

Роль TOR сигнальной системы в прорастании зерна пшеницы

Б.Б. Смайлов, А.А. Мурсалимов, А.К. Бисенбаев

НИИ проблем биологии и биотехнологии
Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан.
e-mail: amangeldy.bissenbaev@kaznu.kz

В настоящей работе было показано дозозависимое подавляющее влияние рапамицина, специфического ингибитора TOR киназы, на рост и развитие изолированных зародышей и цельного зерна пшеницы *Triticum aestivum*, в присутствии фитогормона гиббереллина. Скорость роста coleoptилей и корней на 4 дне инкубации зародышей снижалась от 50% до полного торможения при добавлении рапамицина в дозе от 0.1 до 10 μM . Значительное подавление роста зародышей также наблюдалось в присутствии АТФ-конкурентных ингибиторов TOR киназ – pp242 и Torin-1 в концентрации 0.25 μM . Также показан ингибирующий эффект рапамицина на секрецию и активность α -амилазы в щитке зерна пшеницы в первые 24 часа прорастания. В качестве возможной причины чувствительности пшеницы к рапамицину путем сравнительного анализа влияния замены аминокислот на функцию белков был показан нейтральный эффект по позиции Ser58 в ее гомологе FKBP12.

Ключевые слова: TOR киназа, рапамицин, зародыш зерна пшеницы, α -амилаза.

Изменение темпа роста в ответ на влияние факторов окружающей среды, таких как наличие питательных ресурсов, является неотъемлемым механизмом в выживании живых организмов. Основной функцией консервативной серин/треониновой киназы TOR (target of rapamycin) является регуляция клеточного роста и деления эукариотических организмов. У дрожжей и животных, данный фермент контролирует множество биологических процессов, включая транскрипцию и трансляцию рибосомальных компонентов, что вносит значимый вклад в процесс клеточного роста. TOR киназа обнаружена как минимум в двух огромных белковых комплексах с большим количеством различных субстратов. Первый комплекс TORC1 содержит, помимо самой TOR киназы (TOR1 или TOR2 у дрожжей), белки RAPTOR/KOG1, mLST8/G β L и имеет чувствительность к рапамицину. В состав другого комплекса, TORC2, входят Rictor/AVO3 и mLST8/G β L, данный комплекс фосфорилирует Akt/PKB в животных клетках [1, 2]

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) под доступность внешних ресурсов, таких как свет, влага и минеральные вещества. Однако о генах и механизмах, участвующих в восприятии и передаче внешних стимулов у растений, имеется слишком мало информации. Некоторые компоненты TOR сигнального пути, обнаруженные у растений, такие как Raptor, LST8, S6 киназа и Tap46, представляют собою идеальных кандидатов на роль внутриклеточных посредников между рецепцией информации о наличии питательных веществ и регуляцией роста организма [3]. Открытие TOR киназы непосредственно связано с антибиотиком макролидной природы рапамицином, обладающим способностью подавлять клеточный рост и пролиферацию. Рапамицин, образуя комплекс с внутриклеточным белком FKBP12, связывается с определенным участком TOR (FRB, FKBP12-

rapamycin binding domain), препятствуя образованию TOR комплекса и ингибируя, таким образом, киназную активность фермента [4]. Первые эксперименты по изучению влияния рапамицина на растительные организмы показали, что высшие растения устойчивы к низким концентрациям данного макролида, в отличие от одноклеточных водорослей [5, 6]. Поэтому долгое время в целях изучения действия TOR киназы в растениях ставился акцент на получение и использование различных мутантов по генам элементов TOR комплекса и его субстратов [6, 7]. Позднее было выявлено, что рапамицин не способен подавить рост проростков арабидопсиса даже в высоких концентрациях (до 20 μM) [8], хотя для ингибирования фосфорилирования AtS6K, субстрата TOR киназы, достаточно 0.1 μM [9], что в 10 раз превышает эффективную дозу рапамицина для животных клеток. До настоящего момента не было показано влияние ингибирования TOR сигнального пути на рост и развитие многоклеточного растительного организма без вмешательства в активность генов-компонентов TOR комплекса.

В данной работе показано прямое воздействие рапамицина на рост и развитие зародыша зерна пшеницы в первые дни прорастания, а также на уровень секреции α -амилазы в щитке зародыша.

Материалы и методы

Инкубация зародышей зерна пшеницы. Зерна мягкой пшеницы сорта Казахстанская-4 стерилизовали в 0.5% растворе гипохлорида натрия в течение часа, затем тщательно отмывали 5-6 раз в дистиллированной воде 90 мин. Стерилизованные зерна помещали на фильтровальную бумагу, пропитанную водой, и инкубировали 24 часа. Зародыши отделяли от остатка зерна и помещали на инкубационную среду, содержащую 0.5-кратную концентрацию среды Мурасиге-Скуга, 10 mM CaCl₂, 3% сахарозы и 0.8% агарозы с добавлением фитогормонов гибберелловой (ГК) и абсцизовой кислот (АБК) и/или ингибиторов TOR киназы. Для инкубации целых зерен пшеницы после стерилизации зерна помещали на фильтровальную бумагу, пропитанную 0.5-кратным раствором солей среды Мурасиге-Скуга с добавлением ГК, АБК и ингибиторов TOR киназы в зависимости от условий эксперимента.

Выявление секреции α -амилазы щитком зародышей пшеницы. Отделенные зародыши помещали на инкубационную среду, содержащую 20 mM CaCl₂, 1% растворимого крахмала и 2% агара, и инкубировали в течение указанного времени при комнатной температуре в темноте. Зоны α -амилазной активности проявляли с помощью окрашивания чашек раствором 0.01 M I₂, 0.03M KI в 10% трихлоруксусной кислоте (ТХУ).

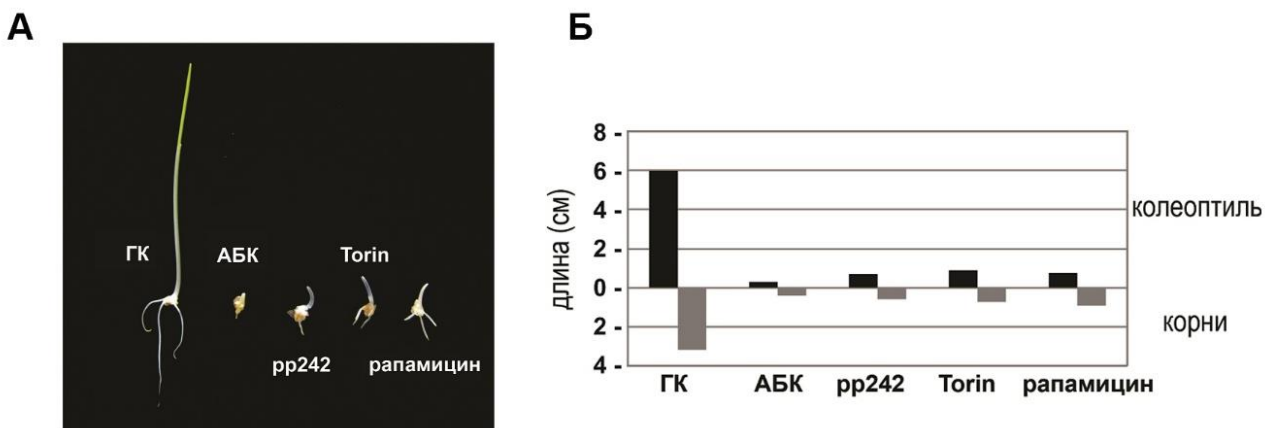
Активность α -амилазы проверялась путем электрофореза в нативном ПАА-геле экстрактов зародышей пшеницы. Изолированные зародыши пшеницы инкубировали в жидкой среде из Na-ацетатного буфера (pH5,8) в присутствии ГК и рапамицина и после окончания времени инкубации лизировали в Na-ацетатном буфере, содержащем 1% Triton X-100. Белковые экстракты разделяли по заряду в нативном ПААГЭ, затем гель инкубировали 1 час в растворе 1 % крахмала. После инкубации гель промывали в 10% ТХУ и окрашивали в растворе I₂+KI, как было описано раньше.

Сравнительное выравнивание аминокислотных последовательностей FKBP12. Выравнивание проводилось с использованием программы Clustal Ω на сайте Европейского института биоинформатики (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Аминокислотные последовательности FKBP12 были взяты из базы данных NCBI и проекта по расшифровке генома пшеницы IWGSC. Для анализа влияния замены аминокислот на биологическую функцию белка использовали программу PROVEAN института имени Д. Крэйг Вентера (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Результаты и их обсуждение

Для выяснения роли киназной системы TOR в росте растений мы использовали селективные ингибиторы TOR киназы – pp242, Torin-1 и рапамицин. pp242 и Torin-1 являются одними из первых селективных АТФ-конкурентных ингибиторов mTOR киназы [10, 11]. Эти молекулы ингибируют оба комплекса mTORC1 и mTORC2 в животных клетках с высокой степенью избирательности, в отличие от ингибиторов киназ семейства PI3, таких как LY294002.

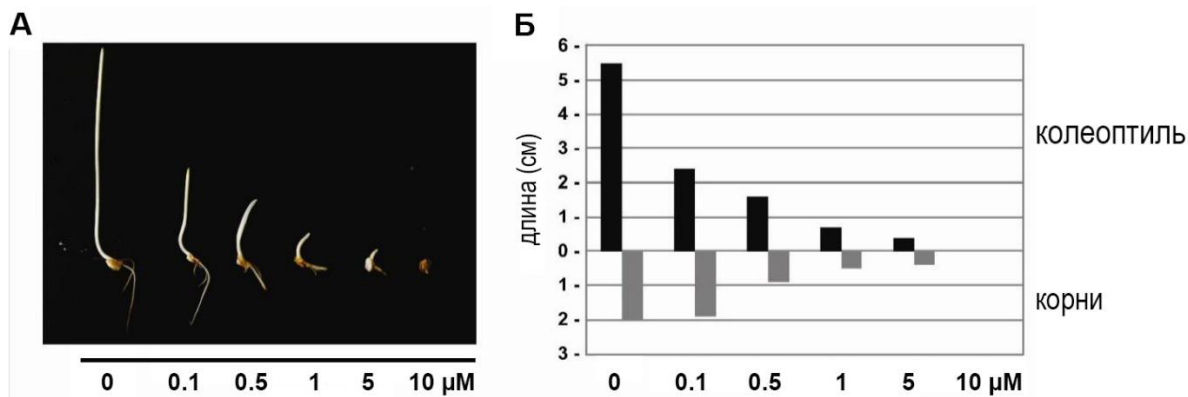
Для выявления эффекта ингибиторов TOR киназы изолированные зародыши зерна пшеницы инкубировали в течение 4 дней в твердой среде Мурасиге-Скуга в разных вариантах: в присутствии только ГК (1 μM); ГК + АБК (5 μM); ГК + pp242 (0.1 μM); ГК + Torin-1 (0.25 μM) и ГК+рапамицин (5 μM). После окончания времени инкубации измеряли длину корня и листьев. В ходе экспериментов установлено, что в присутствии ГК длина корней и листьев составило 3 и 6 см, соответственно (рисунок 1). При этом АБК, природный антагонист гиббереллина, в дозе 5 μM полностью блокировал эффект ГК на рост изолированных зародышей пшеницы. Присутствие в инкубационной среде 0.25 μM pp242 привело к подавлению роста корней и листьев на 90% по сравнению с действием только ГК, тогда как Torin-1 в дозе 0.25 μM тормозил рост эмбрионов на 80-85%. АТФ-конкурентная природа данных ингибиторов TOR киназы может заставить сомневаться в данных результатах, принимая во внимание тот факт, что в высоких концентрациях они способны подавлять активность других ферментов из семейства PI3K-родственных киназ. Однако добавление 5 μM рапамицина в ГК-содержащую среду показало аналогичный результат, служа подтверждением того, что TOR сигнальная система играет большую роль в росте и развитии эмбрионов пшеницы. Использование рапамицина в изучении TOR сигнальной системы имеет отдельное значение, так как данный макролид в отличие от АТФ-конкурентных ингибиторов даже в высоких концентрациях специфичен только к TOR киназе.



А – действие ингибиторов TOR киназы на рост изолированных зародышей зерна пшеницы;
 Б – Изменение длины coleoptилей и корней зародыша зерна пшеницы.

Рисунок 1 – Действие ингибиторов TOR киназы на прорастание эмбриона зерна пшеницы

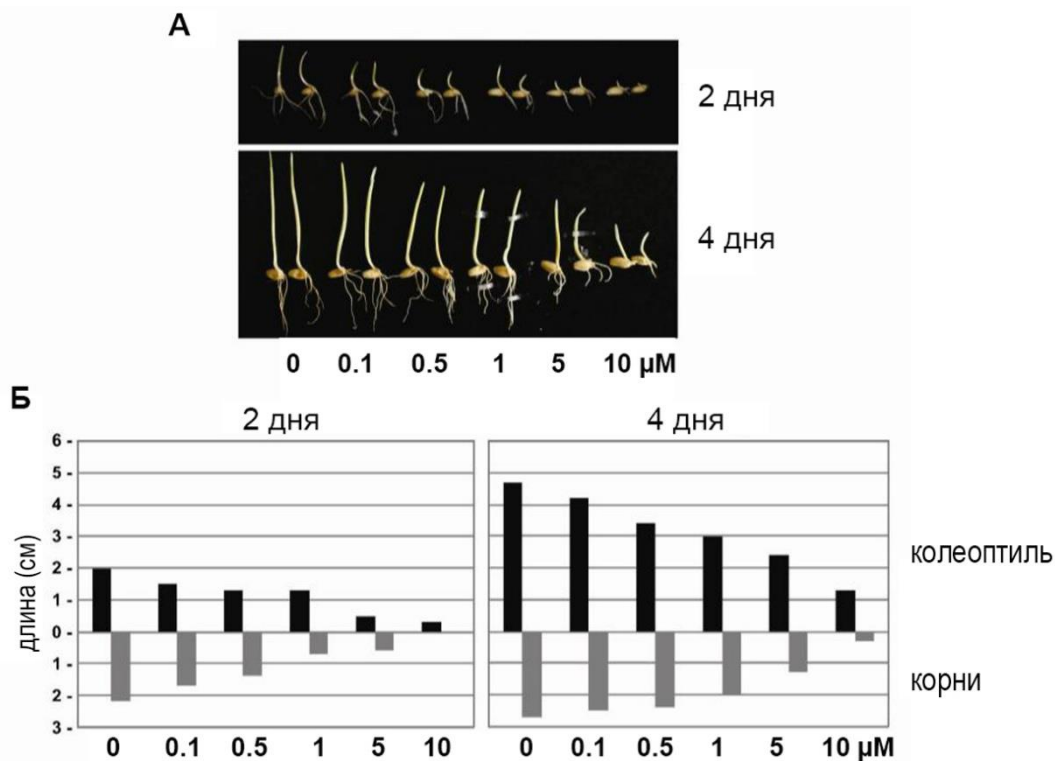
Для определения меньшей эффективной дозы изолированные зародыши инкубировали в среде с содержанием рапамицина от 0.1 до 10 μM в ГК-содержащей среде (рисунок 2). Эффект рапамицина проявляется в дозе 0.1 μM (более 50%) и по мере увеличения концентрации ингибирующий эффект увеличивался до полного подавления роста при концентрации 10 μM .



А – действие рапамицина на рост изолированных зародышей зерна пшеницы; В – Изменение длины coleoptилей и корней зародыша зерна пшеницы.

Рисунок 2 – Дозозависимый эффект рапамицина на рост зародыша зерна пшеницы

Аналогичные эксперименты были проведены с зернами пшеницы в целях подтверждения сохранения ингибирующего эффекта рапамицина на рост в цельном зерне пшеницы. Зерна проращивали на подложке из ватмана, пропитанной дистиллированной водой с ГК (1 μM) и/или рапамицином (0.1-10 μM), в темноте при комнатной температуре в течение 2 и 4 дней (рисунок 3).



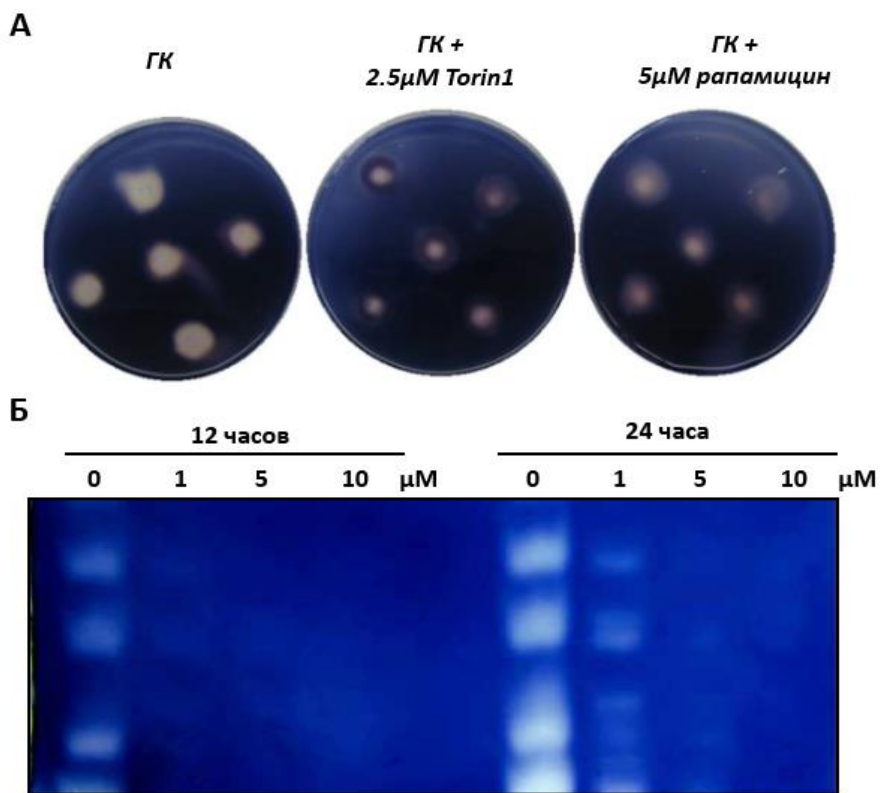
А – действие рапамицина на рост зерна пшеницы; В – Изменение длины coleoptилей и корней целого зерна пшеницы

Рисунок 3 – Дозозависимый эффект рапамицина на рост зародыша целого зерна пшеницы

Полученные данные указывают на дозозависимый эффект рапамицина на рост и развитие целых зерен. В отличие от эмбрионов эффект ингибирования роста менее выражен: разница в задержке роста coleoptилей и корней менее заметна. В итоге можно сделать вывод, что рапамицин проявляет значительный эффект на рост зерна пшеницы на уровне изолированных зародышей, но не на рост целого зерна. Предположительно клетки растений, обработанные рапамицином, хотя и замедляют свой рост, но не прекращают его полностью.

Прорастание зерна и ранние стадии роста сеянцев непосредственно зависят от функциональной активности алейронового слоя и щитка зерна [12]. В зерне злаков присутствуют два типа тканей чувствительны к действию ГК – это алейроновый слой и эпителий щитка. Основная функция щитка в прорастающем зерне – транспорт сахаров и аминокислот к растущему зародышу. Кроме этого, в ходе прорастания зерна, эпителиальные клетки щитка синтезируют и секретируют в эндосперм кислые гидролазы, включая α -амилазу, катализирующие реакции гидролиза пептидных и гликозидных связей белков и полисахаридов эндосперма, и в результате в среде накапливаются аминокислоты, пептиды, моно- и олигосахариды необходимые для роста зародыша зерна [13].

Для выявления эффекта ингибиторов TOR киназы на секрецию α -амилазы, изолированные зародыши зерна пшеницы инкубировали 24 часа в твердой агаризованной среде, содержащей 1% растворимый крахмал. Зоны α -амилазной активности проявляли с помощью окрашивания раствором 0.01 M I_2 , 0.03 M KI в 10% трихлоруксусной кислоте (рисунок 4, А). Как видно из рисунка в присутствии ГК вокруг изолированных зародышей пшеницы четко видны зоны просветления, тогда как, инкубация изолированных зародышей в присутствии ГК и ингибиторов TOR киназы (Torin-1 и рапамицин) зоны просветления не обнаруживались, что указывает на важную роль, которую TOR киназная сигнальная система играет в регуляции секреции α -амилазы.



А - Действие ингибиторов TOR киназы на секрецию α -амилазы; Б- Нативный ПААГЭ изоферментов α -амилазы зародыша зерна пшеницы.

Рисунок 4 - Эффект ингибиторов TOR киназы на секрецию α -амилазы

В последующих экспериментах изолированные зародыши пшеницы инкубировали в жидкой среде в присутствии ГК и рапамицина в течение 12 и 24 часов. Затем из зародышей получали белковые экстракты, которые проверялись на активность α -амилазы в нативном ПАА-гель-электрофорезе (рисунок 4, Б). Инкубация изолированных зародышей пшеницы в присутствии ГК в течение 12 и 24 часов приводит к увеличению активности всего компонентного состава изоферментов α -амилазы. Внесение рапамицина к инкубируемым в присутствии ГК зародышам зерна пшеницы значительно блокировало активность изоформ α -амилазы. Таким образом эти данные указывают на строгую зависимость активности и секреции α -амилазы от функционирования TOR киназной сигнальной системы.

В итоге полученные нами результаты указывают на более высокую чувствительность зародышей пшеницы к ингибиторам TOR киназы по сравнению с арабидопсисом, у которого видимый эффект подавления роста наблюдался только в мутантных линиях с супер-экспрессией FKBP12 [8]. Двугибридный анализ на дрожжах показал, что FKBP12 арабидопсиса имеет низкое сродство с рапамицином в результате измененной аминокислотной последовательности [14, 15]. Возможно у пшеницы структура FKBP12 позволяет более эффективно связывать рапамицин и соответственно препятствовать формированию TOR комплекса, чем у арабидопсиса. Для подтверждения этого предположения было проведено выравнивание по аминокислотным последовательностям гомологов FKBP12 человека, дрожжей *S.cerevisiae*, одноклеточной водоросли *C.reinhardtii*, арабидопсиса *A.thaliana*, кукурузы *Z.mays* и непосредственно самой пшеницы мягкой *T.aestivum* (рисунок 5). Выравнивание по полной последовательности показало относительно высокий уровень консервативности между всеми гомологами. Кристаллографический анализ комплекса HsFKBP12+рапамицин выявил 3 основные радикальные группы аминокислотных остатков: Glu-55, Gln-54 и Asp-38, участвующих в связывании с молекулой рапамицина и выделенных красным [4, 5]. Замена аминокислот на данных позициях существенно влияет на эффективность формирования комплекса FKBP12-рапамицин-FRB домен TOR киназы. При помощи сервиса PROVEAN был проведен сравнительный анализ степени влияния замены аминокислот в 3 ключевых позициях среди гомологов FKBP12 на связывание с рапамицином посредством замены на нужную аминокислоту в HsFKBP12 (таблица 1).

<u>H.sapiens</u>	-----MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDG---KKFDSSRDR-NKPFKFM 50
<u>S.cerevisiae</u>	MSEVIEGNVKIDRISPGDGATFPKGTDLVTIHYGTLENG---QKFDSSVDR-GSPFQCN 56
<u>C.reinhardtii</u>	-----MGVDVATTRPGDGVSFPKGTQTVFVHYGTLTLDG---KKFDSSRDR-GEPFSFR 50
<u>A.thaliana</u>	-----MGVEKQVIRPGNGP-KPAPGQTVTVHCTGFGKDGDLKSQKFWSTKDEGQKPFQ 53
<u>Z.mays</u>	-----MGFEKQILRSGTGP-KPIKQKQVTVHCTGYGKDRDLSKFFWSTKDPGQQPFSFS 53
<u>T.aestivum</u>	-----MGFEKEILKAGTGP-KPVKQKQVTVHCTGYGKDGDLKSQKFWSTKDPGQQPFSFN 53
	.. * * * * : : * * : : * * : * * .**.
<u>H.sapiens</u>	LGKQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDYAYGATGHPGI-IPPHATLVFDVELLKLE 108
<u>S.cerevisiae</u>	IGVGQVIKGDVGIKLSVGEKARLTIPGPYAYGPRGFPGL-IPPNSTLVFDVELLKVN 114
<u>C.reinhardtii</u>	LGMGEVIKGDVGEVAVQMSKQGRATLTISHDFAYGPRGIPGV-IPPSATLVFDVELLDYK 108
<u>A.thaliana</u>	IGKGAVIKGDVGEVIGMQIGEVARLRCSDDYAYGAGGFPAWGIQPNVLDLFEIEVLSVQ 112
<u>Z.mays</u>	IGQGSVIKGDVGEVMTMQVGEVARIQCTPDYAYGAGGFPAWGIQPNVLDLFEIEVLSAQ 112
<u>T.aestivum</u>	IGLGSVIKGDVGEVGMQQLGEVARLTCTPDYAYGEGGFPAWGIQPNVLDLFEIEVLSAK 112
	:* **:**: * : .. * : * : :*** * * . * * :* * :* * .*

Рисунок 5 – сравнительное выравнивание последовательностей FKBP12

Таблица 1 - Значения PROVEAN score при замене аминокислотных остатков гомологов FKBP12 по 3 позициям относительно HsFKBP12

<i>H.sapie ns</i>	<i>S.cerevisi ae</i>	PROVEAN Score	<i>C.reinhardtii</i>	PROVEAN Score	<i>A.thaliana</i>	PROVEAN Score	<i>T.aestivum</i>	PROVEAN Score
E55	Q62	-1.322	E55	0	A58	-4.379	S58	-3.369
Q54	G61	2.647	G54	2.647	G57	2.647	G57	2.647
D38	D44	0	D38	0	W40	-9.556	W40	-9.556

На основе статистического анализа десятков тысяч гомологов эукариотических протеинов был выведен коэффициент негативного влияния замены/делеции аминокислот на биологические функции белков, используемый в расчете PROVEAN score. При 85% специфичности и 70% чувствительности анализа значение предполагаемого нейтрального минимума составляет -3.5, т.е. при замене аминокислоты варианты с PROVEAN score ≥ -3.5 интерпретируются как нейтральные, без негативного влияния на функцию. Таким образом, замена остатка глутаминовой кислоты (E55) в HsFKBP12 на серин имеет предполагаемый нейтральный эффект на связывание с молекулой рапамицина, в отличие от замены на аланин у арабидопсиса со значением -4,379, что ниже нейтрального минимума. При сравнении по всем 3 позициям замены остатков у *S.cerevisiae* и *C.reinhardtii* имеют общее нейтральное значение, что соответствует проявлению чувствительности роста данных организмов к рапамицину [4]. У высших растений общее влияние замен аминокислот имеет негативное значение, однако у пшеницы отрицательный фактор наблюдается только по одной позиции, W40. Приняв во внимание наблюдаемый высокий уровень чувствительности прорастания зародышей пшеницы к рапамицину и отсутствие его у арабидопсиса, можно сделать вывод, что Ser-58 играет ключевую роль в формировании комплекса FKBP12+рапамицин [5].

На основе результатов проведенной работы был выявлен явный негативный эффект ингибиторов TOR киназы на ГК-стимулируемые рост и развитие зародышей и цельных щерен пшеницы, а также показан подавляющий эффект на активность и секрецию изоформ α -амилазы из щитка пшеничных зерен на первых этапах прорастания. Так как подобный эффект ранее не наблюдался у высших растений, в качестве обоснования был проведен сравнительный анализ влияния замен аминокислотных остатков в последовательности FKBP12, играющих ключевую роль в связывании данного белка с молекулой рапамицина. Было показано, что замена E55S имеет относительно нейтральное значение, что может служить частичной причиной проявления более высокой чувствительности пшеницы *T.aestivum* к рапамицину, чем арабидопсис.

Литература

1. Wullschleger S., Loewith R., Hall, M.N. TOR signaling in growth and metabolism // Cell. – 2006. - №124. – С. 471–484.
2. Loewith R., Hall M.N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control // Genetics. – 2011. - №189. – С.1177–1201.
3. Dobrenel T., Marchive C., Sormani R. *et al.* Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase // Biochem Soc Trans. – 2011. - №39 (2). – С. 477–481.

4. Choi J., Chen J., Schreiber S. L., Clardy J. Structure of the FKBP12-Rapamycin Complex Interacting with Binding Domain of Human FRAP // *Science*. – 1996. - №273 (5272). – С. 239-242.
5. Crespo, J.L. Inhibition of Target of Rapamycin Signaling by Rapamycin in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiology*. – 2004. - №139 (4). – С. 1736-1749.
6. Menand B., Desnos T., Nussaume L. *et al.* Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. - №99 (9). – С. 6422-6427.
7. Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M. *et al.* The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation // *EMBO Rep*. – 2007. - №8 (9). – С. 864-870.
8. Ren M, Venglat P, Qiu S, *et al.* Target of Rapamycin Signaling Regulates Metabolism, Growth, and Life Span in Arabidopsis // *The Plant Cell*. – 2012. - №24 (12). – С. 4850-4874.
9. Xiong Y., Sheen J. Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2012. - №287. – С. 2836-2842.
10. Feldman M. E., Apsel B., Uotila A., Loewith R., Knight Z. A., Ruggero D., Shokat K. M. Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2 // *PLoS Biol*. – 2007. - №7 (2). – e1000038.
11. Liu Q., Chang J.W., Wang J., Kang S.A., *et al.* Discovery of 1-(4-(4-Propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1 H)-one as a Highly Potent, Selective Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor for the Treatment of Cancer // *J. Med. Chem*. – 2010. - №53 (19). – С. 7146-7155.
12. Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H. Seed dormancy and germination // *Plant Biol*. - 2002. - № 5. - С. 33-36.
13. Dominguez F., Moreno J., Javier Cejudo F. The scutellum of germinated wheat grains undergoes programmed cell death: identification of an acidic nuclease involved in nucleus dismantling // *J Exp Bot*. – 2012. - №63. – С. 5475–5485.
14. Sormani R., Yao L., Menand B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C., Robaglia C. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility // *BMC Plant Biolog*. – 2007. - №7. - С. 26.
15. Leiber R.M., John F., Verherbruggen Y., Diet A., Knox J.P., Ringli C. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in Arabidopsis // *Plant Cell*. – 2010. - №22. – С. 1898–1908.

Бидай дәнінің өсіп-өну процессіндегі TOR сигналдық жүйесінің рөлі
Б.Б. Смайлов, А.А. Мурсалимов, А.К. Бисенбаев

Осы жұмыста гиббереллин фитогормоны бар ортада TOR киназаның спецификалық ингибиторы рапамициннің *Triticum aestivum* бидай дәнінің және бөліп алынған ұрықтық бөлімінің өсіп-өнуіне дозатәуелді тежеуші әсері көрсетілді. 0.1 - 10 μM дозасында рапамицин қосқылған жағдайда ұрықты инкубациялаудың 4 тәулігінде колеоптель мен тамырдың өсу жылдамдығы 50% дан 100% дейін төмендеді. Сонымен қатар, 0.25 μM концентрациясында TOR киназаның АТФ-конкурентті ингибиторы – pp242 және Torin-1 қосылған жағдайда ұрықтың өсуінің едәуір тежелуі байқалды. Өсіп-өнуінің алғашқы 24 сағатында бидай дәнінің дәнжарнағында α -амилаза секрециясы мен белсенділігіне рапамициннің тежеуші әсері көрсетілді. Аминқышқылдарының алмастырылуының белок функциясына әсерінің салыстырмалы анализі арқылы бидайдың рапамицинге сезімталдығының мүмкін себебі ретінде FKBP12 белогының Ser58 жағдайы бойынша бейтарап эффекті көрсетілді.

Тірек сөздер: TOR киназа, рапамицин, бидай тұқымы, α -амилаза.

Role of TOR signaling in wheat grain germination
B.B. Smailov, A.A. Mursalimov, A.K. Bissenbaev

In the present work, we showed an inhibitory dose-dependent effect of rapamycin, the specific inhibitor of TOR kinase, on growth and development of isolated embryos and whole grains of *Triticum aestivum* in presence of Gibberellin. Growth rate of coleoptiles and roots on 4th day of incubation decreased down to 50% or more when rapamycin was added in concentration of 0.1-10 μ M. Significant growth inhibition in embryos was observed in presence of ATP-competitive TOR kinase inhibitors – pp242 and Torin-1 in dose of 0.25 μ M. Also suppressive effect of rapamycin on activity and secretion of α -amylase in wheat grain scutellum was detected. As a prospective reason for sensitivity of wheat to rapamycin a neutral effect of Ser-58 in its FKBP12 homologue was shown by means of comparative analysis of what effect certain amino acid substitutions have on the protein function

Keywords: TOR kinase, rapamycin, wheat embryo, α -amylase