

КЛІТИННА БІОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 581.1: 577

ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНІСТЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ТЕПЛОВОГО ШОКУ *ATHSP70-10* В ПРОРОСТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА НОРМАЛЬНИХ І СТРЕСОВИХ УМОВ

© 2020 р. Л. Є. Козеко, Є. Л. Кордюм

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Мітохондріальні білки теплового шоку родини HSP70 підтримують білковий гомеостаз мітохондрій за нормальних і стресових умов, забезпечуючи фолдинг і збірку комплексів білків, що кодуються мітохондріальним геномом, імпорту цитозольних білків до мітохондрій, їх фолдинг та захист від агрегації. Повідомляється про органоспецифічність синтезу мітохондріальних HSP70 у рослин. Проте питання тканиноспецифічності їх функціонування залишається мало дослідженим. Вивчення цього питання проводили для мітохондріального *AtHSP70-10* в проростках *Arabidopsis thaliana* з використанням трансгенної лінії, що містить сигнальний ген *uidA*, за нормальних умов і за впливу високої температури і водного дефіциту. Гістохімічне GUS-забарвлення виявило експресію *AtHSP70-10* за нормальних умов в гідатодах сім'ядоль і листків, прилистках, клітинах центрального циліндра зони диференціації та зрілої зони кореня, а також слабкий ефект в апексі кореня та в кореневій шийці. За результатами ЗТ-ПЛР-аналізу проростків дикого типу теплова експозиція при 37°C призводила до швидкої активації транскрипції *AtHSP70-10*, яка досягала найвищого рівня протягом 2 год. Поступовий розвиток водного дефіциту протягом 5 діб спричиняв посилення транскрипції цього гена, яке ставало більш вираженим після 3 діб і досягало максимального рівня через 5 діб дегідратації. Гістохімічний аналіз показав повне збереження тканинної локалізації експресії *AtHSP70-10* за дії обох абіотичних факторів. Отримані дані свідчать про специфічне функціонування мітохондріального шаперона *AtHSP70-10* в певних клітинних структурах.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, HSP70, генна експресія, тканиноспецифічність, висока температура, водний дефіцит

DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2020.03.037>

Білки теплового шоку 70 кДа (heat shock protein, HSP) посідають центральне місце у системі молекулярних шаперонів практично в усіх організмів, включаючи рослини. Члени родини HSP70 у рослин функціонують у цитозолі/ядрі, пластидах, мітохондріях і ендоплазматичному ретикулумі. Зокрема, мітохондріальні HSP70 забезпечують білковий гомеостаз мітохондрій за нормальних і стресових умов. Відзначається висока консервативність функцій

мітохондріальних шаперонів поміж організмами (Sarkar et al., 2013). Перш за все, вони забезпечують фолдинг і збірку комплексів білків, що кодуються мітохондріальним геномом, наприклад, окремих білків мітохондріальних рибосом і молекулярного комплексу АТФ-синтази у дріжджів (Hertmann et al., 1994). Крім того, діючи як АТФ-залежний молекулярний мотор, ці HSP70 асистують в імпорті до мітохондріального матриксу білків, синтезованих у цитозолі, запобігають їх агрегації та сприяють набуттю ними функціональної структури (Dudley et al., 1997; Kawai et al., 2001; Zhang, Glaser, 2002; Su, Li, 2010). Відзначено важли-

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

вість мітохондріальних HSP70 для морфогенезу мітохондрій (Williamson et al., 2008; Lee et al., 2015). Вивчення клітинних систем різного походження з їх надекспресією показало участь цих шаперонів у підтриманні мітохондріального мембранного потенціалу, продукуванні АТФ, пригніченні генерації активних форм кисню (АФК) та гальмуванні розвитку програмованої клітинної смерті (Williamson et al., 2008; Qi et al., 2011).

Мітохондріальні HSP70 синтезуються конститутивно, і разом з тим, посилення їх генної експресії відбувається за впливу ряду абіотичних факторів. Так, активацію їх синтезу виявляли у різних видів рослин у відповідь на дію високої (Li, Guy, 2001; Sung et al., 2001; Liu et al., 2014; Chaudhary et al., 2019) та низької температур (Sung et al., 2001; Liu et al., 2014), посухи (Rizhsky et al., 2004; Fietto et al., 2007; Liu et al., 2014; Tang et al., 2016; Chaudhary et al., 2019), УФ (Swindell et al., 2007), високих концентрацій солі (Liu et al., 2014; Chaudhary et al., 2019), CdCl₂, саліцилової кислоти і брасиностероїдів (Chaudhary et al., 2019).

У ряді досліджень показано органоспецифічність синтезу мітохондріальних HSP70 (Sung et al., 2001; Fietto et al., 2007; Swindell et al., 2007; Chaudhary et al., 2019). Про їх диференційну експресію в різних органах рослин протягом розвитку також свідчать дані eFP browser (<http://bar.utoronto.ca>). Зокрема, стосовно *AtHSP70-10* (*mtHsc70-2*) *Arabidopsis thaliana* показано, що його експресія виявлялась у коренях, стеблах, листках (найбільше), квітках, а також у стручках протягом дозрівання насіння та у насінні в період проростання (Sung et al., 2001). Однак, враховуючи те, що органи складаються з різних тканин із власними специфічними функціями, вивчення тканинної локалізації синтезу цих білків сприятиме глибшому розумінню особливостей їх функціонування. Наприклад, в тканинах стебла соняшника показано диференційну експресію генів низькомолекулярних HSP за нормальних умов і посухи (Almoguera et al., 1993). У проростків *Arabidopsis thaliana* відзначено певну тканинспецифічність експресії *AtHSP90-1* (Haralampidis et al., 2002) і п'яти цитозольних HSP70 (Leng et al., 2017). Проте питання клітинної локалізації мітохондріальних HSP70 у рослин залишається мало дослідженим.

Для з'ясування цього питання ми вивчали локалізацію експресії гена мітохондріального шаперона *AtHSP70-10* в проростках *A. thaliana* за нормальних умов, а також за дії високої тем-

ператури і водного дефіциту. *AtHSP70-10* (AT5G09590, інші назви HSC70-5, mtHSC70-2) – один з двох мітохондріальних членів родини HSP70 (підродина DnaK) у даного виду (Lin et al., 2001), який є чутливим до підвищених температур і посухи (Sung et al., 2001; Rizhsky et al 2004). Згідно з даними eFP browser (<http://bar.utoronto.ca>), значний рівень експресії *AtHSP70-10* притаманний насінню протягом дозрівання і першої доби проростання, тоді як в проростках загальний вміст його транскриптів невисокий.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили з проростками різушки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Brassicaceae) екотипу Columbia (Col-0) та трансгенної лінії GT_5_10609 із сигнальним геном *uidA*, який кодує фермент β-глюкуронідазу (GUS) під контролем промотора гена *AtHSP70-10* (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC, Великобританія). Екотип Col-0 використовували для аналізу генної експресії, лінію GT_5_10609 – для вивчення локалізації експресії *AtHSP70-10*.

Експерименти проводили в умовах стерильної культури. Насіння стерилізували з поверхні 70% етанолом протягом 2 хв і розчином гіпохлориту (3% Cl) протягом 10 хв, відмивали стерильною дистильованою водою 5 разів по 5 хв і витримували у вологих умовах при 4°C протягом 2 діб. Далі в експериментах з тепловою обробкою насіння висаджували у чашки Петрі на МС-середовище, яке містило 0,5 МС, 1% сахарози, 0,8% агару. Чашки з насінням тримали при 22±1°C і фотоперіоді 16/8 год (світло/темрява) при інтенсивності світла ~100 мкмоль м⁻²с⁻¹. Для аналізу використовували 10-12-добові проростки. Теплову обробку проводили шляхом експозиції закритих чашок з проростками на середовищі при 37°C протягом 0,5, 1, 2, 4, 8 і 24 год для аналізу генної експресії та 2 год для визначення її локалізації.

Моделювання прогресуючого водного дефіциту в умовах стерильної культури на агаризованому середовищі проводили, як описано раніше (Bobrownyzky, 2006; Козеко, 2018). Суть цього методу полягає в тому, що 6-добові проростки, вирощені на багатому середовищі І (МС, 4,5% сахарози, 1% агару, рН 5,7), перенесли на середовище ІІ (0,25 МС), залите під малим кутом, що створювало градієнт висихання зверху вниз. Чашки з проростками закривали целофановою плівкою (Sigma), проникною для водяної пари та розміщували вертикально. У

контролі проростки переносили у чашки з середовищем II рівної товщини, які закривали пластиковими кришками. За таких умов рослини вирощували ще 5 діб. Для аналізу генної експресії зразки проростків відбирали щодня протягом періоду дегідратації. Для аналізу локалізації генної експресії використовували 11-добові проростки (після 5 діб дегідратації).

Для аналізу генної експресії методом ЗТ-ПЛР наважку рослинного матеріалу (~100 мг) заморожували у рідкому азоті та гомогенізували. Загальну РНК екстрагували з використанням unniPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena) відповідно до інструкції виробника. РНК розчиняли у деіонізованій воді, вільній від РНКаз. Якість і кількість виділеної РНК визначали спектрофотометрично. 1 мкг РНК кожного зразка використовували для синтезу кДНК за допомогою RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific) і праймера oligo(dT)₁₈ відповідно до інструкції виробника. ПЛР з отриманою кДНК проводили з використанням PCR Master Mix (Thermo Scientific) і ген-специфічних праймерів: *AtHSP70-10* (5'-cggttcctctcctttctca-3' і 5'-tttggttaggtctattccc-3'), референтний ген *AtUBQ5* (5'-aacccttgagggtgaatcatcc-3', 5'-gtccttcttctggttaaacgt-3'). Пари праймерів конструювали за допомогою комп'ютерної програми IDT PrimerQuest Tool (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Нуклеотидні послідовності генів брали у банку даних NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Режим ампліфікації: 95°C – 2 хв; 25 циклів: (95°C – 30 с; Ta – 45 с; 72°C – 90 с); 72°C – 5 хв; Ta для *AtHSP70-10* дорівнювала 54°C, для *AtUBQ5* – 55°C. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,5%-агарозному гелі, візуалізували за допомогою бромистого етидію в УФ і фотографували.

Цитохімічне забарвлення β-глюкуронідази (GUS) проводили за (Weigel, Glazebrook, 2002) з модифікаціями. Проростки GT_5_10609 фіксували у фіксаторі (4% формальдегід у 0,1 М фосфатному буфері pH 7,0) протягом 30 хв на холоді, після чого кілька разів промивали у буфері та інкубували з субстратним розчином (0,05 М фосфатний буфер, 1 мМ K₄Fe(CN)₆, 1 мМ K₃Fe(CN)₆, 0,05% 5-бromo-4-хлоро-3-індоліл-β-D-глюкуронід (X-Gluc) у темряві при кімнатній температурі протягом ночі. Після забарвлення проростки промивали дистильованою водою, хлорофіл з тканин відмивали 70% етанолом. Проростки фотографували за допомогою камери Canon 700D з макрооб'єктивом Canon EF 100 мм та мікрос-

копа Axio Vision Zeiss (Німеччина). В кожному варіанті обстежували не менше 10 проростків.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Гістохімічний аналіз проростків трансгенної лінії *A. thaliana* GT_5_106091, що містить *AtHSP70-10-GUS*, за нормальних умов виявив інтенсивне GUS-забарвлення в гідатодах сім'ядоль і листків, прилистках, клітинах центрального циліндра кореня у зоні диференціації та зрілій зоні, а також слабе забарвлення – у меристемі кореня та кореневій шийці (рис. 1). Стосовно гідатод слід відзначити, що продукт гістохімічної реакції GUS детектували в апікальній гідатоді сім'ядоль, а також апікальній та латеральних гідатодах справжніх листків, як сформованих, так і тих, які ще ростуть (рис. 1, а, с-е). Більш детальний аналіз місць розташування гідатод показав інтенсивне забарвлення клітин палисадного і губчастого мезофілу та слабе забарвлення клітин епідерми, продихів і трихом (рис. 1 f-h). Гідатоли – високо спеціалізовані структури, які розташовані на кінці провідних пучків на краю листкової пластинки. Вони складаються з епітеми – безхлорофільних епідермальних клітин невеликих розмірів, які контактують з клітинами ксилеми і мезофілу (Candela et al., 1999; Недуха, 2011). Основна їх функція – забезпечення гутації, тобто активної секреції води з розчиненими іонами, метаболітами та білками, що потребує енергетично-залежного транспорту цих речовин і є одним з ключових регуляторів водного статусу рослин (Pilot et al., 2004).

Враховуючи те, що *AtHSP70-10* є шапероном мітохондрій, можна припускати його необхідність для підтримання енергозалежних процесів в клітинах гідатод і контактуючих з ними клітинах. Проте різниця в інтенсивності забарвлення між клітинами – висока в мезофілі та слабка в поверхневому шарі клітин, продихах і трихомах – вказує на специфічне залучення *AtHSP70-10* в певні клітинні процеси. Примітно, що гістохімічне забарвлення визначалось у трихомах, розташованих в районі гідатод, і було відсутнім у трихомах на іншій поверхні листкової пластинки. Такі результати можуть свідчити про системну регуляцію генної експресії і важливу роль цього шаперона у функціонально різних клітинах однієї структури.

Експресія *AtHSP70-10* в гідатолах і прилистках корелює з показаною іншими дослідниками експресією в цих структурах аскорбатпероксидази *Арх2*, яка є членом іншої універсальної захисної системи – антиоксидантної (Панчук та

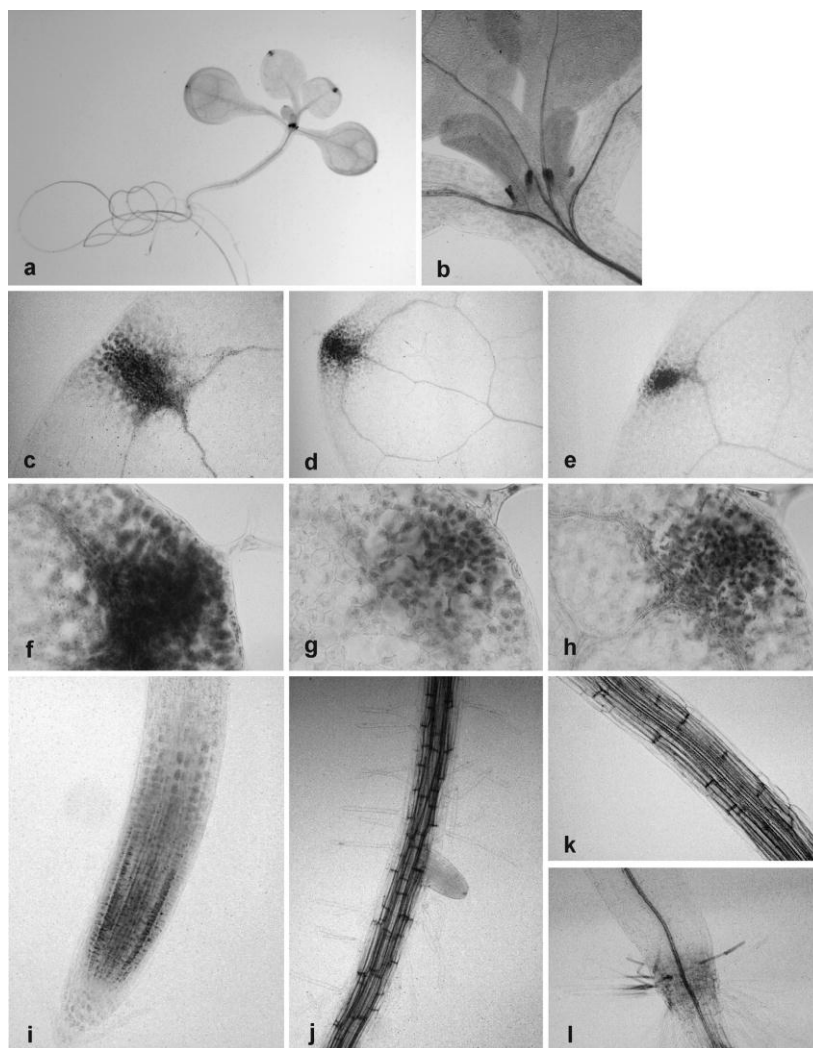


Рис. 1. Гістохімічний аналіз локалізації експресії *AtHSP70-10-GUS* в проростках трансгенної лінії GT_5_106091 за нормальних умов. (a) 12-добовий проросток; (b) апекс стебла з листками та прилистками; (c) апікальна гідатода сім'ядолі; (d, e) апікальна та латеральна гідатоли листка розетки; (f-h) фрагменти апікальної гідатоли листка із забарвленням у палисадному (f, h) і губчастому (g) мезофілі; (i-k) зони кореня: апекс (i), зона диференціації (j) і зріла зона (k); (l) коренева шийка.

[Fig. 1. Histochemical analysis of the spatial expression of *HSP70-10-GUS* in GT_5_106091 transgenic seedlings under normal conditions. (a) 12-d-old seedling; (b) apical shoot with leaves and stipules; (c) apical hydathode of cotyledone; (d, e) apical and lateral hydathodes of rosette leaf; (f-h) fragments of apical hydathode of leaf with staining in palisade (f, h) and spongy (g) mesophyll; (i-k) root zones: apex (i), differentiation zone (j) and mature zone (k); (l) root-shoot junction zone.]

ін., 2008). Крім того, експресію *AtHSP70-10* виявляли в провідних тканинах кореня і клітинах кореневої шийки, перехідної зони між кореневою та стебловою системою, для яких характерні інтенсивні транспортні процеси. Отримані дані дозволяють припускати, що синтез і функціонування цього шаперона притаманні клітинам окремих тканин з активним метаболізмом і транспортною функцією. Таке припущення узгоджується з тим, що однією з функцій шаперонів мітохондрій є підтримання розгорнутих білків, які транспортуються з цитозолу до ор-

ганели (Dudley et al., 1997; Kawai et al., 2001; Zhang, Glaser, 2002; Su, Li, 2010).

Наступним нашим завданням було з'ясувати особливості експресії *AtHSP70-10* в проростках даного виду за дії несприятливих факторів. Для цього ми визначали кінетику експресії гена в реакції теплового шоку і при прогресуючому водному дефіциті та оцінювали її локалізацію. Аналіз реакції на тепловий шок (37°C) за допомогою ЗТ-ПЛР показав швидку, в перші 0,5 год, активацію транскрипції цього гена, високий рівень транскриптів протягом

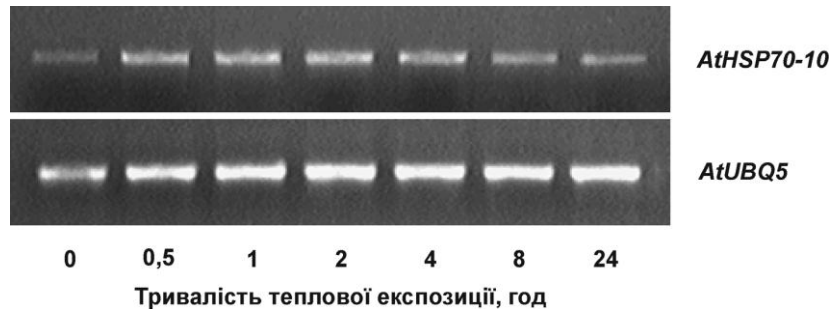


Рис. 2. Експресія гена *AtHSP70-10* у реакції теплового шоку проростків екотипу Col-0 при 37°C. Рівень транскриптів визначали за допомогою ЗТ-ПЛР; внутрішнім контролем служив *AtUBQ5*.

[Fig. 2. Expression of *AtHSP70-10* in heat shock response of Col-0 seedlings at 37°C. Transcript levels were assessed using RT-PCR; *AtUBQ5* was used as internal control.]

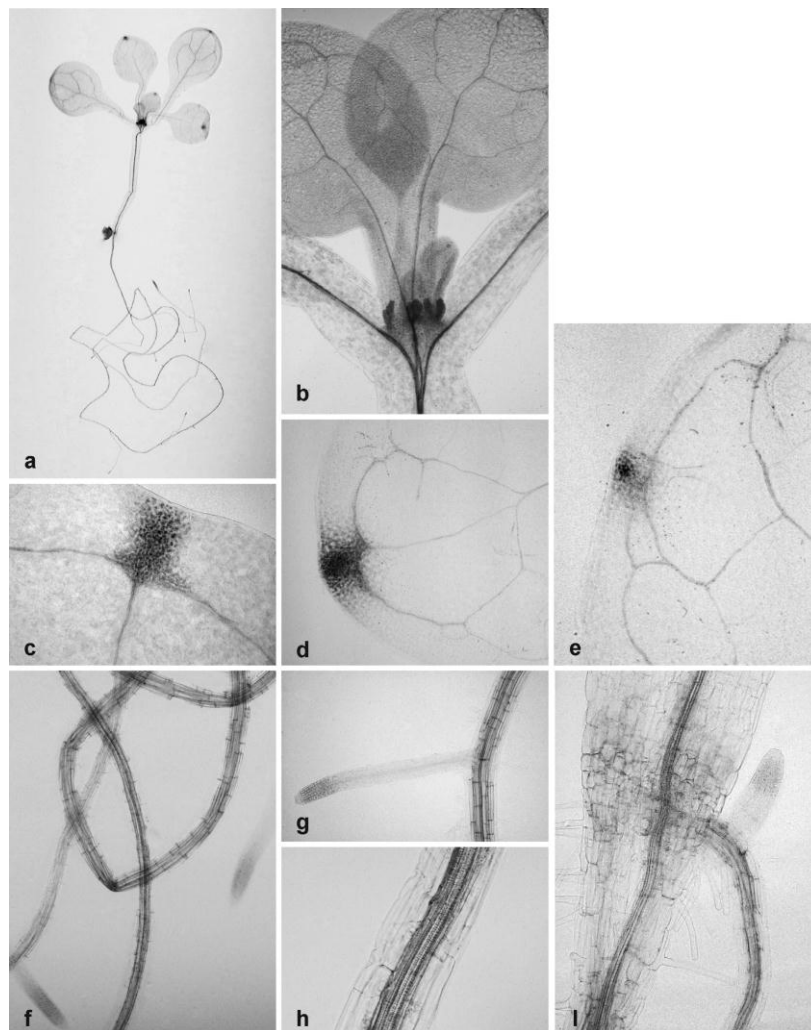


Рис. 3. Гістохімічний аналіз локалізації експресії *AtHSP70-10-GUS* в проростках трансгенної лінії GT_5_106091 після 2 год експозиції при 37°C. (a) 12-добовий проросток; (b) апекс стебла з листками та прилистками; (c) апікальна гідатода сім'ядолі; (d, e) апікальна та латеральна гідатоли листка розетки; (f) корені; (g) зона диференціації кореня з латеральним коренем; (h) зріла зона кореня; (i) коренева шийка.

[Fig. 3. Histochemical analysis of the spatial expression of *HSP70-10-GUS* in GT_5_106091 transgenic seedlings after 2-h exposition at 37°C. (a) 12-d-old seedling; (b) apical shoot with leaves and stipules; (c) apical hydathode of cotyledone; (d, e) apical and lateral hydathodes of rosette leaf; (f) roots; (g) differentiation root zone with lateral root; (h) mature root zone; (i) root-shoot junction zone.]

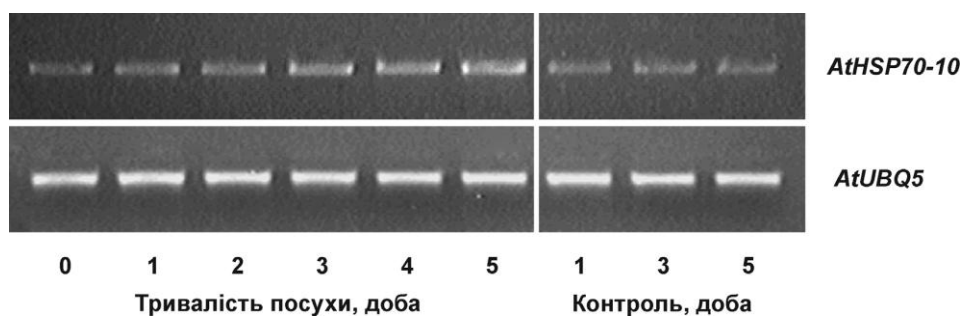


Рис. 4. Експресія гена *AtHSP70-10* у реакції проростків екотипу Col-0 на дегідратацію. Рівень транскриптів визначали за допомогою ЗТ-ПЛР; внутрішнім контролем служив *AtUBQ5*.

[Fig. 4. Expression of *AtHSP70-10* in response of Col-0 seedlings to dehydration. Transcript levels were assessed using RT-PCR; *AtUBQ5* was used as internal control.]

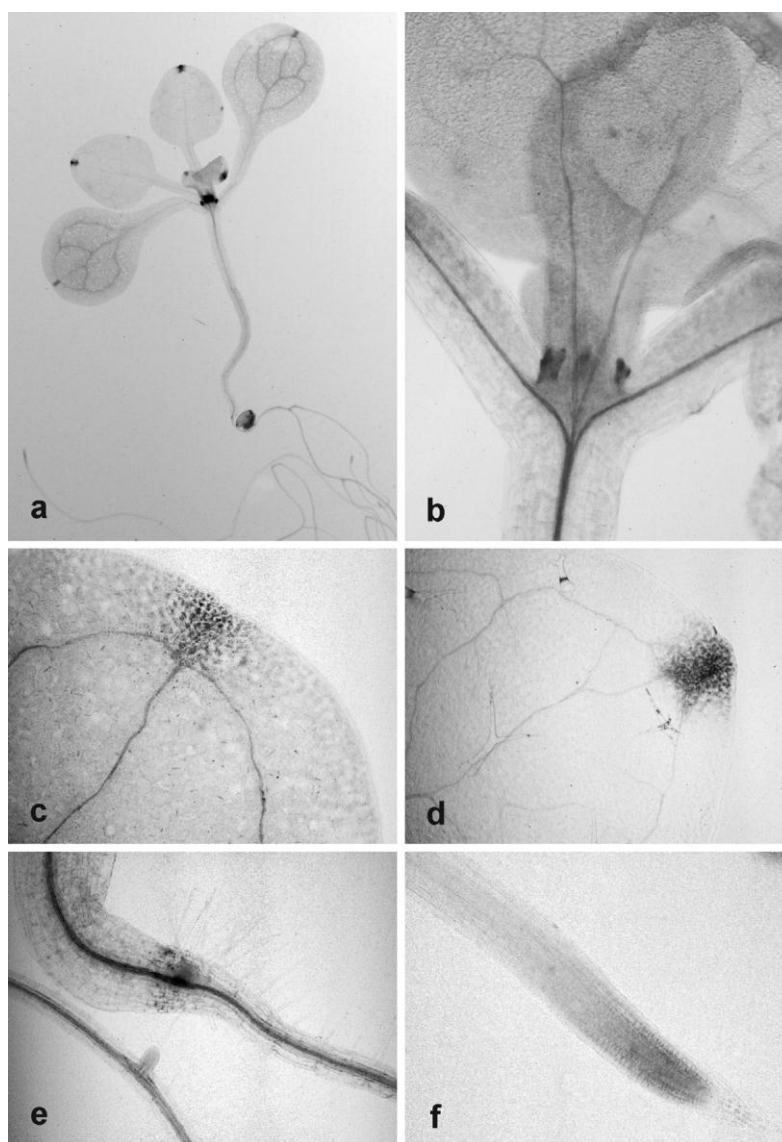


Рис. 5. Гістохімічний аналіз локалізації експресії *AtHSP70-10-GUS* в проростках трансгенної лінії GT_5_106091 після 5-добової дегідратації. (а) 11-добовий проросток; (б) апекс стебла з листками та прилистками; (с, d) апікальні гідатоди сім'ядолі та листка розетки; (е) коренева шийка; (f) апекс кореня.

[Fig. 5. Histochemical analysis of the spatial expression of *HSP70-10-GUS* in GT_5_106091 transgenic seedlings after 5-d dehydration. (a) 11-d-old seedling; (b) apical shoot with leaves and stipules; (c, d) apical hydathodes of cotyledone and rosette leaf; (e) root-shoot junction zone; (f) root apex.]

2 год, і подальше його поступове зниження (рис. 2). Швидку індукцію цього гена в реакції теплового шоку раніше визначали й інші дослідники (Sung et al., 2001). Проте, за їх даними, після значної індукції *AtHSP70-10* (*mtHSC70-2*) в перші півгодини теплової експозиції при 40°C вже у наступну годину наступала певна репресія. Такі розбіжності у ранній кінетиці транскрипції даного гена, на нашу думку, можуть бути пов'язані із застосованими високими температурами. Відомо, що температура 37°C максимально відповідає адаптивному потенціалу *A. thaliana* (Silva-Correia et al., 2014), чому, зокрема, може сприяти здатність клітин до підтримання високого рівня експресії мітохондріального *HSP70* протягом 2 год. На відміну від цього, температура 40°C, ймовірно може викликати швидше пошкодження і виснаження клітин, що призводить до більш швидкої репресії даного гена.

Гістохімічний аналіз *AtHSP70-10-GUS* проводили після 2 год теплової експозиції, коли вміст транскриптів даного гена був максимальним. За таких умов інтенсивне забарвлення GUS виявляли в гідатодах сім'ядоль і листків, прилистках, клітинах центрального циліндра кореня та кореневої шийки, проте воно було слабким у кореневому апексі головного кореня і не виявлялося у бічних коренях (рис. 3). Такий характер тканинної локалізації експресії *AtHSP70-10-GUS* загалом збігався з контролем.

Метод створення прогресуючого водного дефіциту шляхом підсихання агаризованого середовища протягом 5 діб, застосований нами для моделювання посушливих умов, за даними Bobrownyzky (2006), дає поступове зниження водного потенціалу середовища приблизно від -0,34 МПа на початку експерименту до -0,743 МПа наприкінці. За таких умов водний потенціал проростків *A. thaliana* змінюється приблизно від -0,12 МПа до -0,22 МПа (Bobrownyzky, 2006). За результатами ЗТ-ПЛР, розвиток водного дефіциту призводив до поступового посилення транскрипції *AtHSP70-10*, яка ставала більш вираженою після 3 діб і досягала максимального рівня на 5 добу експерименту (рис. 4). Високу чутливість даного гена до водного дефіциту раніше відзначали й інші дослідники (Rizhsky et al., 2004). Проте отримані нами дані чітко показують існування порогового рівня водного дефіциту, який призводив до активації транскрипції даного гена після 3 діб дегідратації середовища. Подібний характер генної

експресії за прогресуючого водного дефіциту раніше нами було відзначено для цитозольного індукцибельного *AtHSP70-5* (Козеко, 2018).

Визначення GUS-забарвлення у проростків GT_5_10609 наприкінці періоду дегідратації показало ідентичність характеру його локалізації до контролю (рис. 5), проте інтенсивність забарвлення несподівано виявилась дещо нижчою від такої у контролі. Останнє, за нашим припущенням, може бути пов'язано зі змінами під впливом водного дефіциту проникності оболонки і внутрішнього середовища клітин для компонентів гістохімічної реакції.

Отже, охарактеризована в цьому дослідженні тканиноспецифічність експресії *AtHSP70-10* суттєво доповнює відомості про диференційну експресію даного гена в різних органах *A. thaliana* (Sung et al., 2001) і свідчить про специфічне функціонування відповідного мітохондріального шаперона в певних клітинних структурах. Відзначено, що за впливу високої температури і водного дефіциту зміни стосувалися інтенсивності експресії цього гена, проте загальний характер її локалізації у тканинах проростків повністю зберігався. Враховуючи високу консервативність функцій мітохондріальних *HSP70* загалом (Sarkar et al., 2013), стабільну тканиноспецифічність експресії *AtHSP70-10* можна розглядати як результат адаптації функціонування цієї групи шаперонів до метаболізму рослин протягом еволюції.

ЛІТЕРАТУРА

- Козеко Л.Е. 2018. Участие цитозольных белков теплового шока HSP70 и HSP90 в адаптации к водному дефициту проростков *Arabidopsis thaliana*. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2 (44) : 41-49.
- Недуга О.М. 2011. Гетерофілія у рослин. Київ : 192 с.
- Панчук І.І., Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А. 2008. Експресія сигнального гену *Gus* під контролем промотору *APX2* у трансгенних рослинах арабідопсису. В кн.: Геном рослин. Збірник наукових статей. Одеса : 108-110.
- Almoguera C., Coca M.A., Jordano J. 1993. Tissue-specific expression of sunflower heat-shock proteins in response to water-stress. *Plant J.* 4 : 947-958.
- Bobrownyzky J. 2006. A method for the imitation of drought stress in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Інтродукція рослин.* 1 : 98-105.
- Candela H., Martínez-Laborda A., Micó J.L. 1999. Vernalization pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Developmental Biol.* 205 : 205-216.

- Chaudhary R., Baranwal V.K., Kumar R., Sircar D., Chauhan H. 2019. Genome-wide identification and expression analysis of Hsp70, Hsp90, and Hsp100 heat shock protein genes in barley under stress conditions and reproductive development. *Funct. Integr. Genomics*. 19 : 1007–1022.
- Dudley P., Wood C.K., Pratt J.R., Moore A.L. 1997. Developmental regulation of the plant mitochondrial matrix located HSP70 chaperone and its role in protein import. *FEBS Letters*. 417 : 321–324.
- Fietto L.G., Costa M.D.L., Cruz C.D., Souza A.A., Machado M.A., Fontes E.P.B. 2007. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3) suppl. : 881–887.
- Haralampidis K., Miliony D., Rigas S., Hatzopoulos P. 2002. Combinatorial interaction of cis elements specify the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiol.* 129 : 1138–1149.
- Herrmann J.M., Stuart R.A., Craig E.A., Neupert W. 1994. Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* 127 (4) : 893–902.
- Kawai A., Nishikawa S., Hirata A., Endo T. 2001. Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. *J. Cell Sci.* 114 : 3565–3574.
- Lee B., Ahn Y., Kang S.-M., Park Y., Jeon Y.-J., Rho J.M., Kim S.-W. 2015. Stoichiometric expression of mtHsp40 and mtHsp70 modulates mitochondrial morphology and cristae structure via Opa1L cleavage. *Molecular Biology of the Cell (MBoC)*. 26 : 2156–2167.
- Leng L., Liang Q., Jiang J., Zhang C., Hao Y., Wang X., Su W. 2017. A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 130 : 349–363.
- Li Q.B., Guy C.L. 2001. Evidence for non-circadian light/dark-regulated expression of Hsp70s in spinach leaves. *Plant Physiol.* 125 : 1633–1642.
- Lin B., Wang J., Liu H., Chen R., Meyer Y., Barakat A., Delseny M. 2001. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*. 6 (3) : 201–208.
- Liu S., Wang J., Cong B., Huang X., Chen K., Zhang P. 2014. Characterization and expression analysis of a mitochondrial heat-shock protein 70 gene from the Antarctic moss *Pohlia nutans*. *Polar Biol.* 37 (8) : 1145–1155.
- Pilot G., Stransky H., Bushey D.F., Pratelli R., Ludwig U., Wingate V.P.M., Frommer W.B. 2004. Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from hydathodes of *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*. 16 : 1827–1840.
- Qi Y., Wang H., Zou Y., Liu C., Liu Y., Wang Y., Zhang W. 2011. Overexpression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Lett.* 585 : 231–239.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134 : 1683–1696.
- Sarkar N.K., Kundnani P., Grover A. 2013. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress & Chaperones*. 18 (4) : 427–437.
- Silva-Correia J., Freitas S., Tavares R.M., Lino-Neto T., Azevedo H. 2014. Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods* 10 : 7. doi: 10.1186/1746-4811-10-7
- Su P.H., Li H.M. 2010. Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*. 22 : 1516–1531.
- Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* 126 : 789–800.
- Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. 8 : 125.
- Tang T., Yu A., Li P., Yang H., Liu G., Liu L. 2016. Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. *Sci. Rep.* 6 : 33650.
- Weigel D., Glazebrook J. 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 354 p.
- Williamson C.L., Dabkowski E.R., Dillmann W.H., Hollander J.M. 2008. Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 overexpression. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 : H249–H256.
- Zhang X.-P., Glaser E. 2002. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7 (1) : 14–21.

REFERENCES

- Kozeko L.Ye. 2018. Involvement of cytosolic heat shock proteins HSP70 and HSP90 in adaptation to water deficit of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Visn. Hark. nac. agrar. univ., Ser. Biol.* 2 (44) : 41–49. (In Russian).
- Nedukha O.M. 2011. *Heterophilia in Plants*. Kyiv : 192 p. (In Ukrainian).
- Panchuk I.I., Pyrizhok R.Yu., Volkov R.A. 2008. Expression of Gus signaling gene under control of APX2 promoter in transgenic *Arabidopsis* plants. In: *Genome of plant. Collected scientific articles*. Odesa : 108–110. (In Ukrainian).
- Almoguera C., Coca M.A., Jordano J. 1993. Tissue-specific expression of sunflower heat-shock proteins in response to water-stress. *Plant J.* 4 : 947–958.

- Bobrownyszky J. 2006. A method for the imitation of drought stress in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Інтродукція рослин*. 1 : 98-105.
- Candela H., Martinez-Laborda A., Micol J.L. 1999. Veneration pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Developmental Biol.* 205 : 205–216.
- Chaudhary R., Baranwal V.K., Kumar R., Sircar D., Chauhan H. 2019. Genome-wide identification and expression analysis of Hsp70, Hsp90, and Hsp100 heat shock protein genes in barley under stress conditions and reproductive development. *Funct. Integr. Genomics*. 19 : 1007–1022.
- Dudley P., Wood C.K., Pratt J.R., Moore A.L. 1997. Developmental regulation of the plant mitochondrial matrix located HSP70 chaperone and its role in protein import. *FEBS Letters*. 417 : 321-324.
- Fietto L.G., Costa M.D.L., Cruz C.D., Souza A.A., Machado M.A., Fontes E.P.B. 2007. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3) suppl. : 881-887.
- Haralampidis K., Miliony D., Rigas S., Hatzopoulos P. 2002. Combinatorial interaction of cis elements specify the expression of the *Arabidopsis* AtHsp90-1 gene. *Plant Physiol.* 129 : 1138-1149.
- Herrmann J.M., Stuart R.A., Craig E.A., Neupert W. 1994. Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* 127 (4) : 893-902.
- Kawai A., Nishikawa S., Hirata A., Endo T. 2001. Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. *J. Cell Sci.* 114 : 3565-3574.
- Lee B., Ahn Y., Kang S.-M., Park Y., Jeon Y.-J., Rho J.M., Kim S.-W. 2015. Stoichiometric expression of mtHsp40 and mtHsp70 modulates mitochondrial morphology and cristae structure via Opa1L cleavage. *Molecular Biology of the Cell (MBoC)*. 26 : 2156-2167.
- Leng L., Liang Q., Jiang J., Zhang C., Hao Y., Wang X., Su W. 2017. A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 130 : 349–363.
- Li Q.B., Guy C.L. 2001. Evidence for non-circadian light/dark-regulated expression of Hsp70s in spinach leaves. *Plant Physiol.* 125 : 1633-1642.
- Lin B., Wang J., Liu H., Chen R., Meyer Y., Barakat A., Delseny M. 2001. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*. 6 (3) : 201-208.
- Liu S., Wang J., Cong B., Huang X., Chen K., Zhang P. 2014. Characterization and expression analysis of a mitochondrial heat-shock protein 70 gene from the Antarctic moss *Pohlia nutans*. *Polar Biol.* 37 (8) : 1145-1155.
- Pilot G., Stransky H., Bushey D.F., Pratelli R., Ludwig U., Wingate V.P.M., Frommer W.B. 2004. Overexpression of GLUTAMINE DUMPER1 leads to hypersecretion of glutamine from hydathodes of *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*. 16 : 1827-1840.
- Qi Y., Wang H., Zou Y., Liu C., Liu Y., Wang Y., Zhang W. 2011. Overexpression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Lett.* 585 : 231-239.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134 : 1683-1696.
- Sarkar N.K., Kundnani P., Grover A. 2013. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress Chaperones*. 18 (4) : 427-437.
- Silva-Correia J., Freitas S., Tavares R.M., Lino-Neto T., Azevedo H. 2014. Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods* 10 : 7. doi: 10.1186/1746-4811-10-7
- Su P.H., Li H.M. 2010. Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*. 22 : 1516-1531.
- Sung D.Y., Vierling E., Guy C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* 126 : 789-800.
- Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. 8 : 125.
- Tang T., Yu A., Li P., Yang H., Liu G., Liu L. 2016. Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. *Sci. Rep.* 6 : 33650.
- Weigel D., Glazebrook J. 2002. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 354 p.
- Williamson C.L., Dabkowski E.R., Dillmann W.H., Hollander J.M. 2008. Mitochondria protection from hypoxia/reoxygenation injury with mitochondria heat shock protein 70 overexpression. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 : H249–H256.
- Zhang X.-P., Glaser E. 2002. Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7 (1) : 14-21.

Надійшла до редакції
12.09.2020 р.

**TISSUE SPECIFICITY OF EXPRESSION OF HEAT SHOCK GENE *ATHSP70-10*
IN *ARABIDOPSIS THALIANA* SEEDLINGS
UNDER NORMAL AND STRESS CONDITIONS**

L.Ye. Kozeko, E.L. Kordyum

*Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Science of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com*

Mitochondrial heat shock proteins of HSP70 family support protein homeostasis in mitochondria under normal and stress conditions. They provide folding and complex assembly of proteins encoded by mitochondrial genome, as well as import of cytosolic proteins to mitochondria, their folding and protection against aggregation. There are reports about organ-specificity of mitochondrial HSP70 synthesis in plants. However, tissue specificity of their functioning remains incompletely characterized. This problem was studied for mitochondrial AtHSP70-10 in *Arabidopsis thaliana* seedlings using a transgenic line with *uidA* signal gene under normal conditions, as well as high temperature and water deficit. Under normal conditions, histochemical GUS-staining revealed the expression of *AtHSP70-10* in cotyledon and leaf hydathodes, stipules, central cylinder in root differentiation and mature zones, as well as weak staining in root apex and root-shoot junction zone (See Fig. 1). RT-PCR analysis of wild-type seedlings exposed to 37°C showed rapid upregulation of *AtHSP70-10*, which reached the highest level within 2 h (See Fig. 2). In addition, the gradual development of water deficit for 5 days caused an increase in transcription of this gene, which became more pronounced after 3 days and reached a maximum after 5 days of dehydration (See Fig. 4). Histochemical analysis showed complete preservation of tissue localization of *AtHSP70-10* expression under both abiotic factors (See Figs. 3, 5). The data obtained indicate the specific functioning of mitochondrial chaperone AtHSP70-10 in certain plant cellular structures.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, HSP70, gene expression, tissue specificity, high temperature, water deficiency

**ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТЕПЛОВОГО
ШОКА *ATHSP70-10* В ПРОРОСТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA*
В НОРМАЛЬНЫХ И СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ**

Л. Е. Козеко, Е. Л. Кордюм

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

Митохондриальные белки теплового шока семейства HSP70 поддерживают белковый гомеостаз митохондрий в нормальных и стрессовых условиях, обеспечивая фолдинг и сборку комплексов белков, кодируемых митохондриальным геномом, импорт цитозольных белков в митохондрии, их фолдинг и защиту от агрегации. Сообщается об органоспецифичности синтеза митохондриальных HSP70 у растений. Однако вопрос тканеспецифичности их функционирования остается мало исследованным. Этот вопрос изучался для митохондриального AtHSP70-10 в проростках *Arabidopsis thaliana* с использованием трансгенной линии, содержащей сигнальный ген *uidA*, в нормальных условиях и при воздействии высокой температуры и водного дефицита. Гистохимическое GUS-окрашивание выявило экспрессию *AtHSP70-10* в нормальных условиях в гидатодах семядолей и листьев, прилистниках, клетках центрального цилиндра зоны дифференциации и зрелой зоны корня, а также слабый сигнал в апексе корня и в корневой шейке. По результатам ОТ-ПЦР-анализа проростков дикого типа тепловая экспозиция при 37°C приводила к быстрой активации транскрипции *AtHSP70-10*, которая достигала наивысшего уровня в течение 2 ч. Постепенное развитие водного дефицита в течение 5 суток

ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНІСТЬ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ТЕПЛОВОГО ШОКУ AtHSP70-10

вызывало усиление транскрипции этого гена, которое становилось более выраженным после 3 суток и достигало максимального уровня через 5 суток дегидратации. Гистохимический анализ показал полное сохранение тканевой локализации экспрессии *AtHSP70-10* при действии обоих абиотических факторов. Полученные данные свидетельствуют о специфическом функционировании митохондриального шаперона *AtHSP70-10* в определенных клеточных структурах.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *HSP70*, генная экспрессия, тканеспецифичность, высокая температура, водный дефицит