa-SNARE in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 2014, vol. 55, no 4, pp. 781–9. doi: 10.1093/pcp/pcu038.
 58. Chong, L.P., Wang, Y., Gad, N., Anderson, N., Shah, B., and Zhao, R., A highly charged region in the middle domain of plant endoplasmic reticulum (ER)-localized heat-shock protein 90 is required for resistance to tunicamycin or high calcium-induced ER stresses, *J. Exp. Bot.*, 2015, vol. 66, no. 1, pp. 113–24. doi: 10.1093/jxb/eru403.
 59. Carland, F.M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., and Nelson, T., The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning, *Plant Cell*, 2002, vol. 14, no. 9, pp. 2045–58. doi: 10.1105/tpc.003939.
 60. Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., and Dangl, J.L., Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein, *EMBO J.*, 2003, vol. 22, no. 21, pp. 5679–89. doi: 10.1093/emboj/cdg547.
 61. Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K., HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*, *PNAS*, 2003, vol. 100, no. 20, pp. 11777–82. doi: 10.1073/pnas.2033934100.
 62. Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., and Baulcombe, D.C., High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance, *EMBO J.*, 2003, vol. 22, no. 21, pp. 5690–9. doi: 10.1093/emboj/cdg546.
 63. Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., and Dinesh-Kumar, S.P., Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants, *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 3, pp. 2101–8. doi: 10.1074/jbc.M310029200.
 64. Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., Steinbiss, H.H., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P., RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance, *Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 12, pp. 3480–95. doi: 10.1105/tpc.104.026682.
 65. Holt III, B.F., Belkhadir, Y., and Dangl, J.L., Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system, *Sci.*, 2005, vol. 309, no. 5736, pp. 929–32. doi: 10.1126/science.1109977.
 66. Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, N.P., Wong, H.L., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T., and Shimamoto, K., The Hop/Stil-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity, *Cell Host Microbe*, 2010, vol. 7, no. 3, pp. 185–96. doi: 10.1016/j.chom.2010.02.008.
 67. Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S., Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem, *J. Plant Res.*, 2009, vol. 122, no. 1, pp. 31–9. doi: 10.1007/s10265-008-0207-3.
 68. You, Y., Sawikowska, A., Neumann, M., Posé, D., Capovilla, D., Langencker, T., Neher, R.A., Krajewski, P., and Schmid, M., Temporal dynamics of gene expression and histone marks at the *Arabidopsis* shoot meristem during flowering, *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, 15120. doi: 10.1038/ncomms15120.
 69. Sun, B., Ito, T., Regulation of floral stem cell termination in *Arabidopsis*, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, 17. doi: 10.3389/fpls.2015.00017.
 70. Clouse, S.D., Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development, *The Plant Cell*, 2011, vol. 23, no. 4, pp. 1219–30. doi: 10.1105/tpc.111.084475.
 71. Kozeko, L.E., Phenotypic variability of *Arabidopsis thaliana* seedlings as a result of inhibition of Hsp90 chaperones, *Cytol. Genet.*, 2013, vol. 47, no. 2, pp. 75–87. doi: 10.3103/S0095452713020072.
 72. Kozeko, L.Ye., Influence of radicicol, an inhibitor of HSP90 chaperons, on growth of *Arabidopsis thaliana* after gamma-irradiation of seeds, *Bull. Kharkiv Natl. Agrar. Univer. Series. Biology*, 2015, vol. 34, no. 1, pp. 14–21.
 73. Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A., E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity, *J. Exp. Bot.*, 2009, vol. 60, no. 4, pp. 1123–32. doi: 10.1093/jxb/erp059.
 74. Kadota, Y., Shirasu, K., and Guerois, R., NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad, *Trends Biochem. Sci.*, 2010, vol. 35, no. 4, pp. 199–207. doi: 10.1016/j.tibs.2009.12.005.
 75. Waddington, C.H., Canalization of development and the inheritance of acquired characters, *Nature*, 1942, vol. 150, no. 3811, pp. 563–5. doi: 10.1038/150563a0.
 76. Gärtner, K., A third component causing random

- variability beside environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year long effort to standardize laboratory animals? *Laborat. Anim.*, 1990, vol. 24, no. 1, pp. 71–7. doi: 10.1258/002367790780890347.
77. Lajus, D., Graham, J.H., and Kozhara, A., Developmental instability and the stochastic component of total phenotypic variance. In: *Developmental instability: causes and consequences*, New York: Oxford University Press, 2003, pp. 343–63.
78. Forde, G.B., Is it good noise? The role of developmental instability in the shaping of a root system, *J. Exp. Bot.*, 2009, vol. 60, no. 14, pp. 3989–4002. doi: 10.1093/jxb/erp265.
79. Shahrezaei, V., Swain, P.S., The stochastic nature of biochemical networks, *Cur. Opin. Biotech.*, 2008, vol. 19, no. 4, pp. 369–74. doi: 10.1016/j.copbio.2008.06.011.
80. Ribeiro, A.S., Smolander, O., Rajala, T., Häkkinen, A., and Yli-Harja, O., Delayed stochastic model of transcription at the single nucleotide level, *J. Comput. Biol.*, 2009, vol. 16, no. 4, pp. 539–53. doi: 10.1089/cmb.2008.0153.
81. Sigworth, F.J., Open channel noise. I. Noise in acetylcholine receptor currents suggests conformational fluctuations, *Biophys. J.*, 1985, vol. 47, no. 5, pp. 709–20. doi: 10.1016/S0006-3495(85)83968-0.
82. Sangster, T.A., Salathia, N., Lee, H.N., Watanabe, E., Schellenberg, K., Morneau, K., Wang, H., Undurraga, S., Queitsch, C., and Lindquist, S., HSP90-buffered genetic variation is common in *Arabidopsis thaliana*, *PNAS*, 2008, vol. 105, no. 8, pp. 2969–74. doi: 10.1073/pnas.0712210105.
83. Borkovich, K.A., Ferrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulley, J., and Lindquist, S., Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures, *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, no. 9, pp. 3919–30.
84. Bandura, J.L., Jiang, H., Nickerson, D.W., and Edgar, B.A., The molecular chaperone Hsp90 is required for cell cycle exit in *Drosophila melanogaster*, *PLoS Genet.*, 2013, vol. 9, no. 9, e1003835. doi: 10.1371/journal.pgen.1003835.
85. Prasinos, C., Krampis, K., Samakovli, D., and Hatzopoulos, P., Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic *Hsp90* genes during embryo development, *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, no. 412, pp. 633–44. doi: 10.1093/jxb/eri035.
86. Oh, S.E., Yeung, C., Babaei-Rad, R., and Zhao, R., Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*, *BMC Res. Not.*, 2014, vol. 7, no. 1, 643. doi: 10.1186/1756-0500-7-643.
87. Yeyati, P.L., Bancewicz, R.M., Maule, J., and van Heyningen, V., Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development, *PLOS Genet.*, 2007, vol. 3, no. 3, e43. doi: 10.1371/journal.pgen.0030043.
88. Ali, A., Bharadwaj, S., O'Carroll, R., and Ovsenek, N., Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes, *Mol. Cell. Biol.*, 1998, vol. 18, pp. 4949–60. doi: 10.1128/MCB.18.9.4949.
89. Uversky, V.N., What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 1, pp. 2–12. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x.
90. Bradshaw, A.D., Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants, *Advances in Genetics*, 1965, vol. 13, no. 2, pp. 115–55. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60048-6.
91. Kordyum, E.L., Sytnik, K.M., Baranenko, V.V., Belyavskaya, N.A., Klimchuk, D.A., and Nedukha, E.M., *Cell Mechan. Plant Adapt. Adv. Environ. Factors Nat. Condit.*, Kiev: Naukova Dumka, 2003.
92. Slack, J.M.W., Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature reviews. Genetics*, 2002, vol. 3, no. 11, pp. 889–95. doi: 10.1038/nrg933.
93. Lin, Y., Cheng, C.L., A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines a new *HY* locus, *Plant Cell*, 1997, vol. 9, no. 1, pp. 21–35. doi: 10.1105/tpc.9.1.21.
94. Cao, D., Lin, Y., and Cheng, C.L., Genetic interactions between the chlorate-resistant mutant *cr88* and the photomorphogenic mutants *cop1* and *hy5*, *Plant Cell*, 2000, vol. 12, no. 2, pp. 199–210. doi: 10.1105/tpc.12.2.199.
95. Kitano, H., Biological robustness, *Nature Review Genetics*, 2004, vol. 5, no. 11, pp. 826–36. doi: 10.1038/nrg1471.
96. Kimura, M. *Neutr. Theor. Mol. Evolut.*, New York: Cambridge Univ. Press, 1983.
97. Mitchell-Olds, T., Schmitt, J., Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*, *Nature*, 2006, vol. 441, no. 7096, pp. 947–52. doi: 10.1038/nature04878.
98. Sangster, T.A., Salathia, N., Undurraga, S., Milo, R., Schellenberg, K., Lindquist, S., and Queitsch, C., HSP90 affects the expression of genetic variation and development stability in quantitative traits, *PNAS*, 2008, vol. 105, no. 8, pp. 2963–8. doi: 10.1073/pnas.0712200105.
99. Abbott, R.J., Gomes, M.F., Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Heredity*, 1989, vol. 62, no. 3, pp. 411–8. doi: 10.1038/hdy.1989.56.
100. Koornneef, M., Dellaert, L.W.M., and Van Der Veen, J.H., EMS-induced and radiation-induced

- mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh, *Mutat. Res.*, 1982, vol. 93, no. 1, pp. 109–23. doi: 10.1016/0027-5107(82)90129-4.
101. Grodzinsky, D.M., *Plant Radiobiology*, Kiev: Naukova Dumka, 1989, 384 p.
102. Grodzinsky, D.M., Dmitriev, O.P., Gusha, M.I., Kolomiets, O.D., Kravetz, O.A., and Rashydov, N.M., *UV-B radiation and plants: mechanisms of damage and protection*, Kyiv: Fitosotsotsentr, 2007, 152 p.
103. Gorobchenko, O.A., Nikolov, O.T., and Gatash, S.V., Influence of γ -irradiation on thermal-evoked conformational transitions and hydration of fibrinogen, *Biopol. Cell*, 2006, vol. 22, no. 2, pp. 162–5. doi: 10.7124/bc.00072C.
104. Kozeko, L., Talalaiev, O., Neimash, V., and Povarchuk V., A protective role of HSP90 chaperone in gamma-irradiated *Arabidopsis thaliana* seeds, *Life Sci. Space Res.*, 2015, vol. 6, pp. 51–8. doi: 10.1016/j.lssr.2015.07.002.
105. Kozeko, L.Ye., Chaperones HSP90 as a stabilizer of plant growth and morphogenesis: a microevolutionary aspect, *Fact. Exp. Evol. Organ.*, 2016, vol. 18, pp. 42–5.
106. Sollars, V., Lu, X., Xiao, L., Wang, X., Garfinkel, M.D., and Ruden, D.M., Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution, *Nat. Genet.*, 2003, vol. 33, no. 1, pp. 70–4. doi: 10.1038/ng1067.
107. Specchia, V., Piacentini, L., Tritto, P., Fanti, L., D'Alessandro, R., Palumbo, G., Pimpinelli, S., and Bozzetti, M.P., Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons, *Nature*, 2010, vol. 463, no. 7281, pp. 662–5. doi: 10.1038/nature08739.
108. Ananthan, J., Goldberg, A.L., and Voellmy, R., Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes, *Sci.*, 1986, vol. 232, no. 4749, pp. 522–4. doi: 10.1126/science.3083508.
109. Mathew, A., Morimoto, R.I., Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. In: Stress of life from molecules to man, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1998, vol. 851, pp. 99–111. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08982.x.
110. Höhfeld, J., Cyr, D.M., and Patterson, C., From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation, *EMBO Reports*, 2001, vol. 2, no. 10, pp. 885–90. doi: 10.1093/embo-reports/kve206.
111. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U., Hsp90 chaperones protein folding in vitro, *Nature*, 1992, vol. 358, no. 6382, pp. 169–70. doi: 10.1038/358169a0.
112. Fernandes, M., O'brien, T., and Lis, J.T., Structure and regulation of heat shock gene promoters. In: *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, pp. 375–93. doi: 10.1101/087969427.26.375.
113. Akerfelt, M., Morimoto, R.I., and Sistonen, L., Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, vol. 11, no. 8, pp. 545–55. doi: 10.1038/nrm2938.
114. McLellan, C.A., Turbyville, T.J., Wijeratne, E.M., Kerschen, A., Vierling, E., Queitsch, C., Whitesell, L., and Gunatilaka, A.A., A rhizosphere fungus enhances *Arabidopsis* thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor, *Plant Physiol.*, 2007, vol. 145, no. 1, pp. 174–82. doi: 10.1104/pp.107.101808.
115. Kozeko, L.Ye., Changes in heat-shock protein synthesis and thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings resulting from Hsp90 inhibition by geldanamycin, *Cell Tiss. Biol.*, 2014, vol. 8, no. 5, pp. 416–22. doi: 10.1134/S1990519X14050046.
116. von Koskull-Döring, P., Scharf, K.D., and Nover, L., The diversity of plant heat stress transcription factors, *Trends Plant Sci.*, 2007, vol. 12, no. 10, pp. 452–7. doi: 10.1016/j.tplants.2007.08.014.
117. Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., Englich, G., Vierling, E., and von Koskull-Döring, P., A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*, *Plant J.*, 2008, vol. 53, no. 2, pp. 264–74. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03334.x.

Поступила в редакцию 22.02.18

После доработки 11.05.18

Принята к публикации 18.03.19