

- 4 Doong R.A., Lei W.G. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant // *J. Hazard. Mater.* – 2003. – V. 96. – P. 15-27.
- 5 Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi N.R. and Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application // *Current science.* – 2008. – V. 94. - № 6 (25). – P. 736-747
- 6 Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation // *Food Technol. Biotechnol.* – 2001. – V. 39. – P. 295-304.
- 7 Ganesh A. and Lin J. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates // *African Journal of Biotechnology.* – 2009. – V.8 (21). – P. 5847-5854
- 8 Cooper, D.G., C.N.Liss, R.Londay and J.E.Zajic, Surface activity of *Mycobacterium* and *Pseudomonas* // *J. Ferment. Technol.* – 1981. – V.59. – N2. – P. 97-101.

УДК 581.1

Р.И. Берсимбай\*, А.П. Кравченко

Институт клеточной биологии и биотехнологии ЕНУ им.Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан

\*e-mail: [ribers@mail.ru](mailto:ribers@mail.ru)

### Роль TOR-сигнальной системы в механизмах адаптации растений *Arabidopsis thaliana* к солевому стрессу

TOR (target of rapamycin) киназа присутствует у большинства видов эукариот и играет ключевую роль как в регуляции процессов роста и развития организмов, так и формировании метаболического ответа клетки на действие различных стрессовых факторов. В настоящей работе с использованием мутантной по гену AtTOR линий арабидопсиса изучена роль TOR системы в физиологических механизмах адаптации растений *Arabidopsis thaliana* к солевому стрессу. В условиях солевого стресса в растениях мутантных линий установлено повышение активности альдегидоксидазы и ксантиндегидрогеназы. На основании участия этих ферментов в биосинтезе АБК предположено, что TOR в определенных условиях может выступать в качестве фактора негативной регуляции биосинтеза АБК.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, TOR, альдегидоксидаза, ксантиндегидрогеназа, АБК, солевой стресс.

Р.И. Берсимбай, А.П. Кравченко

### TOR-сигналинг жүйесінің *Arabidopsis thaliana* өсімдігінің тұзды стресс жағдайына бейімделу механизміндегі рөлі

TOR (target of rapamycin, рапамициннің нысанасы) киназасы жоғары сатыдағы эукариоттардың көпшілігінде кездеседі. Ол организмдердің өсуі мен дамуын реттеуде және әртүрлі стресс факторларына қарсы метаболизмдік жауаптың қалыптасуында шешуші рөл атқарады. Алайда, TOR-сигналинг жүйесі эукариоттарда маңызды болғанымен, бұл ферменттің (киназаның) өсімдіктердегі реттелуінің физиологиялық механизмдері әлі де толықтай ашылмаған күйінде қалып отыр. Бұл жұмыста *Arabidopsis thaliana* өсімдігінің тұзды стресс жағдайына бейімделуінің физиологиялық механизміндегі TOR-сигналинг жүйесінің атқаратын рөлін AtTOR мутант линияларын қолдана отырып зерттедік. Біз жүргізген зерттеу арқылы тұзды стресс жағдайында AtTOR мутант линияларда альдегидоксидаза және ксантиндегидрогеназа ферменттерінің белсенділігінің жоғарылайтындығын анықтадық. Осы ферменттердің өсімдіктерде АБК-ның биосинтезіне қатысатындығына негізделі отырып, айрықша жағдайлар астында TOR киназасының АБК биосинтезінің кері реттеуші факторы ретінде қызмет атқаратындығы тұжырымдалды.

**Түйін сөздер:** *Arabidopsis thaliana*, TOR, альдегидоксидаза, ксантиндегидрогеназа, АБК, тұзды стресс.

R.I. Bersimbay, A.P. Kravchenko

### The role of tor signaling in the mechanisms of adaptation of *Arabidopsis thaliana* to salt stress

TOR (target of rapamycin) kinase is present in most species of higher eukaryotes and plays a key role in the regulation of growth and development of organisms and the formation of the metabolic response of the cell to the action of various stress factors. However, despite the importance TOR signaling in eukaryotes, the physiological mechanisms involving the regulation of this enzyme in plants are still poorly understood. In this paper, was examined the role of TOR kinase in the physiological mechanisms of adaptation of *Arabidopsis thaliana* to salt stress by using a mutant line in AtTOR gene. It was found increased activity of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in mutant line under salt stress. Based on activity of these enzymes participating in ABA biosynthesis we suggest that TOR kinase can act as a negative factor of ABA biosynthesis regulation under certain conditions.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, TOR, aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase, ABA, salt stress.

Основные клеточные функции обеспечиваются сложной сетью биохимических процессов и сигнальных путей, осуществляющих регуляцию клеточного метаболизма в ответ на воздействие внешних сигналов. TOR-сигнальный путь является одной из основополагающих сигнальных систем в клетках эукариотических организмов [1, 2]. Было показано, что TOR (англ. *Target of Rapamycin*)

киназа выступает в качестве центрального компонента этой сигнальной системы в клетках животных и растений и является частью двух различных мультибелковых комплексов, а именно: TORC1 и TORC2, которые регулируют рост и размер клеток, активируя множество анаболических процессов, связанных с биогенезом органелл, включая биосинтез белков и липидов [3].

В клетках млекопитающих mTOR (англ. mammalian *Target of Rapamycin*) существует в виде каталитической субъединицы в составе двух комплексов - mTORC1 и mTORC2. mTORC1 комплекс включает белок раптор, mLST8, известный также как GβL белок, PRAS40 и белок дептор [2, 3]. mTORC1 регулирует клеточный рост и размер клеток, активируя множество анаболических процессов, включая биосинтез белков, липидов и органелл, биогенез митохондрий, а также ограничивая катаболические процессы, такие как аутофагия [3]. mTORC1 комплекс участвует в регуляции синтеза белка путем фосфорилирования 4E-BP1 и S6K1-белков, и его принято также называть рапамицин-чувствительным комплексом в связи с тем, что последний, образуя комплекс с внутриклеточным рецептором FKBP12, способен ингибировать активность mTORC1 [4, 5].

В состав mTORC2 комплекса входят mTOR, рапамицин-нечувствительный спутник mTOR - Rictor, mLST8, mSIN1, Protor 1 и Deptor. Установлено, что mTORC2 играет ключевую роль в пролиферации, метаболизме и выживании клеток, организации цитоскелета [3, 5].

Некоторые члены TOR комплексов - раптор и mLST8/GβL – белки, TOR-субстраты и регуляторы TOR сигналинга имеются и у растений [6-8]. В геноме арабидопсиса, например, представлено два LST8/GβL гомолога (At3g18140, At2g22040). В свою очередь TORC1-специфический белок Raptor/KOG1 у арабидопсиса представлен двумя вариантами: AtRaptor1A (At5g01770) и AtRaptor1B (At3g08850). Показано, что мутация AtRaptor1B в растениях дает широкий спектр дефектов развития: от нарушения роста корней и листьев, нарушения формирования почек и соцветий, до уменьшения ростовой активности апикальных меристем. В растениях не обнаружены TORC2-специфические белки Rictor/AVO3 и hSin1/AVO.

Рост растений, в отличие от животных, в значительной степени зависит от действия факторов окружающей среды. Имеются данные об ингибировании киназной активности S6K1 осмотическим стрессом, что позволяет предположить, что TOR - сигнальная система может быть задействована в регуляции метаболизма растительных клеток в ответ на стрессовые воздействия. Подавление AtTOR экспрессии РНК-интерференцией приводит к остановке роста и развития растений [9].

Известно, что такие ферменты, как альдегидоксидаза и ксантиндегидрогеназа, катализируют окислительно-восстановительные реакции и участвуют в синтезе фитогормонов в растениях, позволяя растению адаптироваться к действию стрессовых факторов. Альдегидоксидаза (АО) играет важную роль в биосинтезе абсцизовой кислоты (АБК), превращая абсцизовый альдегид в этот фитогормон [10]. АБК играет ключевую роль в формировании ответных реакций растений и механизмах адаптации к неблагоприятным условиям внешней среды [11]. Другим ферментом, вовлеченным в биосинтез АБК, является ксантиндегидрогеназа, которая катализирует зависимое от NAD<sup>+</sup> - окисление ксантина до гипоксантина и последующее окисление гипоксантина до мочевой кислоты.

При солевом стрессе нарушается водный и ионный гомеостаз как на клеточном уровне, так и на уровне целого растения. В свою очередь, это ведет к различным токсическим эффектам, проявляющимся в повреждении биополимеров цитоплазмы. Несмотря на большое количество экспериментальных исследований по изучению TOR регуляции клеточных процессов в растительных клетках некоторые вопросы участия pTOR (от англ. *plant TOR*) сигнальной системы в физиологических процессах растительных организмов остаются малоизученными. Не исследованы, в частности, взаимоотношения систем сигналинга pTOR и АБК с точки зрения их участия в процессах адаптации растений к стрессовым условиям окружающей среды.

#### Материалы и методы

В работе были использованы дикий тип и мутантные по гену AtTOR линии *Arabidopsis thaliana*: GK-548G07.01, GK-548G07.07, GK-548G07.12, Agrik line - 35-7, SALK\_7846C, SALK\_147817, SALK\_7654, SALK\_146186CL

Для экстрагирования белков с целью определения активности молибден-содержащих ферментов использовался буфер для экстракции следующего состава: 250 мМ Трис-НСl (рН 8,4), 1 мМ EDTA, 0,1 мМ PMSF, 4 мМ DTT, 5мМ L-цистеина, 0,001 мМ пепстатина. Растения гомогенизировали,

предварительно взвешивая, буфер добавляли из расчета 1:4 (вес/объем). Центрифугировали при +4°C в течение 20 мин при 14000 об/ мин. Отбирали супернатант и использовали его для определения активности соответствующего фермента. Концентрацию белка измеряли по методу Bradford.

Электрофорез нативных белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 94,7 мМ Трис-НСl буфер (рН 8,4). В качестве концентрирующего геля использовали 5% ПААГ, содержащий 15,8 мМ Трис-Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub> буфер, рН 6.9.

Субстратный буфер для определения активности альдегидоксидазы (АО, ЕС 1.2.3.14) имел следующий состав: 50 мМ Трис- НСl (рН 8,4), 1мМ ванилина и 1мМ индолил-3-альдегида, 3,4 мМ МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma, USA), 0,1 мМ PMS(N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate) (Sigma, USA). Для определения активности ксантиндегидрогеназы (ЕС 1.17.1.4) использовался субстратный буфер, следующего состава: 50 мМ Трис- НСl (рН 8,4), 1,5 мМ гипоксантин, 3,4 мМ МТТ, 0,1 мМ PMS.

Нативный гель инкубировали с вышеназванными субстратами при 37°C в течение 1 часа. Обработка результатов определения активности проводилась с помощью программного обеспечения Image J 1.46r [National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>].

Определение активности ферментов АО и ксантиндегидрогеназы проводилось в трех независимых биологических повторностях.

### Результаты и их обсуждение

Целью настоящей работы было изучение возможного участия TOR-сигналинга в механизмах адаптации растений к солевому стрессу с использованием мутантных линий *Arabidopsis thaliana* с гипер- и гипоекспрессией гена AtTOR: *GK-548G07.01*, *GK-548G07.07*, *GK-548G07.12*, *Agrik line - 35-7*, *SALK\_7846C*, *SALK\_147817*, *SALK\_7654*, *SALK\_146186CL*.

Относительный уровень экспрессии гена AtTOR в мутантных линиях был определен в режиме RT-PCR. У мутантных линий *GK-548G07.01*, *GK-548G07.07*, *GK-548G07.12*, *SALK\_7654* наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии гена AtTOR по сравнению с диким типом *Col-0*. *Agrik line- 35-7*, *SALK\_7846C*, *SALK\_147817* и *SALK\_146186C* линии характеризовались сниженным уровнем экспрессии AtTOR. Значительное снижение последней отмечалось в растениях линии *SALK\_147817*.

При наблюдении за ростом и морфологическими свойствами мутантных линий *Arabidopsis thaliana* было обнаружено, что рост стеблей, а также накопление зеленой массы усиливались в линиях, где наблюдалась гиперэкспрессия гена AtTOR: *GK-548G07.01*, *GK-548G07.07*, *GK-548G07.12*.

Наблюдалась четкая корреляция между размером листовой розетки, эпидермальных клеток и уровнем экспрессии гена AtTOR. Повышение экспрессии AtTOR приводило к увеличению размера листовой пластинки и эпидермальных клеток. В случае с мутантами, характеризовавшимися гипоекспрессией гена AtTOR, наблюдалось уменьшение размеров последних.

Линии с гиперэкспрессией AtTOR характеризовались и более развитой корневой системой. По сравнению с диким типом арабидопсиса у растений линии *SALK\_146186C* корневая система более развита за счет образования боковых корней. Результаты RT-ПЦР, показывающие повышенный уровень экспрессии AtTOR в корнях *SALK\_146186C* полностью коррелируют с данными, полученными при наблюдении за морфологией данной мутантной линии. Продукция семян также была выше у линий с гиперэкспрессией AtTOR, в то время как она была снижена у «AtTOR-молчащих» растений.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что повышенная экспрессия гена TOR может привести к увеличению темпов роста, накопления зеленой массы и повышению продуктивности растений в целом. Развитие корневой системы напрямую коррелирует с уровнем экспрессии гена AtTOR в растениях *A.thaliana*.

Для оценки влияния солевого стресса на рост *A. thaliana*, растения мутантных линий и растения дикого типа выращивали на стандартной среде МС и на среде МС, содержащей 50мМ NaCl, в течение 4-х недель. Растения мутантной линии отличались большей устойчивостью к солевому стрессу, чем контрольные растения дикого типа и *Agrik line 35-7*.

В условиях выращивания на питательной среде с добавлением 50 мМ NaCl наблюдались различия в морфогенезе растений. Более выраженный эффект засоления 50 мМ NaCl отмечен у линии с пониженной экспрессией AtTOR - *Agrik line*. Для создания условий засоления с более выраженным эффектом солевого стресса нами были использованы концентрации 75 мМ NaCl и 100 мМ NaCl.

Однако в условиях выращивания на питательной среде с добавлением концентрации 100 мМ NaCl наблюдалась сравнительно низкая выживаемость растений. Отметим, что при концентрации 75 мМ NaCl каких-либо морфологических отличий у растений исследованных линий, помимо более развитой корневой системы у мутанта *SALK\_146186C*, обнаружено не было. В связи с этим в основной серии экспериментов в качестве условий солевого стресса использовали концентрации 50 мМ NaCl.

Фермент альдегидоксидаза (АО), катализирующий окисление абсцизового альдегида до АБК представлен несколькими изоформами. Ранее было установлено, что изоформа альдегидоксидазы АО $\delta$  играет ключевую роль в биосинтезе фитогормона АБК во всех органах растений. У растений дикого типа и линии *SALK\_146186C* не было обнаружено каких-либо существенных различий в активности изоформ АО $\delta$ , АО $\beta$ , АО $\gamma$  в стандартных условиях выращивания. Однако, в условиях засоления (50мМ NaCl, 75мМ NaCl) мутантная линия *SALK\_146186C* характеризовалась высокой активностью АО $\delta$  по сравнению с растениями дикого типа.

Важно подчеркнуть, что в условиях солевого стресса (особенно в присутствии 75 мМ NaCl) были обнаружены существенные различия и в активности остальных изоформ. Так, мутантная линия *SALK\_146186C* характеризовалась более высоким уровнем активности АО $\delta$  и АО $\beta$  по сравнению с растениями дикого типа в присутствии 50 мМ NaCl. При увеличении концентрации соли в питательной среде (75мМ NaCl) активность АО $\beta$  у растений линии *SALK\_146186C* существенно снижалась, в то время как активность АО $\delta$  сохранялась на достаточно высоком по сравнению с контрольным вариантом уровне. Активность третьей  $\gamma$ -изоформы альдегидоксидазы (АО $\gamma$ ) в этих условиях также была существенно ниже у растений мутантной линии по сравнению с растениями дикого типа. В условиях засоления (50мМ NaCl) мутантная линия *GK\_548G07.3* характеризовалась повышенной активностью АО $\delta$  по сравнению с растениями дикого типа и *Agrik line 35-7*. Эти результаты позволяют заключить, что в условиях солевого стресса наблюдается существенное повышение активности изоформы АО $\delta$ , участвующей в заключительных стадиях биосинтеза АБК.

Нами было установлено, что активность ксантиндегидрогеназы у растений мутантной линии *tor<sup>r</sup>* была выше по сравнению с растениями дикого типа, в среднем, в 1,4 раза, как в контрольных условиях, так и при воздействии солевого стресса (50 мМ и 75 мМ NaCl). При этом повышение активности ксантиндегидрогеназы у растений линий *tor<sup>r</sup>* по отношению к растениям дикого типа было более выражено при солевом стрессе, вызываемом 75 мМ NaCl. Очевидно, что в нашем случае повышение активности ксантиндегидрогеназы у растений с нарушенным геном *AtTOR* не было обусловлено исключительно влиянием солевого стресса. Известно, что TOR сигнальная система в животных клетках интегрирует различные сигнальные пути, в том числе пути гормональной регуляции [1,3]. В данной работе впервые установлено, что в условиях солевого стресса в мутантных линиях арабидопсиса с пониженным содержанием белка TOR повышается активность участвующих в биосинтезе АБК ферментов таких как альдегидоксидаза и ксантиндегидрогеназа и высказано предположение, что TOR сигнальная система в определенных условиях может выступать в роли фактора негативной регуляции биосинтеза АБК. В пользу этой гипотезы свидетельствует факт повышенного содержания АБК в растениях линии *tor<sup>r</sup>* при солевом стрессе. Недавно было показано, что в мутантных линиях *Arabidopsis thaliana* с молчащей TOR-экспрессией наблюдается значительное сокращение количества полисом. В дальнейшем нами планируются исследования по определению содержания этого фитогормона у растений дикого типа и мутантных линиях *tor<sup>r</sup>* в условиях засоления и изучению белков-мишеней и факторов транскрипции, участвующих в TOR - зависимой адаптации растений к солевому стрессу. В целом, однако, естественно предполагать, что TOR сигнальная система растений может вступать в сложные регуляторные взаимодействия не только с системой АБК-сигналинга, но и других гормональных систем.

#### Литература

- 1 Martin D., Hall M. The expanding TOR signaling network // Curr. Opin. Cell Biol. – 2005. – V.17. – P. 158-166.
- 2 Bjornsti M., Houghton P. The TOR pathway: A target for cancer therapy // Nature Reviews-Cancer. – 2004. – V. 4. – P.335–348.
- 3 Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing // Nature Reviews-Molecular Cell Biology. – 2011. – V. 12. – P. 21–35.

- 4 Sarbassov D., Guertin D., Ali S., Sabatini D. // Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex // *Science*. – 2005. – V. 307. – P.1098-1101.
- 5 Wullschlegel S., Loewith R., Hall M. TOR signaling in growth and metabolism // *Cell*. – 2006. – V.124. – P. 471–484.
- 6 Anderson G. TOR signaling in plants // *Plant Cell Monographs*. – 2008. – V.10. – P.243-259.
- 7 Moreau M., Sormani R., Menand B., Veit B., Robaglia C., Meyer C. The TOR complex and signaling pathways in plants // *Enzymes*. – 2010. – V.27. – P.285-302.
- 8 John F., Roffler S., Wicker T., Ringli C. Plant TOR signaling components // *Plant Signalling and Behavior*. – 2011. – V.6. – N.11. – P. 1700-1705.
- 9 Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicola M., Bedu M., Robaglia C. and Meyer C. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation // *EMBO Rep*. – 2007. – V. 8. – P. 864–870.
- 10 Milborrow B.V. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – V. 52. – P. 1145-1164.
- 11 Seo M., Koiwai H., Akaba S., Komano T., Oritani T., Kamiya Y., Koshiba T. Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*. – 2000. – V. 23. – P. 481–488.

УДК. 577.216.3; 577.218

С.М. Тайпакова, И.Т.Смекенов, А.К. Бисенбаев\*

НИИ проблем биологии и биотехнологии, Казахский Национальный университет имени аль-Фараби,  
г. Алматы, Казахстан

\*e-mail: amangeldy.bissenbaev@kaznu.kz

### **Создание рекомбинантного штамма *Saccharomyces cerevisiae* с геном эндо-β-1, 4-эндоглюконазы гриба *Aspergillus niger* в НО локусе хромосомы**

Создан интегральный вектор способный включаться в НО локус хромосомы с селективным маркерным геном устойчивости к генетицину (G418), конститутивным промотором и терминатором дрожжевой глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). С использованием вектора для геномной интеграции получены новые штаммы дрожжей эффективно экспрессирующие эндо-1,4-β-глюканазу гриба *Aspergillus niger*. Показано, что подходы, использованные в данной работе, могут быть перспективными для конструирования промышленных штаммов для ферментации целлюлозосодержащего сырья.

**Ключевые слова:** эндо-1,4-β-глюканаза, *Saccharomyces cerevisiae*, геномная интеграция, экспрессия гена, ферментативная активность, гликозилирование.

С.М. Тайпакова, И. Смекенов, А.К. Бисенбаев

### **Хромосомасының НО локусында *Aspergillus niger* саңырауқұлағының эндо-β-1, 4-эндоглюконаза гені бар рекомбинантты *Saccharomyces cerevisiae* штаммын алу**

Жұмыс барысында генетицинге (G418) төзімділік көрсететін маркерлік ген KanMX4 пен ашытқы глицероальдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH) генінің конститутивті промоторы мен терминаторына ие, хромосоманың НО локусына интеграциялануға қабілетті интегральді вектор құрастырылды. Интеграцияланушы векторларды қолдана отырып, *Aspergillus niger* саңырауқұлағының эндо-1,4-β-глюканаза ферментін эффективті түрде экспрессиялауға қабілетті жаңа ашытқы штаммдары алынды. Аталмыш жұмыста қолданылған амалдардың целлюлозалы шикізатты ферментациялауға қабілетті өндірістік штамдарды құрастыруда тиімділігі көрсетілді.

**Түйін сөздер:** целлюбогидролаза, эндо-1,4-β-глюканаза, *Saccharomyces cerevisiae*, ген экспрессиясы, ферментативтік белсенділік, гликозилдену.

Taipakova S.M., Smekenov I.T., Bissenbaev A.K.

### **Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains containing endo-1,4-β-glucanase gene of *Aspergillus niger* into the chromosomal HO locus**

The vector carrying a selective marker gene resistant to geneticin (G418), a constitutive promoter and terminator of yeast gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was created for integration of genetic material into the chromosomal HO locus. Through the use of a genomic integration vector, new yeast strains with efficient expression of endo-1,4-β-glucanase of the fungus *Aspergillus niger* were obtained. Approaches used in this study has been shown to be perspective in the development of industrial strains for the fermentation of cellulose-containing materials.

**Keywords:** cellobiohydrolase, endo-1,4-β-glucanase, *Saccharomyces cerevisiae*, gene expression, enzymatic activity, glycosylation.