

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів  
Кафедра молекулярної генетики та біотехнології**

**БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ *sHSP* У  
*AMBORELLA TRICHOPODA* ТА *ORYZA SATIVA***

**Кваліфікаційна робота  
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

*Виконав:*

Студент 4 курсу, групи 407  
спеціальність 162 Біотехнології та  
біоінженерія

**Колосов Андрій Сергійович**

*Керівник:*

Доктор біологічних наук,  
професор **Панчук І.І.**

До захисту допущено:  
на засіданні кафедри  
протокол № 10 від 09 червня 2025 р.

Зав. кафедри \_\_\_\_\_ проф. Волков Р.А.

**Чернівці - 2025 р.**

## АНОТАЦІЯ

У геномі *A. trichopoda* є 24 гени sHSP, тоді як у *O. sativa* - 35. Довжина, молекулярна маса та розташування їхніх білків у клітині відрізняються. Хоча обидві родини sHSP розділені на структурні класи, амборелла має сім класів, а рис - вісім. Всі білки мають консервативний  $\alpha$ -кристалічний домен, але існує багато варіацій у N- та С-кінцевих ділянках. Згідно з філогенетичним аналізом, кожен вид має як унікальні, так і спільні білки, що свідчить про втрату окремих генів і розширення еволюційних процесів. Різні види мають різну екзон-інтронну структуру генів, причому одноінтронні гени є більш поширеними. Порівняно з амбореллою, рис мав більш рівномірний, але нерівномірний розподіл генів sHSP. Це свідчить про те, що родина має складну еволюційну історію, яка включає в себе адаптацію до стресу та відбір.

**Ключові слова:** *Oryza sativa*, *Amborella trichopoda*, sHSP,  $\alpha$ -кристалічний домен, філогенетичний аналіз, структурні класи, клітинна локалізація, геном, хромосомне розташування, інтрони.

## ANOTATION

*A. trichopoda* has 24 sHSP genes in its genome, while *O. sativa* has 35. The length, molecular weight, and location of their proteins within the cell all differ. Although the two sHSP families are separated into structural classes, amborella has seven classes and rice has eight. All proteins have the conserved  $\alpha$ -crystalline domain, but there is a lot of variation in the N- and C-terminal regions. According to phylogenetic analysis, each species has both unique and common proteins, which indicates the loss of individual genes and the expansion of evolutionary processes. Different species have different exon-intron gene structures, with single-intron genes being more common. Compared to amborella, rice had a more uniform but uneven distribution of sHSP genes. This suggests that the family has a complicated evolutionary history that involves stress adaptation and selection.

**Keywords:** *Oryza sativa*, *Amborella trichopoda*, sHSP,  $\alpha$ -crystalline domain, phylogenetic analysis, structural classes, cellular localisation, genome, chromosomal location, introns.

## ЗМІСТ

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВСТУП .....                                                                              | 5  |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....                                                         | 7  |
| 1.1. Антиоксидантні та шаперонні механізми захисту рослин за умов<br>теплого стресу..... | 7  |
| 1.2. Малі білки теплового шоку sHSP: структура і функції .....                           | 9  |
| 1.3. Класи sHSP у рослин .....                                                           | 12 |
| 1.4. Модель шаперонної активності sHSP .....                                             | 13 |
| 1.5. Дослідження функцій sHSP in vivo .....                                              | 14 |
| 1.6. Біоінформатичні підходи у дослідженні sHSP .....                                    | 16 |
| 1.7. Виклики та обмеження біоінформатичних методів .....                                 | 18 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ .....                                                      | 20 |
| РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....                                                | 26 |
| ВИСНОВКИ.....                                                                            | 43 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....                                                         | 44 |
| ДОДАТКИ.....                                                                             | 48 |

## **Список умовних скорочень**

ТС – тепловий стрес

APX - аскорбатпероксидаза

ASA - аскорбінова кислота

BI – (Bayesian inference) Бассове висновування

CAT - каталаза

GPX – глутатіонпероксидаза

GSH - відновлений глутатіон

GST - глутатіон-S-трансфераза

HSF - Heat Shock Factor

HSP – Heat Shock Protein

IPCC – intergovernmental panel on climate change

ML – (Maximum likelihood) максимальна правдоподібність

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NJ – (Neighbor joining) приєднання сусідів

POD – пероксидаза

sHSP – small Heat Shock Protein

SOD - супероксиддисмутаза

## ВСТУП

Згідно з даними IPCC (Міжурядова група експертів зі зміни клімату, 2023), глобальне потепління продовжуватиме зростати в період 2021–2040 років, (приблизно до підвищення на 1,5 °C). Унаслідок глобальних кліматичних змін підвищення середньої температури створило загрозливий вплив на виробництво сільськогосподарських культур у вигляді масштабного зниження врожайності на 15–35 % (Sun et al., 2020). Таким чином, зменшується харчовий ресурс для зростаючого населення. Тому існує нагальна потреба в розробці стратегій, спрямованих на стимулювання сільськогосподарського виробництва, з одночасним забезпеченням продовольчої безпеки.

Одним із основних викликів, що загрожує стійкості агровиробництва, є підвищення температури понад оптимальний рівень, що може призвести до незворотних пошкоджень росту рослин, що називається тепловим стресом. Він у свою чергу негативно впливає на фізіологічні процеси та цілісність рослин, а також суттєво знижує врожайність і біорізноманіття. Останнє включає втрату ключових видів, інвазію нових видів та зміну структури екосистеми (Zhao et al. 2020). Тепловий стрес спричиняє пошкодження мембран та вбудованих у неї білків, порушує їхні біосинтетичні процеси шляхом інактивації ключових ферментів. До того ж деструктивно впливає на ріст і поділ клітин (Qi and Zhang, 2020). Таке масштабне пошкодження клітинних компартментів призводить до оксидативного стресу та суттєво обмежує ріст культур.

Проте в рослин існує ряд механізмів для боротьби з наслідками абіотичних стресових факторів, зокрема і оксидативного стресу. Малі білки теплового шоку виступають як перша лінія захисту клітини, запобігаючи необоротній агрегації білків, стабілізуючи їх у стані, придатному для повторного згортання за допомогою інших шаперонів (Volkov et al., 2006). Це запобігання агрегації має вирішальне значення для виживання клітини під час теплового стресу та інших несприятливих умов.

Однак, попри їхні захисні функції, механізми дії sHSPs все ще остаточно не з'ясовані, і залишаються суперечності щодо їхніх взаємодій з іншими білками

та точних шляхів, за допомогою яких вони забезпечують стійкість до стресу (Do et al., 2023). А маніпуляція шляхами експресії та регуляції sHSPs може призвести до створення культур із покращеною стійкістю до стресів, що є критично важливим на тлі глобальних змін клімату.

Тому метою роботи було провести біоінформатичний аналіз генів sHSP у *Amborella trichopoda* та *Oryza sativa*.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Здійснити пошук генів sHSP у геномах *Amborella trichopoda* та *Oryza sativa* у базі даних GenBank.
2. Провести множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей генів sHSP *Amborella trichopoda* та *Oryza sativa*.
3. Побудувати філогенетичне дерево на основі вирівняних послідовностей методом Neighbor Joining та PhyML, з використанням серверу iTOL.
4. Провести класифікацію білків sHSP за структурними класами на основі філогенетичного розміщення та наявності консервативних доменів.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Антиоксидантні та шаперонні механізми захисту рослин за умов теплового стресу

Навіть короточасний вплив теплового стресу може суттєво знизити продуктивність сільськогосподарських культур через знижену здатність використання поживних речовин рослинами, що виникає внаслідок порушення ключових функціональних процесів та індукції оксидативного стресу (Wang et al., 2018). Більше того, на стадії наливу зерна навіть короточасний вплив ТС може пришвидшити його наповнення, але кінцевим результатом стане зниження якості зерна, що призводить до втрат урожаю. Водночас здатність рослин виживати за умов оксидативного стресу залежить від балансу між утворенням і знешкодженням активних форм кисню (АФК) за допомогою ряду ферментативних і неферментативних механізмів детоксикації (Mishra et al., 2023).

Механізми детоксикації рослин, які знижують рівень АФК у клітинах, таких як супероксид-аніон радикал ( $O^{2-}$ ) та перекис водню ( $H_2O_2$ ), включають продукування антиоксидантних ферментів, таких як пероксидаза (POD), каталаза (CAT), аскорбатпероксидаза (APX) та супероксиддисмутаза (SOD). Тепловий стрес посилює утворення АФК шляхом деактивації ключових антиоксидантних ферментів, таких як SOD, CAT, APX, глутатіон-S-трансфераза (GST) і глутатіонпероксидаза (GPX), а також шляхом зниження біосинтезу неферментативних антиоксидантів, таких як відновлений глутатіон (GSH), аскорбінова кислота (ASA) та фенольні сполуки (Chauhan et al., 2022). Тривалість, частота та інтенсивність високих температур порушують роботу електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ), посилюючи утворення АФК у мітохондріях та хлоропластах. Утворення АФК призводить до окисного пошкодження клітинних макромолекул, таких як нуклеїнові кислоти, ліпіди та білки, а також первинних і вторинних метаболітів усередині клітин рослин, що у кінцевому результаті призводить до загибелі клітин шляхом запрограмованої клітинної смерті (Saha et al., 2021). Екстремальна спека також ускладнює

накопичення осмолітів, таких як пролін та розчинні цукри, і біосинтез білків теплового шоку (HSP), які захищають органели клітин під час зневоднення, спричиненого ТС (Saha et al., 2021).

Кожна рослина має певний діапазон температур навколишнього середовища для оптимального росту та розвитку. Рослини, як і всі інші організми, демонструють різке перепрограмування експресії генів у відповідь на підвищення температури на  $\geq 10^{\circ}\text{C}$  відносно оптимальної для росту. Ця збережена реакція, відома як «тепловий шок», супроводжується активацією транскрипції та трансляції групи генів, які кодують відповідні білки теплового шоку (HSPs).

Білки теплового шоку функціонують як молекулярні шаперони, регулюючи згортання білків, їхнє складання, транспортування та деградацію. Ці білки належать до великої родини індукованих теплом молекулярних шаперонів, яка також включає HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 і малі HSP. Експресія HSP регулюється HSF (фактори теплового шоку), який позитивно впливає на стійкість рослин до ТС. Зокрема, HSFA вважається основним регулятором сприйняття сигналів і їхньої передачі, а також регуляції генів, відповідальних за відповідь на тепловий стрес (Waters and Vierling, 2020; Mondal et al., 2023). Крім того, експресія sHSPs змінюється залежно від стадій розвитку рослини, що свідчить про адаптивний підхід до управління стресом, узгоджений із фазами росту та умовами середовища. (Do et al., 2023)

Крім того, експресія sHSPs є тонко регульованою і активується різними біотичними та абіотичними стресовими факторами. Наприклад, тепловий стрес активує каскад теплового шоку (HSF), який, у свою чергу, стимулює експресію генів sHSP, забезпечуючи швидку адаптаційну відповідь (Volkov et al., 2005).

sHSPs продукуються у відповідь на різні впливи довкілля, такі як висока температура, холод, посуха та засолення (Tian et al., 2021; Banerjee & Roychoudhury, 2018). Наприклад, у дослідженні (González-Gordo et al., 2023) вивчали *Solanum melongena* L., який піддавали впливу стресових чинників, таких як висока температура ( $45^{\circ}\text{C}$ ), засолення (200 mM NaCl) та посуха (150 mM



манітолу), щоб оцінити експресію гена *shsp24.1* у листках середнього ярусу. Результати показали, значне підвищення експресії гена *shsp24.1* після впливу стресових факторів, що означає ключову роль білків теплового шоку у регуляції відповідей на стрес. Ще одним прикладом, HSP17.5CI із ячменю проявляє шаперонну активність у бактерії *Escherichia coli*, підвищуючи її термостійкість, що свідчить про високий рівень функціональної консервативності серед різних видів. Аналогічно, у томатах цитозольні sHSPs Hsp17.7 та Hsp17.3 були пов'язані зі збільшенням осмотолерантності, коли гени, що кодують ці білки надекспресувалися, що демонструє їхню роль у толерантності до стресу (Mondal et al., 2023).

### **1.2. Малі білки теплового шоку sHSP: структура і функції**

Малі білки теплового шоку (sHSPs) — це повсюдно поширена родина білків, що виявляється у архей, бактерій і еукаріотів. У рослин, як і в інших організмах, sHSPs активуються у відповідь на стрес і, як вважається, виконують функцію молекулярних шаперонів, захищаючи інші білки від ушкодження, спричиненого стресом. Вони демонструють складну структуру, яка має вирішальне значення для їхньої ролі як молекулярних шаперонів у рослинах. Їхня активність залежить від третинної та четвертинної структури білка, яка визначає їхню здатність взаємодіяти з неправильно згорнутими білками під час стресових умов (Guo et al., 2020). Попри відмінності у первинній структурі, спричинені еволюційною адаптацією, sHSPs зберігають консервативні елементи вторинної структури, що свідчить про їхню спільну еволюцію та функціональне значення. Гомологія послідовностей між sHSPs із різних класів становить від 62% до 80%, що підкреслює високий ступінь консервативності в межах цієї родини, особливо серед злакових культур (Tian et al., 2021). Ці білки зазвичай функціонують як олігомери, утворюючи великі комплекси з 12 або більше субодиниць, що підсилює їхню здатність запобігати агрегації білків і сприяти їхньому правильному згортанню за стресових умов (Mondal et al., 2023).

sHSPs мають спільний  $\alpha$ -кристаліновий домен зі структурою  $\beta$ -сендвіча та варіативний N-кінцевий домен. Хоча молекулярна маса sHSPs становить 12–25 кДа, більшість із них формують олігомери, що складаються щонайменше з 12 субодиниць. Рослинні sHSPs вирізняються особливою різноманітністю та чисельністю — у деяких видів їх може бути до 40. У покритонасінних ця різноманітність представлена щонайменше 11 класами sHSP, білки яких локалізовані в цитозолі, ядрі, ендоплазматичному ретикуліумі, хлоропластах, мітохондріях і пероксисомах.

Гени *shsps* зазнали дуплікації у межах окремих філогенетичних ліній, диференціюючись ще на ранніх етапах еволюції наземних рослин, імовірно, як адаптація до стресових умов наземного середовища. Подальше розширення відбулося у насінних рослин і повторно — у покритонасінних. Із розширенням баз даних геномів і транскриптомів рослин з'явиться можливість глибше дослідити еволюційні механізми, що спричинили різноманіття sHSP (Waters & Vierling, 2020).

Рослинні sHSPs гомологічні sHSP інших організмів. Таким чином, sHSPs класифікуються як білки HSP20/ $\alpha$ -кристалін (PFAM HSP20/ $\alpha$ -crystallin PF00011; El-Gebali et al., 2019), і їхній основний домен позначається як  $\alpha$ -кристаліновий домен (ACD). ACD містить приблизно 90 амінокислот і утворює компактну структуру з семи  $\beta$ -листків, яка є структурним ядром усіх sHSPs. Цей домен оточений варіативним N-кінцевим доменом (NTD), зазвичай <85 амінокислот, та коротким C-кінцевим розширенням (CTE), як це проілюстровано для кількох sHSP у *Arabidopsis thaliana* (рис. 1a).

(a) Схематичне зображення основних класів sHSP на основі всіх представників у *A. thaliana*. Основні домени позначено відповідно до опису в тексті. Рожеві області в альфа-кристалінових доменах (ACD) і світло-коричневі області у C-кінцевих розширеннях (CTE) цитозольного класу II (CII) відповідають логотипам на рис. (b) і (c). Світло-коричневі області у CTE sHSP, що локалізуються в ендоплазматичному ретикуліумі (ER) та пероксисомах (PX),

позначають відповідні сигнали націлювання. Світло-коричнева ділянка в білку цитозольного класу IV (CIV) відповідає двом С-кінцевим залишкам аланіну.

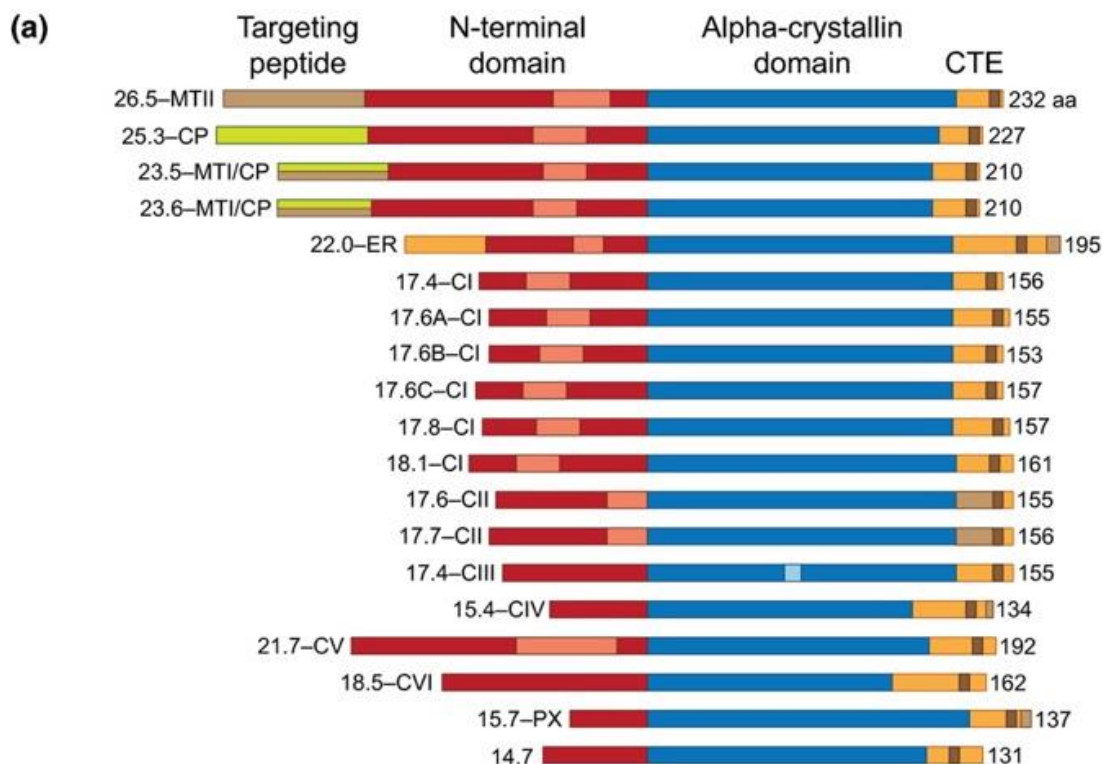


Рис. 1. (початок). Малі білки теплового шоку (sHSPs) у *Arabidopsis thaliana*.

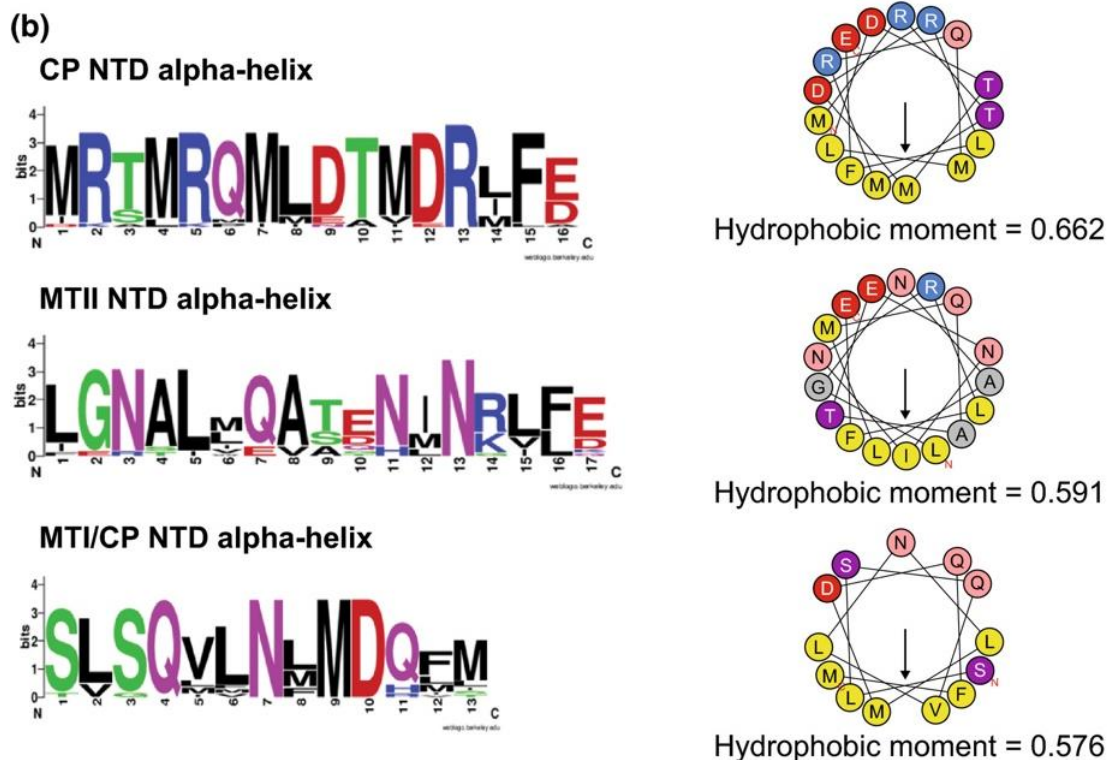


Рис. 1. (продовження).

(b) Зліва: Амінокислотні LOGOS (графічне представлення консервативних послідовностей), отримані шляхом вирівнювання білків хлоропластів (CP),

мітохондрій II (MTII) або мітохондрій I/хлоропластів (MTI/CP) з різних родин sHSP покритонасінних (Crooks et al., 2004). Справа: Гвинтове (спіральне) колесо, яке відображає LOGOS зліва, побудоване за допомогою HeliQuest. Стрілка вказує напрям гідрофобного моменту спіралі.

(c)

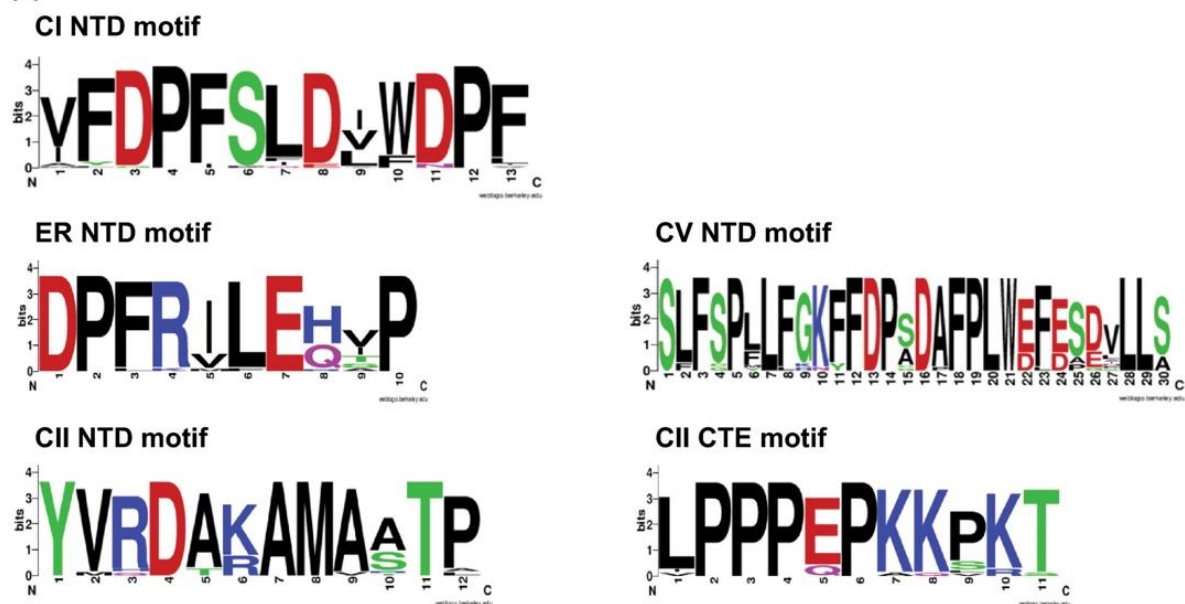


Рис. 1. (продовження).

(c) LOGOS для інших консервативних мотивів у зазначених sHSP, які розглядаються у тексті. Отримані шляхом вирівнювання послідовностей щонайменше 22 sHSP із різних родин покритонасінних.

### 1.3. Класи sHSP у рослин

Визначення генів, що кодують sHSP в покритонасінних рослинах створює основу для детального обговорення еволюції та функцій sHSP. В ангіосперм можна виділити одинадцять класів (або підродин) генів sHSP, і деякі види рослин мають понад 20 окремих генів sHSP, що значно більше, ніж у інших еукаріотів (Waters et al., 2008). Зокрема, у квіткових рослин, як показано на прикладі *Arabidopsis thaliana*, існує шість класів, що кодують білки, які локалізовані в мембранних органелах клітини: хлоропластах (CP), мітохондріях (MTII), ендоплазматичного ретикулума (ER), пероксисом (PX) та ядра (CIII), а також білки, що локалізуються— як у мітохондріях, так і хлоропластах (MTI/CP).

Консервативність цих класів підтверджується численними аналізами sHSP у секвенованих геномах і транскриптомах рослин (Ma et al., 2019). Існують також п'ять класів sHSP, які називаються цитозольними; вони не мають специфічного сигнального пептиду для транспорту, хоча інколи можуть також виявлятися у ядрі (CI, CII, CIV, CV та CVI). Наявність органел-спрямованих sHSP, схоже, є унікальною особливістю рослин, оскільки за межами рослинної лінії всі відомі sHSP є цитозольними або ядерними білками, за винятком мітохондріальних sHSP, описаних у *Drosophila* (Dabbaghizadeh et al., 2018). У *A. thaliana* також виявлено додатковий sHSP — Hsp14.7, який не є консервативним за межами тісно споріднених видів і тому вважається «сирітським» (orphan) sHSP.

#### 1.4. Модель шаперонної активності sHSP

Філогенія родини sHSP/ $\alpha$ -кришталіну свідчить про те, що еукаріотичні sHSP утворюють монофілетичну групу, а  $\alpha$ -кришталінові білки виникли в результаті подвоєння та дивергенції від sHSP на ранніх етапах еволюції. Також очевидно, що ангіоспермні sHSP походять від давньої події, яка призвела до окремої еволюційної траєкторії порівняно з метазойними, архейними та еубактеріальними sHSP (Basha et al., 2012). Однією з найцікавіших особливостей рослинних sHSP є їх складність порівняно з іншими лініями еукаріотичних sHSP (Waters et al., 2008; Bondino et al., 2012). В еволюційному плані вони демонструють модель «розширення, специфічного для лінії». Родини генів проходять постійний процес «появи і фрагментації» або дублювання й делеції генів. Більшість окремих дублювань генів з часом втрачаються, якщо на них не діє добір (Panchy et al., 2016). Розширення генів у межах однієї лінії свідчить про потужний добір, спрямований на збереження дуплікованих генів. Еволюція sHSP у рослин свідчить про те, що в межах рослинної лінії існував потужний добір на збереження великої кількості різноманітних класів sHSP.

Незважаючи на велику різноманітність, сучасна модель функціонування sHSP припускає, що всі sHSP діють як АТФ-незалежні молекулярні шаперони, які захоплюють субстратні білки, денатуровані внаслідок стресу. Субстрати,

зв'язані з sHSP, захищені від незворотної денатурації та можуть піддаватися дії АТФ-залежних шаперонів — Hsp70/DnaK і ко-шаперонів, разом із білковим дисагрегазом Hsp100/ClpB — для повторного згортання (Haslbeck & Vierling, 2015; Santhanagopalan et al., 2015).

Усі компоненти моделі присутні в цитозолі, мітохондріях та хлоропластах рослин, і перераховані вище процеси можуть відбуватися у цих компартментах. У цитозолі гомолог Hsp100/ClpB (у рослин відомий як Hsp101 або ClpB1, At1g74310 у *A. thaliana*) є недетектованим або присутній на дуже низькому рівні в вегетативних тканинах, але, як і sHSP, сильно індукується у відповідь на стрес. Варто зазначити, що рослини — єдині багатоклітинні еукаріоти, які мають цитозольний білок Hsp100/ClpB. Хлоропластні та мітохондріальні гомологи (ClpB3/APG6/At5g15450 та ClpB4/Hsp98.7/At2g25140 відповідно у *A. thaliana*) присутні постійно, хоча й також піддаються індукції стресом, а хлоропластний Hsp100/ClpB є необхідним для нормального розвитку та функціонування хлоропластів (Mishra & Grover, 2016; Muthusamy et al., 2016). Існує кілька ізоформ Hsp70 у всіх трьох клітинних компартментах, деякі з яких експресуються протягом усього росту і розвитку рослини, а інші індукуються специфічно тепловим стресом (Lin et al., 2001; Sung et al., 2001).

### 1.5. Дослідження функцій sHSP *in vivo*

Незважаючи на численні експерименти *in vitro*, що демонструють здатність багатьох різних sHSP запобігати нерозчинності денатурованих модельних субстратів, аналіз функцій sHSP *in vivo* значно відстає. Дослідження (Merino et al., 2014) продемонструвало підвищення експресії CI sHSP, що може посилити термостійкість і ріст у трансгенних деревах тополі. Також Zhang et al., (2018) повідомили, що RNAi CI sHSP у томатах знижувала вміст сахарози та фруктози в плодах, що дозрівають. McLoughlin et al., (2016) також показали пригнічення експресії CI або CII sHSP у *A. thaliana* за використання методу RNAi, автори інтерпретували результати тим, що sHSP необхідні для

відновлення рослинної клітини після сильного теплового стресу (10 годин при 45°C).

Декілька досліджень були присвячені вивченню функції sHSP, локалізованих у хлоропластах, представлених білком Hsp25.3-CP з *Arabidopsis thaliana* (часто називають Hsp21 на основі молекулярної маси зрілого білка). Zhong та ін. (2013) виявили, що мутант HSP25.3-CP з нокаутом гена нормально розвивається за відсутності стресу, а єдиним фенотипом стресу була нездатність сім'ядоль позеленіти після теплового стресу темно-рослих проростків. Натомість Chauhan та ін. (2012) повідомили, що у рослин *A. thaliana*, в яких експресія Hsp25.3-CP була знижена за допомогою антисенсової РНК, спостерігалось зниження продуктивності насіння, вони не відновлювались після 2-годинного теплового впливу при 39°C та не змогли набутися теплової толерантності.

Chen та ін. (2017) повідомили, що надекспресія sHSP хлоропластів могла відновити функцію мутанта *A. thaliana*, дефектного за сигнальним шляхом від хлоропласту до ядра (*gun5*), і що цей sHSP взаємодіє з білками D1 та D2 фотосистеми II. Zhong та ін. (2013) надали докази взаємодії Hsp25.3-CP з pTAC5 — компонентом пластидного транскрипційно активного хроматину (pTAC) за результатами ко-імунопреципітації. Проте ці дослідження не довели, що мічені варіанти sHSP хлоропластів, використані в деяких аналізах, могли компенсувати втрату функції у мутанта з нокаутом або що нативна структура sHSP була збережена, тому отримані результати слід тлумачити з обережністю.

Окрім критичних функцій, які sHSP можуть виконувати під час теплового стресу, вже понад два десятиліття відомо, що sHSP експресуються як частина програми розвитку дозрівання насіння, і нещодавні транскриптомні аналізи sHSP підтверджують, що мРНК sHSP експресуються в насінні багатьох видів рослин (González-Gordo et al., 2023). Кілька класів sHSP накопичуються та присутні у сухому насінні, але швидко зникають після проростання. Гени sHSP, що експресуються в насінні, включають sHSP, мітохондріальні, (класи MTI/CP; MTII), пероксисомні (клас PX), а також ядерні білки (клас CIII та цитозольний клас CVI). Дані, що накопичуються, продовжують свідчити про те, що експресія

sHSP регулюється специфічними транскрипційними факторами, чутливими до абсцизової кислоти (ABA), а також факторами теплового шоку, і що sHSP відіграють роль у життєздатності та довговічності насіння (Kaur et al., 2015, 2016). До того існує гіпотеза, що sHSP класів CI та CII сприяли толерантності до висихання у перших наземних рослин, і ця активність могла б виконувати подібну функцію в насінні. І окрім цього, припускають, що sHSP залучені до реактивації трансляції під час набухання насіння, що пов'язано з спостереженнями про їхню асоціацію зі специфічними факторами трансляції під час теплового стресу (Dirk & Downie, 2018).

Нещодавно була запропонована конкретна роль sHSP класу MTI/CP у проростанні насіння (Ma et al., 2019). Надекспресія або недостатня експресія Hsp24.7 з *Gossypium hirsutum* (ортологу Hsp23.5-MTI/CP з *A. thaliana*) відповідно підвищувала або знижувала проростання насіння у трансгенної бавовни, а гетерологічна надекспресія також посилювала проростання у *A. thaliana* та томатів. Дослідження *in vitro* свідчать про те, що Hsp24.7 взаємодіє з фактором, необхідним для дозрівання цитохрому с (CCMFC). Автори припускають, що мітохондріальний sHSP сприяє проростанню, блокуючи електронний транспорт на рівні цитохрому с, що призводить до підвищення рівня активних форм кисню, які сприяють розриву насінневої оболонки та проростанню. Вони також припускають, що підвищення рівня Hsp24.7 із підвищенням температури є частиною механізму, за допомогою якого вищі температури можуть стимулювати проростання (Waters & Vierling, 2020; Wu et al., 2022).

### **1.6. Біоінформатичні підходи у дослідженні sHSP**

Біоінформатичні підходи дедалі частіше застосовуються для розуміння складних взаємодій і структурних варіацій sHSP. Ці методи допомагають аналізувати просторові координати структур білків і пояснювати взаємодії, що сприяють їхній функції. За допомогою комп'ютерного моделювання та структурної біоінформатики дослідники можуть передбачити динаміку sHSP та



їхню взаємодію з різними клітинними компартментами, що, у свою чергу, поглиблює розуміння їхньої ролі у клітинній відповіді на стресові чинники.

Одним із основних інструментів, що використовується для ідентифікації sHsp, є NCBI BLAST, який дозволяє виявляти sHsp і перевіряти, чи містять секвеновані фрагменти консервативні домени, характерні для цих білків (Hussain & Brooks, 2024). Крім того, онлайн-ресурс sHSPdb надає класифікацію та докладні властивості sHsp разом із інструментами для структурного та функціонального аналізу. Відкриті рамки зчитування (ORF), трансляції та прогнози вторинної структури sHsp зазвичай отримують за допомогою онлайн-платформ біоінформатики (Hussain & Brooks, 2024).

Щоб полегшити порівняння sHsp у різних групах, гени інших видів часто завантажують із баз даних, таких як GenBank, і вирівнюють за допомогою програмного забезпечення, як-от MEGA6 (Xie et al., 2025). Такий підхід порівняльної геноміки допомагає ідентифікувати нові підродиної та нові sHsp у різних геномах, що дає уявлення про їхні еволюційні траєкторії (Xie et al., 2025).

Філогенетичний аналіз послідовностей sHsp проводиться із використанням кількох методологій, включно з методами Байєсівського виведення (BI), максимальної подібності (ML) та приєднання сусідів (NJ). Аналіз BI зазвичай виконується за допомогою MrBayes, що дозволяє тестувати складні еволюційні моделі (Xie et al., 2025; Hussain & Brooks, 2024). Ці аналізи допомагають з'ясувати взаємозв'язки між різними sHsp, що сприяє глибшому розумінню їхніх біологічних функцій та адаптацій. Крім аналізу послідовності та філогенетичного аналізу, біоінформатика також відіграє вирішальну роль у прогнозуванні тривимірних структур sHsp, що є важливим для розуміння їхніх функціональних механізмів. Інструменти, які оцінюють молекулярну масу та структуру білків, є невід'ємною частиною цього процесу, надаючи необхідні дані для інтерпретації ролі sHsp (Xie et al., 2025; Hussain & Brooks, 2024).

Важливість біоінформатичних досліджень легко прослідковується у дослідженні (Min et al., 2021) де було проаналізовано еволюційну консервативність малих білків теплового шоку (sHsp) у лускокрилих комах.

Результати показали, що хоча схожість послідовностей між генами sHsp справді існувала, вона не відповідала стабільній функціональній консервативності у відповідь на стресові фактори. Натомість результати свідчили про те, що збережені домени, які зазвичай використовуються для прогнозування функцій генів, не завжди є надійними для екстраполяції даних з модельних організмів на інші досліджувані види. Автори припустили, що sHsp, можливо, виконують переважно роль білків "домашнього господарства", підтримуючи молекулярні структури на різних стадіях розвитку, а не виступають виключно як шаперони у відповідь на стресові умови (Gabler et al., 2020).

### **1.7. Виклики та обмеження біоінформатичних методів**

Вивчення малих білків теплового шоку (sHsp) за допомогою біоінформатичних підходів має низку обмежень. Одним із основних є складність отримання високоякісних атомарних структур. Традиційні методи, як-от рентгенівська кристалографія, ЯМР-спектроскопія та тривимірна електронна мікроскопія, є дороговартісними (Hussain & Brooks, 2024).

Методи прогнозування структури поділяються на два типи: порівняльне та *de novo* моделювання. Порівняльне моделювання, також відоме як гомологічне моделювання, передбачає побудову тривимірної структури на основі амінокислотної послідовності цільового білка та відомого шаблону. Хоча цей метод може бути ефективним, він значною мірою залежить від наявності гомологічних шаблонів; їх відсутність обмежує застосування цього підходу, особливо для sHsp, які можуть мати низьку ідентичність послідовностей із добре охарактеризованими білками. *De novo* моделювання, яке не потребує наявності відомих структур, є альтернативою, але також має свої обмеження. Для точних прогнозів потрібні значні обчислювальні ресурси, а залучені алгоритми можуть не справлятися зі складними схемами згортання, характерними для певних родин білків, зокрема sHsp (Hussain & Brooks, 2024). Тому передбачення можуть суттєво відрізнятися за точністю, що ускладнює інтерпретацію результатів і заважає створенню надійних моделей для експериментальної верифікації.

Ще одна проблема у вивченні sHsp за допомогою біоінформатики — доступність і якість даних. Невідповідності між джерелами даних можуть призвести до прогалин у знаннях про конкретні sHsp, що впливає як на обчислювальний аналіз, так і на біологічні інтерпретації (Hussain & Brooks, 2024).

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Пошук послідовностей

Матеріалом для цього дослідження слугували амінокислотні послідовності sHSP *A. trichopoda* та *O. sativa*. Для пошуку нуклеотидних та амінокислотних послідовностей ми провели пошук у базі даних GenBank.

GenBank - це загальнодоступна база даних, яка містить послідовності 420 000 описаних видів разом з біологічними та бібліографічними анотаціями (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). За створення та розповсюдження GenBank відповідає Національний центр біотехнологічної інформації (NCBI), філія Національної медичної бібліотеки (NLM), що знаходиться в Національному інституті охорони здоров'я (NIH) в Бетесді, штат Меріленд, США.

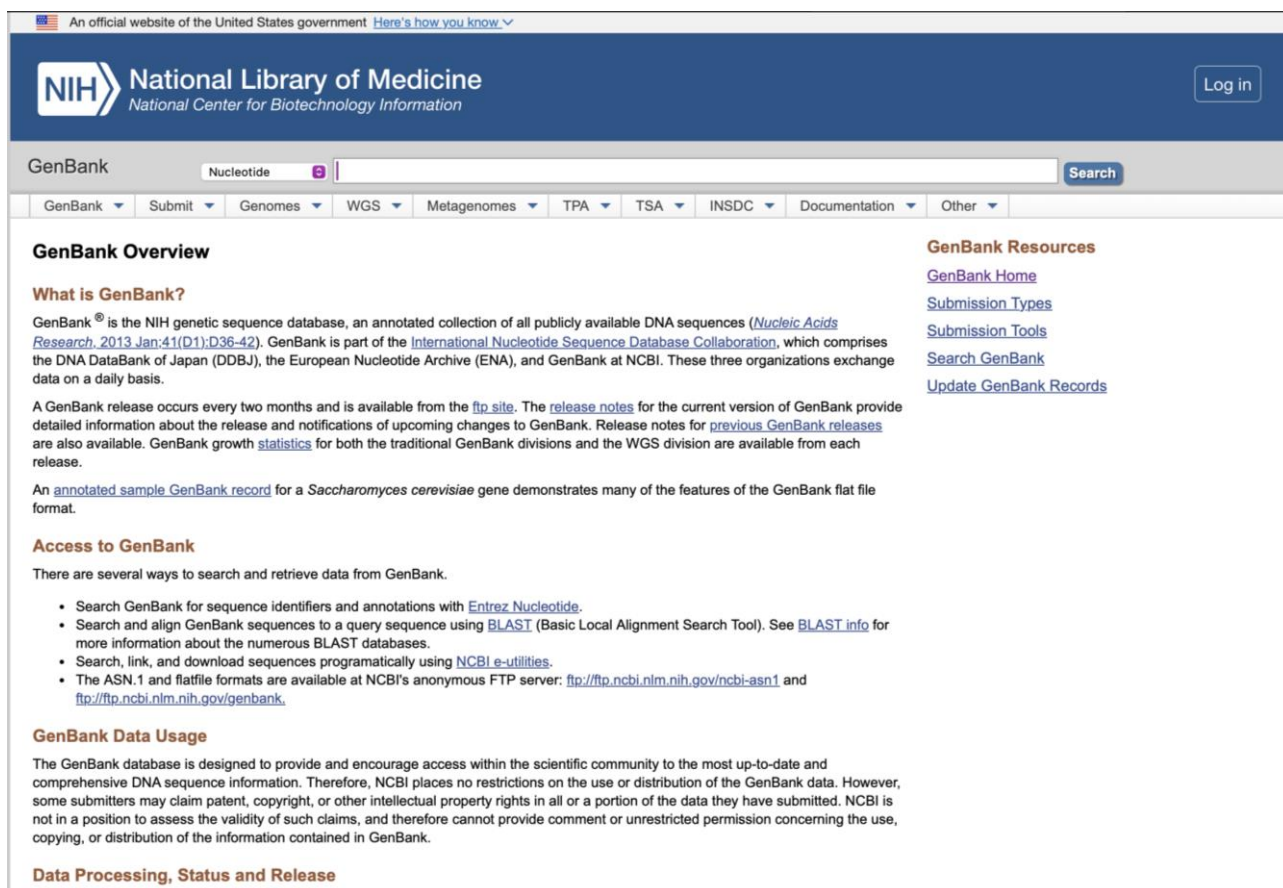
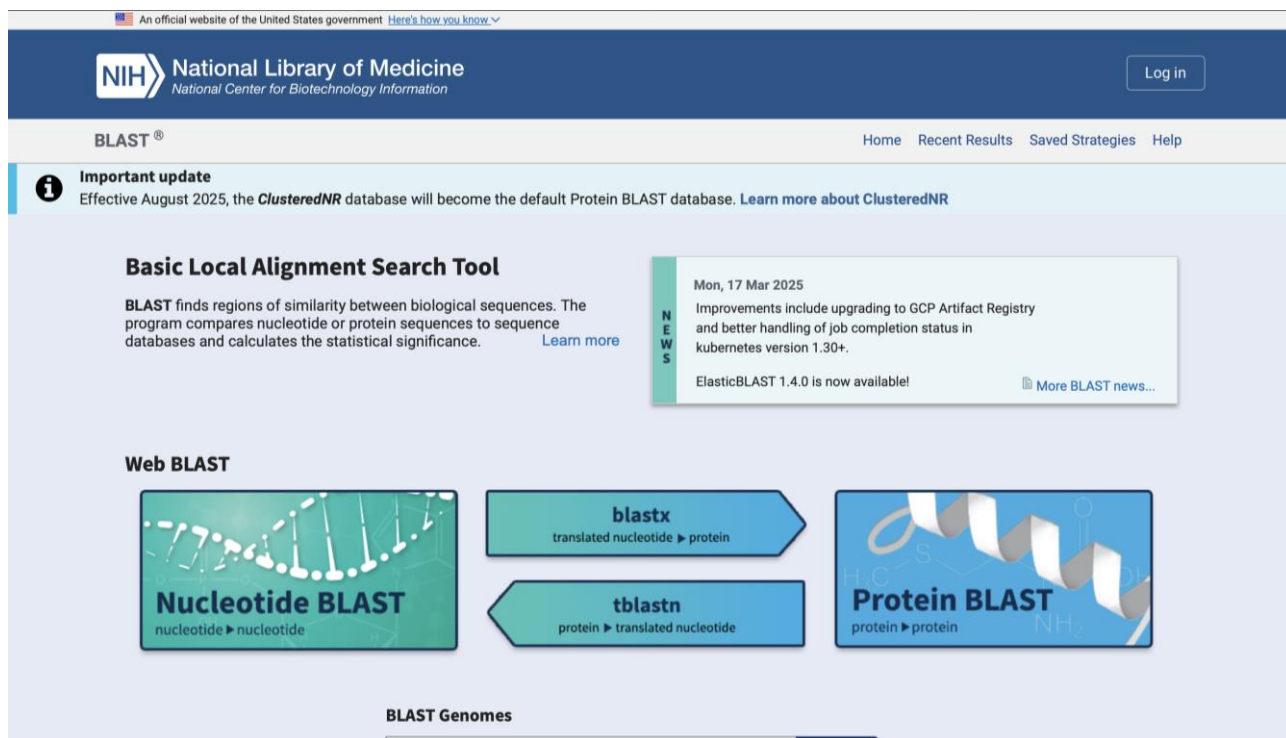


Рис. 2.1.1. Вікно пошуку у GenBank.

Повне охоплення глобальних даних забезпечується завдяки щоденній взаємодії з Японським банком даних ДНК (DDBJ) та Європейським

нуклеотидним архівом (ENA). Переважна більшість даних, що надходять до GenBank, походить з окремих лабораторій, які використовують інструмент tbl2asn, BankIt або портал подання даних NCBI. Крім того, більшість даних збирається в рамках проектів з відбору проб навколишнього середовища та секвенування всього геному (WGS), а також інших великомасштабних проектів з секвенування. База даних нуклеотидів NCBI надає доступ до GenBank і посилання на відповідні дані, включаючи геноми, таксономію, білкові послідовності та структури, а також біомедичну літературу в PubMed (Sayers et al., 2018).

Програмне забезпечення BLAST дозволило нам успішно розширити пошук необхідних послідовностей. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) - широко використовуваний інструмент для вирівнювання та пошуку послідовностей (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



**Рис. 2.1.2.** Вікно онлайн-сервісу BLAST.

Отримавши нуклеотидну або білкову послідовність, BLAST шукає її в базі даних нуклеотидних або білкових послідовностей. Якщо потрібно, програма може також перекладати нуклеотидні послідовності. Таким чином, BLAST може

шукати білковий запит в базі даних нуклеотидів або нуклеотидний запит в базі даних білків. Для прискорення пошуку BLAST використовує евристики. Крім того, BLAST пропонує статистику, яка обчислює ймовірність випадкового збігу. Результати з веб-сайту BLAST містять посилання на додаткові ресурси NCBI (Boratyn et al., 2013).

Для подальшої обробки послідовності були завантажені та збережені у форматі FASTA (.fasta).

## 2.2. Вирівнювання послідовностей

Для вирівнювання отриманих послідовностей було використано програмне забезпечення MAFFT (множинне вирівнювання з використанням швидкого перетворення Фур'є). За допомогою цього програмного забезпечення можна вирівнювати як нуклеотидні, так і амінокислотні послідовності. Для завершення вирівнювання було використано метод L-INS-I, також відомий як «з кінця в кінець». Для <200 послідовностей це, швидше за все, найточніший підхід, який рекомендується. Дані локального попарного вирівнювання використовуються в ітеративному процесі уточнення (Nakamura et al., 2018).

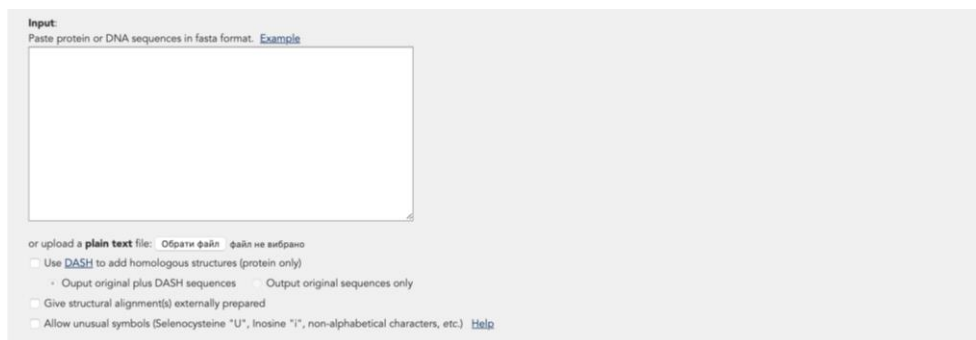


Рис. 2.2.1. Вікно завантаження у MAFFT.

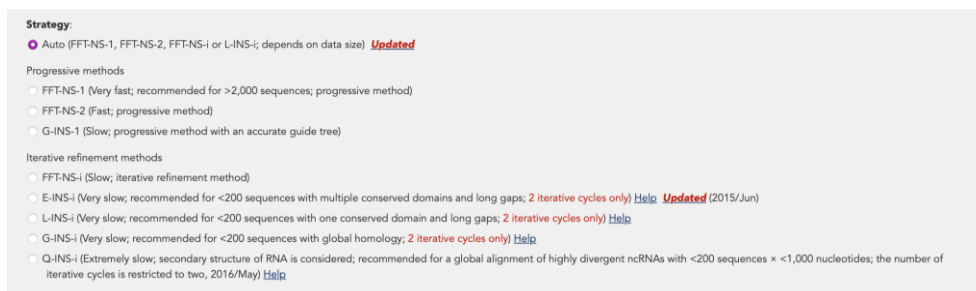
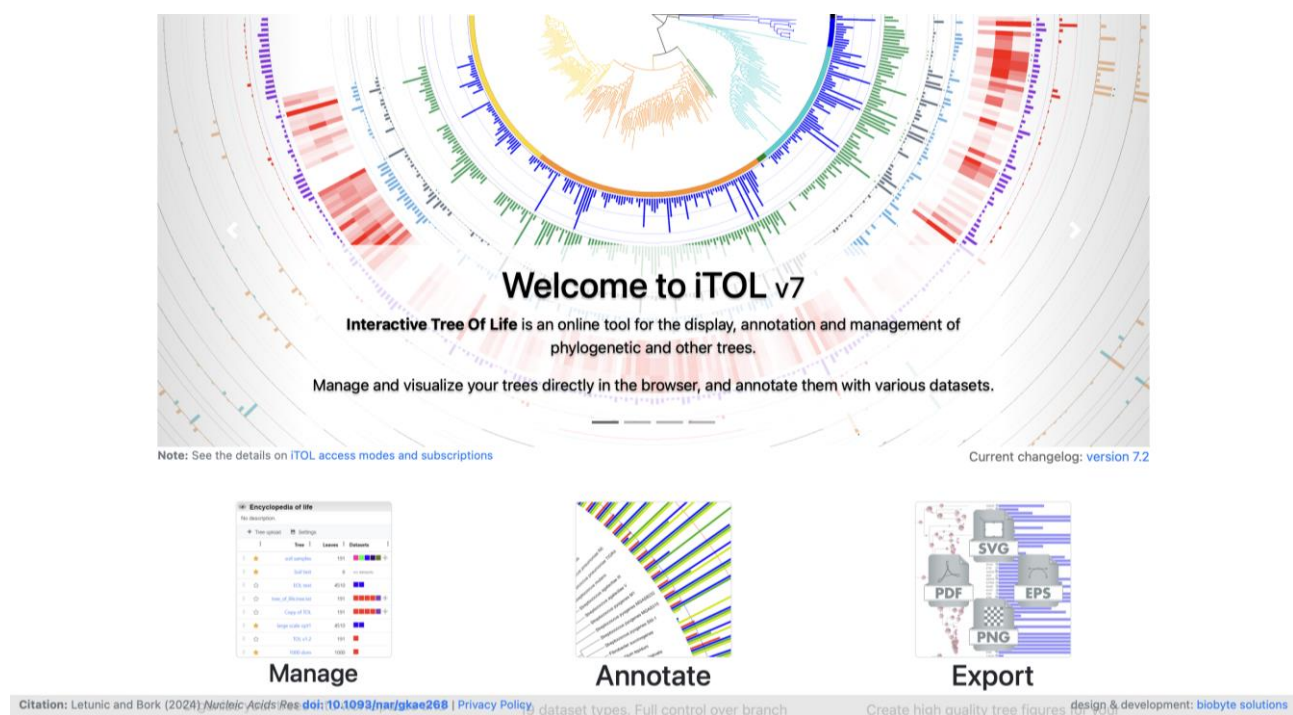


Рис. 2.2.1. Вікно вибору методу вирівнювання у MAFFT.

### 2.3. Побудова філогенетичного дерева

Для проведення філогенетичного аналізу методом максимальної правдоподібності використано плагін PhyML для Geneious Prime 2021.0.3.2. Для визначення статистичної підтримки гілок використано тест ALRT Chi. Онлайн-додаток iTOL v6 - інтерактивне дерево життя - було використано для анотування остаточного дерева після його експорту у форматі Newick. Будь-який сучасний веб-браузер може бути використаний для доступу до онлайн-інструменту, відомого як iTOL (The Interactive Tree Of Life (<https://itol.embl.de>)). Для візуалізації механізму відображення дерева використовується елемент HTML5 Canvas, який повністю реалізований на JavaScript. Клієнтський веб-браузер виконує більшість обчислень і завдань відображення, забезпечуючи тонкий інтерактивний контроль над низкою параметрів відображення. Програма підтримує численні формати відображення дерев, включаючи кореневі та некореневі, прямокутні та радіальні, філограми та кладограми.



**Рис. 2.3.1.** Вікно онлайн-сервісу iTOL.

Користувачі можуть інтерактивно переміщувати або видаляти окремі вузли або цілі клади за допомогою базових функцій редагування. Крім того, клади можна вручну або автоматично обрізати або згортати відповідно до ряду

параметрів (наприклад, середня відстань між гілками або пов'язані з ними значення бутстрапу). Інші варіанти модифікації отриманого дерева включають автоматичне сортування листя різними способами або ручне вкорінення в будь-якому вузлі за допомогою методу вкорінення в середній точці (Letunic & Bork, 2021).

Для побудови філогенетичного дерева було використано метод приєднання сусідів (Neighbor-joining). Цей підхід, вперше представлений у статті 1987 року, використовується і сьогодні. Використовуючи ітеративний процес кластеризації для визначення того, які листки є «сусідами» - тобто нащадками одного і того ж внутрішнього батьківського вузла, - цей метод будує дерево за допомогою матриці відстаней. Це метод мінімальної еволюції, оскільки отримане дерево ілюструє мінімальну еволюцію, необхідну для врахування відмінностей між об'єктами.

Перевагами використання NJ методу є:

- Швидким і доступним у порівнянні з іншими відомими підходами;
- Простий і зрозумілий. Байєсівський метод та метод максимальної правдоподібності, зокрема, є значно повільнішими;
- Було продемонстровано, що асоціація сусідів є топологічно точною і іноді працює краще, ніж більш складні методи, такі як метод максимальної правдоподібності та байєсівський висновок.

Недоліки:

- Вирівнювання послідовностей та інші дані зменшуються, коли вони стискаються у відстані. Хоча методи впорядкування, такі як РСА, також роблять це, тому це не обов'язково погано, але ви повинні знати про це.
- Отримання лише одного дерева. Інші методи, такі як байєсівський висновок та метод максимальної правдоподібності, генерують декілька дерев, або еволюційних гіпотез, які є корисними для деяких аналізів.
- Негативна довжина гілок може іноді виникати через приєднання сусідів. Майте на увазі, що це впливає лише на довжину гілок, а не на топологію дерева (Harrision, 2022).



#### 2.4. Об'єкти досліджень

*Oryza sativa* ( $2n = 24$ ) — це однорічна трав'яниста рослина, яка належить до родини злакових і широко культивується як основна продовольча культура в тропічних і субтропічних регіонах. Це самозапильна рослина, здатна також до часткового перехресного запилення, що забезпечує генетичне різноманіття. Цвітіння зазвичай припадає на період з червня по серпень залежно від умов вирощування. Збір матеріалу здійснювали в період активного цвітіння у липні 2022 року на експериментальній ділянці в околицях міста Хошимін, В'єтнам.

*Amborela trichopoda* ( $2n = 26$ ) — це вічнозелений підлісковий чагарник або невелике дерево, ендемік Нової Каледонії. Це дводомна рослина, яка запилюється як вітром, так і комахами, і рясно цвіте під час переходу від сезону дощів до сухого у березні та квітні. Запилення проводили на початку квітня 2001 року в популяції на плато-де-Доньї, поблизу Саррамеа, Нова Каледонія.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Геном *O. sativa* містить 35 генів, які, найімовірніше, кодуєть sHSP, згідно з базою даних GenBank. Їх передбачувана молекулярна маса варіює від 15,9 до 27,5 кДа, а амінокислотні послідовності варіюють за довжиною від 148 (OsHSP15.9-Per) до 251 (OsHSP27.5-P) п.н. (табл. 1). Водночас геном *A. trichopoda* містить 24 гени з молекулярною масою в межах від 13,7 до 29,3 кДа та з довжиною амінокислотних послідовностей в межах від 120 (Atr13.7-СІІІ) до 260 (Atr29.3-M).

**Таблиця 1.** Характеристика нуклеотидних та амінокислотних послідовностей sHSP *O. Sativa* та *A. trichopoda*.

| №                                  | Назва<br>гена/білка | CDS<br>(н/п) | CDS<br>(а/к) | М/м,<br>kDa | № н/п          | № а/п          |
|------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|-------------|----------------|----------------|
| <b><i>Oryza sativa</i> клас CI</b> |                     |              |              |             |                |                |
| 1                                  | Os16.8A-CI          | 450          | 149          | 16,8        | NM_001401476.1 | NP_001388405.1 |
| 2                                  | Os16.8B-CI          | 453          | 150          | 16,8        | NM_001401477.1 | NP_001388406.1 |
| 3                                  | Os16.8C-CI          | 453          | 150          | 16,8        | NM_001401478.1 | NP_001388407.1 |
| 4                                  | Os17.8A-CI          | 501          | 166          | 17,8        | NM_001401475.1 | NP_001388404.1 |
| 5                                  | Os18.0A-CI          | 483          | 160          | 18,0        | KT304314.1     | ALS88372.1     |
| 6                                  | Os18.0B-CI          | 486          | 161          | 18,0        | NM_001417479.1 | NP_001404408.1 |
| 7                                  | Os17.5-CI           | 480          | 159          | 17,5        | NM_001417480.1 | NP_001404409.1 |
| 8                                  | Os17.2-CI           | 465          | 154          | 17,2        | NM_001402128.1 | NP_001389057.1 |
| 9                                  | Os18.1-CI           | 486          | 161          | 18,1        | KT304316.1     | ANW06227.1     |
| 10                                 | Os17.8B-CI          | 486          | 161          | 17,8        | NM_001402127.1 | NP_001389056.1 |
| 11                                 | Os17.7-CI           | 480          | 159          | 17,7        | U83671.1       | AAC78394.1     |
| 12                                 | Os17.4-CI           | 465          | 154          | 17,4        | EU846992.1     | ACJ54896.1     |
| 13                                 | Os16.5-CI           | 453          | 150          | 16,5        | NM_001401474.1 | NP_001388403.1 |
| 14                                 | Os17.6-CI           | 495          | 164          | 17,6        | NM_001416846.1 | NP_001403775.1 |
| 15                                 | Os18.7A-CI          | 534          | 177          | 18,7        | NM_001409259.1 | NP_001396188.1 |

|                                       |              |     |     |      |                |                |
|---------------------------------------|--------------|-----|-----|------|----------------|----------------|
| 16                                    | Os18.7B-CI   | 522 | 173 | 18,7 | NM_001403103.1 | NP_001390032.1 |
| <b>Amborella trichopoda клас CI</b>   |              |     |     |      |                |                |
| 17                                    | Atr17.9-CI   | 456 | 158 | 17,9 | XM_006826664.3 | XP_006826727.1 |
| 18                                    | Atr18.7-CI   | 363 | 165 | 18,7 | XM_006827533.3 | XP_006827596.1 |
| 19                                    | Atr18.8-CI   | 453 | 165 | 18,8 | XM_006828281.3 | XP_006828344.1 |
| 20                                    | Atr17.0-CI   | 372 | 149 | 17,0 | XM_006850341.3 | XP_006850404.1 |
| 21                                    | Atr18.2-CI   | 495 | 162 | 18,2 | XM_006850373.3 | XP_006850436.1 |
| 22                                    | Atr17.5A-CI  | 546 | 153 | 17,5 | XM_006850342.3 | XP_006850405.1 |
| 23                                    | Atr17.6A-CI  | 468 | 155 | 17,6 | XM_006853975.3 | XP_006854037.1 |
| 24                                    | Atr17.5B-CI  | 468 | 155 | 17,5 | XM_006853974.3 | XP_006854036.1 |
| 25                                    | Atr17.6B-CI  | 456 | 151 | 17,6 | XM_006858109.3 | XP_006858171.1 |
| 26                                    | Atr14.5-CI   | 372 | 123 | 14,5 | XM_011627293.1 | XP_011625595.1 |
| 27                                    | Atr18.6-CI   | 495 | 164 | 18,6 | XM_006850372.1 | XP_006850435.1 |
| 28                                    | Atr20.5-CI   | 546 | 181 | 20,5 | XM_006827048.1 | XP_006827111.1 |
| <b>Oryza sativa клас CII</b>          |              |     |     |      |                |                |
| 29                                    | Os18.0-CII   | 501 | 166 | 18,0 | DQ180746.1     | ABA29610.1     |
| 30                                    | Os17.9-CII   | 501 | 166 | 17,9 | NM_001406238.1 | NP_001393167.1 |
| 31                                    | Os18.9-CII   | 528 | 175 | 18,9 | NM_001409862.1 | NP_001396791.1 |
| <b>Amborella trichopoda клас CII</b>  |              |     |     |      |                |                |
| 32                                    | Atr22.5-CII  | 591 | 196 | 22,5 | XM_006843086.3 | XP_006843149.2 |
| 33                                    | Atr17.1-CII  | 453 | 150 | 17,1 | XM_006843088.3 | XP_006843151.1 |
| 34                                    | Atr17.3-CII  | 456 | 151 | 17,3 | XM_006843090.3 | XP_006843153.1 |
| 35                                    | Atr17.4-CII  | 465 | 154 | 17,4 | XM_006843087.3 | XP_006843150.2 |
| 36                                    | Atr16.8-CII  | 453 | 150 | 16,8 | XM_006843089.2 | XP_006843152.1 |
| <b>Oryza sativa клас CIII</b>         |              |     |     |      |                |                |
| 37                                    | Os18.5- CIII | 519 | 172 | 18,5 | NM_001416979.1 | NP_001403908.1 |
| <b>Amborella trichopoda клас CIII</b> |              |     |     |      |                |                |
| 38                                    | Atr13.7-CIII | 363 | 120 | 13,7 | XM_011623407.1 | XP_011621709.1 |
| <b>Oryza sativa клас P</b>            |              |     |     |      |                |                |

|                                                     |             |     |     |      |                |                |
|-----------------------------------------------------|-------------|-----|-----|------|----------------|----------------|
| 39                                                  | Os26.6-P    | 720 | 239 | 26,6 | AB020973.1     | BAA78385.1     |
| 40                                                  | Os22.1-P    | 723 | 240 | 22,1 | NM_001402123.1 | NP_001389052.1 |
| 41                                                  | Os21.4-P    | 603 | 200 | 21,4 | XM_015755840.3 | XP_015611326.1 |
| 42                                                  | Os27.5-P    | 756 | 251 | 27,5 | XM_015782094.3 | XP_015637580.1 |
| 43                                                  | Os21.0-P    | 594 | 197 | 21,0 | XM_015757781.3 | XP_015613267.1 |
| <b><i>Amborella trichopoda</i> клас P</b>           |             |     |     |      |                |                |
| 44                                                  | Atr14.5-P   | 378 | 125 | 14,5 | XM_020662550.1 | XP_020518209.1 |
| 45                                                  | Atr26.3-P   | 702 | 233 | 26,3 | XM_006852102.3 | XP_006852164.1 |
| <b><i>Oryza sativa</i> клас M</b>                   |             |     |     |      |                |                |
| 46                                                  | Os23.6A-M   | 663 | 220 | 23,6 | NM_001401986.1 | NP_001388915.1 |
| 47                                                  | Os23.6B-M   | 666 | 221 | 23,6 | NM_001401985.1 | NP_001388914.1 |
| 48                                                  | Os23.5-M    | 660 | 219 | 23,5 | XM_015772047.3 | XP_015627533.1 |
| 49                                                  | Os26.2-M    | 747 | 248 | 26,2 | NM_001421446.1 | NP_001408375.1 |
| 50                                                  | Os24.1-M    | 663 | 220 | 24,1 | GU120342.1     | ADR66976.1     |
| <b><i>Amborella trichopoda</i> клас M</b>           |             |     |     |      |                |                |
| 51                                                  | Atr26.5-M   | 696 | 231 | 25,9 | XM_006842004.3 | XP_006842067.3 |
| 52                                                  | Atr29.3-M   | 783 | 260 | 29,3 | XM_020665866.1 | XP_020521525.1 |
| <b><i>Oryza sativa</i> клас ER</b>                  |             |     |     |      |                |                |
| 53                                                  | Os19.1-ER   | 621 | 208 | 19,1 | NM_001423181.1 | NP_001410110.1 |
| 54                                                  | Os19.3-ER   | 552 | 183 | 19,3 | XM_015757600.3 | XP_015613086.1 |
| 55                                                  | Os20.7-ER   | 648 | 215 | 20,7 | NM_001419362.1 | NP_001406291.1 |
| <b><i>Oryza sativa</i> клас Per</b>                 |             |     |     |      |                |                |
| 56                                                  | Os15.9-Per  | 441 | 148 | 15,9 | NM_001421521.1 | NP_001408450.1 |
| <b><i>Amborella trichopoda</i> клас Per</b>         |             |     |     |      |                |                |
| 57                                                  | Atr16.3-Per | 435 | 144 | 16,3 | XM_006826843.3 | XP_006826906.2 |
| <b><i>Oryza sativa</i> некласифікований</b>         |             |     |     |      |                |                |
| 58                                                  | Os22.1      | 612 | 203 | 22,1 | NM_001420689.1 | NP_001407618.1 |
| <b><i>Amborella trichopoda</i> некласифікований</b> |             |     |     |      |                |                |
| 59                                                  | Atr20.7     | 537 | 178 | 20,7 | XM_011622765.2 | XP_011621067.1 |

На рис. 1 показано аналіз та порівняння послідовностей геному *O. sativa* з генами *A. trichopoda*. Варіабельна N-кінцева ділянка, консервативний  $\alpha$ -кристалічний домен (ACD) і C-кінцева ділянка - особливість, яка відрізняє структуру sHSP - є трьома основними компонентами порівнюваних амінокислотних послідовностей, згідно з результатами аналізу.



|                 | 90       | 100      | 110           | 120           | 130            | 140           | 150                          | 160         |
|-----------------|----------|----------|---------------|---------------|----------------|---------------|------------------------------|-------------|
| Consensus       | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 1. Atr13.7-CII  | TSSIKQSE | GGGI     |               |               |                |               |                              |             |
| 2. Atr14.5-CI   | KRIE     | GGNM     |               |               |                |               |                              |             |
| 3. Atr17.0-CI   | RR       | NNA      |               |               |                |               |                              |             |
| 4. Atr17.5A-CI  | RR       | TNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 5. Os16.8A-CI   | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 6. Os16.8B-CI   | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 7. Os16.8C-CI   | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 8. Os17.2-CI    | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 9. Os17.4-CI    | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 10. Os18.0A-CI  | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 11. Os18.0B-CI  | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 12. Os18.1-CI   | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 13. Os17.5-CI   | RR       | GNA      |               |               |                |               |                              |             |
| 14. Os17.7-CI   | RR       | GNA      |               |               |                |               |                              |             |
| 15. Os17.8A-CI  | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 16. Atr17.5B-CI | QR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 17. Atr17.6A-CI | QR       | GDV      |               |               |                |               |                              |             |
| 18. Atr18.7-CI  | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 19. Atr18.8-CI  | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 20. Atr18.2-CI  | RR       | SHI      |               |               |                |               |                              |             |
| 21. Atr18.6-CI  | RR       | SNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 22. Atr17.9-CI  | QR       | SSI      |               |               |                |               |                              |             |
| 23. Os16.5-CI   | RS       | GNV      |               |               |                |               |                              |             |
| 24. Os18.7A-CI  | RK       | QNA      | QKKG          |               | GGGGGR         |               | TGGGGGGE                     |             |
| 25. Atr20.5-CI  |          | WRGT     |               |               |                |               |                              |             |
| 26. Os17.8B-CI  |          | KL       |               |               |                |               |                              |             |
| 27. Os19.1-ER   | PP       | AAA      |               |               |                |               |                              |             |
| 28. Atr16.3-Per |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 29. Os15.9-Per  |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 30. Os20.7-ER   |          | STA      |               | AD            |                | GALLP         |                              | WFGGGGARDEA |
| 31. Atr16.8-CII |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 32. Atr17.4-CII |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 33. Atr22.5-CII |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 34. Atr17.1-CII |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 35. Atr17.3-CII |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 36. Os17.9-CII  |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 37. Os18.0-CII  |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 38. Os18.9-CII  |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 39. Os18.5-CIII |          | TSL      |               |               |                |               |                              |             |
| 40. Os17.6-CI   |          | RML      |               |               |                |               |                              |             |
| 41. Atr14.5-P   | AW-RRAR  | RPT      | VGLPSSGRARQLA |               |                |               | VASAAQENRDNTAVDVHVNQDGGNQQGN |             |
| 42. Os22.1-P    | AW-RSEPT |          | VGLPSSGRARQLA |               |                |               | VASAAQENRDNTAVDVHVNQDGGNQQGN |             |
| 43. Os26.6-P    | KW-SSKRC | SFIP     |               |               |                |               | AAMADGRDSLHD                 | LQKAPP      |
| 44. Atr26.3-P   | SALRPV   | AVAGGS   |               |               | RAYNT-GAQLRRHE | RDESDDDSGRGYD |                              |             |
| 45. Os23.6A-M   | SALRPV   | AVAGGS   |               |               | RAYNT-GAQLRRHE | RDESDDDSGRGYD |                              |             |
| 46. Os24.1-M    | SALRPV   | AVAGGS   |               |               | RAYNT-GAQLRRHE | RDESDDDSGRGYD |                              |             |
| 47. Os23.6B-M   | SALRPV   | AVAGGS   |               |               | RAYNT-GAQLRRHE | RDESDDDSGRGYD |                              |             |
| 48. Os26.2-M    | RPV      | AAAPAA   | SGKPV         | TAPAAATATNAAS | RRLYNT         | EGAPLRRYDV    | VDES                         | SGTDSGDEYD  |
| 49. Atr26.5-M   | GEERQLM  | GGGI     |               |               | RRFT           |               | KSTADNP                      | KDVAV       |
| 50. Atr29.3-M   | GEERQLM  | GGGI     |               |               | RRFT           |               | KSTADNP                      | KDVAV       |
| 51. Os27.5-P    | SC       | RPSRCWVR | VRSM          |               |                |               | RNGSTES                      | LDHLQR      |
| 52. Os23.5-M    | RPL      | HAAS     | PVAAAA        | ANSHG         | PLNFRAL        | FSSAGAD       | AAATTGGC                     |             |
| 53. Atr17.6B-CI |          |          |               |               |                |               | APAKGD                       | GHSREVAV    |
| 54. Os18.7B-CI  | RPRF     |          |               |               |                |               |                              |             |
| 55. Os21.0-P    | KPAA     |          | FVSLAS        | ERKSRPL       | SPCF           | AISSNKP       | G                            |             |
| 56. Os21.4-P    | ALRSAG   | KPA      |               | AALAL         | QRKSPRL        |               | LVRANN                       | SP-KSPA     |
| 57. Atr20.7     |          |          |               |               |                |               |                              |             |
| 58. Os22.1      | AA       | RAVFG    |               | EGSL          |                |               |                              |             |
| 59. Os19.3-ER   |          |          | AAAAS         | GSR           | SRVL           | SE            |                              |             |

N-кінець

Рисунок 1. (продовження).



| Consensus       | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1. Atr13.7-CII  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2. Atr14.5-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 3. Atr17.0-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4. Atr17.5A-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5. Os16.8A-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 6. Os16.8B-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 7. Os16.8C-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 8. Os17.2-CI    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 9. Os17.4-CI    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 10. Os18.0A-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 11. Os18.0B-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 12. Os18.1-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 13. Os17.5-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 14. Os17.7-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 15. Os17.8A-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 16. Atr17.5B-CI | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 17. Atr17.6A-CI | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 18. Atr18.7-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 19. Atr18.8-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 20. Atr18.2-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 21. Atr18.6-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 22. Atr17.9-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 23. Os16.5-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 24. Os18.7A-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 25. Atr20.5-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 26. Os17.8B-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 27. Os19.1-ER   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 28. Atr16.3-Per | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 29. Os15.9-Per  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 30. Os20.7-ER   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 31. Atr16.8-CII | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 32. Atr17.4-CII | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 33. Atr22.5-CII | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 34. Atr17.1-CII | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 35. Atr17.3-CII | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 36. Os17.9-CII  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 37. Os18.0-CII  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 38. Os18.9-CII  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 39. Os18.5-CIII | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 40. Os17.6-CI   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 41. Atr14.5-P   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 42. Os22.1-P    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 43. Os26.6-P    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 44. Atr26.3-P   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 45. Os23.6A-M   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 46. Os24.1-M    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 47. Os23.6B-M   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 48. Os26.2-M    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 49. Atr26.5-M   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 50. Atr29.3-M   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 51. Os27.5-P    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 52. Os23.5-M    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 53. Atr17.6B-CI | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 54. Os18.7B-CI  | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 55. Os21.0-P    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 56. Os21.4-P    | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 57. Atr20.7     | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 58. Os22.1      | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 59. Os19.3-ER   | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

N-конец

Рисунок 1. (продовження).



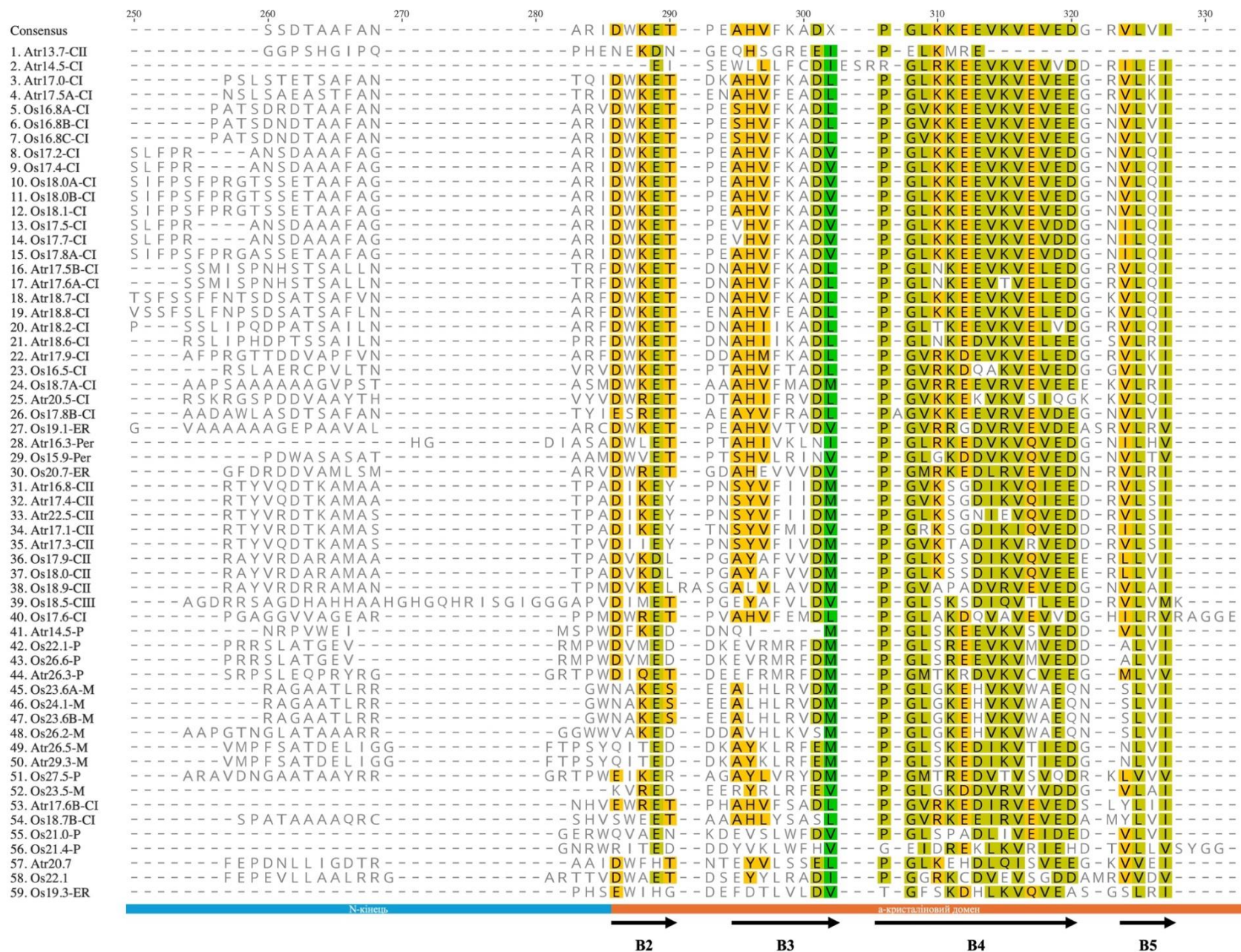


Рисунок 1. (продовження).



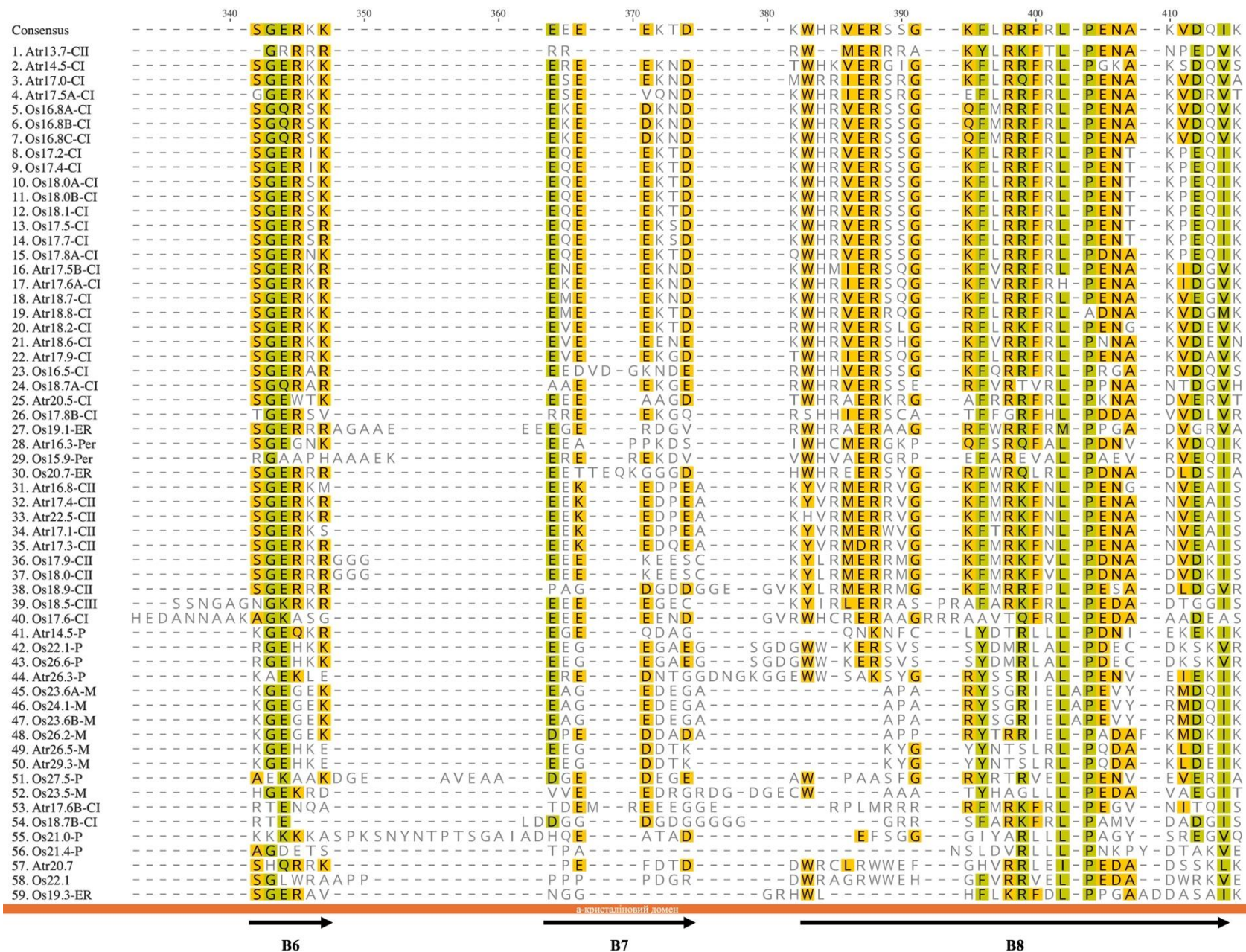
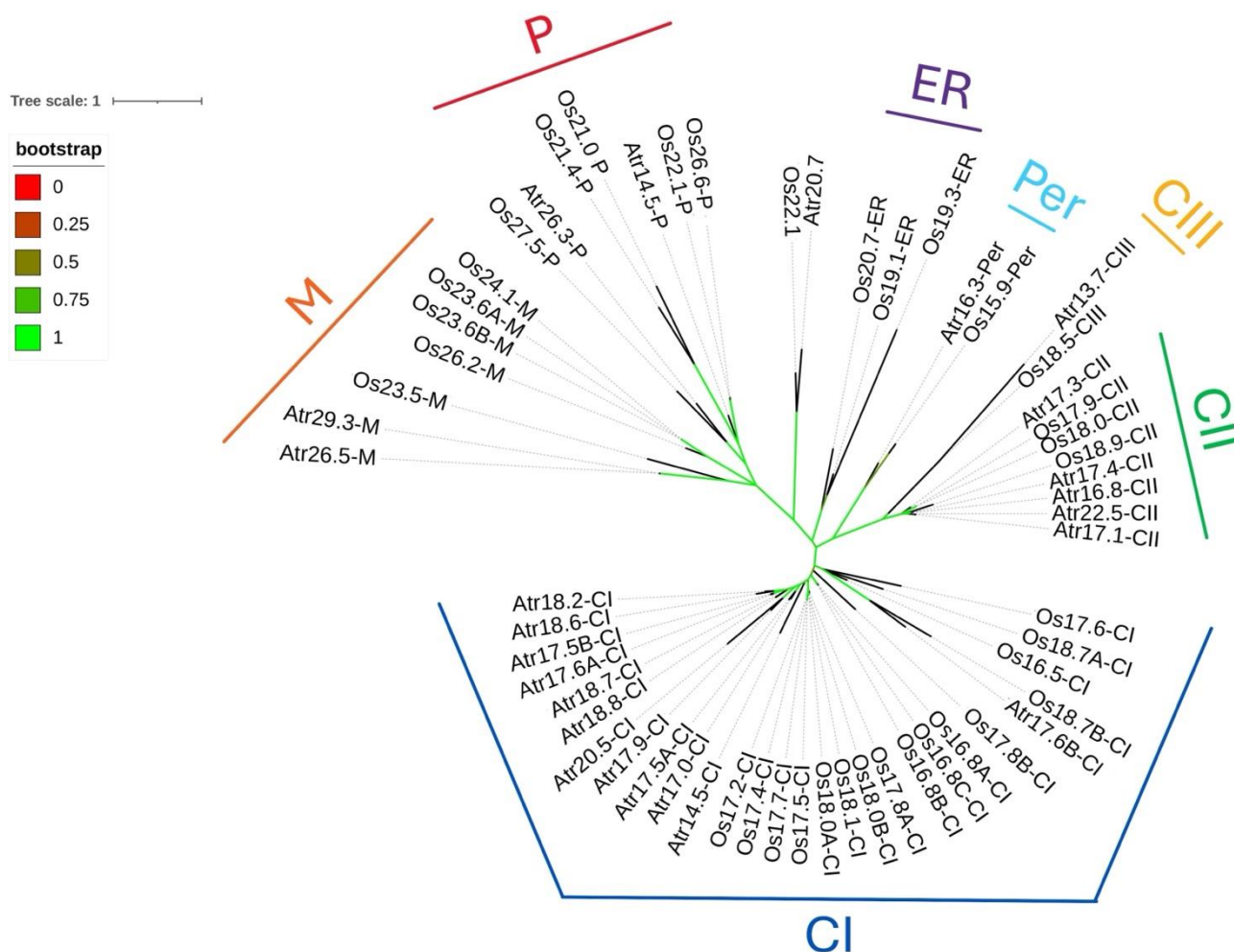


Рисунок 1. (продовження).





Для опису молекулярної еволюції sHSP було створено дендрограму подібності з використанням вирівнювання амінокислотних послідовностей. Для ряду клад було знайдено високу статистичну підтримку (рис. 2).



**Рисунок 2.** ML-дендрограма подібності амінокислотних послідовностей sHSP *Oryza sativa* та *Amborella trichopoda*.

Далі було досліджено гени та білки, щоб з'ясувати, чи належать вони до певного структурного класу. Аналіз зосереджено на розміщенні консервативних мотивів у домені ACD, сигнальних пептидів, відповідальних за клітинну локалізацію та транспорт, які виявлені у N- і C-кінцевих ділянках, а також на їхній анотації в базі даних GenBank. В аналізі також враховував положення послідовностей sHSP рису на дендрограмі відносно sHSP амборелли.

Згідно з філогенетичним аналізом, родину мультипротеїнів sHSP *O. sativa* можна розділити на вісім структурних класів (табл. 1). Три класи білків

знаходяться в цитоплазмі та/або ядрі, тоді як інші білки знаходяться в пероксисомах, пластидах, мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі. На додаток до sHSP, які були віднесені до певного класу, було виявлено білок OsHSP22.1, який не є членом жодного з цих класів.

Філогенетичний аналіз генів sHSP *A. trichopoda* показав, що їх можна розділити на 7 структурних класів (табл. 1). Вони локалізовані в тих самих клітинних компартментах, що і гени sHSP рису, окрім ендоплазматичного ретикулуму. Аналогічно до рису було виявлено білок, що не є членом жодного з цих класів.

Аналіз генів sHSP рису визначив, що довжина N-кінцевої ділянки цитоплазматичних sHSP варіює від 42 до 71 АК. Для пластидних sHSP це число варіює від 80 до 141 АК, а для мітохондріальних білків - від 113 до 148 залишків. N-кінцева ділянка ендоплазматичних sHSP варіює від 23 до 77 а.к., пероксисомний білок має лише 31 а.к., а неідентифікований Os22.1- 94 а.к. Набагато коротша С-кінцева ділянка містить від 15 до 32 АК в цитоплазмі, 13-33 в пластиді, 14-15 в мітохондріях, 34-61 в ендоплазмі і 18 в пероксисомному sHSP. Ця ділянка становить 18 АК у неідентифікованому білку Os22.1. Всі sHSP мають альфа-кристалічний домен з приблизно 90 амінокислотними залишками, незважаючи на варіації в N і С областях (рис. 1).

Проаналізовані довжини ділянок sHSP амборелли показують іншу ситуацію. N-кінцева ділянка цитоплазматичних sHSP варіює від 47 до 114 АК. Для пластидних sHSP це число варіює від 41 до 138 АК, а для мітохондріальних білків - від 149 до 179 залишків. Пероксисомальний білок має лише 49 а. к., і неідентифікований Atr20.7 - 86 а.к. С-кінцева ділянка у генах sHSP амборелли також коротка, містить від 17 до 43 АК в цитоплазмі, 13 в пластиді, 14 в мітохондріях і 17 в пероксисомному sHSP. Ця ділянка становить 16 АК у неідентифікованому білку Atr20.7.

Вісім білків - Os17.2-CI, Os17.4-CI, Os17.5-CI, Os17.7-CI, Os17.8B-CI, Os18.0A-CI, Os18.0B-CI та Os18.1-CI - надзвичайно схожі між собою і складають окрему підгрупу на дендрограмі серед 16 sHSPs *O. sativa*, що входять до класу

CI (цитозольні I). Одинадцять послідовностей *A. trichopoda* (Atr18.2-CI, Atr18.6-CI, Atr17.5B-CI, Atr17.6A-CI, Atr18.7-CI, Atr18.8-CI, Atr20.5-CI, Atr17.9-CI, Atr17.5A-CI, Atr17.0-CI та Atr14.5-CI) – Рис. 2) складають сестринську групу на дендрограмі.

Os17.6-CI, Os18.7A-CI, Os16.5-CI, Os18.7B-CI, та Atr17.6B-CI - це підгрупи класу CI, які включають білки з амборелли та рису. Решта рисових sHSP показані на рис. 2 як окремі гілки, оскільки вони не мають гомологів у геномі амборелли. Можна припустити, що гени, які кодують ці білки, були присутні в давньому предковому геномі, враховуючи їхнє положення над дендрограмою. Пізніше вони були втрачені в амбореллі, але збереглися в геномі рису.

Три білки (OsHSP17.9-CII, OsHSP18.0-CII і OsHSP18.9-CII) які демонструють високий ступінь подібності між собою, належать до класу CII. На відміну від OsHSP17.9-CII та OsHSP18.0-CII, послідовність OsHSP18.9-CII є унікальною завдяки 6-амінокислотній делеції GEGGAA в N-кінцевій ділянці. Крім того, ACD OsHSP18.9-CII демонструє поодинокі амінокислотні заміни між  $\beta 2$  та  $\beta 3$  листами на додаток до вставки двох амінокислот, LR. OsHSP18.5-CIII, єдиний білок, що представляє клас CIII в рисі, відрізняється за ACD, хоча і має структурну схожість з білками класу CII. Ці два класи білків походять від спільного предкового білка, про що свідчить той факт, що вони утворюють спільну гілку на дендрограмі і відрізняються від цитоплазматичних sHSPs класу CI. Відповідні білки класу CII і CIII амборелли (Atr17.3-CII, Atr17.4-CII, Atr16.8-CII, Atr22.5-CII і Atr17.1-CII, Atr13.7-CIII) також дуже схожі на ці гени.

У геномі *O. sativa* також виявлено п'ять пластидних, п'ять мітохондріальних, три ендоплазматичні та одну пероксисомальну ділянки, що кодують sHSP. На дендрограмі мітохондріальні та пластидні білки утворюють окремі гілки. N-кінцева ділянка пластидних білків (OsHSP21.0-P, OsHSP21.4-P, OsHSP22.1-P, OsHSP26.6-P та OsHSP27.5-P) демонструє помітну мінливість. Крім того, OsHSP21.4-P має додатковий амінокислотний залишок треоніну в ACD між  $\beta 4$  і  $\beta 5$  листами, тоді як OsHSP27.5-P має залишок аланіну, вставлений в область  $\beta 5$  листа. Os21.0-P, Os26.6-P та Os21.4-P характеризуються делеціями

в ділянці B6. Амборелла також містить гомологічні білки цього класу (Atr14.5-P та Atr26.3P).

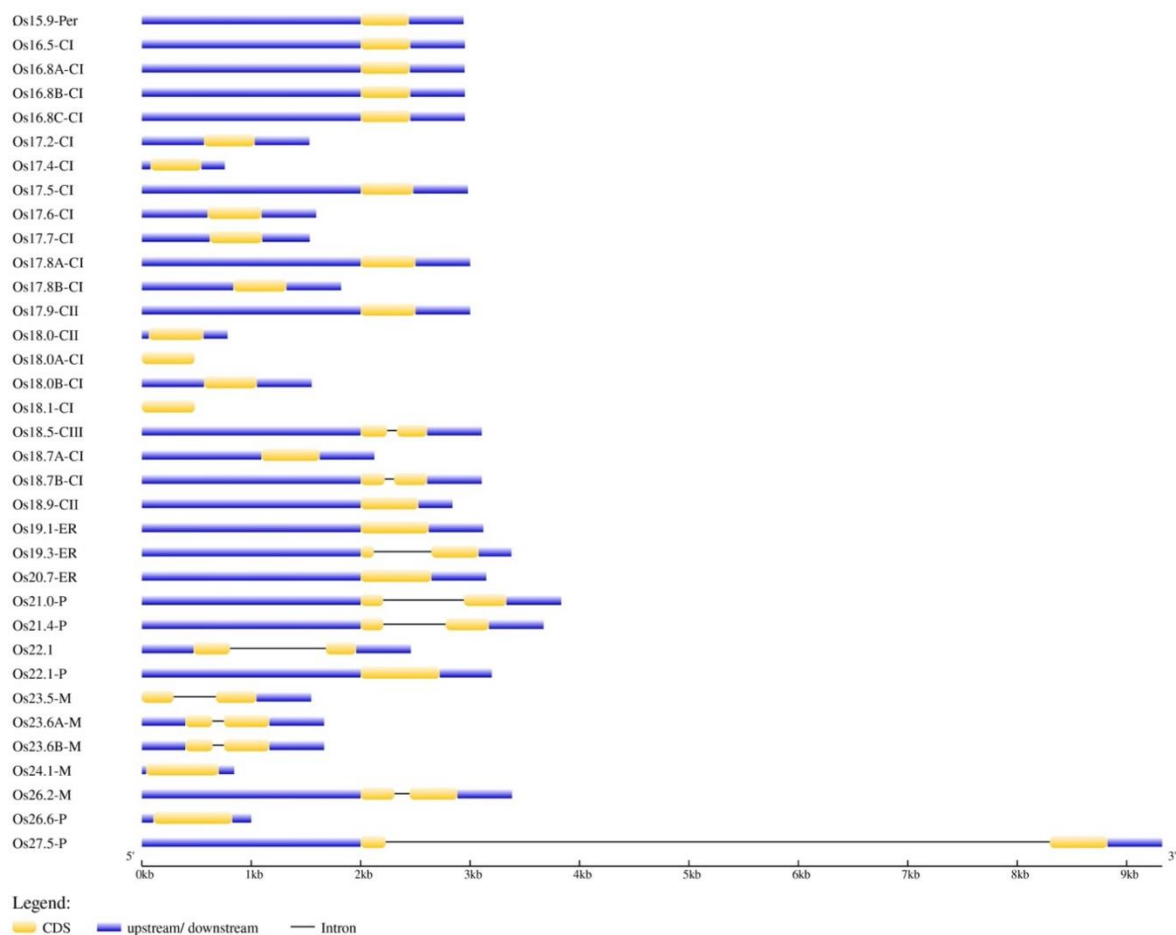
Мітохондріальні білки (OsHSP23.5-M, OsHSP23.6A-M, OsHSP23.6B-M, OsHSP24.1-M та OsHSP26.2-M) мають кілька особливостей. Зокрема, N-кінцеві ділянки OsHSP26.2-M та OsHSP23.5-M мають відмінні амінокислотні залишки, які відрізняють їх від інших білків цієї групи. ACD цих білків показали часткову втрату амінокислотної послідовності B6 листа. Виявлено, що OsHSP23.6A-M, OsHSP23.6B-M, OsHSP24.1-M та OsHSP32.3-M дуже подібні до білків *A. trichopoda* Atr29.3-M та Atr26.5-M.

OsHSP19.1-ER, OsHSP19.3-ER та OsHSP20.7-ER, ендоплазматичні sHSP, демонструють широку консервативність в ACD. Але в B6 області листка Os19.3-ER має п'ятиамінокислотну делецію, HRXER на дендрограмі ці білки не мають спільних гілок з *A. trichopoda*. OsHSP15.9-Per, єдиний пероксисомний sHSP рису, має коротку N-кінцеву ділянку і характерний сигнал локалізації пероксисомного білка (SKL) на C-кінці.

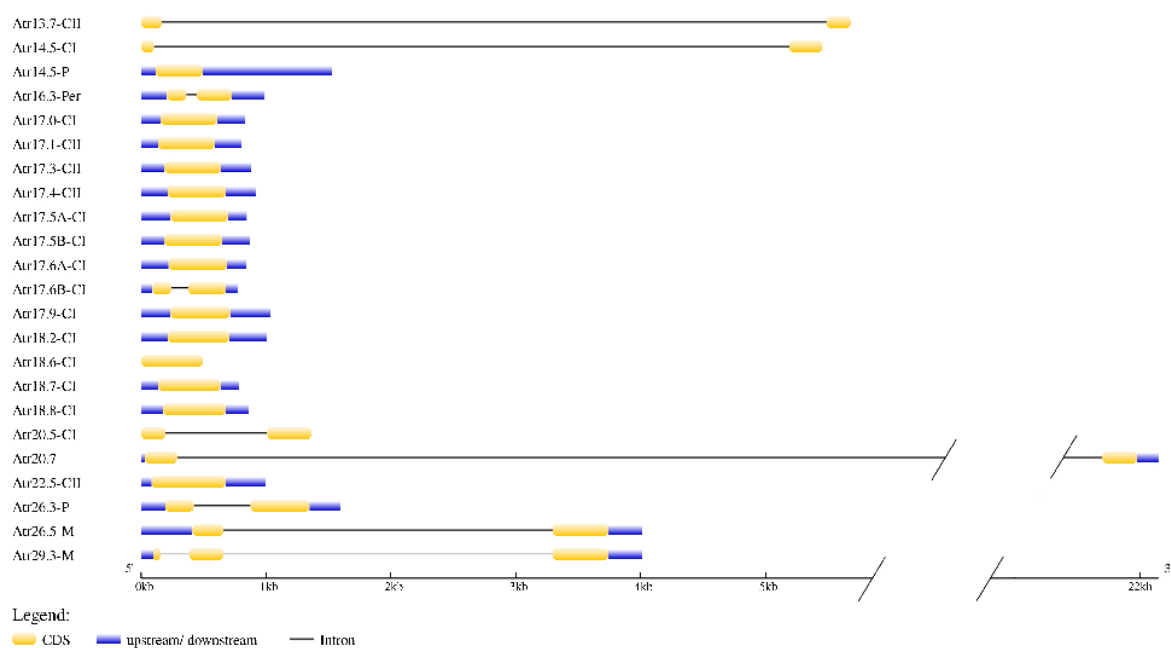
OsHSP22.1 виявився білком, який не належить до жодного з визнаних класів, на додаток до вже згаданих білків. Він має спільну гілку з Atr20.7, що також неідентифікований.

Також було досліджено екзон-інтронну структуру для генів sHSP рису (рис. 3) та амборелли (рис. 4). Згідно з результатами аналізу, дванадцять з 35 досліджених генів рису мали по одному інтрону. З усіх генів найдовший інтрон мав OsHSP27.5-P, а найкоротший - OsHSP18.5-CIII, OsHSP18.7B, OsHSP23.6A-M, OsHSP23.6B-M та OsHSP26.2-M. У генах, що кодують білки класів CII та Per, відсутні інтрони. Тим часом в амборелли тільки 8 з 24 генів мали по одному інтрону і 1 ген (Atr29.3-M) аж 2 інтрони. З усіх генів найдовший інтрон мав Atr20.7, а найкоротший – Atr16.3-Per, Atr17.6B-CI та Atr26.3-P. Наразі невідомо, яким чином інтрони можуть контролювати реакцію організму на тепловий стрес.





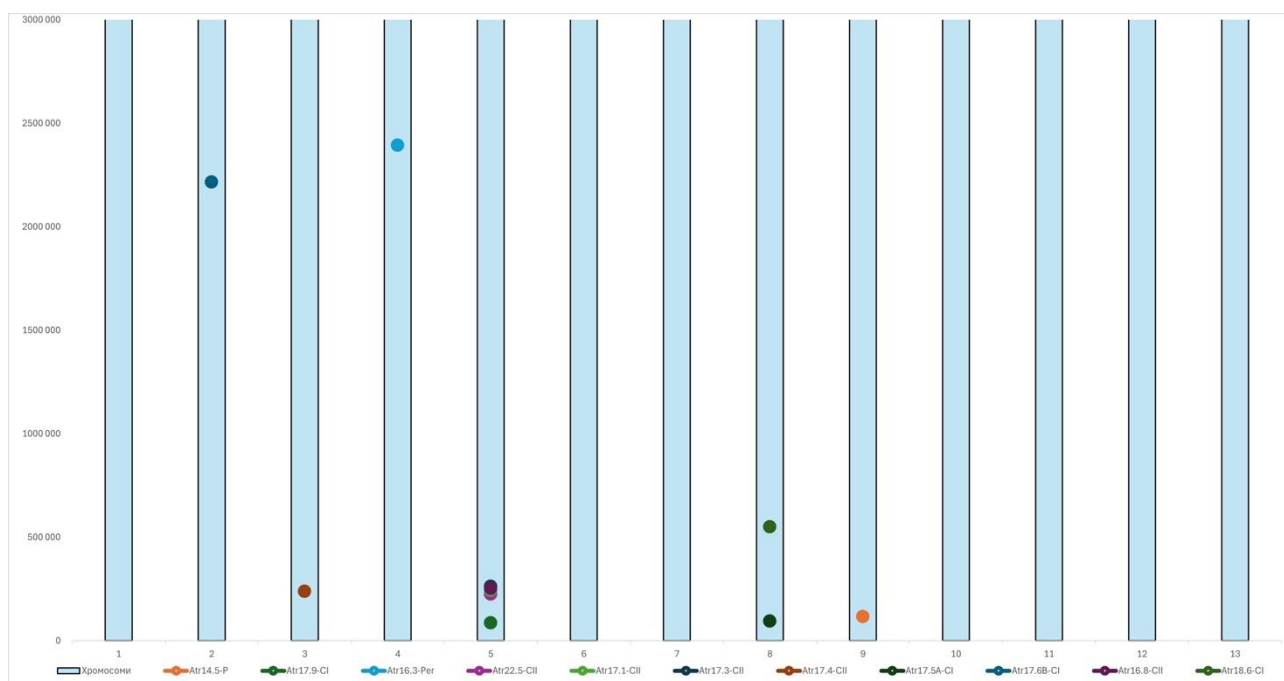
**Рисунок 3.** Екзон-інтронна структура генів sHSP *O. sativa*.



**Рисунок 4.** Екзон-інтронна структура генів sHSP *A. trichopoda*.



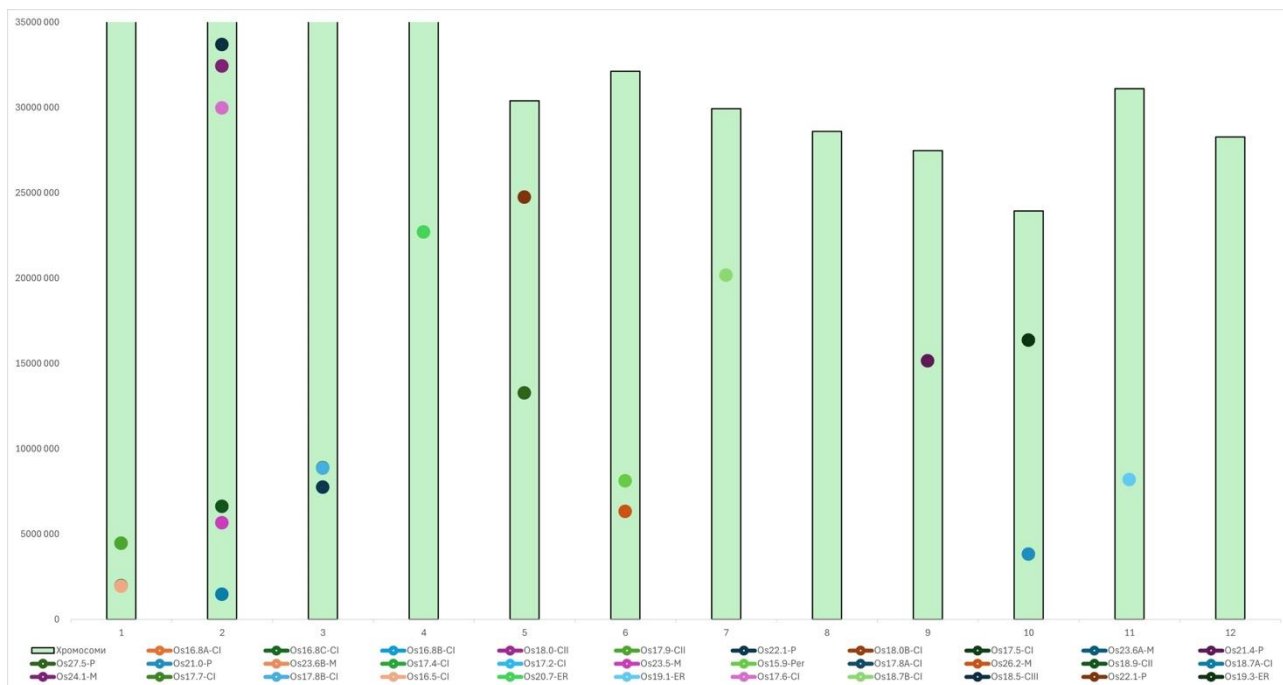
В кінці дослідження було проаналізовано хромосомне розташування генів sHSP *A. trichopoda* та *O. Sativa* (рис. 5 та рис. 6). На рис. 5 показано розташування генів sHSP на 13 хромосомах амборелли. Різними кольорами позначено гени відповідно до їхньої класифікації. Ці гени нерівномірно розподілені по хромосомах, як демонструє візуалізація. Зокрема, 4, 6, 10, 11 і 13 хромосоми не мають жодного гена, тоді як 5 і 8 хромосоми мають по два-три гени. Такий розподіл може свідчити про наслідки геномних дуплікацій або існування локальних кластерів генів. Крім того, кілька генів, які належать до одного класу - наприклад, Atr17.1-CII і Atr17.3-CII - присутні на різних хромосомах. Це може вказувати на еволюційне розширення родини sHSP та сегментні дуплікації у цього виду. Загалом, розташування генів sHSP у геномі *A. trichopoda* свідчить про складне еволюційне минуле цієї родини. Ко-регуляція та функціональна різноманітність білків sHSP може забезпечувати механізми адаптації до стресових умов, про що свідчить нерівномірне розташування, кластери та гомологічні копії генів.



**Рисунок 5.** Хромосомне розташування генів sHSP *A. trichopoda*.

На рис. 6 показано розташування генів sHSP на хромосомах *Oryza sativa*. Можна зробити висновок, що ця родина має широке геномне поширення,

оскільки ці гени знаходяться на кожній хромосомі геному. Рис має набагато рівномірніший, хоча все ще нерівномірний розподіл генів sHSP, ніж амборелла, де в деяких хромосомах вони взагалі відсутні. Це може вказувати як на недавні, так і на давні дуплікації, а також на складні еволюційні геномні перебудови. На складну еволюційну історію sHSP в *O. sativa* загалом вказує велика кількість генів sHSP, їх функціональна спеціалізація, а також те, що вони присутні на всіх хромосомах. Організація цього геному, найімовірніше, пов'язана з потребою рослини в адаптації до низки стресових впливів навколишнього середовища. Як природний відбір, так і селекційний тиск під час одомашнення культур могли сприяти зростанню та диференціації родини sHSP.



**Рисунок 6.** Хромосомне розташування генів sHSP *O. sativa*.

## ВИСНОВКИ

1. У геномі рису налічується 35 генів sHSP, які поділяються на 8 структурних класів, тоді як у геномі амборелли - 24 гени, які поділяються на 7 класів. *A. trichopoda* не містить sHSP, які локалізовані в ендоплазматичному ретикулумі, на відміну від *O. sativa*. Крім того, кожен вид має по одному білку (OsHSP22.1 і Atr20.7 відповідно), який не належить до жодного класу.
2. У генах sHSP обох видів існує значна варіація довжини доменів, особливо в N- та С-кінцевих ділянках. Мітохондріальні білки амборелли мають N-кінцеву ділянку довжиною 149-179 амінокислот, тоді як мітохондріальні білки рису мають ділянку довжиною від 113 до 148 амінокислот. На відміну від С-кінцевої ділянки рису, що складається з 13-33 амінокислот, білки амборелли мають лише 13 амінокислот. Всі білки мали однаковий  $\alpha$ -кристалічний домен (ACD), який складається приблизно з 90 амінокислот, що дозволяє припустити, що ця ділянка є консервативною.
3. Os17.6-CI та Atr17.6B-CI - два приклади підгруп білків класу CI, які, як було виявлено, містять гени обох видів. Однак деякі білки рису не мають гомологів амборелли, що свідчить про те, що ці гени були або нещодавно виявлені в рисі, або втрачені в процесі еволюції в амборелли. Це свідчить про те, що шляхи еволюції sHSP цих видів відрізняються один від одного.
4. Наявність генів sHSP на кожній хромосомі рису свідчить про широке геномне представництво і, найімовірніше, як нові, так і старі дуплікації. Однак у п'яти з тринадцяти хромосом амборелли відсутні гени sHSP, а решта хромосом розподілені нерівномірно, що може бути ознакою сегментних дуплікацій і локальних кластерів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2018). Small heat shock proteins. In *Elsevier eBooks* (pp. 367–376). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812689-9.00019-4>
2. Beretta, G., & Shala, A. L. (2022). Impact of heat shock proteins in neurodegeneration: possible therapeutical targets. *Annals of Neurosciences*, 29(1), 71–82. <https://doi.org/10.1177/09727531211070528>
3. Chandel, G., Dubey, M., & Meena, R. (2012). Differential expression of heat shock proteins and heat stress transcription factor genes in rice exposed to different levels of heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0156-8>
4. Chen, X., Lin, S., Liu, Q., Huang, J., Zhang, W., Lin, J., Wang, Y., Ke, Y., & He, H. (2014). Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(4), 818–828. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.010>
5. Cheng, H., Wang, J., Zhao, Y., Hou, X., Ling, F., Wang, Y., & Cao, Y. (2024). Deciphering the role of heat shock protein HSPA1L: biomarker discovery and prognostic insights in Parkinson's disease and glioma. *Slas technology*, 100212. <https://doi.org/10.1016/j.slant.2024.100212>
6. Dabbaghizadeh, A., Morrow, G., Amer, Y. O., Chatelain, E. H., Pichaud, N., & Tanguay, R. M. (2018). Identification of proteins interacting with the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster*: Implication in mitochondrial homeostasis. *PLoS ONE*, 13(3), e0193771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193771>
7. Do, J., Kim, H., Shin, S., Park, S., Kim, J., & Yoon, H. (2023). OSHSP 17.9, a small heat shock protein, confers improved productivity and tolerance to high temperature and salinity in a natural paddy field in transgenic rice plants. *Agriculture*, 13(5), 931. <https://doi.org/10.3390/agriculture13050931>
8. Gabler, F., Nam, S., Till, S., Mirdita, M., Steinegger, M., Söding, J., Lupas, A. N., & Alva, V. (2020). Protein sequence analysis using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Current Protocols in Bioinformatics*, 72(1).

<https://doi.org/10.1002/cpbi.108>

9. González-Gordo, S., López-Jaramillo, J., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2023). Soybean (*Glycine max* L.) lipoxygenase 1 (LOX 1) is modulated by nitric oxide and hydrogen sulfide: an in vitro approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8001. <https://doi.org/10.3390/plants12020389>
10. Guo, L., Li, J., He, J., Liu, H., & Zhang, H. (2020). A class I cytosolic HSP20 of rice enhances heat and salt tolerance in different organisms. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58395-8>
11. Hussain, A., & Brooks, C. L., III. (2024). Guiding discovery of protein sequence-structure-function modeling. *Bioinformatics*, 40(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btae002>
12. Ma, W., Guan, X., Li, J., Pan, R., Wang, L., Liu, F., Ma, H., Zhu, S., Hu, J., Ruan, Y., Chen, X., & Zhang, T. (2019). Mitochondrial small heat shock protein mediates seed germination via thermal sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4716–4721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815790116>
13. Min, S., Kim, H., Lee, B., & Yoon, S. (2021). Protein transfer learning improves identification of heat shock protein families. *PLoS ONE*, 16(5), e0251865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251865>
14. Mondal, S., Karmakar, S., Panda, D., Pramanik, K., Bose, B., & Singhal, R. K. (2023). Crucial plant processes under heat stress and tolerance through heat shock proteins. *Plant Stress*, 10, 100227. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100227>
15. Sakai, H., Lee, S. S., Tanaka, T., Numa, H., Kim, J., Kawahara, Y., Wakimoto, H., Yang, C., Iwamoto, M., Abe, T., Yamada, Y., Muto, A., Inokuchi, H., Ikemura, T., Matsumoto, T., Sasaki, T., & Itoh, T. (2013). Rice Annotation Project Database (RAP-DB):an integrative and interactive database for rice genomics. *Plant and Cell Physiology*, 54(2), e6. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs183>
16. Sun, L., Liu, Y., Kong, X., Zhang, D., Pan, J., Zhou, Y., Wang, L., Li, D., & Yang, X. (2012). ZmHSP16.9, a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea*

- mays), confers heat tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 31(8), 1473–1484. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1262-8>.
17. Sun, X., Zhu, J., Li, X., Li, Z., Han, L., & Luo, H. (2020). AsHSP26.8a, a creeping bentgrass small heat shock protein integrates different signaling pathways to modulate plant abiotic stress response. *BMC Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02369-5>
  18. Tian, F., Hu, X., Yao, T., Yang, X., Chen, J., Lu, M., & Zhang, J. (2021). Recent advances in the roles of HSFs and HSPs in heat stress response in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.704905>
  19. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., & Schöffl, F. (2005). Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 57(4), 487–502. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0339-y>
  20. Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Mullineaux, P.M. & Schöffl, F. (2006). Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 61(4–5), 733–746. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0045-4>
  21. Wang, Q., Chen, J., He, N. & Guo, F. (2018). Metabolic reprogramming in chloroplasts under heat stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 849. <https://doi.org/10.3390/ijms19030849>
  22. Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity. *New Phytologist*, 227(1), 24–37. <https://doi.org/10.1111/nph.16536>
  23. Wu, J., Gao, T., Hu, J., Zhao, L., Yu, C., & Ma, F. (2022). Research advances in function and regulation mechanisms of plant small heat shock proteins (sHSPs) under environmental stresses. *The Science of the Total Environment*, 825, 154054. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154054>
  24. Xie, Z., Situ, Y., Deng, L., Liang, M., Ding, H., Guo, Z., Xu, Q., Liang, Z., & Shao, Z. (2025). Identification of therapeutic targets for Alzheimer’s Disease Treatment



using bioinformatics and machine learning. *Scientific Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88134-w>

25. Zhao, J., Lu, Z., Wang, L. & Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117. <https://doi.org/10.3390/ijms22010117>

## **ДОДАТКИ**

## **Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях**

### **Вимоги безпеки перед початком роботи**

1. Лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.

2. Перед початком роботи потрібно:

- оглянути та упорядкувати робоче місце;
- перевірити витяжну систему;
- перевірити правильність підключення устаткування до електромережі;
- перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
- переконатися в наявності захисного заземлення приладів.

3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання. Працівник зобов'язаний повідомити керівнику про виявлені пошкодження.

### **Вимоги безпеки під час виконання роботи**

Під час роботи у лабораторії слід дотримуватись таких правил:

1. Необхідно використовувати захисний одяг (лабораторний бавовняний халат, при необхідності гумові рукавички та окуляри; при роботі з дрібнодисперсними речовинами потрібно носити респіраторні маски);
2. Двері під час роботи мають бути зачинені;
3. При роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи і пилу;
4. При роботі з летючими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри **забороняється**:

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;
- працювати у верхньому одязі;

- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- викидати в раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальничками тощо);
- переносити обладнання без дозволу зав. кафедрою або зав. лабораторією;
- користуватись зіпсованими електроприладами;
- самостійно проводити ремонт розеток, вимикачів, запобіжників;
- користуватись витяжними шафами з розбитим склом або непрацюючою вентиляцією;
- зберігати реактиви у посуді без етикеток.

По закінченні роботи слід мити руки.

### **Робота з хімічними речовинами**

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи:

1. Робота з шкідливими речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.
2. Використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні.
3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.
4. У кожній лабораторії повинні бути списки небезпечних речовин.

### **Вимоги безпеки після закінчення роботи**

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру;
- виходячи останнім, зачинити вікна (кватирки), вимкнути світло, газ, перевірити чи вимкненні всі електроприлади та закриті крани, зачинити

приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журналі.

### **Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях**

До аварійних ситуацій відносяться:

- розгерметизація технологічних трубопроводів, тари та обладнання з викидом продукту, його пари та пилу у виробниче та зовнішнє середовище;
- загоряння технологічних трубопроводів, обладнання, продукту;
- відключення електропостачання, яке живить засоби колективного захисту, обривання і коротке замикання електрокомунікацій, електрообладнання.

У разі розливу легкозаймистих та горючих рідин необхідно погасити газові пальники, вимкнути електроживлення загальним рубильником, розлитий продукт засипати піском, пісок зібрати і усунути у безпечне місце.

У випадку займання легкозаймистих та горючих рідин необхідно:

- негайно приступити до її гасіння, застосовуючи відповідні для даного випадку засоби гасіння (пісок, порошкові та інші вогнегасники);
- негайно вимкнути вентиляцію, пальники і нагрівальні прилади;
- винести з приміщення посудини з вогнєнебезпечними речовинами.

При виникненні іскріння (спалахування) струмоведучих частин електрообладнання, лаборант зобов'язаний його негайно знеструмити, повідомити про це електрику, завідувачому лабораторією.

### **У разі виявлення пожежі (ознак горіння) необхідно:**

- припинити роботу;
- знеструмити електрообладнання;
- негайно повідомити про це телефоном пожежну охорону. При цьому необхідно назвати адресу об'єкта, вказати кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку на пожежі, наявність людей, а також повідомити своє прізвище;
- вжити (за можливістю) заходів до евакуації людей, гасіння (локалізації)

пожежі та збереження матеріальних цінностей;

- повідомити про пожежу наукового керівника або працівників кафедри;
- у разі необхідності викликати інші аварійно-рятувальні служби (медичну, газорятувальну тощо);
- у випадку оголошення евакуації швидко й організовано покинути приміщення лабораторії та навчального корпусу.

### Надання першої медичної допомоги

У випадку **ураження людини струмом** перш за все потрібно вимкнути рубильники та викликати «Швидку допомогу» за номером 103.

При легких **термічних опіках** шкіру слід промити етанолом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та етанолом необхідно змастити засобом від опіків.

При **опіках кислотами** потрібно промити обпалене місце великою кількістю води протягом 10 хвилин, потім – 3% розчином соди.

При **опіках лугами** шкіру потрібно промити великою кількістю води, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При **отруєнні хімікатами** слід терміново викликати лікаря або відправити потерпілого в найближчий лікарський заклад. Дуже важливо визначити, отруєння якою речовиною мало місце. Перша допомога при будь-якому отруєнні полягає в швидкому видаленні отрути з організму, а якщо це не можливо, то у знешкодженні її в організмі. При попаданні отрути в організм через рот необхідно викликати блювання. Проте це не можна робити, якщо потерпілий знаходиться у несвідомому або напівсвідомому стані, а також при різкому порушенні кровообігу. Найпростіший спосіб викликати блювання – ввести пальці глибоко в рот. Щоб видалити отруту із шлунку, слід дати випити велику кількість (5-8 склянок) теплої (30-35°C) води, а після цього знов викликати блювання. Таке промивання шлунку слід повторити декілька разів. Якщо отрута

відома, шлунок промивають чистою водою, або розчинами речовин, що нейтралізують отруту. При отруєнні кислотами для промивання шлунку застосовують воду (використання розчину соди не допускається). При отруєнні лугами промивку проводять 2% оцтовою або лимонною кислотою. При отруєнні ртуттю або свинцем для промивання використовують молоко.

При отруєнні парами постраждалого слід вивести на свіже повітря. При послабленні дихання та нестачі кисню слід застосовувати штучне дихання і викликати лікаря.

При *попаданні хімікатів у очі* їх необхідно негайно промити великою кількістю води.

При *порізах* у разі необхідності видалити з рани уламки скла або інших матеріалів, промити рану, краї рани продезинфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах слід накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити того, хто постраждав, у лікарню.