

**ШОЛУ МАҚАЛАСЫ**



**REVIEW ARTICLE**



**ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ**

МРНТИ 34.15.25; 31.27.00; 34.15.27

**Алыбаев С.Д., Бисенбаев А.К.**

Казахский национальный университет имени им. аль-Фараби,  
Казахстан, г. Алматы, e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz

## **TOR СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА В РАСТЕНИЯХ**

Мишень рапамицина млекопитающих (Mammalian target of rapamycin (mTOR)) представляет собой серин-треониновую киназу, которая функционирует в качестве центрального элемента в сигнальном пути, отвечающем за клеточную реакцию на стрессы и доступность питательных веществ/энергии, и обеспечивает соответствующие изменения процессов роста, пролиферации и выживания клеток, а также синтеза белка. До настоящего времени изучение молекулярных механизмов TOR сигнальной системы в основном было сосредоточено на клетках дрожжей и животных. Растительные организмы, в большинстве своем неподвижные и ограниченные к одному месту обитания, обязаны постоянно подстраивать темпы роста (выраженного в увеличении размеров органов) и развития (состоящего в формировании новых органов и структур) в зависимости от наличия питательных веществ. Кроме того, растения также преодолевают неблагоприятные внешние факторы, не имея возможности их физически избежать. TOR сигнальная система является центром регуляторных сетей поддержания баланса между защитой и ростом у всех эукариот. Следовательно, раскрытие молекулярных механизмов TOR сигнальной системы у растений является ключом к контролю устойчивости к стрессу и продуктивности растений. Последние достижения в изучении пути передачи сигналов TOR у растений позволяют предположить значительное совпадение клеточных процессов и процессов развития, которые регулируются TOR у растений, животных и людей. Целью данного обзора является раскрытие последних достижений в исследованиях пути передачи сигналов TOR у растений.

**Ключевые слова:** TOR, млекопитающие, растения, водоросли, *Saccharomyces cerevisiae*, рапамицин, аутофагия, раптор.

Alybayev D.S., Bisenbaev K.A.  
Al-Farabi Kazakh National University,  
Kazakhstan, Almaty, e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz

### **TOR signaling system in plants**

The mammalian target of rapamycin (TOR), is a protein Ser-Thr kinase that functions as a central element in a signaling pathway responsible for a cellular reaction towards stresses and nutrient/energy availability and promote appropriate changes in cell growth and proliferation, cell survival, and protein synthesis. Until now, study of the molecular mechanisms of TOR signaling pathway have been mainly focused on yeast and animal cells. As sessile organisms plants are limited to one habitat are obliged to constantly adjust the growth rates (expressed in increasing the size of organs) and development (consisting in the formation of new organs and structures) to the availability of nutrients. Furthermore, plants also overcome adverse external factors without being able to physically avoid them. Therefore, the disclosure of molecular mechanisms of the TOR signaling pathways in plants is the key to controlling stress resistance and plant productivity. Recent advances in the study of TOR signaling pathway in plants suggest a significant overlap in the cellular and developmental processes that are regulated by TOR in plants, animals and humans.

The purpose of this review is to reveal the latest advances in studies of the TOR signaling pathway in plants

**Key words:** TOR, mammals, plants, algae, *Saccharomyces cerevisiae*, rapamycin, autophagy, raptor.

Алыбаев С.Д., Бисенбаев А.К.,  
өл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,  
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz

### Өсімдіктердің TOR сигналды жүйесі

Сүтқоректілердің рапамициннің нысанасы (Mammalian target of rapamycin (mTOR)) клетканың стрестік жағдайға немесе қоректік заттар мен энергияның бар-жоқтығына жауап беретін сигналды жүйенің орталық элементі болып табылатын серин-треонинді киназаларға жатады, клеткалардың өсуіне, бөлінуі мен ақуыз биосинтезіне жауап береді. Осы уақытқа дейін TOR сигналды жүйесінің молекулалық механизмдері негізінен ашытқылар мен сүтқоректілерде жақсы зерттелінді. Өсімдіктер көп жағдайда бір жерге орнығып өсуіне байланысты өзінің өсіп-өну үрдістерін (мүшелерінің ұлғаюы мен жаңа мүшелерінің пайда болуы) қоректік заттардың бар-жоқтығына байланысты үнемі реттеп отыруларына тура келеді. Сонымен қатар өсімдіктер, өз орынын өзгерте алмайтынына қарамастан, қоршаған ортаның қолайсыз әсерлеріне төтеп бере алады. Барлық эукариоттарда TOR сигналдық жүйе қорғаныш пен өсу арасындағы балансты тұрақтандыратын түйінді реттегіш орталық болып табылады. Сондықтан да өсімдіктердегі TOR сигналды жүйесінің молекулалық механизмдерін ашу, өсімдіктердің қоршаған ортаның қолайсыз факторларына тұрақтылығы мен өнімділігін арттырудың кілті болып табылады. Өсімдіктердің TOR сигналды жүйесін зерттеу бағытындағы соңғы деректер, TOR жүйесі арқылы реттелетін өсімдіктер мен жануарлардың клеткалық және өсу үрдістерінің ұқсастығын байқатады. Осы шолудың мақсаты өсімдіктердегі TOR сигналды жүйесінің реттелу механизмдерін зерттеудегі соңғы жетістіктерін қарастыру.

**Түйін сөздер:** TOR, сүтқоректілер, өсімдік, балдырлар, *Saccharomyces cerevisiae*, рапамицин, аутофагия, раптор.

### Введение

Клеточные сигнальные и метаболические регуляторные сети переплетены и играют определяющую роль в выборе программы развития в ответ на изменения окружающей среды и стрессы. Мишень рапамицина (*Target of rapamycin, TOR*) является центром таких регуляторных сетей у всех эукариот, от одноклеточных дрожжей и водорослей до многоклеточных растений, животных и человека [1]. Со времен открытия рапамицина как продукта метаболизма бактерии *Streptomyces hygroscopicus* из почвенного образца с острова Пасхи и характеристики гена TOR киназы у дрожжей [2], млекопитающих [3] и растений [4], достигнут огромный прогресс в расшифровке молекулярных механизмов TOR сигнальной системы. У растений, как и у животных, *tor* ноль-мутанты являются эмбрионально *летальными*, тогда как *рапамицин* лишь частично снижает широкий спектр действия TOR сигнальной системы [4, 5, 6, 7]. Однако, с использованием индуцибельных *tor*-RNAi линий растений, количественных методов анализа мишеней фосфорилирования TOR киназы и специфических химических ингибиторов исследованы возможная связь между молекулярными, клеточными и метаболическими функциями TOR сигнальной системы и его прямыми или опосредованными субстратами

фосфорилирования в разных процессах развития растений.

Целью настоящего обзора, является раскрыть последнее достижения в исследованиях TOR сигнальной системы в растениях.

### Структура TOR белка

TOR киназа – это эволюционно консервативная серин-треониновая киназа, которая входит в семейство родственных по отношению к фосфатидилинозитол-3-киназе (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinases, PIKK*) [3]. Все обнаруженные TOR белки имеют схожее строение: все содержат С-концевой домен, гомологичный каталитическим доменам PI3K и PI4K. TOR киназа в отличие от других киназ этого семейства содержит FKBP-рапамицин-связывающий домен (FRB), примыкающий к каталитическому киназному домену. Помимо каталитических и FRB доменов TOR-белки имеют на N-конце tandemно повторяющиеся мотивы HEAT (*Huntington, Elongation Factor 3 regulatory, subunit A of PP2A, TOR1*). Мотивы HEAT обуславливают белок-белковые взаимодействия в многокомпонентных белковых комплексах. Также имеется так называемый FAT домен (*FRAM/ATM/TRRAP*), обнаруженный исключительно у представителей семейства PIKK. Данный домен состоит из приблизительно 500 аминокислот и рас-

полагается ближе к N-концу по сравнению с FRB и киназным доменами. Функция FAT неизвестна. Предположительно, данный участок, подобно HEAT, обеспечивает белок-белковые взаимодействия. Наконец, PI3K содержат короткую

C-концевую последовательность – FATC [8]. Этот домен присутствует только при наличии FAT, и, возможно, важен для каталитической активности киназ семейства PI3K. Доменная структура киназ TOR приведена на рисунке 1.

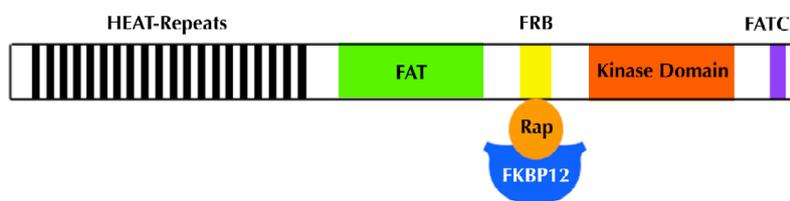


Рисунок 1 – Доменная структура mTOR

Белки TOR были описаны в растениях, включая модельное растение *Arabidopsis thaliana* и одноклеточного зеленого водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Геном *Arabidopsis thaliana* содержит один ген TOR (AtTOR), который кодирует белок (молекулярной массой приблизительно 280 кДа.) с высокой идентичностью с TOR млекопитающих и дрожжей. Аналогичным образом, исследование генома *Chlamydomonas* показала высокую консервативность TOR киназы в зеленых водорослях, и в этом одноклеточном организме идентифицирован единственный ген TOR киназы (CrTOR). Анализы AtTOR и CrTOR показали, что оба белка содержат домены, высоко-консервативные в TOR киназе, включая FRB домен, C-концевой киназный домен, N-концевые повторы HEAT, FAT и FATC домены связанные с фосфатидилинозитол-3-киназой [9]. В секвенированном геноме *Oryza sativa* [10], *Solanum lycopersicum* [11], *Solanum tuberosum* [13], *Zea mays* [12] и других растениях идентифицированы гены кодирующие предполагаемую TOR киназу. Показано, что TOR из разных видов растений имеют высокое сходство аминокислотных последовательностей с TOR млекопитающих и дрожжей, особенно в киназной и FRB доменах. В геноме *Gossypium hirsutum* выявлено, что гены TOR киназы хлопчатника представлена в двух генетических локусах GhTOR1 и GhTOR2 [14]. Полноразмерная последовательность гена GhTOR1 состоит из 20,012 п.н. и содержит 58 экзонов, тогда как GhTOR2 имеет 21,569 п.н. с тем же числом экзонов, что и в GhTOR1. Аминокислотная последовательность белка GhTOR1 показал сходную организацию доменов, как у арабидопсиса и человека. При этом домен FATC не был обнаружен в белке GhTOR2.

Высокая степень консервативности аминокислотной последовательности TOR киназы среди всех изученных видов растений подтверждает жизненно важное значение этой киназы и, как следствие, TOR сигнальной системы для роста и развития растений.

#### Действие рапамицина на рост и развитие растений и водорослей

Протеинкиназа TOR была впервые идентифицирована с помощью генетического скрининга линий *Saccharomyces cerevisiae* устойчивых к действию рапамицина [15]. Устойчивые к рапамицину линии в основном несут рецессивные миссенс-мутации, приводящие к аминокислотным заменам в белке FKBP12 (12 kDa FK506 Binding Protein), но также были идентифицированы доминантные миссенс-мутации в двух генах, названных TOR1 и TOR2 (Target of Rapamycin 1 и 2). Дальнейшие исследования показали, что мутации консервативного остатка серина в домене FRB TOR1 или TOR2 придают доминантную устойчивость к рапамицину [16]. Вскоре после этого три научные группы определили «физическую мишень рапамицина» у млекопитающих с помощью биохимических методов с использованием рапамицина и FKBP12. Рапамицин был незаменимым инструментом для изучения роли TOR сигнальной системы как у дрожжей, так и у животных, но эффект рапамицина у животных более ограничен в отношении синтеза белка, аутофагии и пролиферации и дозозависимый эффект рапамицина широко варьировались в зависимости от типа клеток и тканей [17-20].

Рапамицин – это липофильный макролид, продуцируемый *Streptomyces hygroscopicus*.

Кристаллы этого антибиотика практически нерастворимы в воде, но легко растворяются в этаноле, метаноле, диметилсульфоксиде и других органических растворителях. Химическое строение рапамицина представлено на рисунке 2. Несмотря на слабую антибактериальную активность, рапамицин является сильным ингибитором дрожжевого роста. Наиболее выражен его эффект в отношении представителей рода *Candida*, в частности *C. albicans* [21].

Структурный аналог рапамицина – FK506, является антибиотиком синтезируемым *Streptomyces tsukubaensis*. FK506 является сильным иммуносупрессантом, чье ингибирующее воздействие было изучено в ходе ряда испытаний прикладного характера. FK506 связываются

с широко распространенными и филогенетически консервированным внутриклеточным рецептором FKBP12 [22]. Рапамицин и FK506 имеют сходное химическое строение (рисунок 2), что вызвало интерес к рапамицину, как к потенциальному иммуносупрессанту.

Оба соединения связываются с одним и тем же доменом FKBP12 белка. Если FK506 образует комплекс с FKBP12, то происходит ингибирование активности  $Ca^{2+}$ -зависимой серин-треониновой фосфатазы – кальциневрина. Тогда как, комплекс FKBP12-рапамицин связывается с FRB доменом TOR киназы, образуя тройной комплекс, что приводит к торможению активности TOR-киназы посредством аллостерического взаимодействия [23].

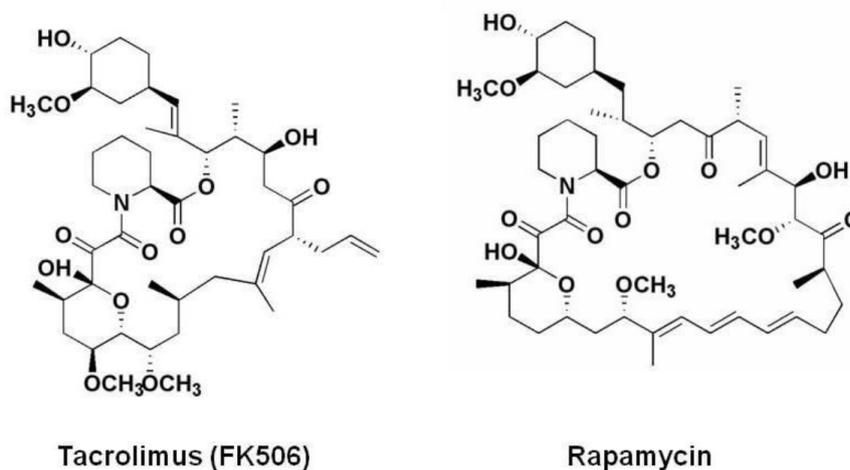


Рисунок 2 – Структура FK506 и рапамицина

У водорослей чувствительность к рапамицину зависит от видовой принадлежности. При этом, уровень ингибирования клеточного роста и доза рапамицина значительно варьируются от 100 нМ (40% ингибирование роста) для *Chlamydomonas reinhardtii* [24] до 50 мкМ (40% ингибирование роста) для *Euglena gracilis* [25], при этом незначительный эффект при дозе 10 мкМ наблюдалась для диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* [26] и красных водоросли *C. merolae* [27]. Следует отметить, что в присутствии 1 мкМ рапамицина содержание хлорофилла снижалось у *C. merolae*, но не у *C. reinhardtii* [25].

Получены устойчивые к рапамицину мутантные по гену FKBP12 линии *C. Reinhardtii*. С помощью мутантной линии *C. Reinhardtii* показано, что рапамицин ингибирует проли-

ферацию клеток посредством взаимодействия комплекса рапамицин-FKBP12 с TOR, что является сильным аргументом для дальнейшего использования рапамицина в этой экспериментальной системе [24]. Эти немногочисленные данные показывают, что рапамицин не является общим сильным ингибитором TOR киназы у водорослей, напоминая разнообразие фоновых реакций клеточных линий млекопитающих к рапамицину.

Некоторые эксперименты по изучению влияния рапамицина на растительные организмы показали, что высшие растения устойчивы к низким концентрациям данного макролида, в отличие от одноклеточных водорослей [4, 7, 11, 13, 14, 28, 29, 30, 31]. Авторы не исключают вероятность селективного преимущества мутации в гене FKBP12 растений, чтобы противостоять по-

чвенному стрептомицету, который продуцирует рапамицин [32].

Предполагается, что нечувствительность или слабая чувствительность растений к рапамицину связана с низкой способностью FKBP12 белков растений образовывать ингибиторный тройной комплекс с рапамицином из-за изменений аминокислотных остатков, критически важных для взаимодействия с рапамицином [31, 33, 34]. С помощью двухгибридного дрожжевого анализа и изучения белок-белкового взаимодействия в условиях *in vitro* показано отсутствие взаимодействия между FKBP12 арабидопсиса (AtFKBP12) и FRB доменом TOR киназы арабидопсиса (AtTOR-FRB). При этом, AtTOR-FRB образовывал комплекс с человеческим HsFKBP12 или дрожжевым ScFKBP12 [4, 29, 31].

Таким образом, растения арабидопсиса могут стать чувствительными к рапамицину за счет сверхэкспрессии FKBP12 дрожжей и человека [7, 28, 31, 35, 36]. Чувствительность к рапамицину (10-500 нМ) также значительно усиливалась у линии красной водоросли *C. merolae* экспрессирующей ген ScFKBP12.

Несколько научных групп показали, что растения арабидопсиса, выращенные на твердой среде, нечувствительны к рапамицину вплоть до концентрации 10 мкМ [28, 29, 7, 31]. Такой диапазон концентраций в 100-1000 раз превышает концентрацию, которая ингибирует пролиферацию дрожжей (100 нМ) или уменьшают размер клеток и пролиферацию В-клеток лимфоцитов (0.005-0.5 нМ) или эмбриональных фибробластов мыши (50-250 нМ) [18, 37, 38].

Наиболее изученной мишенью TOR киназы является серин/треониновая протеин киназа p70-S6 киназа 1 (S6K1). Уровень фосфорилированности этого белка является индикатором активности mTORC1 в клетках. У арабидопсиса TOR киназа фосфорилирует AtS6K1 по треонину расположенному в 449 положении начиная с N-конца. В работе Xiong и Sheen [36] показано, что AtTOR-зависимое фосфорилирование T449-AtS6K1 (эквивалентно к T389 у животных S6K1) значительно ингибируется более низкими концентрациями рапамицина, в протопластах коэкспрессирующих гены AtS6K1 и AtFKBP12 или HsFKBP12.

Другие авторы [28] сконструировали трансгенные растения, сверхэкспрессирующие AtFKBP12 и/или ScFKBP12 и/или HsFKBP12. Затем изучали чувствительность трансгенных растений к рапамицину. Однако, в этих экспери-

ментальных условиях, сверхэкспрессия FKBP12 не приводило к усилению чувствительными к рапамицину. Таким образом, это несоответствие с данными Xiong и Sheen [36] указывает на возможные ошибки в конструировании трансгенных линий для сверхэкспрессии FKBP12.

Интересно отметить, в ряде работ показано зависимость чувствительности растений к рапамицину от условий роста. Выявлено, что, арабидопсис выращенный в жидкой культуре, более чувствителен к рапамицину [28, 36, 39]. Высказано предположение о возможной роли гипоксии в усилении чувствительности растений к рапамицину [28]. Действительно, рост в жидких средах, в присутствии рапамицина, значительно замедляется. При этом, через 9 дней роста в присутствии рапамицина, корни семян арабидопсиса имеют длину около 2-3 см, что примерно в 2-3 раза меньше, чем у вертикально выращенных семян на твердой среде [7, 30]. Можно предположить, что гипоксический стресс может усиливать экспрессию AtFKBP12 и/или AtTOR в этих условиях значительной степени заблокирован, что может повысить доступность AtTOR к рапамицину. Однако следует отметить, что растения томата проявляют чувствительность к рапамицину. При обработке растений томата рапамицином в дозе 10 мкМ происходило существенное ингибирование роста растений. Инкубация *растений* в присутствии АТФ-конкурентных ингибиторов TOR киназы – KU63794, AZD8055 и Torin-1 приводило к аналогичному подавлению роста растений. Эти данные указывают на то, что FKBP12 белок функционирует в растениях томата, и TOR сигнальная система контролирует рост и развитие растений. Кроме того, было показано, что AtFKBP12 взаимодействует с ядерным белком, который контролирует эндоредупликацию [40]. Как и в случае кальциневрина, HsFKBP12 также является субъединицей рецептора первого типа трансформирующего ростового фактора В (TGF-β), который является трансмембранной серин-треониновой киназой и регулирует рост и дифференцировку в большинстве клеток животных [41]. У клеточных линий нокаутных по генам HsFKBP12 клеточный цикл останавливается из-за нарушения регуляции передачи сигналов TGF-рецептором [42]. Следовательно, возникает вопрос участвует ли AtFKBP12, в отсутствие рапамицина, в регуляции клеточного цикла или других процессах, мешающих исследованию TOR сигнальной системы в линиях растений сверхэкспрессирующих FKBP12. Действи-

тельно, сверхэкспрессия гетерологичного гена FKBP12 может также изменить физиологию растений, поскольку ген PaFKBP12 из антарктического мха *Polytrichastrum alpinum*, эктопически экспрессированный в растении арабидопсиса значительно усилил устойчивость растений к стрессу [43]. Таким образом, даже если линии сверхэкспрессирующие FKBP12 не имеют более заметного фенотипа [28, 31], это не исключает возможность изменений на клеточном/тканевом уровнях по сравнению с диким типом.

Следует также отметить, что рапамицин в животных системах ингибирует протеиназную и пептидазную активность каталитического ядра протеасомы при низких микромолярных концентрациях (0.5-5 мкМ). Показано, что рапамицин препятствует связыванию активатора протеасомы PA200 с каталитическим ядром 20S протеасомы. Авторы предполагают, что рапамицин и родственные им соединения аллостерически регулирует функцию протеасом [44]. При этом этот эффект рапамицина не зависит от функциональной активности TOR сигнальной системы. Эти исследования справедливо поднимает вопрос о селективности рапамицина по отношению к TOR киназе при высоких концентрациях.

Таким образом, несмотря на то, что FKBP12 белок арабидопсиса не может связываться с рапамицином с образованием ингибиторного комплекса с TOR, было обнаружено, что рапамицин оказывает ингибирующее действие на прорастание семян, хотя и в гораздо более высокой концентрации, чем было показано в клетках животных и дрожжей. Следовательно, нельзя исключить вероятность существования истинного гомолога FKBP12, который возможно еще не идентифицирован у растений. В последнее время трансгенные растения сверхэкспрессирующие FKBP12 дрожжей и человека становятся модельной системой для исследования функционирования TOR сигнальной системы в растениях. Учитывая влияние FKBP12 на независимые от TOR сигнальной системы клеточные процессы, необходимо избегать использование модельных систем на основе трансгенной сверхэкспрессии FKBP12. Кроме этого, в проводимых исследованиях концентрацию FKBP12 и/или рапамицина, а также физиологические параметры клеток необходимо тщательно контролировать, поскольку они могут оказать влияние на результаты, не зависящие от ингибирования TOR сигнальной системы.

## TOR-комплексы в растениях

С помощью генетических и биохимических исследований выявлена два основных комплекса TOR сигнальной системы млекопитающих: mTORC1, чувствительный к рапамицину и нечувствительный к рапамицину mTORC2. Комплекс, способный связывать FKBP12-рапамицин, и, следовательно, рапамицин-чувствительный, помимо mTOR состоит из белков раптора, mLST8 (или GβL) и PRAS40. Данный комплекс был назван mTORC1. Функциональное состояние этого комплекса напрямую зависит от наличия и доступности питательных веществ. mTORC1 регулирует рост клеток, а также модулирует такие процессы как трансляция мРНК, биогенез рибосом, метаболизм питательных веществ, аутофагия. mTORC2 регулирует другую, рапамицин-нечувствительную, ветвь mTOR-опосредованной сигнальной трансдукции и состоит из mTOR, mLST8, риктора, Sin1 и PRR5 (или Protor). **mTORC2 контролирует пространственную организацию роста клеток, за счет регуляции структуры и полярности цитоскелета.**

Некоторые компоненты TOR сигнальной системы идентифицированы у растений. Гены RAPTOR (RAPTOR1A и RAPTOR1B) и LST8 (LST8-1 и LST8-2) были идентифицированы у всех секвенированных видов растений. У *Arabidopsis* гены RAPTOR1B (At3g08850) и LST8-1 (At3g18140) активно экспрессируются в клетках растений и мутантные растения по этим генам жизнеспособны [45, 46, 47, 48, 49, 50]. Однако, нет никаких данных о присутствии TORC2 комплекса у растений, так как основные компоненты данного комплекса, такие как риктор и Sin1 отсутствуют в геноме растений.

У млекопитающих mLST8 – единственный партнер mTOR, обнаруживаемый в обоих комплексах. Этот белок, целиком состоит из семи повторов WD40. **Эти повторы являются короткими мотивами длиной 40 аминокислот.** mLST8 связывается с киназным доменом mTOR, стимулируя тем самым киназную активность. Тем не менее, mLST8, по-видимому, необязателен для ассоциации mTOR с раптором, и поэтому может не играть критической роли для функционирования mTORC1.

Генетические исследования гомозиготных линий арабидопсиса по мутации в гене LST8-1 показало, что отсутствие этого гена приводит к замедлению вегетативного роста и преимущественному развитию верхушечной почки, и тор-

мозило рост боковых почек [48]. При этом наблюдалось отклонения в развитии цветка. Кроме этого, мутантные растения проявляли значительную чувствительность к продолжительности светового дня и содержали более высокие концентрации крахмала и аминокислот, включая пролин и глютамин. У мутантных растений наблюдались низкие концентрации инозита и рафинозы. Следовательно, представляется вероятным, что белок LST8-1 играет в растениях важную роль в регуляции уровня аминокислот и синтеза мио-инозита и рафинозы во время адаптации растений к длительному световому дню.

Раптор – уникальный компонент mTORC1. У млекопитающих это белок молекулярной массой 150 кДа, содержащий N-терминальный домен (RNC, *raptor* N-terminal conserved) и три следующих за ним повтора HEAT и семь повторов WD40 на C-конце [3]. Изучение взаимодействия между TOR дрожжей и Kog1, дрожжевым гомологом раптора, установило, что повторы WD40 Kog1 связываются с N-концевыми мотивами HEAT TOR, и что в результате данного взаимодействия домен RNC располагается вблизи киназного домена TOR. По всей видимости, домен RNC раптора служит для представления субстратов каталитической субъединице mTORC1.

У арабидопсиса нарушение работы гена *AtRaptor1B* приводит к широким спектрам дефектов в развитии растений. Наблюдается утолщение и замедление роста корней, задержка инициации листьев и оплодотворения, а соцветие побега показывает снижению апикального доминирования [45]. Двойные мутанты *AtRaptor1A*, *AtRaptor1B* показывают нормальное эмбриональное развитие, но не способны поддерживать постэмбриональный рост, обусловленный дефектом меристемы.

В работе других авторов [49] показано, что прорастания мутантных по гену *raptor1b* растений происходило со значительной задержкой, а также были менее устойчивы к стрессам, что приводило к снижению жизнеспособности. Эти физиологические фенотипы сопровождалось морфологическими изменениями, включая снижение пигментации оболочки семени. Кроме этого, у мутантов наблюдалась высокое содержание свободных аминокислот и снижение уровня вторичных метаболитов и запасных белков. Интересно отметить, наблюдаемые морфологические и физиологические изменения сопровождалось с увеличением содержания абсцизиловой кислоты, ауксина и жасминовой кислоты, которые, как известно, ингибируют прорастание. При

этом, задержка прорастания и роста проростков, наблюдаемая в семенах *raptor1b*, может быть частично восстановлена за счет экзогенного добавления гибберелловой кислоты, что указывает на то, что TOR сигнальная система находится в центре регуляторных сетей, контролирующих метаболизм, созревание и прорастание семян.

Недавно, трехмерная структура mTORC1 была определена с помощью криоэлектронной микроскопии высокого разрешения [51, 52]. Предполагается, что в ходе формирования комплекса два белка mTOR димеризуются, образуя полую ромбовидную структуру со своими партнерами по связыванию, RAPTOR и mLST8. При этом RAPTOR и mLST8 образуют более длинный и короткий ось в периферической части комплекса. Кроме этого, трехмерная структура раскрывает доступность и селективность субстрата к каталитическому центру и объясняет, как комплекс FKBP12-рапамицин ограничивает доступ субстрата к каталитическому сайту [52, 53].

Взаимодействия между компонентами комплекса TOR также, по-видимому, сохраняются у растений. Показано, что связывание белка RAPTOR с N-концевым HEAT-доменом TOR киназы необходим для TOR-зависимого фосфорилирования S6K в арабидопсисе [29]. Белки LST8 арабидопсиса и млекопитающих взаимодействуют с C-концевым киназным доменом TOR растений и могут модулировать активность TOR киназы по отношению к селективным субстратам.

Необходимо отметить, что всесторонний генетический, геномный, метаболический и фенотипический анализы функций TORC1 растений позволяет предположить значительное совпадение клеточных процессов и процессов развития, которые регулируются TORC1 сигнальной системой у растений, животных и человека (рис. 2) [36, 54, 55, 56]. Консервативная чувствительность к FKBP12-рапамицину и высокое сходство TOR, RAPTOR и LST8 между растениями и животными позволяют предположить, что растение может образовывать структуру, подобную TORC1, у животных и человека.

## Субстраты TORC1

Всего несколько непосредственных субстратов mTORC1 было обнаружено. Наиболее изученные из них – 4EBP1 и S6K1. Уровень фосфорилированности этих двух белков является индикатором активности mTORC1 в клетках [29]. Малое количество известных субстратов

mTORC1 может служить отображением того обстоятельства, что внутриклеточные мишени mTORC1 структурно разнообразны и мало определяемы биоинформатическими способами.

4EBP1 – это трансляционный репрессор, связывающий и ингибирующий фактор eIF4E, ключевой фактор для трансляции 5'-кэпированных мРНК, среди которых транскрипты, кодирующие такие стимулирующие рост клеток белки, как мус, циклин D1, VEGF, STAT3 и др. mTORC1 фосфорилирует 4EBP1 по сайтам Thr-37, Thr-46, Ser-65, Thr-70, Ser-80, в результате чего 4EBP1 отделяется от eIF4E [6].

S6K1 фосфорилируется mTORC1 по Ser-389 в гидрофобном мотиве, связывающем каталитический домен с С-терминальным аутоингибиторным доменом. Данное фосфорилирование позволяет PDK1 фосфорилировать Thr-229 в активационной петле киназного домена, что приводит к активации S6K1. Активная киназа S6K1 фосфорилирует рибосомальный белок S6, необходимый для трансляции 5'-ТОР мРНК, кодирующих рибосомальные белки и факторы элонгации. S6K, помимо S6, фосфорилирует ряд других белков, среди которых IRS-1, GSK3, eEF2, проапоптотический белок Bad и др.

При активном mTORC1 S6K фосфорилирует и ингибирует IRS-1 (по Ser-302). Последний связан с инсулиновыми и IGF-1-рецепторами и активирует PI3K. То есть, фосфорилирование IRS-1 киназой S6K является механизмом обратной связи, ингибирующим проведение сигнала от рецептора к mTOR [5]. Так, мыши с нокаутированным *s6k1* жизнеспособны, но при диете, обогащенной жирами, несмотря на десенситизацию инсулиновых рецепторов, не подвержены ожирению, так как отсутствие петли обратной связи усиливает их чувствительность к инсулину.

Также S6K фосфорилирует белок PDCD4 и направляет его по пути деградации. PDCD4 блокирует трансляцию, присоединяясь к хеликазе eIF4A, которая ответственна за «раскручивание» вторичных структур 5'-НТП мРНК [5].

Несмотря на то, что у mTORC1 скорее всего есть и другие субстраты, 4EBP1 и S6K являются ключевыми факторами, отвечающими за mTORC1-опосредованную регуляцию клеточного роста. Однако в настоящее время гомолог 4EBP1 не был идентифицирован в растениях, что позволяет предположить, что эффекты TOR на трансляционный контроль опосредованы другими эффекторными белками в растениях.

Геном арабидопсиса также содержит два гена S6 киназы (*AtS6k1* и *AtS6k2*, каталожные номера

генов – At3g08720 и At3g08730 соответственно) непосредственного субстрата TOR. Несмотря на то, что N- и С-концевые последовательности этих белков отличаются от S6K животных, у киназного домена сохраняется высокая консервативность. Основные и регуляторные сайты фосфорилирования, обнаруженные в S6K человека (Thr229, Ser371, Thr389 и Thr226, Ser370, Thr388 для hS6K1 и hS6k2 соответственно), консервативны и присутствуют в последовательностях его гомологов у арабидопсиса (Ser290, Ser431, Thr449 и Ser296, Ser437, Thr455 для AtS6K1 и AtS6K2 соответственно).

В арабидопсисе активность S6 киназы также стимулируется ауксином, который, очевидно, увеличивается под действием TOR киназы. Эксперименты по сверхэкспрессии гена S6K линии в арабидопсисе, показали, что трансгенные растения проявляют мужскую стерильность. Авторы предположили, что стерильность может являться последствием повышенной трансляции регуляторных генов, содержащих предполагаемые 5'ТОР последовательности в 5'-нетранслируемой последовательности (5'-НТП, участка между 5'-концом мРНК и началом белок-кодирующей последовательности) соответствующих мРНК. Также было показано, что, как и в клетках животных, раптор взаимодействует с S6K *in vivo* и регулирует его активность по отношению к рибосомному белку S6. Все эти и другие данные указывают на то, что S6K является мишенью TOR киназы в растениях.

У эукариот более 30% мРНК обладают одним или несколькими короткими открытыми рамками считывания (*uORF*) в 5'-НТП. Показано, что *uORF* содержащиеся в 5'-НТП мРНК подавляют трансляцию [57, 58, 59]. Если в составе 5'-НТП мРНК расположена небольшая *uORF*, то после ее трансляции некоторые рибосомы сохраняют способность к повторной инициации (реинициации).

У растений арабидопсиса реинициация трансляции после *uORF*-зависимой репрессии зависит от фосфорилирования eIF3h, которая является субъединицей эукариотического фактора инициации 3 (eIF3) и одновременно является предполагаемой мишенью S6K1. Выявлено, что под действием ауксина TOR киназа фосфорилирует S6K1, что в свою очередь фосфорилирует eIF3h и активирует реинициацию трансляции *uORF*-мРНК фактора ARF (auxin response factor) [60]. Более того показано, что TAV фактор реинициации вируса мозаики цветной капусты (transactivator-viropasmin) может связываться и

активировать TOR киназу клетки хозяина для трансляции полицистронных мРНК. Под действием TAV TOR киназа клетки хозяина активирует S6K1 и, таким образом, фосфорилирует eIF3h и RISP (re-initiation-supporting protein), чтобы рекрутировать факторы реинициации и полисомы для реинициации трансляции мРНК [61, 62].

Кроме того, недавно было установлено, что MRF1 (MA3 DOMAIN-CONTAINING TRANSLATION REGULATORY FACTOR1) является субстратом S6K, который регулирует трансляцию мРНК, особенно в условиях дефицита энергии [63].

TAP46 растений, ортолог TAP42 у дрожжей и  $\alpha 4$  (регуляторная субъединица протеин фосфатазы 2A; белок  $\alpha 4$  человека также известен как IGBP1) у животных, также играет роль субстрата TOR киназы и участвует в регуляции трансляции. TAP46 является консервативной регуляторной субъединицей PP2A (протеин фосфатазы 2A) и является прямым субстратом TOR киназы. Нарушение экспрессии TAP46 приводит к глобальным дефектам трансляции с уменьшением накопления полисом и включения метионина в состав новосинтезируемого белка [64]. Хотя уровни белка TAP46 в растениях зависят от активности TOR киназы, участвует ли TAP46 в регуляции трансляции через S6K1 или выполняет ли он аналогичные функции как у животных остается неизвестным [65].

#### **Активация и репрессия глюкоза-TORC1 сигнальной системы**

Обширные исследования показали, что TORC1 активируется питательными веществами и факторами роста, но инактивируется недостатком энергии, голоданием и стрессами как у растений, так и у животных [36, 55, 56, 66]. У растений глюкоза, полученная в результате фотосинтеза, является основным питательным веществом для развития клеток и организма [39, 67].

С использованием химических ингибиторов, эстрадиол индуцируемых Tor-RNAi-мутантов (tor-es), маркировки клеточного цикла, фосфорилирования S6K и анализа транскриптом, было показано, что глюкоза-TOR путь передачи сигнала активирует рост корня с помощью переключения стратегии выработки энергии от анаэробного гликолиза на окислительное фосфорилирование. Кроме того, гормоны роста растений, такие как ауксин, брассиностероид (BR),

цитокинин и гиббереллин, не могут способствовать быстрому удлинению корня при переходе от гетеротрофного к фотоавтотрофному статусу без фотосинтеза или экзогенных сахаров. У арабидопсиса глюкоза-TOR сигнальная система изменяет транскрипционное перепрограммирование широких наборов генов, участвующих в центральном и вторичном метаболизме, клеточном цикле, транскрипции, передаче сигналов, транспорте и фолдинге белков [39]. Однако, конкретные механизмы, лежащие в основе, глюкоза-TOR сигнальной системы до сих пор не известно. Одним из возможных общих механизмов глюкоза-TOR сигнальной системы может является стимуляция димеризации TORC1, которая является предпосылкой для ее транслокации на мембрану лизосомы [68]. Такая транслокация и активация TORC1 индуцируется с помощью чувствительных к глюкозе Tel2-Tti1-Tti2 (TTT)-RUVBL1/2 комплекс у мух и животных [68, 69].

Сборка комплекса TTT-RUVBL1/2 и его взаимодействие с TOR требует АТФ-азную активность RUVBL1/2 белка. Показано, что АТФ-азная активность RUVBL1/2 белка подавляется ингибиторами электрон-транспортной цепи митохондрий и в отсутствии питательных веществ.

Геном арабидопсиса содержит гомологичные гены, кодирующие предполагаемые Tti1, Tti2, Tel2 и RUVBL, которые могут образовывать комплекс TTT-RUVBL1/2 для регуляции димеризации и активации TORC1 [7, 70]. Существует ли такой комплекс у растений пока не известно. Определение субклеточных сайтов (то есть вакуолей, эндосомы, митохондрий и/или ядра) для активации TORC1 и новых компонентов TOR сигнальной системы является объектом будущих исследований.

Глюкоза зависимая активация TOR сигнальной системы также может происходить косвенно путем инактивации эволюционно консервативной протеинкиназы SnRK1, сенсора глюкозы/энергии (SNF1-связанной киназы 1, ортолога  $\alpha$ -субъединицы АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК)) в растениях, как и у млекопитающих. Возможно, такой механизм представляет собой еще один эволюционно консервативный узел для интеграции ответов на питательные вещества, энергию и стрессы [71-74].

У арабидопсиса гены KIN10 и KIN11 кодируют каталитические субъединицы гетеротримерного комплекса SnRK1, который подавляется глюкозой, но активируется голоданием, отсутствием энергии и многими абиотическими стрессами [71]. Аналогично, АМПК млекопита-

ющих непосредственно фосфорилирует и активирует TSC2 (комплекс туберозного склероза 2) или фосфорилирует и инактивирует RAPTOR для репрессии mTORC1 при недостатке энергии и стрессах [73, 75]. Хотя у растений отсутствуют гены TSC, показано, что KIN10 взаимодействует и фосфорилирует RAPTOR [76]. Возможно действия SnRK1 и TOR киназ направлены на более распространенные субстраты фосфорилирования, чтобы антагонистически определять уровни питательных веществ и энергии и координировать транскриптом, метаболизм, рост и развитие клеток. Однако, для оценки роли этого фермента в регуляции этих процессов необходимы дальнейшие исследования.

### **TOR зависимая регуляция аутофагии у растений**

Аутофагия — это эволюционно высококонсервативная катаболическая программа, характерная для всех типов эукариотических клеток. В процессе аутофагии происходит разрушение и рециркуляция белков, цитоплазматических органелл и макромолекул, при этом возрождаемые низкомолекулярные вещества и энергия используются для поддержания развития и роста организма в ответ на недостаток питательных веществ и энергии, а также на многие биотические и абиотические стрессы.

АМПК и mTOR являются основными регуляторами аутофагии в ответ на уровень питательных веществ и энергии. В условиях недостатка питательных веществ АМПК млекопитающих активирует аутофагию путем фосфорилирования ULK1 (UNC-51-like kinase 1, a homolog of yeast ATG1), чтобы способствовать образованию комплекса с ULK1, FIP200 (ATG17; также известен как RBC1CC1), ATG13 и ATG101 для инициации образования аутофагосом. В условиях достатка питательных веществ, mTOR фосфорилирует ULK1 и ATG13 для предотвращения образования комплекса [68, 77, 78].

Другой субстрат mTOR, TFEB (транскрипционный фактор EB), также участвует в регуляции аутофагии и лизосомного биогенеза [79].

У растений TOR и SnRK1 участвуют в регуляции аутофагии. В *tor-RNAi*, *raptor1b* и *tap46* мутантных растениях, а также при инактивации TOR киназы АТФ конкурентным ингибитором AZD8055 происходит инициация аутофагии, о чем свидетельствует увеличение количества аутофагосом и уровня экспрессии гена ATG8e [64, 80, 81]. Необходимо отметить, что ключевым

посредником при индукции аутофагии в ответ на стресс служит белок ATG13. В нормальных физиологических условиях TOR-киназа фосфорилирует ATG13. Такая гиперфосфорилированная форма ATG13 имеет низкое сродство к ATG1, и комплекс ATG1/ATG13, иницирующий образование аутофагосомы, не формируется. Связывание ATG1/ATG13 становится возможным лишь при снижении активности TOR-киназы. Показано, что ATG1 и ATG13 белки арабидопсиса образуют комплекс и иницирует образование аутофагосомы, указывая на высококонсервативную функцию ATG1/13 как у растений, так и у животных. Интересно, содержание и уровень фосфорилирования белков ATG1 и ATG13 арабидопсиса чувствительны к наличию питательных веществ, потенциально опосредованных регуляцией TOR киназы [82, 83].

### **Фитогормональная регуляция активности**

Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) участвует в регуляции таких жизненно важных для растений процессах как созревание и поддержание покоя семян, ингибирование прорастания, переход к цветению и многие другие. Кроме того, АБК является одним из центральных регуляторов формирования ответов на абиотические стрессы такие, как высыхание, засоление и низкая температура. АБК снижает интенсивность транспирации и фотосинтеза [84], перепрограммирует метаболизм для накопления осмолитов, ингибирует рост и способствует покою и старению, чтобы адаптироваться и пережить сильный стресс [85]. Подобно другим фитогормонам, возникновение биологического ответа на АБК на клеточном уровне является результатом инициации биохимических реакций, обеспечивающих работу пути передачи гормонального сигнала, который включается после связывания АБК с ее рецепторами PYR1/PYL/RCAR (далее PYL). Впоследствии рецепторный комплекс АБК-PYL ингибирует протеин фосфатазы принадлежащие к семейству PP2C, включая ABI1 (ABA Insensitive), ABI2, HAB1 (Hypersensitive to ABA 1/2), HAB2, PP2CA и AHG1 (ABA Hypersensitive Germination 1/3). Ингибирование протеин фосфатаз PP2C высвобождает SnRK2 (non-fermenting-1 SNF1-related protein kinase-2), которая фосфорилирует нижестоящие эффекторы для инициации защитных реакций, таких как закрытие устьиц и перепрограммирование экспрессии генов [86]. Необходимо отметить, что SnRK2 киназа близка к

протеинкиназам дрожжей SNF1 (от Sucrose Non-Fermenting Kinase 1), а также протеинкиназам млекопитающих, активируемым АМФ (АМПК, от AMP-Activated Protein Kinase). Функционирование АМПК и SNF1 связано с регуляцией метаболизма клеток млекопитающих и дрожжей при понижении энергетического обеспечения, как в случае недостатка питательных элементов. У животных комплекс TOR регулируется протеинкиназой AMP (АМПК), основным сенсором энергии у человека. Подобные антагонистические взаимоотношения между ортологом АМПК растений SnRK2 и связанными с TOR сигнальными путями в ответ на изменение условий питания и энергии были предложены у *Arabidopsis*. У млекопитающих, находящихся выше TOR, SnRK1 может ингибировать активность TOR посредством прямого взаимодействия и фосфорилирования белка Raptor – основного компонента TOR сигнальной системы, который возможно, приводит к разборке комплекса. Недавно, в работе Wang с соавторами [87] было показано, что в отсутствие стресса, TOR киназа фосфорилирует рецепторы АБК PYL белки по консервативному остатку серина для предотвращения инициации реакции на стресс у растений в нормальных условиях. Это фосфорилирование нарушает комплекс PYL с АБК и с эффекторными фосфатазами семейства PP2C, что в конечном итоге приводит к инактивации киназ SnRK2. В условиях стресса происходит АБК-зависимая активация SnRK2 протеинкиназ, который в свою очередь фосфорилирует белок Raptor, основного компонента TOR сигнальной системы растений, что вероятно запускает диссоциацию комплекса TOR и торможению роста растений.

Таким образом, фосфорилирование Raptor посредством SnRK2s представляет собой механизм, который предотвращает рост растений в неблагоприятных условиях для сохранения энергии и обеспечения выживания. Тогда как, фосфорилирование PYL – рецептора АБК отключает АБК зависимые сигнальные системы при наступлении благоприятных условий для роста растений.

### Заключение

Мы попытались суммировать результаты исследований TOR сигнальной системы, полу-

ченные за последние несколько лет. Уже существует неопровержимые доказательства того, что клеточные и сигнальные пути, регулирующие разные процессы развития растений контролируются TOR киназой. Здесь мы попытались выделить некоторые важные направления исследований, которые указывают о важной роли TOR сигнальной системы в растениях и водорослей. Показаны, что TOR из разных видов растений имеют высокое сходство аминокислотных последовательностей с TOR млекопитающих и дрожжей, особенно в киназной и FRB доменах. Высокая степень консервативности аминокислотной последовательности TOR киназы среди всех изученных видов растений подтверждает жизненно важное значение этой киназы и, как следствие, TOR сигнальной системы для роста и развития *растений*. При этом консервативная чувствительность к комплексу FKBP12-рапамицин и высокое сходство аминокислотных последовательностей TOR, Raptor и LST8 между растениями и животными позволяют предположить, что растение может образовывать структуру, подобную TORC1, как у животных и человека.

Всесторонний генетический, геномный, метаболический и фенотипический анализ функций TOR растений позволяет предположить значительное совпадение клеточных процессов и процессов развития, которые регулируются TORC1 сигнальной системой у растений, животных и человека. Исследования мутантных растений указывают на вероятность существования, помимо консервативного TORC1 комплекса, новых TOR комплексов локализованных в разных субклеточных структурах и/или в различных типах клеток. Следовательно, необходимы исследования, направленные на обнаружения новых регуляторов расположенных до и после TOR сигнальной системы. В ближайшее время место основного аналитического подхода в исследованиях TOR сигнальной системы, по-видимому, займет фосфопротеомика, что позволит выявить широкий спектр субстратов TOR киназы и новых белковых компонентов.

### Благодарности

Работа поддержана грантом № AP05131598 МОН РК

## Литература

- 1 Xiong Y. and Sheen J. (2015). Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28, 83-91.
- 2 Sehgal S.N., Baker H. and Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 727-732.
- 3 Sabatini D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui M., Tempst P. and Snyder S.H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-independent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.
- 4 Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. and Robaglia C. (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6422-6427.
- 5 Gangloff Y.-G., Mueller M., Dann S.G., Svoboda P., Sticker M., Spetz J.-F., Um S. H., Brown E.J., Cereghini S., Thomas G. et al. (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9508-9516.
- 6 Kang S.A., Pacold M.E., Cervantes C.L., Lim, D., Lou, H.J., Ottina, K., Gray, N.S., Turk, B.E., Yaffe, M.B. and Sabatini, D.M. (2013). mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science* 341, 1236566.
- 7 Ren M., Venglat P., Qiu S., Feng L., Cao Y., Wang E., Xiang D., Wang J., Alexander D., Chalivendra S. et al. (2012). Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 4850-4874.
- 8 Cafferkey R., McLaughlin M., Young P., Johnson R, Livi G (1994). Yeast TOR (DRR) proteins: amino-acid sequence alignment and identification of structural motifs. *Gene* 141:133-36.
- 9 Shi L., Wu Y. and Sheen J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation *Development*. 145, dev160887. doi:10.1242/dev.160887
- 10 Maegawa K., Takii R., Ushimaru T., Kozaki A.. (2015). Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast *Mol Genet Genomics*. Oct; 290(5):2019-30.
- 11 Xiong F., Dong P., Liu M., Xie G., Wang K., Zhuo F., Feng L., Yang L., Li Z, Ren M. Tomato FK506. (2016). Binding Protein 12KD (FKBP12) Mediates the Interaction between Rapamycin and Target of Rapamycin (TOR). *Front Plant Sci.* 2016 Nov 18; 7:1746.
- 12 Agredano-Moreno L.T, Reyes de la Cruz H, Martínez-Castilla L.P, Sánchez de Jiménez E. (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol Biosyst.* Nov; 3(11):794-802.
- 13 Deng K., Dong P., Wang W., Feng L., Xiong F., Wang K., Zhang S., Feng S., Wang B., Zhang J. et al. (2017). The TOR pathway is involved in adventitious root formation in Arabidopsis and potato. *Front. Plant Sci.* 8, 784.
- 14 Song Y., Zhao G., Zhang X.Y., Li L.X., Xiong F.J., Zhuo F.P., et al. (2017). The crosstalk between target of rapamycin (TOR) and Jasmonic Acid (JA) signaling existing in Arabidopsis and cotton. *Sci. Rep.* 7:45830.
- 15 Heitman J., Movva N.R. and Hall M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- 16 Stan R., McLaughlin M. M., Cafferkey R., Johnson R.K., Rosenberg M., Livi G.P. (1994). Interaction between Fkbp12-Rapamycin and Tor Involves a Conserved Serine Residue. *Journal of Biological Chemistry* 269, 32027- 32030.
- 17 Mukhopadhyay S., Frias M.A., Chatterjee A., Yellen P., Foster D.A. (2016). The Enigma of Rapamycin Dosage. *Molecular Cancer Therapeutics* 15, 347-353.
- 18 Sarbassov D.D., Ali S.M., Sengupta S., Sheen J.-H., Hsu P.P., Bagley A.F., Markhard A.L. and Sabatini D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 22, 159-168.
- 19 Thoreen C.C. (2017). The molecular basis of mTORC1-regulated translation. *Biochemical Society Transactions* 45, 213-221.
- 20 Zhao J., Zhai B., Gygi S. P., Goldberg A. L. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112, 15790-15797.
- 21 Vezina C., Kudelski A., Sehgal S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28:721-26.
- 22 Schreiber S.L., Crabtree G.R. (1992). The mechanism of action of cyclosporine and FK506. *Immunol. Today* 13:136-42.
- 23 Tocci M., Matkovich D., Collier K., Kwok P., Dumont F., Lin S., Degudicibus S., Siekierka J., Chin J., Hutchinson N. (1989). The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J. Immunol.* 143:718-26.
- 24 Crespo J.L., Diaz-Troya S., Florencio F.J. (2005). Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 139, 1736-1749.
- 25 Mukaida S., Ogawa T., Ohishi K., Tanizawa Y., Ohta D., Arita M. (2016). The effect of rapamycin on biodiesel-producing protist *Euglena gracilis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 80, 1223-1229.
- 26 Prioretti L., Avilan L., Carriere F., Montane M. H., Field B., Gregori G., Menand B., Gontero B. (2017). The inhibition of TOR in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* promotes a get-fat growth regime. *Algal Research* 26, 265-274.
- 27 Imamura S., Ishiwata A., Watanabe S., Yoshikawa H., Tanaka K. (2013). Expression of budding yeast FKBP12 confers rapamycin susceptibility to the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 439, 264-269.
- 28 Deng K., Yu L., Zheng X., Zhang K., Wang W., Dong P., Zhang J., Ren M. (2016). Target of Rapamycin Is a Key Player for Auxin Signaling Transduction in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 7, 291
- 29 Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J. and Verma, D.P. (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18, 477-490.
- 30 Montané M.-H. and Menand B. (2013). ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J. Exp. Bot.* 64, 4361-4374.

- 31 Sormani R., Yao L., Menand B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C., Robaglia C. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biology* 7, 26.
- 32 Vezina C., Kudelski A., Sehgal S. N. (1975). Rapamycin (Ay-22,989), a New Antifungal Antibiotic. I. Taxonomy of Producing Streptomycete and Isolation of Active Principle. *Journal of Antibiotics* 28, 721-726.
- 33 Choi J., Chen J., Schreiber S. L., Clardy J. (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273, 239-242.
- 34 Xu Q., Liang S.P., Kudla J., Luan S. (1998). Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin. *The Plant Journal* 15, 511-519.
- 35 Leiber R.-M., John F., Verhertbruggen Y., Diet A., Knox J.P. and Ringli C. (2010). The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 1898-1908.
- 36 Xiong Y. and Sheen J. (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J. Biol. Chem.* 287, 2836-2842.
- 37 Thoreen C.C., Sabatini D.M. (2009). Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* 5, 725-726. Van Dam T. J.P., Zwartkruis F. J.T., Bos J.L., Snel B. 2011. Evolution of the TOR Pathway. *Journal of Molecular Evolution* 73, 209-220.
- 38 Wicker L.S., Boltz R. C., Jr., Matt V., Nichols E.A., Peterson L.B., Sigal N. H. (1990). Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. *European Journal of Immunology* 20, 2277-2283.
- 39 Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C. and Sheen J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496, 181-186.
- 40 Vespa L., Vachon G., Berger F., Perazza D., Faure J.D., Herzog M. (2004). The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant Physiology* 134, 1283-1292.
- 41 Gold L.I., Sung J.J., Siebert J.W., Longaker M.T. (1997). Type I (RI) and type II (RII) receptors for transforming growth factor-beta isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor-beta ligands during excisional wound repair. *American Journal of Pathology* 150, 209-222.
- 42 Aghdasi B., Ye K., Resnick A., Huang A., Ha H.C., Guo X., Dawson T. M., Dawson V. L., Snyder S. H. (2001). FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98, 2425-2430.
- 43 Alavilli H., Lee H., Park M., Yun D.J., Lee B. H. (2018). Enhanced multiple stress tolerance in *Arabidopsis* by overexpression of the polar moss peptidyl prolyl isomerase FKBP12 gene. *Plant Cell Reports* 37, 453-465.
- 44 Osmulski P. A., Gaczynska M. (2013). Rapamycin allosterically inhibits the proteasome. *Molecular Pharmacology* 84, 104-113.
- 45 Anderson, G.H., Veit, B. and Hanson, M.R. (2005). The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* 3, 12.
- 46 Diaz-Troya, S., Florencio, F.J. and Crespo, J.L. (2008). Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 7, 212-222.
- 47 Kravchenko A., Citerne S., Jéhanno I., Bersimbaev R.I., Veit B., Meyer C. and Leprince A.-S. (2015). Mutations in the *Arabidopsis* Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 992-997.
- 48 Moreau M., Azzopardi M., Clement G., Dobrenel T., Marchive C., Renne C., Martin-Magniette M.-L., Taconnat L., Renou J.-P., Robaglia C. et al. (2012). Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GbetaL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* 24, 463-481.
- 49 Salem M.A., Li Y., Wiszniewski A. and Gialvalisco P. (2017). Regulatory associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of *Arabidopsis* seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential. *Plant J.* 92, 525-545.
- 50 Tatebe H. and Shiozaki K. (2017). Evolutionary conservation of the components in the TOR signaling pathways. *Biomolecules* 7, 77.
- 51 Yip C.K., Murata K., Walz T., Sabatini D.M. and Kang S.A. (2010). Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* 38, 768-774.
- 52 Aylett C.H.S., Sauer E., Imseng S., Boehringer D., Hall M.N., Ban N. and Maier T. (2016). Architecture of human mTOR complex I. *Science* 351, 48-52.
- 53 Yang H., Rudge D.G., Koos J.D., Vaidialingam B., Yang H.J. and Pavletich N.P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497, 217-223.
- 54 Ben-Sahra I. and Manning B.D. (2017). mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 45, 72-82.
- 55 Dobrenel T., Caldana C., Hanson J., Robaglia C., Vincenz M., Veit B. and Meyer C. (2016a). TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 261-285.
- 56 González, A. and Hall, M. N. (2017). Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J.* 36, 397-408.
- 57 Calvo S.E., Pagliarini D.J. and Mootha V.K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 7507-7512.
- 58 Rahmani F., Hummel M., Schuurmans J., Wiese-Klinkenberg A., Smeeckens S. and Hanson J. (2009). Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide. *Plant Physiol.* 150, 1356-1367.
- 59 Johnstone T.G., Bazzini A.A. and Giraldez A.J. (2016). Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J.* 35, 706-723.

- 60 Schepetilnikov M., Dimitrova M., Mancera-Martínez E., Geldreich A., Keller M. and Ryabova L.A. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* 32, 1087-1102.
- 61 Schepetilnikov M., Kobayashi K., Geldreich A., Caranta C., Robaglia C., Keller M. and Ryabova L.A. (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J.* 30, 1343-1356.
- 62 Thiébeauld O., Schepetilnikov M., Park H.-S., Geldreich A., Kobayashi K., Keller M., Hohn T. and Ryabova L. A. (2009). A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation. *EMBO J.* 28, 3171-3184.
- 63 Lee D.-H., Park S.J., Ahn C.S. and Pai H.-S. (2017). MRF family genes are involved in translation control, especially under energy-deficient conditions, and their expression and functions are modulated by the TOR signaling pathway. *Plant Cell* 29, 2895-2920.
- 64 Ahn C.S., Han J.-A., Lee H.-S., Lee S. and Pai H.-S. (2011). The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *Plant Cell* 23, 185-209.
- 65 Ahn C.S., Ahn H.-K. and Pai H.-S. (2015). Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. *J. Exp. Bot.* 66, 827-840.
- 66 Saxton R.A. and Sabatini D.M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 168, 960-976.
- 67 Li L. and Sheen J. (2016). Dynamic and diverse sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 116-125.
- 68 Kim S.G., Hoffman G. R., Pouligiannis G., Buel G.R., Jang Y.J., Lee K.W., Kim B.-Y., Erikson R.L., Cantley L.C., Choo A.Y. et al. (2013). Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *Mol. Cell* 49, 172-185.
- 69 David-Morrison G., Xu Z., Rui Y.-N., Charng W.-L., Jaiswal M., Yamamoto S., Xiong B., Zhang K., Sandoval H., Duraine L. et al. (2016). WAC regulates mTOR activity by acting as an adaptor for the TTT and Pontin/Reptin complexes. *Dev. Cell* 36, 139-151.
- 70 Schepetilnikov M., Makarian J., Srouf O., Geldreich A., Yang Z., Chicher J., Hammann P. and Ryabova L.A. (2017). GT-Pase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J.* 36, 886-903.
- 71 Baena-González E., Rolland F., Thevelein J. M. and Sheen J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448, 938-942.
- 72 Broeckx T., Hulsmans S. and Rolland F. (2016). The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *J. Exp. Bot.* 67, 6215-6252.
- 73 Herzig S. and Shaw R.J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 121-135.
- 74 Wurzinger B., Nukarinen E., Nä gele T., Weckwerth W. and Teige M. (2018). The SnRK1 kinase as central mediator of energy signalling between different organelles. *Plant Physiol.* 176, 1085-1094.
- 75 Gwinn D. M., Shackelford D. B., Egan D. F., Mihaylova M. M., Mery A., Vasquez D. S., Turk B.E. and Shaw ,R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214-226.
- 76 Nukarinen E., Nä gele T., Pedrotti L., Wurzinger B., Mair A., Landgraf R., Bö rnke F., Hanson J., Teige M., Baena-Gonzalez E. et al. (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci. Rep.* 6, 31697.
- 77 Russell R. C., Yuan H.-X. and Guan K.-L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 24, 42-57.
- 78 Puente C., Hendrickson R. C. and Jiang X. (2016). Nutrient-regulated hosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy. *J. Biol. Chem.* 291, 6026-6035.
- 79 Settembre C., Zoncu R., Medina D.L., Vetrini F., Erdin S., Erdin S.U., Huynh T., Ferron M., Karsenty G., Vellard M.C. et al. (2012). A lysosome-tonucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 31, 1095-1108.
- 80 Liu Y. and Bassham D.C. (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 5, e11883.
- 81 Pu Y., Luo X. and Bassham D.C. (2017). TOR-dependent and –independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 8, 1204.
- 82 Suttangkakul A., Li F., Chung T. and Vierstra R.D. (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3761-3779.
- 83 Marshall R.S. and Vierstra R.D. (2018). Autophagy: the master of bulk and selective recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 173-208.
- 84 Munemasa S., Hauser F., Park J., Waadt R., Brandt B., and Schroeder J.I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28, 154–162.
- 85 Zhao Y., Chan Z., Gao J., Xing L., Cao M., Yu C., Hu Y., You J., Shi H., Zhu Y., et al. (2016). ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 1949–1954.
- 86 Wang P., Xue L., Batelli G., Lee S., Hou Y.J., Van Oosten M.J., Zhang H., Tao W.A., and Zhu J.K. (2013). Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 11205–11210.
- 87 Wang P., Zhao Y., Li Zh., Chuan-Chih Hsu, Liu X., Fu L., Yueh-Ju Hou, Du Y., Xie Sh., Zhang Ch., Gao J., Cao M., Huang X., Zhu Y, Tang K., Wang X., Tao W. A., Xiong Y., and Jian-Kang Zhu. (2018). Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response, *Molecular Cell* 69, 1–13, January 4.