

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. В.Л. КОМАРОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Муртузова Александра Владимировна

**Роль киназных комплексов TOR и SnRK1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
в устойчивости к дефициту калия и солевому стрессу**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Войцеховская Ольга Владимировна

Санкт-Петербург - 2023

| | |
|---|----|
| ОГЛАВЛЕНИЕ | |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ | 10 |
| 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 15 |
| 1.1. Киназные комплексы TOR и SnRK1 как центральные переключатели анаболизма и катаболизма у растений | 15 |
| 1.1.1.1. Структура белка TOR..... | 15 |
| 1.1.1.2. Комплексы на основе киназы TOR..... | 16 |
| 1.1.1.3. Регуляция активности TORC1 | 17 |
| 1.1.1.4. Гены, кодирующие компоненты TORC1, и мутации по ним | 19 |
| 1.1.2.1. Структура комплекса SnRK1 и регуляторы его активности..... | 21 |
| 1.1.2.2. Подсемейство киназ SnRK2 | 25 |
| 1.1.2.3. Подсемейство киназ SnRK3 | 28 |
| 1.2. Роль киназных комплексов TOR и SnRK1 в развитии и метаболизме растений в благоприятных и стрессовых условиях. | 29 |
| 1.3. Автофагия, ее структурные особенности и регуляция в клетках растений. | 40 |
| 1.3.2.1. Регуляция автофагии киназами TOR и SnRK1 | 44 |
| 1.3.2.2. Регуляция автофагии абсцизовой кислотой (АБК)..... | 46 |
| 1.3.2.3. Регуляция автофагии брассиностероидами | 47 |
| 1.3.2.4. Участие салицилатов и жасмонатов в регуляции автофагии..... | 48 |
| 1.3.2.5. Некоторые ингибиторы автофагии, применяемые в исследованиях растений | 48 |
| 1.4. Роль ионов калия в метаболизме и стрессоустойчивости растений..... | 50 |
| 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 57 |
| 2.1. Объект исследования и условия выращивания..... | 57 |
| 2.1.1. Поверхностная стерилизация семян <i>Arabidopsis thaliana</i> | 57 |
| 2.1.2. Выращивание <i>A. thaliana</i> в стерильной культуре и грунте..... | 58 |
| 2.1.2.1. Выращивание <i>A. thaliana</i> в стерильной культуре | 58 |
| 2.1.2.2. Выращивание <i>A. thaliana</i> в стерильной культуре на средах с различным содержанием калия..... | 59 |
| 2.1.2.3. Выращивание <i>A. thaliana</i> в стерильной культуре на средах с добавлением 3-МА | 61 |
| 2.1.2.4. Выращивание <i>A. thaliana</i> в грунте..... | 61 |
| 2.1.2.5. Выращивание <i>A. thaliana</i> в грунте в условиях солевого стресса..... | 61 |
| 2.2. Методы исследования | 62 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.2.1. | Морфометрические методы | 62 |
| 2.2.2. | Методы молекулярной биологии | 62 |
| 2.2.2.1. | Выделение тотальной РНК..... | 62 |
| 2.2.2.2. | Очистка тотальной РНК от полисахаридов | 63 |
| 2.2.2.3. | Электрофорез РНК в агарозном геле..... | 64 |
| 2.2.2.4. | Определение концентрации нуклеиновых кислот | 64 |
| 2.2.2.5. | Очистка тотальной РНК и постановка обратной транскрипции | 64 |
| 2.2.2.6. | Полимеразная цепная реакция | 65 |
| 2.2.2.7. | ПЦР в реальном времени..... | 65 |
| 2.2.3. | Методы работы с белками..... | 67 |
| 2.2.3.1. | Выделение суммарного белка из растительной ткани | 67 |
| 2.2.3.2. | Денатурирующий электрофорез белков в ПААГ..... | 68 |
| 2.2.3.3. | Вестерн-блоттинг | 69 |
| 2.2.3.4. | Окрашивание ПААГ-геля Кумасси G-250..... | 71 |
| 2.2.3.6. | Построение зависимости интенсивности сигнала от концентрации белка и поиск линейного диапазона изменения концентраций..... | 72 |
| 2.2.3.7. | Определение эффективных концентраций ингибиторов TOR | 77 |
| 2.2.4. | Определение уровня АТФ..... | 78 |
| 2.2.5. | Флуоресцентная микроскопия | 78 |
| 2.2.5.1. | Детекция и количественный анализ автофагосом с помощью окраски монодансилкадаверином..... | 78 |
| 2.2.6. | Импульсная флуориметрия..... | 79 |
| 2.2.6.1. | Световые кривые | 79 |
| 2.2.6.2. | Электрохимический градиент на тилакоидных мембранах..... | 80 |
| 2.2.6.3. | Скрипт для измерения электрохимического градиента и его компонентов..... | 82 |
| 2.2.7. | Статистический анализ..... | 83 |
| 2.2.7.1. | Скрипт для ANOVA с Tukey HSD test | 83 |
| 3. | РЕЗУЛЬТАТЫ..... | 85 |
| 3.1. | Исследование влияние дефицита калия на активность киназы TOR и индукцию автофагии у проростков <i>Arabidopsis thaliana</i> | 85 |
| 3.1.1. | Влияние дефицита калия на морфометрические показатели проростков. | 85 |
| 3.1.2. | Недостаток калия и энергетический обмен в клетках корней проростков | 87 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.1.3. | Роль калия в регуляции генов, кодирующих ферменты, участвующие в гликолизе, митохондриальном дыхании и ассимиляции азота..... | 88 |
| 3.1.4. | Влияние дефицита калия в среде прорастивания на деградацию общего белка проростков <i>Arabidopsis thaliana</i> | 90 |
| 3.1.5. | Исследование изменения уровня активности TOR-киназы в условиях дефицита калия методом вестерн-блоттинга..... | 91 |
| 3.1.6. | Уровни экспрессии генов, кодирующих каталитические субъединицы SnRK1 - KIN10 и KIN11, у трансгенных линий <i>Arabidopsis</i> , экспрессирующих конструкторы <i>p35S::KIN10</i> (KIN10OX) и <i>p35S::kin10(RNAi)</i> (KIN10RNAi)..... | 93 |
| 3.1.7. | Изучение роли SnRK1 в активации автофагического потока при дефиците калия | 95 |
| 3.2. | Участие SnRK1 в регуляции процессов фотосинтеза..... | 97 |
| 3.2.1. | Фенотипические изменения растений под действием солевого стресса | 97 |
| 3.2.2. | Изучение показателей эффективности ФСІ и ФСІІ у растений с разным уровнем экспрессии <i>KIN10</i> при солевом стрессе | 98 |
| 3.2.3. | Электрохимический градиент и скорость синтеза АТФ | 104 |
| 3.2.4. | Уровень продукции АТФ в проростках <i>Arabidopsis thaliana</i> | 106 |
| 4. | ОБСУЖДЕНИЕ..... | 107 |
| 4.1. | Хронический дефицит калия в среде выращивания оказывает ингибирующее воздействие на активность киназы TOR и активирует автофагию | 107 |
| 4.2. | Киназа SnRK1 участвует в регуляции фотосинтетической активности хлоропластов в норме и в ходе ответа на солевой стресс | 110 |
| | ВЫВОДЫ | 113 |
| | БЛАГОДАРНОСТИ | 114 |
| | СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 115 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3-МА - 3-метиладенин;

АБК - абсцизовая кислота;

АК - аминокислота;

ЖК - жасмоновая кислота;

ПКС - программированная клеточная смерть;

ПЦР-РВ – Полимеразная Цепная Реакция в Реальном Времени;

СК - салициловая кислота;

ТАГ - триацилглицерол;

ТФ - транскрипционный фактор;

ФС I - Фотосистема I;

ФС II - Фотосистема II;

ЭХГ - Электрохимический градиент;

ABF - ABRE-binding factor;

AIS - Active Inhibition Scale;

AGPase - ADP-glucose pyrophosphorylase;

AMPK - adenosine monophosphate-activated protein kinase;

ASC - association with SNF1 complex;

Asp - Aspartic acid;

ATG - AuTophagy-related genes;

ATM - ataxia-telangiectasia mutated;

AtTORC1 - Arabidopsis thaliana target of rapamycin complex;

BAK1 - Brassinosteroid insensitive 1-Associated receptor Kinase1;

BCAA - branched-chain amino acids;

BIN2 - Brassinosteroid -insensitive 2;

bZIP - Basic leucine zipper;

CBL - Calcineurin B-Like proteins;

CBM - Carbohydrate Binding Module;

CBS - cystathionine- β -synthase;

CDK - Cyclin - Dependent Kinase;

CDPK - Calcium-Dependent Protein Kinase;

CIPK - CBLs interacting protein kinases;

ConA - Concanavalin A;

CSL - Cellulose Synthase-Like;

CTD - C-terminal domain;

CTR1 - Constitutive Triple Response1;

Cys - cysteine;

DCMU - 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea;

DSK2 - Dominant Suppressor of KAR2;

EIN - Ethylene Insensitive;

F2KP - fructose-6-phosphate-2-kinase;

FAT - FRAP-ATM-TRRAP;

FATC - FRAP, ATM, TRRAP C-terminal;

FKBP - FK506-Binding Protein;

FLZ - FCS-Like Zinc finger;

FRAP - Ferrous Reducing Antioxidant Potential;

FRB - FKBP-Rapamycin-Binding;

GBD - Glycogen Binding Domain;

GI - Gigantea;

Glu - Glutamic acid;

GRIK - Geminivirus Rep Interacting Kinase;

HEAT - huntingtin, eukaryotic translation elongation factor 3 (eEF3), protein phosphatase 2 regulatory A subunit (PP2A), mechanistic target of rapamycin (mTOR);

HMG-CoA reductase - 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Reductase;

IDD - Indeterminate Domain;

KA1 - Kinase-Associated Domain 1;

Leu - Leucine;

LST8 - Lethal with Sec-13 protein8;

MDC - MonoDansylCadaverine;

NMT1 - N-MyristoylTransferase 1;

NPR1 - Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes1;

NR - Nitrate Reductase;

NVR - N-terminal Variable Region;

PCK1 - Phosphoenolpyruvate Carboxy Kinase1;

PDK1 - 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1;

PIF - Phytochrome Interacting Factors;

PI3K - PhosphoInositide 3-Kinase;

PIKK - Phosphatidylinositol 3-Kinase-related Kinase;

PKC α - protein kinase C α ;

PKS - protein kinases like SOS2;

PMDH2 - Peroxisomal malate dehydrogenase 2;

PP2A - protein phosphatase 2A;

PP2C - protein phosphatase 2C;

PYL - PYR1-Like;

PYR1 - PYrabactin Resistance 1;

RAPTOR - Regulatory-Associated Protein Of TOR;

RICTOR - Rapamycin-Insensitive Companion Of mTOR;

RNAi - RNA Interference;

ROP - Rho of Plants;

RPS6 - Ribosomal Protein S6;

rRNA - Ribosomal Ribonucleic Acid;

S6K - S6 Kinase;

SAG - Senescence Associated Gene;

SAR - Structure-Activity Relationships;

SCaBP - SOS3-like-Calcium Binding Proteins;

SEN - Senescence Gene;

Ser - Serine;

SINAT - Seven In Absentia;

SMR - SiaMese Related;

SnAK - SnRK-Activating Kinase;

SNF1 - Sucrose Non-Fermenting 1;

SnRK - Snf1-Related protein Kinase 1;

SOS - Salt Overly Sensitive;

SPS - Sucrose Phosphate Synthase;

SS - Starch Synthase;

SUSY - Sucrose Synthase;

T6P - Trehalose-6-Phosphate;

TOR - Target Of Rapamycin;

TORC - TOR Complex;

TOS - TOR-signaling;

TPS - Trehalose-6-Phosphate Synthase;

TRAF - Tumor necrosis factor receptor-associated factor;

TRRAP - transformation/transcription domain-associated protein;

UBA - Ubiquitin-Associated;

UTR - UnTranslated Region;

Val - Valine;

WGD - Whole-Genome Duplication;

ZTL - ZeiTLupe.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Высшие растения ведут прикрепленный образ жизни и потому сильно зависят от факторов внешней среды. Это способствовало развитию сети сигнальных систем, необходимых для быстрой реакции на стресс. Примечательно, что у растений активация механизмов ответа на стресс любого рода, как правило, сопровождается остановкой или замедлением роста. До недавнего времени считалось, что это связано с перераспределением ресурсов растения от растущих органов в русло энергообеспечения детоксикации и других защитных процессов, активирующихся в ответ на стресс. Однако, исследования последних лет позволяют предполагать, что остановка роста и запуск механизмов борьбы со стрессом находятся под контролем двух различных генетических программ (Campos *et al.*, 2016; De Vleeschauwer *et al.*, 2018; Filipe *et al.*, 2018; Margalha *et al.*, 2019). Это значит, что можно добиться их независимой регуляции в условиях стресса и получить хорошо растущие даже в неблагоприятных условиях стрессоустойчивые растения. Однако, для этого важно выявить механизмы, обеспечивающие координированную регуляцию ростовых и защитных программ у растений в различных стрессовых условиях.

В настоящее время у растений обнаружено два центральных протеинкиназных комплекса, TOR (Target Of Rapamycin) и SnRK1 (Sucrose non-fermenting 1-Related protein Kinase 1), регулирующих переключение между анаболическими (в т.ч. связанными с ростом) и катаболическими (активирующимися в условиях стресса с целью энергообеспечения защитных программ) процессами. Киназа TOR активна при благоприятных условиях, способствуя пролиферации и росту клеток, и является важнейшим активатором анаболизма и репрессором катаболизма эукариот (Shi *et al.*, 2018). Киназа SnRK1 активируется в стрессовых условиях, связанных с низким уровнем сахаров/энергии в клетке, и способствует реализации стратегий энергосбережения и ремобилизации питательных веществ (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). SnRK1 ингибирует TOR, способствуя таким образом активации тех катаболических программ, которые были подавлены TOR-киназой, в том числе автофагии (Baena-Gonzalez, Hanson, 2017). Автофагия представляет собой процесс, при котором поврежденные или ненужные компоненты клетки подвергаются деградации в литических компартментах (Marshall, Vierstra, 2018), позволяя

восполнить недостаток питательных веществ и энергии. Пока что механизмы, обеспечивающие взаимодействие киназных комплексов TOR и SnRK1, остаются невыясненными. Наиболее изучены взаимодействия сигнальных каскадов, инициируемых TOR и SnRK1, в регуляции автофагии; последние данные также показывают участие автофагии в активации SnRK1 (Yang *et al.*, 2023).

Поскольку растения – автотрофные организмы, то энергия поступает в их организм в виде сахаров, образованных в процессе фотосинтеза, и превращается в используемую клеткой форму – АТФ – благодаря катаболизму сахаров, в первую очередь, в ходе митохондриального дыхания. Возможно, именно поэтому главными метаболическими регуляторами TOR и SnRK1 у растений выступают молекулы сахаров и сахарофосфатов, в отличие от ортологичных киназ дрожжей и животных, где в этой роли выступают аминокислоты и аденозинфосфаты (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Baena-González, Sheen, 2008; Dobrenel *et al.*, 2016). Так, киназа TOR у растений регулируется глюкозой, что позволяет координировать процессы роста с доступностью образующихся в ходе фотосинтеза ресурсов (Dobrenel *et al.*, 2016). В свою очередь, сама TOR оказывает регуляторное действие на процесс фотосинтеза (Dong *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2018). Известно, что активность киназы SnRK1 растений ингибируется сахарофосфатами (Zhai *et al.*, 2018). Более того, многие белки фотосинтетического аппарата кодируются генами, активность которых регулируется транскрипционными факторами, представляющими собой потенциальные мишени для SnRK1 (Wurzinger *et al.*, 2018). Однако, в данный момент отсутствует информация о влиянии основного сенсора энергетического статуса растительной клетки - киназы SnRK1 - на регуляцию фотосинтетического метаболизма, как в оптимальных условиях, так и в условиях стресса.

В связи с увеличением площадей засоленных земель исследования, связанные с поиском механизмов солеустойчивости растений, крайне необходимы. Известно, что важнейшая роль в устойчивости растений к солевому стрессу принадлежит цитоплазматическому калию (Shabala, 2017). Калий в растениях является важным макроэлементом и осмотиком (Dreyer, 2021). Цитозольный гомеостаз K^+ необходим для поддержания активности ряда цитозольных ферментов, участвующих в реакциях анаболизма. Многие ферменты, которым для своей активности необходим K^+ , катализируют реакции с расходом АТФ (Yang *et al.*, 2016). У *Arabidopsis thaliana*

дефицит калия приводит к ингибированию более 50 ферментов, в том числе ферментов гликолиза и путей усвоения азота. При солевом стрессе в ответ на вход в клетки ионов Na^+ происходит потеря K^+ из клеток корня через калиевые каналы GORK, что приводит к запуску запрограммированной клеточной гибели и автофагии (Demidchik, *et al.*, 2010, 2018). Ранее было высказано предположение, что уровень цитозольного K^+ может выступать «метаболическим переключателем» между анаболизмом и катаболизмом (Leigh, WynJones, 1984). Однако, до сих пор не изучался вопрос о том, могут ли уровни цитозольного K^+ влиять на передачу сигналов через TOR или SnRK1.

Таким образом, исследование роли обеих регуляторных киназ, TOR и SnRK1, в обеспечении роста, фотосинтетического метаболизма и стрессоустойчивости растений представляет большой интерес для получения стрессоустойчивых, но при этом высокопродуктивных растений, а изучение ответов растений на солевой стресс и на дефицит калия позволит выявить новые аспекты взаимодействия этих регуляторов.

Цели и задачи исследования

Цели данной работы - изучение влияния хронического дефицита калия в среде выращивания на активность киназы TOR, и характеристика роли киназы SnRK1 в регуляции фотосинтетического метаболизма в ходе ответа на солевой стресс, у растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Для достижения целей исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) Отработать метод определения активности киназы TOR по уровню фосфорилирования одного из субстратов TOR – белка S6K – с помощью иммуноблоттинга;
- 2) Определить влияние дефицита калия в среде выращивания на рост и на уровень индукции автофагии у проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.;
- 3) Определить влияние дефицита калия в среде выращивания на активность TOR-киназного комплекса;
- 4) Оценить уровень автофагического потока при дефиците калия в среде выращивания у растений *A. thaliana* с измененным уровнем экспрессии каталитической субъединицы SnRK1-киназы KIN10;

- 5) Определить влияние уровня экспрессии каталитической субъединицы SnRK1-киназы KIN10 на параметры фотосинтеза *A. thaliana* вне стрессовых условий и при солевом стрессе.

Научная новизна результатов

На примере модельного растения *Arabidopsis thaliana* впервые обнаружено ингибирующее воздействие хронического дефицита калия в среде выращивания на активность основного регулятора анаболизма и роста – киназы TOR, и активирующее воздействие на активность регулятора стрессовых ответов растений – киназы SnRK1. Впервые изучена роль киназы SnRK1 в регуляции фотосинтеза, и выявлены изменения фотохимической активности хлоропластов, обусловленные сверхэкспрессией ее каталитической субъединицы KIN10.

Теоретическая и практическая значимость проведенных исследований

Результаты работы могут быть использованы для решения задачи достижения высокой урожайности важных сельскохозяйственных культур в стрессовых условиях, связанных с дефицитом калия или засолением почв. Полученные результаты могут быть использованы при чтении курсов лекций по биофизике, биохимии и физиологии растений.

Положения, выносимые на защиту

1. Хронический недостаток калия в среде выращивания приводит к ингибированию активности протеинкиназы TOR в корнях проростков *Arabidopsis thaliana*.
2. Хронический недостаток калия в среде выращивания приводит к индукции автофагии в корнях проростков *Arabidopsis thaliana*, которая опосредована протеинкиназой SnRK1.
3. Повышение уровня протеинкиназы SnRK1 в растениях *Arabidopsis thaliana* приводит к снижению в хлоропластах амплитуды транстилакоидной протондвижущей силы pmf , а также индуцирует дополнительные механизмы защиты фотохимической активности хлоропластов от солевого стресса, что выражается в увеличении реальных квантовых выходов ФСII и ФСI и снижении нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ).

Личный вклад соискателя

Автор лично участвовал в проведении экспериментальных исследований, обработке полученных результатов, анализе и обсуждении результатов, а также принимал участие в написании научных статей совместно с соавторами и апробации результатов исследований на научных конференциях.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на Международной научной конференции «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability — 2019» (Санкт-Петербург, 2019), Всероссийском съезде «IX съезд общества физиологов растений России» (Казань, 2019), региональном конкурсе «Лучшие научные работы молодых ученых БИН РАН им. В.Л. Комарова» (Санкт-Петербург, 2021), Международной конференции «V (XIII) Международная ботаническая конференция молодых ученых» (Санкт-Петербург, 2022).

Список публикаций по теме диссертации

По материалам диссертации было опубликовано 8 работ, из которых 3 – статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК:

1. Voitsekhovskaja O.V., Apollonov V.I., **Murtuzova A.V.**, Rabadanova S.K., Charnysh M.A., Drozdova I.V., Belyaeva A.I., Kovaleva O.N., Loskutov I.G., Pawlowski K., Demidchik V.V., Tyutereva E.V. (2020) Photosynthetic activity as assessed via chlorophyll *a* fluorescence suggests a role of potassium channels in root to shoot signaling. *Photosynthetica*, 58, 608-621.

2. Тютерева Е.В., **Муртузова А.В.**, Войцеховская О.В. (2022) Автофагия и энергетический статус растительной клетки. *Физиология растений*, 69, 115-131.

3. **Муртузова А.В.**, Тютерева Е.В., Войцеховская О.В. (2023) Роль киназы SnRK1 в ответе фотосинтетического аппарата на солевой стресс. *Физиология растений*, 70, 279-292.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 145 страницах машинописного текста и включают 27 рисунков и 4 таблицы. Диссертационная работа состоит из разделов: «СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ», «ВВЕДЕНИЕ», «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ», «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ», «РЕЗУЛЬТАТЫ», «ОБСУЖДЕНИЕ», «ВЫВОДЫ» и «СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ». Список цитируемой литературы включает 292 источника, из которых 289 на иностранном языке.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Киназные комплексы TOR и SnRK1 как центральные переключатели анаболизма и катаболизма у растений

1.1.1. Киназа Target Of Rapamycin (TOR)

В настоящее время благодаря большому количеству исследований, выполненных на модельных организмах из животных, грибов и растений установлено что центральным регулятором анаболизма у всех эукариот является белковый комплекс протеинкиназы Target of rapamycin (TOR). В соответствии с уровнем питательных веществ и энергетическим статусом, а также под влиянием внешних факторов, TOR модулирует программы роста и пролиферации клеток, оказывая активирующее воздействие на синтез белка (процессы трансляции) и транскрипцию множества генов, и ингибируя процессы катаболизма, в частности, автофагию.

1.1.1.1. Структура белка TOR

Эволюционно консервативная серин/треониновая протеинкиназа TOR имеет массу 280 кДа и принадлежит к семейству киназ, связанных с фосфатидилинозитол-3-киназами (PI3K; Cafferkey *et al.* 1993). Белок TOR состоит из 5 пяти консервативных доменов (рис. 1). Эти домены, начиная с N-конца, включают: домен повторяющихся мотивов HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, subunit A of protein phosphatase 2A, TOR); домен FAT (FRAP-ATM-TRRAP или Focal Adhesion Target); домен FRB (FKBP-rapamycin-binding); домен Ser/Thr киназы; домен FATC на C-концевой области (Bosotti *et al.* 2000, Kunz *et al.* 2000., Schmelzle and Hall 2000, Kim *et al.*, 2002, Loewith *et al.* 2002). Повторы мотива HEAT непосредственно связываются с промотором и 5'-UTR областью 45S rRNA для регуляции ее транскрипции, а также участвуют в белок-белковых взаимодействиях (Ren *et al.* 2011, Andrade and Bork, 1995, Kunz *et al.*, 2000). Домен FAT поддерживает структурную стабильность белка TOR и, как и HEAT, принимает участие в межбелковых взаимодействиях (Choi *et al.* 1996, Bosotti *et al.* 2000, Dames *et al.*, 2005). Домен FRB представляет собой сайт связывания белка FKBP12, который, в свою очередь, является мишенью для опосредованного рапамицином ингибирования

активности белка TOR (Schmelzle and Hall, 2000, Kim *et al.*, 2002, Loewith *et al.*, 2002). Домен Ser/Thr протеинкиназы необходим для осуществления киназой TOR своей регуляторной функции в процессах, связанных с ростом и анаболизмом (Takahashi *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2011). Домен FATC выполняет каркасную функцию (Takahashi *et al.*, 2000, Dames, 2010).

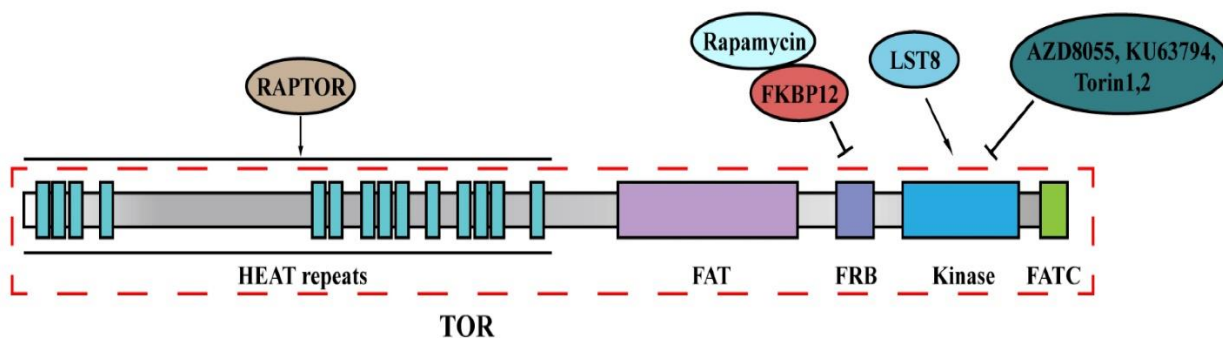


Рис. 1. Структура белка TOR. Белок содержит пять консервативных доменов, включая повторы HEAT, домен FAT, домен FRB, киназный домен и домен FATC. На рисунке также показаны ингибиторы TOR (рапамицин в комплексе с белком FKBP12, AZD8055, KU63794, Torin1, Torin2) и их мишени. RAPTOR (regulatory-associated protein of TOR, «регуляторно-ассоциированный белок TOR») и LST8 (lethal with sec-13 protein8, «летальный для белка 8 Sec13») - компоненты киназного комплекса TOR (Song *et al.*, 2021).

1.1.1.2. Комплексы на основе киназы TOR

У животных и дрожжей TOR образует 2 вида комплексов – target of rapamycin complex (TORC) 1 и TORC2. У растений обнаружен только TORC1, который состоит из субъединиц TOR, LST8 (lethal with sec-13 protein8) и RAPTOR (regulatory-associated protein of TOR). Функциональная специфика TORC1 и TORC2 определяется включением белков RAPTOR или RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), соответственно. У *Arabidopsis* взаимодействие RAPTOR с доменом HEAT необходимо для осуществления TOR-зависимого фосфорилирования рибосомальной киназы S6K (Mahfouz *et al.*, 2006). Белок LST8 взаимодействует с С-концевым киназным доменом TOR в ходе модуляции селективной активности TOR-киназы в отношении различных субстратов (Aylett *et*

al., 2016, Yang *et al.*, 2013, Moreau *et al.*, 2012). На сегодняшний день ни один из специфических компонентов TORC2 млекопитающих или дрожжей (например, RICTOR/AVO3 или mSIN1/AVO1) не был идентифицирован ни в одном секвенированном геноме растений, что позволяет утверждать, что фотосинтезирующие организмы обладают только TORC1 (Tatebe and Shiozaki, 2017). Гипотеза, о том, что TORC2 мог присутствовать у общего предка эукариот и был утрачен на раннем этапе эволюции зеленой линии, подтверждается наличием гомологов RICTOR в некоторых древних микроводорослях из Chlorarachniophyta и Stramenophyla (Mallen-Ponce *et al.*, 2022). У млекопитающих и дрожжей TORC2 отвечает за реорганизацию цитоскелета (Xie *et al.*, 2018); нокаутирование RICTOR, mTOR или mLST8 нарушает перестройку сети актиновых филаментов (Jacinto *et al.*, 2004, Larsson, 2006). Обнаружено, что у растений в мутантах *tor* с сниженной активностью TOR наблюдается избыточное накопление аминокислот с разветвлёнными боковыми цепями, что приводит к связыванию актина на образовавшихся aberrантных эндомембранных структурах. Это, в свою очередь, вызывает замедление образования корневых волосков и снижение числа боковых корней (Cao *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2022). Примечательно, что у мутанта *raptor1b* таких дефектов обнаружено не было (Dai *et al.*, 2022). Эти данные позволяют предположить, что комплексы TORC1 растений функционально эквивалентны TORC1 и TORC2 дрожжей или млекопитающих.

Следует отметить, что важную роль в работе комплекса TORC1 играет белок-лиганд FKPВ12 – иммунофилин, или пептидил-пролил-изомераза, возможно со свойствами шаперонов, который у животных связывается со множеством мишеней, например, рианодиновыми рецепторами, выполняющими функцию Ca²⁺-каналов в саркоплазматическом ретикулуме (Kang *et al.*, 2008), а у растений функции FKP12 не выяснены.

1.1.1.3. Регуляция активности TORC1

Важной особенностью киназных комплексов TOR всех организмов является их свойство активироваться в ответ на наличие необходимых для анаболизма

питательных веществ. Так, у животных ключевыми активаторами TOR выступают незаменимые аминокислоты (Takahara et al., 2020). Поскольку метаболизм автотрофных растений принципиально отличается от гетеротрофных животных и дрожжей, то и регуляция TOR у растений имеет ряд особенностей. TOR у растений достоверно активируется повышением концентрации глюкозы (Xiong et al., 2013) и других питательных веществ: нитратного азота (Liu et al., 2017, Liu et al., 2021) и фосфатов. Кроме того, важными активаторами выступают свет, а также фитогормон ауксин (Schepetilnikov et al., 2017, Liu et al., 2017). Ингибирование TOR как у растений, так и у животных происходит при дефиците энергии и питательных веществ, а также при воздействии стрессов (Dobrenel et al., 2016, González and Hall, 2017, Saxton and Sabatini 2017, Suyn and Sheen, 2015). Ауксин активирует TOR в апикальной меристеме побега и в корнях путем прямого фосфорилирования TOR по аминокислотному остатку Ser-2424 на С-конце; это фосфорилирование осуществляют белки-ГТФазы ROP2 после их связывания с ауксином (Schepetilnikov et al., 2013, 2017). Интересно, что активирование TOR глюкозой не опосредовано ROP2; по-видимому, TOR «воспринимает» глюкозу либо напрямую, либо через другой не идентифицированный пока регулятор (Li et al., 2017).

Во взаимодействии сигналов, регулирующих TOR – глюкозы, ауксина, а также света – обнаружены различия между апикальными меристемами побега и корня. Если в апексе корня для активации TOR (и таким образом активации пролиферации клеток) достаточно глюкозы и ауксина, то в апексе побега необходим еще и свет (Li et al., 2017). Вероятно, такая регуляция обусловлена относительно высоким содержанием ауксина в клетках корня, и низким – в клетках апекса побега, поскольку добавление экзогенного ауксина к апексам побега активировало TOR посредством ROP2 и в отсутствие света (Li et al., 2017). Каким образом свет активирует ROP2, остается неясным; вероятно, этот этап включает транслокацию ROP2 из цитозоля к плазматической мембране (Jeon et al., 2008).

У *Arabidopsis* гормон стресса растений АБК подавляет передачу сигналов от TOR посредством АБК-опосредованной активации киназы Sucrose non-fermenting 1-

related kinase 2 (SnRK2), которая фосфорилирует RAPTOR1, что приводит к его отделению от AtTORC1 и деактивации комплекса (Wang *et al.*, 2018). Кроме того, активность TOR находится под контролем киназы SnRK1, что будет подробно рассмотрено ниже.

1.1.1.4. Гены, кодирующие компоненты TORC1, и мутации по ним

У большинства эукариот имеется только одна копия гена *TOR*; у растений-полиплоидов *Glycine max*, *Populus trichocarpa* и *Brassica rapa* идентифицировано два гена *TOR*, а у аллотетраплоидного хлопчатника *Gossypium hirsutum* было обнаружено четыре гена *TOR* (Song *et al.*, 2019, Song *et al.*, 2017, Fu *et al.*, 2020). У высших растений RAPTOR и LST8 кодируются двумя генами каждый: *RAPTOR1A/B* и *LST81/2*, соответственно (Turck *et al.*, 2004, Anderson *et al.*, Mahfouz *et al.*, 2006, Moreau *et al.*, 2012, Ren *et al.*, 2012, Xiong & Sheen 2012, Schepetilnikov *et al.*, 2013). В *Arabidopsis* преимущественно экспрессируются *RAPTOR1B* и *LST8-1*. Нокаут *tor* у *Arabidopsis* является летальным на ранней эмбриональной стадии, а подавление экспрессии *TOR* приводит к значительному снижению ростовых показателей, остановке пролиферации, удлинению клеток и раннему старению (Xiong and Sheen, 2012, Xiong *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2017, Fu *et al.*, 2021, Liu *et al.*, 2021). Мутации по *RAPTOR1B* или *RAPTOR1A/B* также приводят к снижению морфометрических показателей и способны вызывать гибель зародышей на ранней стадии, как и у линий с подавленной экспрессией *TOR* (Salem *et al.* 2017). У *Arabidopsis* RAPTOR1B участвует в контроле жизнеспособности, прорастания и морфологии семян (Anderson *et al.*, 2005, Diaz-Troya *et al.*, 2008, Kravchenko *et al.*, 2015, Moreau *et al.*, 2012, Salem *et al.*, 2017, Tatebe and Shiozaki, 2017). Семена мутантов *Arabidopsis raptor1b* демонстрируют низкую жизнеспособность, высокую чувствительность к стрессам окружающей среды и задержку прорастания (Anderson *et al.*, 2005, Deprost *et al.*, 2005). Мутация *lst8-1* приводила к снижению вегетативного роста и апикального доминирования, задержке цветения с аномальным развитием цветков, высокой чувствительности к стрессам и накоплению крахмала и пролина (Moreau *et al.*, 2012). В целом TOR контролирует гораздо более широкий набор биологических

процессов, чем RAPTOR и LST8, что выражается в летальности ноукатной мутации *tor* (Menand *et al.*, 2002, Anderson *et al.*, 2005, Deprost *et al.*, 2005, Ren *et al.*, 2011, Moro *et al.*, 2012, Xiong and Sheen, 2012).

1.1.2. Семейство киназ Sucrose non-fermenting 1-related kinase (SnRK)

Растения ведут прикрепленный образ жизни и сильно зависят от факторов среды обитания. Для выживания растительному организму необходимы быстрые и тонкие механизмы регуляции ответов на сигналы, несущие информацию о различных стрессовых воздействиях. Семейство ферментов SnRK (Sucrose Non-Fermenting 1-related protein kinase) играет решающую роль в реакции растений на биотические и абиотические стрессы. Кроме того, киназы SnRK участвуют в регуляции большинства клеточных функций, а также переходов между этапами развития (Ваена-González *et al.*, 2017). Группа киназ SnRK относится к суперсемейству CDPK-SnRK серин/треониновых протеинкиназ и включает в себя три подсемейства: SnRK1, SnRK2 и SnRK3/CIPK (Hrabak *et al.*, 2003). Все белки SnRK имеют консервативный домен серин/треониновой протеинкиназы на N-конце и варибельный C-конец.

Киназа SnRK1, гомолог животной АМПК (adenosine monophosphate-activated protein kinase) и дрожжевой SNF1 (sucrose non-fermenting 1) киназ, участвует в переключении программ анаболизма и катаболизма в стрессовых условиях, а также является основным регулятором реакций растений на темновой стресс и недостаток сахаров (Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007). SnRK1 регулирует эти процессы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях (Lovas *et al.*, 2003, Hao *et al.*, 2003, Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007, Schwachtje *et al.*, 2006, Lie *et al.*, 2009, Mair *et al.*, 2015, Nukarinen *et al.*, 2016, Pedrotti *et al.*, 2018). Сверхэкспрессия SnRK1 значительно увеличивает устойчивость риса к широкому спектру болезней, усиливая защитный ответ, опосредованный жасмонатом (Filipe *et al.*, 2018).

Киназы подсемейств SnRK2 и SnRK3/CIPK (CBLs (calcineurin B-like proteins) -interacting protein kinases) представлены только у растений и не имеют ортологов среди млекопитающих и дрожжей. Киназы SnRK2 тесно взаимодействуют с SnRK1

и TOR (Halford and Hey, 2009, Coello *et al.*, 2011). SnRK2 и SnRK3/CIPK участвуют в сигналинге и модуляции ответа на стрессы, вызванные абиотическими факторами и нутриентным голоданием. SnRK2 играет важную роль в пути передачи сигнала АБК, осмотическом стрессе и метаболизме сахаров (Wang *et al.*, 2019; Hasan *et al.*, 2022). Экспрессия генов подсемейства CIPK у *Arabidopsis thaliana* повышает устойчивость к таким стрессам, как засоление, механические повреждения и засуха (Kim *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2015). SnRK3, взаимодействуя с CBL, образует комплекс CBL-CIPKs, который представляет собой сложную кальций-сигнальную систему, необходимую для устойчивости растений к различным стрессам (Pandey *et al.*, 2015., Haffer *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2020).

1.1.2.1. Структура комплекса SnRK1 и регуляторы его активности

Киназный комплекс SnRK1, как и его ортологи – белковые комплексы киназ AMPK и SNF1, состоит из каталитической субъединицы α и регуляторных субъединиц β и γ , и образует гетеротримерный комплекс (рис. 2). У *Arabidopsis* обнаружены как изоформы субъединиц, подобные AMPK/SNF1 - SnRK1 α 1, SnRK1 α 2, SnRK1 β 1, SnRK1 β 2 и SnRK1 γ , так и две изоформы, специфичные только для растений - SnRK1 β 3 и SnRK1 β 4.

Каталитические α -субъединицы SnRK1 (у *Arabidopsis* они имеют названия SnRK1 α 1/KIN10/AKIN10, SnRK1 α 2/KIN11/AKIN11 и SnRK1 α 3/KIN12/AKIN12) отвечают за киназную активность и состоят из N-концевого высококонсервативного домена Ser/Thr киназы, убиквитин-ассоциированного (UBA) домена и киназно-ассоциированного домена 1 (KA1) на C-конце, который гомологичен таковому SNF1 у дрожжей и AMPK у животных и регулирует взаимодействия α -субъединицы с β - и γ -субъединицами (Estruch *et al.*, 1992, Hawley *et al.*, 1996, Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).

Активация комплекса SnRK1 происходит путем фосфорилирования остатков Thr175/176 в T-петле белка каталитической α -субъединицы киназами SnAK (SnRK1-Activating Kinase) - SnAK1 и SnAK2 (Shen *et al.*, 2009). SnAK1 и SnAK2 изначально были идентифицированы как киназы, взаимодействующие с белком Rep геминивируса, и получили исходное название GRIK (geminivirus Rep interacting

kinases). Кроме того, активирующее воздействие оказывает фосфорилирование по консервативным аминокислотным остаткам Ser173 и Ser176, присутствующим в SNF1, AMPK и SnRK1 (Nakagami *et al.*, 2010). Наконец, SnRK1 способна к автофосфорилированию; однако, для полной активации SnRK1 необходимы киназы SnAK. Киназа AtSnAK1 активируется путем автофосфорилирования по Thr153 и активирует SnRK1; SnRK1 после активации фосфорилирует AtSnAK1 по Ser260, что приводит к ингибированию AtSnAK1 по механизму отрицательной обратной связи (Crozet *et al.*, 2010). Таким образом SnRK1 способна ограничивать собственную активность для предотвращения чрезмерного ответа на стресс (Crozet *et al.*, 2016). В отличие от AMPK α и Snf1 животных и дрожжей, которые имеют самоингибирующую последовательность (AIS), у SnRK1 растений такого домена нет (Crute *et al.*, 1998; Jiao *et al.*, 2015).

Каталитическая субъединица SnRK, как указывалось выше, у *Arabidopsis* кодируется несколькими генами; при этом паттерны экспрессии изоформ различаются. Так, *SnRK1 α 3/KIN12* считается псевдогеном, но имеются данные о его экспрессии в пыльце и на ранней стадии развития семян (Brox *et al.*, 2016). *SnRK1 α 1/KIN10* экспрессируется во всех органах и тканях и вносит максимальный вклад в активность SnRK1. Активность гена *SnRK1 α 2/KIN11* ограничена гидатодами, основаниями листовых зачатков и сосудистыми тканями побегов и корней (Jossier *et al.*, 2009, Bitrian *et al.*, 2011, Williams *et al.*, 2014). Сверхэкспрессия *KIN10* способствует удлинению жизненного цикла и позднему цветению за счет перестройки метаболических путей, а для растений со сверхэкспрессией *KIN11* характерно раннее цветение и увеличенные размеры листьев и розетки на ранних этапах развития (Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007). Сверхэкспрессия *KIN11* из *Arabidopsis* в *Nicotiana benthamiana* приводила к повышению устойчивости к геминивирუსам и ингибированию роста (Mohannath *et al.*, 2014).

Белки KIN11 и KIN10 обнаруживаются в ядре и цитоплазме (Williams *et al.*, 2014). Подавление экспрессии этих генов у растений с двойной нокдаун-мутацией *kin10kin11* приводило к ингибированию роста, раннему цветению и старению, что

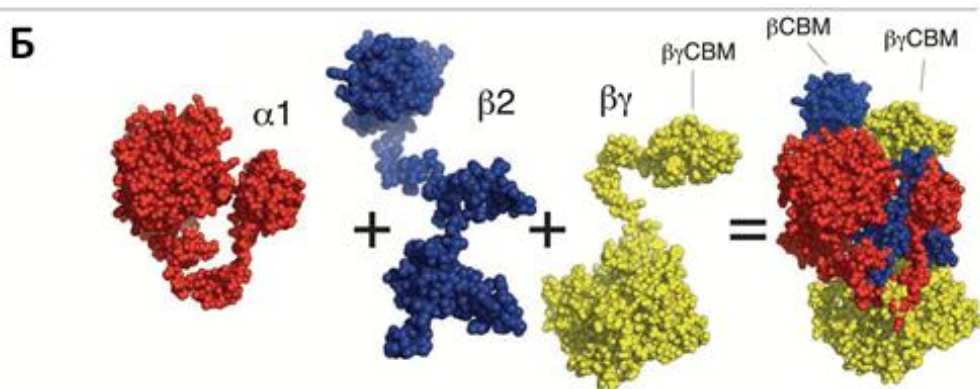
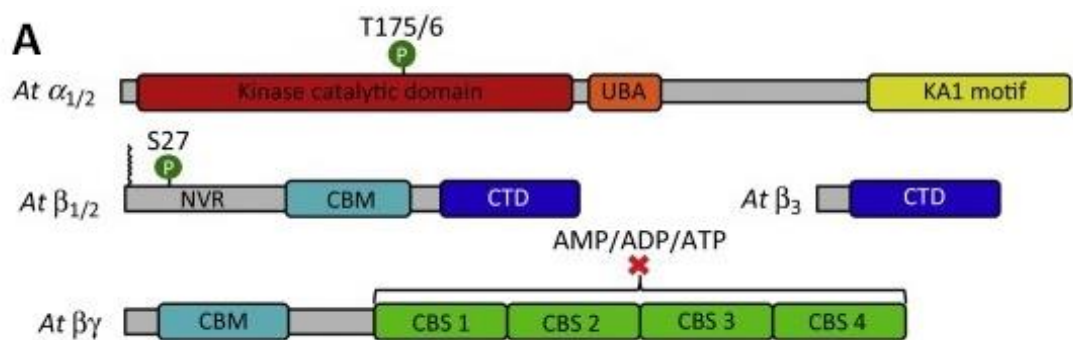


Рис. 2. Структура комплекса SnRK1 у *Arabidopsis*. (А) α -субъединица состоит из каталитического домена (красный цвет), где показан основной регуляторный сайт фосфорилирования, остаток треонина Т-петли (Т175/6) и регуляторной части, которая включает в себя связанную с убиквитином последовательность (UBA) и киназно-ассоциированный домен (KA1) для связывания β - и γ -субъединиц. Субъединица β включает в себя N-концевую варибельную область (NVR), углеводсвязывающий модуль – CBM и С-концевой домен (CTD). Уникальная для растений SnRK1 β 3 является атипичной, поскольку не обладает CBM или N-концевой областью. Субъединица $\beta\gamma$ состоит из CBM и четырех мотив цистатионин- β -синтазы (CBS) (Emanuelle *et al.*, 2015, 2016). (Б) Модель 3D-структуры SnRK1 α 1 β 2 $\beta\gamma$ с указанием субъединиц (α 1, β 2, $\beta\gamma$) и расположением модулей связывания (β CBM, $\beta\gamma$ CBM) (Crepin and Rolland, 2019).

указывает на частичное дублирование функций KIN10 и KIN11 (Williams *et al.*, 2014). Двойная нокаутная мутация *kin10kin11* является летальной еще на эмбриональном этапе (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).

Субъединицы β (KIN β) выполняют каркасную функцию и способствуют связыванию субстрата, а также регулируют внутриклеточную локализацию комплекса. KIN β содержат миристоилированный варибельный N-концевой домен

KIS (kinase-interacting sequence), который взаимодействует с киназой (т.е. α -субъединицей), центральный углеводсвязывающий модуль CBM (carbohydrate-binding module) и С-концевой домен ASC (association with SNF1 complex) для связывания субъединицы γ (Jiang и Carlson, 1997). Миристоилирование β -субъединиц является важным механизмом, регулирующим активность SnRK1. У арабидопсиса потеря N-миристоилтрансферазы 1 (NMT1) усиливала эндогенную активность SnRK1. Нарушение мотива миристоилирования у субъединиц SnRK1 β 1 и β 2 приводит к их миграции из плазматической мембраны в цитозоль и ядро (Pierre *et al.*, 2007). В условиях метаболического стресса, таких как длинная ночь или гипоксия, происходит снижение активности фотосинтеза и/или дыхания, и SnRK1 α 1 перемещается в ядро, где она участвует в регуляции экспрессии ряда генов. Было обнаружено, что миристоилирование SnRK1 β 2 негативно регулирует ядерную транслокацию SnRK1 α 1 (Ramon *et al.*, 2019).

Субъединицы γ содержат четыре высококонсервативных мотива цистатионин- β -синтазы (CBS), которые способны связывать адениновые нуклеотиды. Именно γ -субъединицы являются энергетическими датчиками у комплексов AMPK и SNF1. Растения обладают атипичными γ -субъединицами, которые, возможно, произошли от зеленых водорослей (Ramon *et al.*, 2013). Важно отметить, что SnRK1 γ растений не способна комплементировать соответствующие мутанты *snf4* дрожжей, а мутации *snrk1 γ* у *Arabidopsis* не приводили к изменению типичных ответов растений на стресс, которые регулируются SnRK1; т.е. SnRK1 γ у растений функционирует иначе, чем типичная субъединица γ AMPK/SNF1 киназ и в соответствии с этими данными она не выявляется в составе комплекса SnRK1 (Ramon *et al.*, 2013; Emmanuelle *et al.*, 2015).

В то же время у растений появляется уникальная гибридная субъединица $\beta\gamma$ (SnRK1 $\beta\gamma$), которая включает в себя N-концевой гликогенсвязывающий домен (GBD, glycogen binding domain), обычно присутствующий в β -субъединицах, и С-концевую субъединицу γ , представленную четырьмя мотивами CBS (Lumbreras *et al.*, 2001, Gissot *et al.*, 2006). GBD субъединицы SnRK1 $\beta\gamma$ усиливает киназную

активность комплекса SnRK1 (Ruiz-Gayosso *et al.*, 2018). Субъединица $\beta\gamma$ *Arabidopsis* способна комплементировать мутанты дрожжей *snf4*, лишенные субъединицы γ (Ramon *et al.*, 2013). Именно субъединица $\beta\gamma$ способствует образованию функционального комплекса SnRK1 (Ramon *et al.*, 2013, Emanuelle *et al.*, 2015). Гомозиготные нокауты по *KIN $\beta\gamma$* являются летальными, что свидетельствует о важности регуляторной субъединицы $\beta\gamma$ для растений (Ramon *et al.*, 2013, Gao *et al.*, 2016). Мутация гена *KIN $\beta\gamma$* приводит к нарушению прорастания пыльцы на поверхности рыльца пестика, за счет дефектного биогенеза митохондрий и пероксисом в пыльце *Arabidopsis* (Ramon *et al.*, 2013, Gao *et al.*, 2016).

В составе белкового комплекса киназы SnRK1 *Arabidopsis* обнаружена еще одна уникальная субъединица $\beta 3$. Она представляет собой укороченную β -субъединицу и не имеет N-концевой области и домена GBD (Gissot *et al.*, 2004), но тем не менее обнаруживается в составе комплекса SnRK1 (Emanuelle *et al.*, 2015).

Основным аллостерическим регулятором ортологичных киназ SNF1 и AMPK выступает АМФ; однако, активность киназы SnRK1 растений регулируется главным образом сахарофосфатами, и практически не регулируется АМФ, что резко отличает ее от SNF1 и AMPK дрожжей и животных (Wurzinger *et al.*, 2018). Важная роль сахарофосфатов в регуляции SnRK1, возможно, связана с тем, что именно сахара – продукты фотосинтеза - обеспечивают приток энергии в метаболизм растений. Кроме того, ингибитором SnRK1 у растений выступает трегалозо-6-фосфат (Zhai *et al.*, 2018).

1.1.2.2. Подсемейство киназ SnRK2

Считается, что гены *SnRK2* и *SnRK3* возникли у растений в результате дупликации гена *SnRK1 α* , при которой одна копия гена позже потеряла регуляторную область, в которой расположены домены UBA и C-концевой домен, ответственный за связывание субъединиц β и γ (Helford and Hardy, 1998, Hrabak *et al.*, 2003, Broeckx *et al.*, 2016). Поскольку эта область критически важна для образования гетеротримерного комплекса (Kleinow *et al.*, 2000, Broeckx *et al.*, 2016), то SnRK2 имеет мономерную природу и меньше размером (40 кДа у *Arabidopsis*),

чем SnRK1 (58 кДа у *Arabidopsis*). На основании филогенетического анализа киназы семейства SnRK2 были разделены на три группы в зависимости от их чувствительности к фитогормону АБК: в первую группу входят киназы, не активируемые АБК, во вторую группу - слабо активируемые или не активируемые АБК (в зависимости от вида растения), в третью группу — сильно активируемые и зависящие от АБК. Третья группа является наиболее древней для SnRK2 наземных растений, тогда как первая группа - самая современная (Kulik *et al.*, 2011).

Киназы подсемейства SnRK2 содержат на N-конце высококонсервативный киназный домен, а регуляторный C-конец содержит остатки кислых аминокислот Glu (группа 1) или Asp (группы 2 и 3), а также домены I и II типа (Yoshida *et al.*, 2006, Мао *et al.*, 2020). Домен I, необходимый для АБК-независимой активации SnRK2 осмотическим стрессом, присутствует у всех киназ семейства SnRK2. Домен II отвечает только за АБК-зависимую активацию SnRK2 и связывает протеинфосфатазу 2С (PP2C) ABI1 (Yoshida *et al.*, 2006, Мао *et al.*, 2020). АБК-независимая SnRK2 *Nicotiana tabacum* регулируется обратимым фосфорилированием Ser154 и Ser158 в киназной петле активации (Burza *et al.*, 2006).

В целом SnRK2-киназы выполняют две важные функции: они способствуют росту растений в оптимальных условиях, ингибируя активность киназ SnRK1, а в стрессовых условиях способствуют активации программ устойчивости к осмотическому стрессу и засухе (Belda-Palazon *et al.*, 2020, Fujii *et al.*, 2009, Hasan *et al.*, 2020, Hayzer *et al.*, 2011, Kobayashi *et al.*, 2004, Zheng *et al.*, 2010). SnRK2-киназы выступают посттранскрипционными регуляторами стабильности мРНК (группа 1), и АБК-зависимого альтернативного сплайсинга (группа 3) (Ma *et al.*, 2020). Кроме того, SnRK2-киназы фосфорилируют экзорибонуклеазы, участвующие в образовании микроРНК, способствуя образованию последних (Ma *et al.*, 2020).

В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено 10 генов SnRK2. Анализ десятирных мутантов *Arabidopsis* (*SnRK2.1/4/5/7/8/9/10*), а также четверных (*SnRK 2.1/4/5/10*) и пятерных (*SnRK 2.1/4/5/9/10*) мутантов, показал, что все SnRK2 важны для реакции растений на осмотический стресс (Fujii *et al.*, 2011). Однако, группа 1 АБК-

независимых SnRK2-киназ изучена хуже, чем эволюционно более древние АБК-зависимые киназы, поскольку последние являются важнейшими компонентами передачи сигналов АБК у растений. Киназы SnRK2 группы 2 фосфорилируют ряд белков – транскрипционных факторов, связывающихся с промоторами генов, активируемых АБК. Эти же киназы регулируют ответ растений на холодостресс (Ma *et al.*, 2020). Но главный путь передачи сигнала от АБК лежит через коровый комплекс, который включает киназу SnRK2 группы 3, рецептор АБК – PYR/PYL/RCAR, и протеинфосфатазу PP2C, а также различные транскрипционные факторы (Ma *et al.*, 2020). Когда коровый комплекс связывает АБК, из него высвобождается SnRK2, которая активируется автофосфорилированием. Наиболее хорошо изучена роль киназы SnRK2.6/OST1 в регуляции работы устьиц. В ответ на АБК киназа SnRK2.6/OST1 активирует быстрые и медленные анионные каналы плазмалеммы клеток устьиц, что вызывает выход анионов из клеток и закрытие устьиц. Мишенями SnRK2.6/OST1 выступают анионные каналы SLAC1 и QUAC1 (активируются), а также калиевые каналы KAT1 (ингибируются) и НАДФН-оксидаза плазмалеммы, участвующая в Ca²⁺-АФК зависимой передаче стрессовых сигналов.

Киназы SnRK2 всех трех групп играют важную роль в ответе растений на биотические стрессы и атаки патогенов. SnRK2.8 участвует в устойчивости против *Pseudomonas syringae* (Ma *et al.*, 2020). У *Chlamydomonas* SnRK2.1 и SnRK2.2 активируются в ответ на недостаток серы и индуцируют экспрессию ряда соответствующих генов (Davies *et al.*, 1999), а у пшеницы SnRK2.4 регулирует поглощение фосфора в ответ на голодание по фосфору (Wang *et al.*, 2013). В целом подсемейство SnRK2 интегрирует ответы растений на абиотические и биотические стрессы.

Наконец, SnRK2-киназы играют важную роль в регуляции развития растений. АБК-зависимые SnRK2 (*SnRK2.2*, *SnRK2.3* и *SnRK2.6* у *Arabidopsis*) участвуют в развитии проростка при выходе семян из состояния покоя, при чем они контролируют экспрессию большого количества генов (Nakashima *et al.*, 2009).

Киназа SnRK2.6/OST1 фосфорилирует транскрипционный фактор ABI5, который ингибирует транскрипцию FLC (Flowering locus C) и тем самым индуцирует цветение в ответ на АБК и в зависимости от длины дня (Dai *et al.*, 2013). Киназа SnRK2.2 регулирует гидротропизм корней, а SnRK2.4 и SnRK2.10 регулируют развитие корней, а также архитектуру корневой системы в условиях солевого стресса (Ma *et al.*, 2020). Поскольку АБК запускает программу старения растений, то SnRK2 участвуют и в переходе растений к старению, активируя, в частности, экспрессию генов-маркеров старения SAG12 и ORESARA1 (Ma *et al.*, 2020).

1.1.2.3. Подсемейство киназ SnRK3

Белки киназ SnRK3/CIPK на N-конце имеют консервативный киназный домен, а на С-конце - два консервативных домена NAF/FISL и PPI (Halford and Hardie, 1998; Hrabak *et al.*, 2003). Посредством домена NAF киназы SnRK3/CIPK могут связываться с кальциневрин В-подобным (CBL) белком для участия в Ca⁺²-опосредованной реакции на абиотический стресс и недостаток питательных веществ (Sh *et al.*, 1999, Halford *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2006, Ho *et al.*, 2009, Steinhorst and Kudla, 2013, Edel and Kudla, 2015, Tang *et al.*, 2015). Это происходит за счет ослабления автоингибирования путем отделения киназного домена от С-концевого регуляторного домена, который действует как псевдосубстрат и выполняет функцию автоингибирующего домена (Weinl, Kudla 2009). Смежный домен - мотив взаимодействия протеинфосфатазы (PPI) - отвечает за взаимодействие с протеинфосфатазой 2С (Weinl and Kudla 2009). CIPK взаимодействует с белками CBL и CSL (cellulose synthase-like), образуя кальциевый сигнальный комплекс. Геном *Arabidopsis* кодирует 26 предполагаемых белков CIPK и 10 белков CBL. CIPK напрямую взаимодействуют с CBL, причем каждый CBL взаимодействует с определенным подмножеством CIPK, и каждая CIPK взаимодействует с одним или несколькими CBL (Gong *et al.*, 2004, Luan, 2009, Weinl and Kudla, 2009). Киназа SnRK3/CIPK SOS2 (Salt Overly Sensitive 2) наиболее хорошо исследована, так как она является основным участником сигнального каскада солевого стресса (Imamura *et al.*, 2008). SOS2 взаимодействует с SOS3,

миристоилированным CBL-белком, который выступает в качестве сенсора роста концентрации Ca^{+2} в цитозоле под воздействием солевого стресса. Увеличение концентрации ионов Ca^{+2} приводит к изменению конформации SOS3 и SOS3-подобных белков и активации взаимодействующих с ними SOS2 и SOS2-подобных протеинкиназ. CIPK и кальциневрин B-подобные белки (CBL) играют важную роль в реакциях растений также на засуху, холод, АБК и изменения pH (Coello *et al.*, 2011, Gong *et al.*, 2004, Hrabak *et al.*, 2003, Luan, 2009, Guo *et al.*, 2002, Pandey *et al.*, 2004).

1.2. Роль киназных комплексов TOR и SnRK1 в развитии и метаболизме растений в благоприятных и стрессовых условиях.

Киназы TOR (target of rapamycin) и SnRK1 (Snf1-related protein kinase 1) регулируют переключение между анаболическими и катаболическими путями метаболизма растений (Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007, Caldana *et al.*, 2019). Профилирование генома *Arabidopsis* и других растений показало, что TORC1, активирует экспрессию генов, участвующих в путях синтеза (клеточный цикл, модификация клеточной стенки, транспорт и ассимиляция питательных веществ, фотосинтез), и подавляет экспрессию генов, связанных с катаболическими путями (старение, автофагия, деградация белка, липидный обмен), а также вызывает изменения уровня экспрессии генов, участвующих в метаболизме гормонов, передаче сигналов, стрессовых реакциях и модуляции хроматина (Moreau *et al.*, 2012, Ren *et al.*, 2012, Caldana *et al.*, 2013, Xiong *et al.*, 2013, Forzani *et al.*, 2019, Scarpin *et al.*, 2020, Fu *et al.*, 2021). Напротив, киназа SnRK1 активируется в условиях, связанных с низким уровнем сахаров/энергии в клетке, и способствует реализации стратегий энергосбережения и ремобилизации питательных веществ, путем ингибирования активности TOR и активации тех катаболических процессов, которые были подавлены TOR-киназой, в том числе автофагии (Ваена-Gonzalez *et al.*, 2007, 2008, 2017). Автофагия тесно связана с метаболическим статусом клеток, который регулируется сигнальными и сенсорными механизмами сахаров и/или других молекул, что позволяет рассматривать автофагию как маркер стресса у растений. Кроме регуляции стрессовых ответов, киназа SnRK1 играет важную роль

и в поддержании гомеостаза на разных этапах развития растений (Peixoto and Baena-González, 2022). SnRK1 способствует поддержанию оптимального уровня сахарозы, необходимой для роста и правильного развития, регулируя центральный метаболизм путем как прямого фосфорилирования ферментов, так и контроля за транскрипционной активностью множества генов (Peixoto and Baena-González, 2022).

1.2.1. Роль киназы TOR в регуляции развития растений

Киназа TOR критически важна для поддержания различных аспектов формирования растений в благоприятных условиях на протяжении всего периода жизни растения. TORC1 способствует пролиферации и росту клеток и протеканию анаболических реакций, воздействуя на трансляцию белков, биогенез рибосом, стабильность мРНК, автофагию, транскрипцию и клеточный цикл (Rodland *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2017, Artins, Caldana, 2022, Gonzalez and Rallis, 2017, Forzani *et al.*, 2019, Scarpin *et al.*, 2020, Fu *et al.*, 2021).

Нокауты *tor* летальны уже на ранней стадии. Эндосперм на этапе синцития у таких мутантов арабидопсиса теряет до 75% ядер и клеточной дифференцировки не происходит (Menand *et al.*, 2002). Зародыши погибают на стадии дерматогена, где происходит подавление роста клеток путем ингибирования механизмов трансляции и ферментов, таких как как CELLULASE SYNTHASE 6 (CESA6) и EXPANSIN B1 (EXPB1), модифицирующих клеточную стенку (Xiong *et al.*, 2013).

TOR является ключевым звеном в сети передачи сигналов окружающей среды в прорастающие семена (Xiong *et al.*, 2013). Глюкоза активирует TOR и, через TOR, широкий набор генов, участвующих в клеточном цикле и анаболических процессах, для перехода от гетеротрофного к фотоавтотрофному росту проростков (Xiong *et al.*, 2013). Для мутантов *raptor1* характерны задержка в прорастании семян и низкая стрессоустойчивость (Salem *et al.*, 2017), а также увеличение содержания АБК и жасмонатов, которые подавляют прорастание семян (Xiong *et al.*, 2013).

Для обеспечения своевременной деэтиоляции проростков при их переходе от подземного прорастания к свету TOR может связывать уровни освещенности и

ауксина через центральный репрессор фотоморфогенеза семян – E3-убиквитинлигазу CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), а также рибосомальную киназу RPS6K и активируемые ауксином малые ГТФазы ROP2 (Chen *et al.*, 2018, Schepetilnikov *et al.*, 2017). Ингибирование активности TOR у проростков приводит к уменьшению числа хлоропластов (Li *et al.*, 2015, Xiong *et al.*, 2017). Рибосомальная киназа S6K является мишенью фосфорилирования TOR; она регулирует синтез белка на рибосомах и способствует развитию хлоропластов и росту проростков (Shi *et al.*, 2018).

У 4-5-дневных проростков арабидопсиса AtTOR активирует S-фазу клеточного цикла в апикальных меристемах побега и корня через фосфорилирование транскрипционных факторов семейства E2F (Xiong *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2017, Somssich *et al.*, 2016). Еще одной мишенью AtTOR является киназа YAK1, которая индуцирует экспрессию генов *SIAMESE RELATED*, которые, в свою очередь, подавляют экспрессию генов циклин-зависимых киназ CDK, что приводит к дифференцировке в меристематической зоне апикальной меристемы корня (Barrada *et al.*, 2019). Таким образом, ингибирование AtTOR YAK1-киназы способствует росту и пролиферации, снимая репрессию CDK (Barrada *et al.*, 2019).

AtTOR участвует в регуляции размера клеток и листьев растений (Xiong and Sheen, 2012). Ингибирование TOR предотвращает образование зачатков листьев у 10-дневных растений *Arabidopsis* (Mohammed *et al.*, 2018), а у мутантов *lst8-1* наблюдается усиленное ветвление побегов (Moreau *et al.*, 2012). Напротив, сверхэкспрессия *AtTOR* приводит к получению растений с более крупными семенами и листьями (Deprost *et al.*, 2007, Ahn *et al.*, 2015).

Избыточная или низкая активность TORC приводит к изменению времени цветения и аномальному развитию репродуктивных органов и тканей. Ингибирование активности AtTOR у мутантов *raptor1* и *lst8-1* приводит к задержке цветения (Anderson *et al.*, 2005, Deprost *et al.*, 2007, Moreau *et al.*, 2012), а избыточная экспрессия TOR приводит к раннему цветению (Ren *et al.*, 2012, Ahn *et al.*, 2015). Мутант *raptor1* имеет стерильные цветки (Anderson *et al.*, 2005), а мутант *lst8-1* имеет

аномально развитые бутоны, цветки без лепестков и мелкие соцветия с абортрованными семенами после оплодотворения (Moreau *et al.*, 2012).

Заключительной стадией развития растений является старение, которое индуцируется и регулируется генами, связанными со старением (*SAG*) (Lim *et al.*, 2007, Woo *et al.*, 2019). Ингибирование активности TOR индуцирует экспрессию генов *SAG*. Фенотипы раннего старения листьев наблюдаются в мутантных линиях *lst8-1* или *RNAi-TAP46* (*TAP46* - регуляторная субъединица протеинфосфатазы PP2A, которая действует как положительный эффектор передачи сигналов TOR) (Anderson *et al.*, 2005, Deprost *et al.*, 2007, Ahn *et al.*, 2011). Сверхэкспрессия TOR у *Arabidopsis* приводит к ускоренному старению листьев и сокращению продолжительности жизни, что связано с избыточным потреблением энергии и быстрым ростом (Ren *et al.*, 2011, 2012).

Таким образом, киназный комплекс TOR играет критически важную роль на всех этапах роста и развития растений, а его временное подавление приводит к отчетливыми фенотипическими проявлениями.

1.2.2. TOR и фотосинтез

Как уже указывалось выше, основными модуляторами активности TORC1 у растений являются ауксин, свет и глюкоза (Artins and Caldana, 2022). Рост растений сильно зависит от количества и качества падающего света. У *Arabidopsis* дальний красный и синий свет приводит к опосредованной COP1 и ауксином активации TOR и фосфорилированию рибосомальной киназы S6K, усиливая трансляцию белка в деэтилирующих проростках и способствуя их переходу к фотоморфогенному развитию (Chen *et al.*, 2018). TOR играет важную роль в регуляции фотоморфогенеза, в том числе позеленения пластид (Shi *et al.*, 2018). Ингибирование TORC1 приводит к задержке роста корней в световой период, что указывает на роль киназного комплекса TOR в функционировании циркадных часов (Zhang *et al.*, 2019, da Silva *et al.*, 2021, Urrea-Castellanos *et al.*, 2022). Снижение экспрессии TOR (Caldana *et al.*, 2013) или отсутствие RAPTOR1b (Moreau *et al.*, 2012, Salem *et al.*, 2018) приводит к накоплению крахмала, которое сопровождалось накоплением триацилглицеридов и

снижением уровня сахарозы, используемой для анаболических процессов (Caldana *et al.*, 2013, Salem *et al.*, 2018).

На *Chlamydomonas* показано, что ингибирование передачи сигналов через TORC1 приводит к торможению фотосинтеза через регуляцию световых реакций (Couso *et al.*, 2021, Ford *et al.*, 2019). Ингибирование TOR приводит к низкому потоку электронов через ФСII, что связано с уменьшенным размером пластохинонового пула и снижением линейного электронного транспорта, а также с увеличением циклического транспорта электронов и синтеза АТФ (Ford *et al.*, 2019, Upadhyaya and Rao, 2019). Кроме того, ингибирование TOR вызывает изменения в морфологии хлоропластов, увеличение фрагментации митохондрий, усиление нефотохимического тушения и митохондриального дыхания, что свидетельствует о том, что TOR необходима для поддержания функций хлоропластов и митохондрий в *Chlamydomonas reinhardtii* (Upadhyaya and Rao, 2019). У *Arabidopsis* TORC1 индуцирует экспрессию хлоропластных и фотосинтетических генов, а его ингибирование приводит к уменьшению количества хлоропластов (Dong *et al.*, 2015).

Свет способствует ассимиляции углерода в результате фотосинтеза в цикле Кальвина-Бенсона. Большая часть сахаров транспортируется к корням и молодым листьям для поддержания их роста и развития (Smith and Stitt, 2007, Sulpice *et al.*, 2014). TOR, способствуя трансляции рибосомальных белков, выполняет функцию ключевого регулятора в преобразовании фотоассимилятов в структурные компоненты клетки (Schepetilnikov *et al.*, 2018, Scarpin *et al.*, 2022). У микроводоросли *C. reinhardtii* было обнаружено, что фиксация CO₂ регулирует передачу сигналов TOR посредством синтеза ключевых аминокислот (Mallen-Ponce *et al.*, 2022). У проростков *Arabidopsis* ингибирование TOR приводило к изменению экспрессии множества генов, участвующих в фотосинтезе (Dong *et al.*, 2015). В зрелых листьях растений *Arabidopsis* TOR участвует в регуляции плазмодесм, и, таким образом, экспорта фотосинтатов из листа и их распределения между донорными органами (Brunkard *et al.*, 2020).

1.2.3. Роль SnRK1 в онтогенезе растений

Наряду с TORC1, SnRK1 является ключевой киназой, регулирующей метаболизм и развитие на этапе формирования проростка. У *Arabidopsis* запасными веществами семян являются липиды, которые хранятся в масляных тельцах в виде триацилглицеринов (ТАГ) и расщепляются до жирных кислот и глицерина (Graham, 2008, Li-Beisson *et al.*, 2013). Они используются в качестве субстратов для глюконеогенеза, поддерживая гетеротрофный энергетический метаболизм (Baker *et al.*, 2006). SnRK1 регулирует ген *PMDH2*, кодирующий фермент для регенерации НАД⁺ для поддержки β -окисления, и *PCK1*, кодирующий единственный фермент, который обеспечивает вход дикарбоновых кислот – продуктов окисления ТАГ в глюконеогенез. Таким образом, SnRK1 управляет мобилизацией запасов ТАГ (Henninger *et al.*, 2022).

На ранних этапах развития проростков аминокислоты образуются в результате деградации запасных белков. У мутанта *snrk1a1/a2* на третьи сутки прорастания обнаружено снижение концентрации аминокислот. Транскрипция генов, связанных с метаболизмом большинства аминокислот, значительно подавляется у мутантов *snrk1a1/a2*, что свидетельствует о важной роли SnRK1 в регуляции метаболизма аминокислот на начальных этапах роста (Henninger *et al.*, 2022). Кроме того, SnRK1 влияет на экспрессию генов как в этиолированных проростках, так и во время фотоморфогенеза, поскольку переход к автотрофному образу жизни приводит к массовому транскрипционному репрограммированию (Xiong *et al.*, 2013, Silva *et al.*, 2016, Pedrotti *et al.*, 2018).

Растения после перехода к автотрофии получают энергию в виде сахаров, образованных в процессе фотосинтеза, которые превращаются в используемую клеткой форму – АТФ - благодаря катаболическим процессам, в первую очередь, в ходе митохондриального дыхания. Кроме того, сахара играют роль сигнальных молекул в ответ на изменения внутренних и внешних условий (Smeekens *et al.*, 2010, Figueroa and Lunn, 2016, Sakr *et al.*, 2018). При дефиците энергии SnRK1 восстанавливает энергетический гомеостаз, включая катаболические пути

производства АТФ (гликолиз и окисление жирных кислот), одновременно отключая биосинтетические процессы, потребляющие АТФ (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). SnRK1 фосфорилирует и инактивирует ключевые ферменты биосинтеза сахарозы – сахарозофосфатсинтазу; метаболизма трегалозы - трегалозо-6-фосфатсинтазу; распределения углерода - фруктозо-6- фосфат-2-киназу/фруктозо-2,6-бисфосфатазу; ассимиляции азота – нитратредуктазу; биосинтеза изопреноидов - 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазу (Dale *et al.*, 1995, Robertlee *et al.*, 2017, Sudgen *et al.*, 1999, Cho *et al.*, 2016), что было подтверждено позднее фосфопротеомным анализом на мутантах SnRK1 α (Cho *et al.*, 2016, Nukarinen *et al.*, 2016).

На *Zea mays* показано, что SnRK1 регулирует ассимиляцию углерода и азота во время развития семян (Li *et al.*, 2020). Подавление гена *PKIN1*, кодирующего одну изоформу SnRK1 α в картофеле, вызывает снижение экспрессии гена *SUS4* сахарозосинтазы (SUSY), которая играет центральную роль в метаболизме сахарозы, и снижение ее активности на 65% в клубнях (Purcell *et al.*, 1998). Сверхэкспрессия *PKIN1* приводит к увеличению уровней экспрессии *SUS4* и активности SUSY на 20–60% (McKibbin *et al.*, 2006). Множество исследований подтвердили теорию о том, что SnRK1 может усиливать «акцепторную силу» органов и тканей, стимулируя потребление в них сахарозы (Wang *et al.*, 2019, Liang *et al.*, 2021).

SnRK1 тесно связана с метаболизмом крахмала и критически необходима для мобилизации запасов крахмала из семян, поскольку под ее контролем находится экспрессия генов амилаз (Laurie *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2007). С другой стороны, SnRK1 способствует синтезу крахмала за счет усиления активности АДФ-глюкозозо-пирофосфорилазы (Wang *et al.*, 2017, Liang *et al.*, 2021) и повышения активности крахмалсинтазы (Ren *et al.*, 2019, Liang *et al.*, 2021). При этом синтез крахмала стимулируется в листьях и растущих органах и тканях, потребляющих сахарозу, а деградация крахмала усиливается на этапе роста, зависящего от ремобилизации запасенной энергии (прорастающие семена, клубни).

Одной из важнейших групп мишеней SnRK1 являются транскрипционные факторы bZIP. У растений белок bZIP63 является прямой мишенью SnRK1 в

условиях дефицита энергии (Mair *et al.*, 2015). Кроме того, bZIP1, bZIP11 или bZIP53 участвуют в передаче сигнала об изменении уровня сахаров и аминокислот при солевом и темновом стрессах (Hanson *et al.*, 2008, Alonso *et al.*, 2009, Weltmeier *et al.*, 2009, Dietrich *et al.*, 2011, Hartmann *et al.*, 2015). У мутантов по *bzip63* в условиях недостатка энергии значительно возрастала концентрация цитрата, 2-оксоглутарата и малата, которые являются промежуточными продуктами цикла Кребса, что указывает на важную роль bZIP63 в координации субклеточного метаболизма (Facchinelli and Weber, 2011).

Старение листьев связано с содержанием ауксина и биосинтезом этилена, (Iqbal *et al.*, 2017), а сигнальный путь этилен-EIN3 играет важную роль в регуляции прогрессирования старения. SnRK1 α напрямую фосфорилирует и подавляет EIN3, что приводит к снижению скорости старения листьев (Kim *et al.*, 2017). Кроме того, показано, что экспрессия генов, связанных со старением *SENESCENCE1 (SEN1, At4g35770)* и *SENESCENCE-ASSOCIATED GENE12 (SAG12, At5g45890)* подавляется SnRK1 (Cho *et al.*, 2012).

1.2.4. SnRK1 и фотосинтез

Поскольку основными регуляторами SnRK1 выступают сахарофосфаты, то активность SnRK1 напрямую связана с фотосинтетическим метаболизмом. У *Arabidopsis* экспрессия *KIN10* активируется обработкой растений гербицидом DCMU, который блокирует транспорт электронов в пределах ФСII, что приводит к дефициту энергии за счет ингибирования фотосинтеза (Baena González *et al.*, 2007). Многие фотосинтетические гены регулируются транскрипционно в зависимости от активности SnRK1 (Zhang *et al.*, 2009).

Показано, что экзогенные сахара могут поддерживать циркадные ритмы в отсутствие света (Haydon *et al.*, 2013). Сахароза стабилизирует белок GIGANTEA (GI), деградация которого зависит от белка F-box ZEITLUPE (ZTL) и негативного регулятора передачи сигналов этилена CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1). Этилен сокращает циркадный период, что обусловлено совместным действием сахарозы и GI (Haydon *et al.*, 2017). У мутантов арабидопсиса

сверхэкспрессия *KIN10* задерживает пик экспрессии *GI* и удлиняет циркадный период, особенно в условиях освещения (Shin *et al.*, 2017). У мутантов *etr1*, нечувствительных к этилену, снижается активность ФСЦ, что приводит к дефициту энергии, повышению уровня экспрессии *KIN10* и подавлению индуцируемого этиленом роста гипокотыля на свету (Kim *et al.*, 2017).

Транскриптомный анализ растений *Prunus persica* со сверхэкспрессией *SnRK1α* показал значительные изменения в экспрессии генов семейства *NF-Y*, которые играют важную роль в регуляции хлоропластов и фотосинтеза (Liang *et al.*, 2021). В растениях со сверхэкспрессией *PpSnRK1α* содержание хлорофилла было выше, чем в растениях дикого типа, что связано с изменениями уровня экспрессии транскрипционных регуляторов PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIF)3 и PIF1 (Liang *et al.*, 2021). Кроме того, в условиях светового стресса скорость фотосинтеза у сверхэкспрессоров *PpSnRK1α* была значительно выше, чем у растений дикого типа (Liang *et al.*, 2021).

SnRK1 может оказывать не прямое влияние на фотосинтез через регуляцию формирования устьиц: так, уровень устьичного индекса зависит от активности *SnRK1*. Высокая концентрация *KIN10* в ядре необходима для фосфорилирования и стабилизации *SPEECHLESS*, главного регулятора формирования устьиц, тем самым способствуя развитию устьиц (Han *et al.*, 2020). Эти данные позволяют предположить, что не только активность фотосинтетического аппарата может влиять на работу киназы *SnRK1*, но и *SnRK1* способна регулировать фотосинтетический метаболизм.

1.2.5. Взаимодействие киназ TOR, SnRK1 и SnRK2 у растений в благоприятных и стрессовых условиях

В благоприятных условиях в отсутствие стресса киназа *SnRK2* рекрутирует белки *SnRK1* в репрессорные комплексы, в состав которых также входит протеинфосфатаза 2С (PP2С). В отсутствие PP2С *SnRK1* и *SnRK2* не способны взаимодействовать друг с другом. В составе таких комплексов *SnRK1* становится неактивной, и киназа TOR осуществляет свои функции (рис. 3а). Интересно, что в

оптимальных условиях роста TOR-киназа фосфорилирует рецепторы АБК PYL по консервативному остатку серина Ser119 (Wang et al. 2018). Это фосфорилирование разрушает ассоциацию PYL с АБК и с эффекторами фосфатазы PP2C, что увеличивает связывание PP2C с киназами SnRK2 и SnRK1 и инактивацию последних.

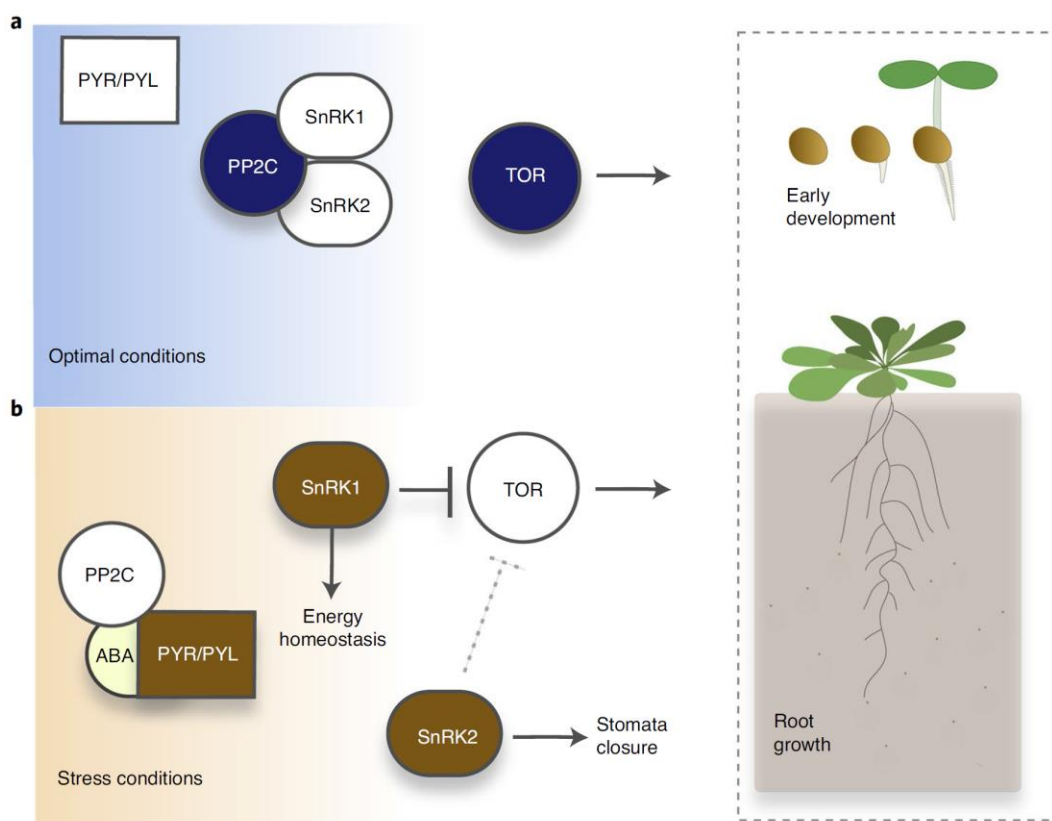


Рис. 3. Взаимодействие киназ SnRK2 и SnRK1 в регуляции киназы TOR и роста растений в оптимальных (a) и стрессовых (b) условиях. (a) В оптимальных условиях в отсутствие АБК киназа SnRK2 способствует росту, образуя репрессорный комплекс с PP2C и SnRK1. Секвестрация SnRK1 в этих комплексах предотвращает ее взаимодействие с TOR и тем самым обеспечивает рост при благоприятных условиях. (b) В условиях стресса в присутствии АБК киназа SnRK2 ингибирует рост, поскольку АБК приводит к секвестрации PP2C с помощью АБК-связанных рецепторов PYR/PYL, и, следовательно, разборке SnRK2 и PP2C-содержащих репрессорных комплексов SnRK1. При разборке комплексов высвобождаются SnRK2 и SnRK1 α , которые активируют ответы на стресс и тормозят рост. Частично это достигается за счет прямой репрессии TOR с помощью SnRK1, но может также включать участие киназы SnRK2. Неактивные компоненты показаны белым цветом. Темно-синий и темно-оранжевый обозначают компоненты, активные в оптимальных условиях или при стрессе соответственно. Belda-Palazon et al., 2020.

При таких стрессах, как солевой, осмотический и др., в клетках накапливается АБК. АБК уменьшает взаимодействие SnRK1 с SnRK2 и PP2C, а также взаимодействие между SnRK1 и PP2C: комплекс АБК с рецептором данного гормона PYR/PYL связывает протеинфосфатазу PPP2C, что приводит к распаду репрессорного комплекса и высвобождению киназ SnRK1 и SnRK2. SnRK2 фосфорилирует RAPTOR1, что приводит к его отделению от AtTORC1 и деактивации комплекса (Wang *et al.*, 2018). Кроме того, каталитическая субъединица SnRK1 KIN10 также напрямую фосфорилирует RAPTOR1B и подавляет активность TORC1 (Nukarinen *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2017). Таким образом, передача сигналов TOR ингибирует сигналы АБК и стрессовые реакции в благоприятных условиях, тогда как АБК подавляет передачу сигналов TOR и рост во время стресса посредством киназ SnRK1 и SnRK2 (Belda-Palazon *et al.*, 2020; Hasan *et al.*, 2022). Предположительно, специфичный для растений сигнальный модуль АВА-PP2C-SnRK2 в ходе эволюции был «добавлен» к с эволюционно древнему регуляторному модулю SnRK1-TOR эукариот, что сделало возможным обеспечение остановки роста растений в ответ на такие абиотические стрессы, в ходе которых синтезируется АБК (Belda-Palazon *et al.*, 2020).

Важную роль в активации SnRK1 играет также белок FLZ8 (Jamsheer K *et al.*, 2022). Он связывается как с RAPTOR1B, так и с SnRK1 α 1, усиливая их взаимодействие и таким образом модулируя активность TOR. Кроме того, FLZ8 выступает как транскрипционный регулятор и усиливает экспрессию генов SnRK1 (Jamsheer K *et al.*, 2022). Потеря функционального FLZ8 препятствует активации передачи сигналов SnRK1 и АВА, и приводит к гиперчувствительности к осмотическому и солевому стрессу (Jamsheer K *et al.*, 2022). Кроме того, у трансгенных томатов- сверхэкспрессоров *SnRK1 α* из *Prunus persica* уровни транскрипции генов, чувствительных к солевому стрессу (*PP2C37*, *PYL4*, *PYL8*, *NAC022*, *INAC042*), а также генов подсемейства *SnRK2*, были значительно изменены, что свидетельствует об участии SnRK1 в сигналинге АБК и в повышении устойчивости к солевому стрессу (Wang *et al.*, 2020).

1.3. Автофагия, ее структурные особенности и регуляция в клетках растений

Автофагия – это консервативный внутриклеточный катаболический процесс, направленный на удаление поврежденных или ненужных цитоплазматических компонентов и, таким образом, восполнение недостатка питательных веществ и энергии для поддержания клеточного гомеостаза. На протяжении всей жизни растения, с целью обеспечения роста и развития, в клетках поддерживается постоянный уровень «базальной» автофагии, а при ряде стрессов активируется стресс-индуцированная автофагия (Wang *et al.*, 2018).

У растений описаны три цитологических типа автофагии: микроавтофагия, макроавтофагия и мегаавтофагия, которая сопровождается программируемой клеточной гибелью (Marshall and Vierstra, 2018, Avin-Wittenberg, 2019, Gou *et al.*, 2019; рис. 4). При микроавтофагии цитозольные белки или целые органеллы собираются на поверхности вакуоли и напрямую поглощаются через выпячивание или инвагинацию тонопласта, образуя внутривакуолярные везикулы – автофагические тела, которые деградируют в просвете вакуоли после разрыва мембраны (Marshall and Vierstra, 2018). К настоящему времени все еще мало данных о молекулярных механизмах, лежащих в основе микроавтофагии растений.

Макроавтофагия характеризуется образованием двумембранной органеллы – автофагосомы (Le Bars *et al.*, 2014). В месте сборки преавтофагосомальной структуры (PAS) образуется чашевидный фагофор (Zhuang *et al.*, 2013.), мембрана которого растет и закрывается, окружая компоненты, подлежащие деградации, что в конечном итоге приводит к образованию везикулярной аутофагосомы (Le Bars *et al.*, 2014). Автофагосома, либо по некоторым данным автолизосома – органелла, образующаяся после слияния автофагосомы с лизосомой, содержащей кислые литические ферменты – доставляется в вакуоль (Ketelaar *et al.*, 2004), где наружная автофагосомальная мембрана сливается с тонопластом, а внутренняя мембрана вместе с содержимым в виде везикулы (т.н. «автофагическое тело») высвобождается в просвет вакуоли для последующей деградации (Liu and Bassham, 2012).

Мегаавтофагия – наиболее масштабный тип автофагии, который встречается только у растений, и происходит одновременно с запрограммированной клеточной гибелью (ПКС; Van Doorn and Papini, 2013). При мегаавтофагии происходит нарушение целостности вакуолярной мембраны и высвобождение большого количества гидролаз в цитоплазму, что приводит к массовой деградации клеточных компонентов и гибели клетки (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011, Van Doorn and Papini, 2013). В отличие от других типов автофагии, гены ATG не участвуют в мегаавтофагии.

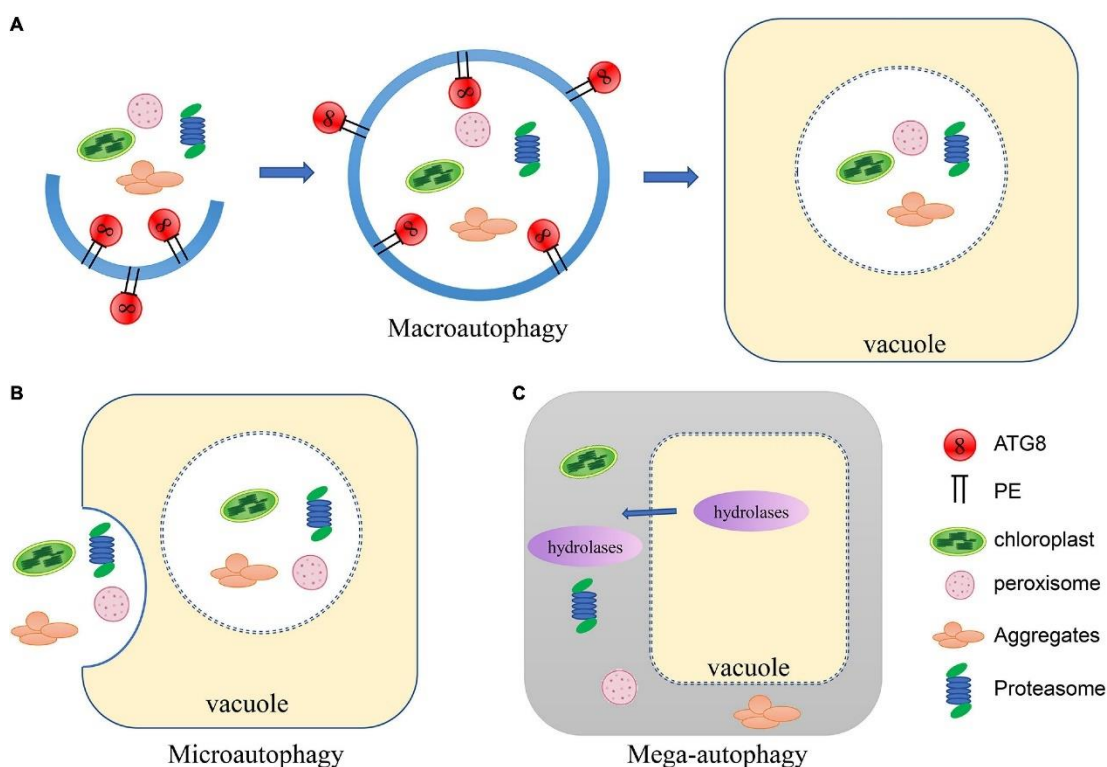


Рис 4. Схематическое изображение трех цитологических типов автофагии у растений: (А) При макроавтофагии формируется чашеобразный фагофор, который при замыкании образует автофагосому, содержащую компоненты цитоплазмы. Затем автофагосома доставляется в вакуоль, где наружная мембрана автофагосомы сливается с тонопластом, а внутренняя везикула высвобождается в просвет вакуоли для деградации. (В) При микроавтофагии цитозольный материал собирается на тонопласте и напрямую захватывается вакуолью посредством инвагинации для дальнейшей деградации. (С) Во время мегаавтофагии вакуолярная мембрана разрывается, высвобождая большое количество гидролаз в цитоплазму, вызывая массовую деградацию цитоплазматического материала (Wang *et al.*, 2021).

1.3.1. Молекулярные механизмы макроавтофагии

К настоящему моменту макроавтофагия является наиболее изученным типом автофагии. Многоступенчатая регуляция деградации различных компонентов достигается за счет генов, связанных с автофагией (ATG), которые впервые были

обнаружены у дрожжей (Qi *et al.*, 2020, Yang and Klionsky, 2010). На данный момент у *Arabidopsis thaliana* идентифицировано более 40 генов *ATG*, большинство из которых являются гомологами *ATG* дрожжей (Chung, 2019). Белки *ATG* функционируют во время индукции автофагии и участвуют в формировании автофагосом (Le Bars *et al.*, 2014, Marshall and Vierstra, 2018). Белки *ATG* можно разделить на шесть основных функциональных групп (Тютерева *и др.*, 2022):

1) Киназный комплекс *ATG1*, включающий белки *ATG1*, *ATG13*, *ATG11*, и *ATG101*. *ATG1-ATG13* при взаимодействии с субъединицами *ATG11* и *ATG101* образуют новый комплекс *ATG1-ATG13-ATG11-ATG101*, который опосредует инициацию автофагии, т.е. образование, расширение и закрытие фагофора (Wang *et al.*, 2018, Suttangkakul *et al.*, 2011, Li and Vierstra, 2014, Marshall *et al.*, 2015).

2) Трансмембранный белок *ATG9* играет критически важную роль в формировании автофагосом и образует комплекс *ATG9-ATG2-ATG18*, отвечающий за образование автофагосом и расширение фагофора за счет поставки к нему липидов (Soto-Burgos *et al.*, 2018, Yamamoto *et al.*, 2012, Zhuang *et al.*, 2017, Kang *et al.*, 2018).

3) Фосфоинозитид-3-киназный комплекс белков *ATG6*, *ATG14*, *VPS34*, *VPS15* необходим для фосфорилирования фосфатидинозитола с образованием фосфатидинозитол-3-фосфата (PI_3P), который является фактором запуска автофагии и необходим для рекрутирования белков, участвующих в автофагии (Takatsuka *et al.*, 2004, Marshall and Vierstra, 2019, Liu *et al.*, 2020). *VPS34* (vacuolar protein sorting-associated protein 34), выполняет в комплексе роль каталитической субъединицы. *VPS15* является активирующей субъединицей комплекса и заякоривает его в автофагосомальной мембране. *ATG6* является PI_3P -киназой и обеспечивает инициацию автофагии в зависимости от ряда внешних сигналов.

4) Комплекс белков *ATG2-ATG18*, совместно и белками *ATG9* и *ATG18a*, играет критически важную роль в контроле закрытия мембраны автофагосомы (Luo *et al.*, 2023, Mishra, 2023).

5) ATG8-липидирующая система обеспечивает присоединение к белку ATG8 фосфатидилэтаноламина. Она располагается как во внутренней, так и во внешней мембранах автофагосом, выполняя функцию стыковочной платформы и благодаря множеству ATG8-связывающих адаптерных и рецепторных белков способствует связыванию карго с фагофором, закрытию автофагосом и слиянию с вакуолями (Cui *et al.*, 2018, Liu and Bassham, 2012, Minina *et al.*, 2018). Белки ATG8 являются маркерами образования автофагосом и необходимы для специфического распознавания грузов автофагии посредством мотива, взаимодействующего с ATG8 (AIM) (Pankiv *et al.*, 2007, Noda *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2021, Michaeli *et al.*, 2016) или мотивов, связывающий ATG8 и взаимодействующих с убиквитином (UIM) (Marshall *et al.*, 2019).

6) Система убиквитин-подобной конъюгации ATG5-ATG12 участвует в переносе ATG8 на фагофор (Marshall, Vierstra, 2018).

В течение продолжительного времени автофагия рассматривалась как процесс неселективной деградации клеточных структур, но согласно последним данным автофагия все же является высокоселективным инструментом, направленным на сохранение и поддержание функций и структур клеток в самых разных условиях (Avin-Wittenberg *et al.*, 2018, Marshall and Vierstra, 2018, Yoshimoto, Ohsumi, 2018). Селективность обеспечивается специфическими белками – селективными рецепторами автофагии (Liu and Bassham, 2012, Reggioni, Klionsky, 2013). К настоящему времени выделены типы автофагии специфичные для белков (протеофагия, агрефагия; Yoon and Chung, 2019, Balchin *et al.*, 2016), хлоропластов (хлорофагия; Nakamura and Izumi, 2019, Izumi *et al.*, 2019, Nakamura *et al.*, 2019, Zhuang and Jiang, 2019), для митохондрий (митофагия; Ren *et al.*, 2021, Broda *et al.*, 2018), для рибосом (рибофагия; Kazibwe *et al.*, 2019, Тютерева и др., 2022), для пероксисом (пексофагия; Bartel *et al.*, 2014, Voitsekhovskaja *et al.*, 2014, Yamauchi *et al.*, 2019), а также для клеточных ядер (нуклеофагия; Li *et al.*, 2020).

1.3.2. Регуляция автофагии в клетках растений

1.3.2.1. Регуляция автофагии киназами TOR и SnRK1

В благоприятных условиях при отсутствии стресса основным регулятором, блокирующим развитие стресс-индуцированной автофагии в клетках растений, является киназный комплекс TORC1 (Liu and Bassham, 2010, Chen *et al.*, 2017, Soto-Burgos and Bassham, 2017). В этих условиях белок RAPTOR1B, функционирующий как кофактор распознавания мишеней TOR (Deprost *et al.*, 2005), рекрутирует ATG13 через мотив передачи сигнала TOR – TOS (TOR-signaling), который присутствует у ATG13 и у других мишеней TOR, например, у рибосомальной киназы S6K (Pu *et al.*, 2017, Son *et al.*, 2018). Это позволяет TOR напрямую фосфорилировать ATG13. Гиперфосфорилированность ATG13 приводит к снижению способности к образованию комплекса ATG1-ATG13, что в результате обеспечивает протекание автофагии лишь на базальном уровне (Son *et al.*, 2018, Mugume *et al.*, 2020; рис. 5). В условиях, богатых питательными веществами, автофагия поддерживается на базальном уровне также благодаря убиквитинированию ATG13 и ATG6 убиквитинлигазами E3 RING-типа AtSINAT1 и AtSINAT2 (SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS THALIANA 1) и их последующей деградации в протеасомах 26S (Qi *et al.*, 2017).

Дефицит питательных веществ или энергии способствует активации киназы SnRK1, которая ингибирует TOR, что в свою очередь приводит к активации автофагии (Baena-González *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2017, Soto-Burgos and Bassham, 2017, Тютерева *и др.*, 2022). При дефиците азота, серы или же при кратковременном дефиците по углероду (например, вызванном удлинением темного периода в сутках) SnRK1 гиперфосфорилирует ATG1a и дефосфорилирует ATG13a. Это способствует образованию активного комплекса ATG1-ATG13 вместе с ATG11 и ATG101 (Suttangkakul *et al.*, 2011, Li and Vierstra, 2014, Chen *et al.*, 2017, Soto-Burgos and Bassham, 2017). Кроме того, каталитическая субъединица SnRK1 KIN10 может напрямую взаимодействовать с субъединицей комплекса TOR RAPTOR1B и фосфорилировать ее, подавляя активность TORC1 (Nukarinen *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2017; рис. 5).

В условиях длительного голодания по углероду активация автофагии происходит ATG1-независимым путем. При этом, как было показано для *Arabidopsis*, SnRK1 (в данном эксперименте ее каталитическая субъединица KIN10) фосфорилирует AtATG6 в комплексе PI3K, тем самым индуцируя автофагию (Huang *et al.*, 2019; рис. 5).

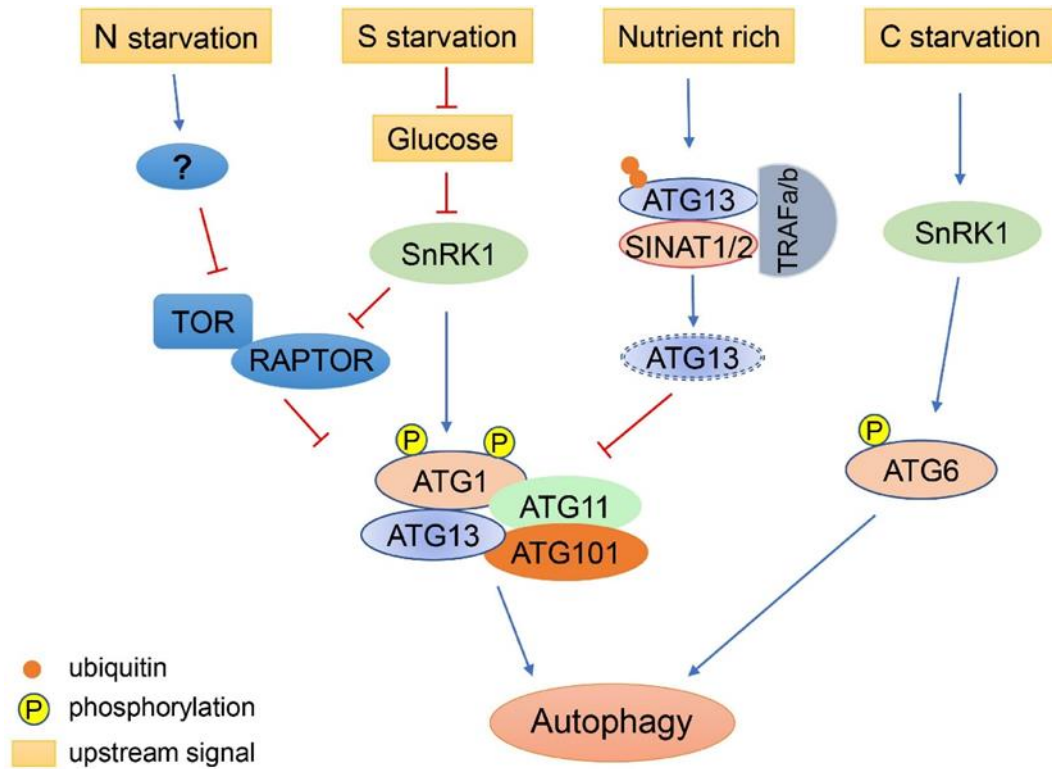


Рис. 5. Механизм активации автофагии при различных дефицитах питательных веществ. Автофагия индуцируется азотным (N) голоданием растений посредством ингибирования TOR. Дефицит серы (S) регулирует автофагию за счет подавления передачи сигналов глюкозы, что приводит к активации SnRK1, который ингибирует TOR и активирует комплекс инициации автофагии ATG1. В условиях, богатых питательными веществами, ATG13 убиквитинируется комплексом SINAT1-TRAF1a и расщепляется протеасомным путем, поддерживая низкие уровни автофагии. При длительном голодании по углероду (C) ATG6 может фосфорилироваться с помощью SnRK1, для активации автофагии через ATG1-независимый путь (Wang *et al.*, 2021).

Кроме того, дефицит питательных веществ приводит к индукции автофагии путем, независимым от TOR и SnRK1, через убиквитинлигазу AtSINAT6, которая подавляет убиквитинирование и деградацию комплекса ATG1/ATG13, а для

поддержания автофагии на высоком уровне AtSINAT6 дополнительно участвует в ингибировании убиквитинирования и деградации белка AtATG6 путем непосредственного связывания с ним (Qi *et al.*, 2017). На этапе восстановления после голодания активируется протеасомно-зависимая деградация ATG13 за счет убиквитинирования через AtSINAT1 и AtSINAT2, до снижения автофагии до базального уровня.

1.3.2.2. Регуляция автофагии абсцизовой кислотой (АБК)

Концентрация абсцизовой кислоты (АБК) возрастает в ответ на стресс и в свою очередь способствует адаптации растения к негативным факторам. Ключевую роль в сигнальных путях абсцизовой кислоты играют киназы семейства SnRK2 - SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6, SnRK2.7 и SnRK2.8 у *Arabidopsis* (Kamiyama *et al.*, 2021), в комплексе с рецепторами АБК PYRABACTIN RESISTANCE 1/PYR1-LIKE (PYL) и протеинфосфатазами 2Cs (PP2Cs) (Hasan *et al.*, 2022).

При отсутствии стресса TOR фосфорилирует рецепторы PYL АБК, предотвращая связывание PYL с АБК и PP2C. Это позволяет PP2C напрямую дефосфорилировать киназу SnRK2 и инактивировать ее (Wang *et al.*, 2018). С другой стороны, в отсутствие АБК, неактивная SnRK2 и PP2C образуют комплекс с SnRK1, что инактивирует также и SnRK1, так как предотвращает ее взаимодействие с TOR (Belda-Palazon *et al.*, 2020). При повышении концентрации АБК происходит разбор комплекса, поскольку PP2C связывается с комплексом АБК-PYR/PYL, и обе киназы, SnRK1 и SnRK2, активируются. В конечном итоге взаимодействие SnRK1α с TOR приводит к активации автофагии (Belda-Palazon *et al.*, 2020). В свою очередь, активированная SnRK2 фосфорилирует RAPTOR, что также приводит к ингибированию TOR и активации автофагии (Wang *et al.*, 2018).

Кроме того, экзогенная обработка АБК может вызывать персульфидацию цистеиновой протеазы AtATG4a (Laureano-Marin *et al.*, 2020). Персульфидированный остаток Cys170 является частью характерной каталитической триады Cys-His-Asp протеаз Cys (Sugawara *et al.*, 2005). Внутриклеточный сульфид поддерживает высокий уровень персульфидирования

пула ATG4 в базальных условиях, что приводит к ингибированию протеолитической активности ATG4, которое в свою очередь ограничивает образование ATG8-PE и синтез автофагосом (Laureano-Marín *et al.*, 2020).

1.3.2.3. Регуляция автофагии брассиностероидами

Брассиностероиды, как и АБК, играют важную роль в повышении устойчивости ряда растений к неблагоприятным условиям: субоптимальным температурам, высокому содержанию в почве тяжелых металлов, избыточному засолению и другим факторам (Houimli *et al.*, 2010, Fariduddin *et al.*, 2014). Киназы, участвующие в передаче сигналов брассиностероидов, в условиях стресса могут фосфорилировать субстраты, связанные с автофагией (Nolan *et al.*, 2017). Киназа BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1) регулирует устойчивость растений к патогенам, напрямую фосфорилируя ATG18a, что приводит к снижению образования автофагосом, уровня автофагии и устойчивости растений (Zhang *et al.*, 2020). *ATG18a* – единственный ген семейства *ATG18* (*ATG18a-ATG18h*) который индуцируется при недостатке питательных веществ и старении (Xiong *et al.*, 2005). Киназа BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2) также является негативным регулятором передачи сигналов брассиностероидов и находится «выше» TOR в регуляции автофагии. BIN2 непосредственно фосфорилирует RAPTOR1B, субъединицу комплекса TOR. Это приводит к активации TOR, фосфорилированию ATG13a и ингибированию автофагии (Liao *et al.*, 2023).

Показано, что AtSINAT2 напрямую взаимодействует с компонентами сигнальных путей брассиностероидов – с транскрипционным регулятором AtBES1 (BRI1-EMS SUPPRESSOR1) и с белком рецептора убиквитина DSK2 (DOMINANT SUPPRESSOR OF KAR2). В условиях дефицита углерода или воды DSK2 взаимодействует с убиквитин-подобным белком ATG8, что приводит к автофагической деградации AtBES1 (Funakoshi *et al.*, 2002, Nolan *et al.*, 2017), индукции ряда генов и повышению стрессоустойчивости.

1.3.2.4. Участие салицилатов и жасмонатов в регуляции автофагии

Фитогормоны салициловая кислота (СК) и жасмонаты необходимы для защиты растений от патогенов. NPR1 (NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1) является ключевым регулятором приобретенного иммунитета к патогенам и модулирует большинство генов, чувствительных к СК (Zhang and Li, 2019, Chen *et al.*, 2021). Показано, что NPR1 регулирует также экспрессию ATG-генов. NPR1 ингибирует экспрессию *ATG1*, *ATG6* и *ATG8a* во время раннего гиперчувствительного ответа на авирулентный штамм бактерии *Pseudomonas syringae Psm ES4326/AvrRpt2* (Gong *et al.*, 2020). В соответствии с этими данными, агонист СК бензотиадиазол (BTH) индуцирует автофагию по NPR1-зависимому сигнальному пути. В то же время, NPR3 и NPR4 стимулируют образование автофагосом через убиквитин-подобные системы конъюгации (Wang *et al.*, 2016); правда, было высказано предположение, что, в отличие от NPR1, NPR3 и NPR4 все же не участвуют в СК-сигналинге (Wang *et al.*, 2016).

До сих пор мало данных, отражающих прямое взаимодействие между путями жасмонатного сигналинга и автофагией. Известно, некротрофный грибковый патоген *Botrytis* индуцирует автофагию, что сверхэкспрессия транскрипционного фактора WRKY33 повышает устойчивость к патогену у *Arabidopsis*, а мутанты *wrky33* и *atg* более восприимчивы к некротрофным грибковым патогенам (Lai *et al.*, 2011). Это связано с тем, что WRKY33 напрямую взаимодействует с ATG18a (Lai *et al.*, 2011). Поскольку устойчивость к некротрофным патогенам основана на сигнальных путях жасмонатов, то эти данные косвенно указывают на регуляцию автофагии жасмонатами. Однако, детальные механизмы остаются неизучены.

1.3.2.5. Некоторые ингибиторы автофагии, применяемые в исследованиях растений

Известно большое количество различных активаторов и ингибиторов автофагии (Yang *et al.*, 2013).

К активаторам автофагии относятся ингибиторы киназы TOR. Рапамицин является мощным ингибитором TOR млекопитающих (Abraham & Wiederrecht 1996,

Benjamin *et al.* 2011) и растений (Li *et al.*, 2011, Xiong and Sheen, 2012). Как известно, рибосомальные протеинкиназы S6K1/2 являются важнейшими субстратами TOR; оказалось, что рапамицин ингибирует опосредованное AtTORC1 фосфорилирование киназы S6K1 по Thr-449, а киназы S6K2 - по Thr-455, как в протопластах арабидопсиса, так и в проростках (Xiong and Sheen, 2012). Рапамицин связывается с белком FKBP12. Образовавшийся комплекс стабилен и не подвергается деградации; он является аллостерическим ингибитором киназы TOR, связываясь с ее FRB-доменом. Показано что у *Arabidopsis thaliana* сверхэкспрессия FKBP12 может повышать чувствительность к рапамицину (Xiong and Sheen, 2012). Поскольку рапамицин используется в медицине, то на сегодняшний день создан ряд его аналогов («рапалогов»), способных ингибировать TOR.

Альтернативным механизмом ингибирования активности TOR является конкурентное ингибирование веществами - структурными аналогами АТФ в сайте связывания АТФ. В настоящее время известны такие конкурентные ингибиторы TOR-киназы как AZD8055, TORIN1, TORIN2, WYE-132, WYE-354 и KU-63794 (Chresta *et al.*, 2010, Montane and Menand, 2013, Xiong *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2017, Dong *et al.*, 2015, Pu *et al.*, 2017, Song *et al.*, 2019). Эти вещества активируют инициацию автофагии.

Другая группа активаторов автофагии включает вещества, индуцирующие стресс эндоплазматического ретикулума (ER-stress), такие как брефельдин А и туникамицин (Yang *et al.*, 2013).

Поскольку киназа SnRK1 оказывает ингибирующее действие на TOR, то можно ожидать, что активаторы SnRK1 будут усиливать автофагию через ингибирование TOR. Действительно, активатор SnRK1 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид (AICAR), вещество, являющееся структурным аналогом АМФ, у *Arabidopsis* вызывал рост образования автофагосом и усиление автофагического потока (Soto-Burgos *et al.*, 2017).

Ингибирование автофагии может происходить как на этапе ее инициации, так и на последующих этапах. 3-метиладенин (3-МА) и вортманнин ингибируют

активность фосфатидилинозитол-3-киназ (PI3K), и таким образом блокируют инициацию автофагии через инициаторный фосфоинозитид-3-киназный комплекс белков ATG6, ATG14, VPS34, VPS15. Конканамицин А и бафиломицин А1 ингибируют вакуолярные АТФазы V-типа (Huss *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2013), и таким образом предотвращают закисление вакуоли и эндомембранных компартментов, в т.ч. лизосом и автолизосом (автолизосома – органелла, образующаяся после слияния автофагосомы с лизосомой, содержащей кислые литические ферменты). Это блокирует вакуолярный гидролиз и подавляет автофагическую деградацию везикул в вакуолях, вызывая накопление в них «автофагических телец» (Hafnén *et al.*, 2017). E64d, лейпептин и пепстатин, ингибиторы лизосомальных протеаз, также специфично блокируют поток автофагии (Takatsuka *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2008).

1.4. Роль ионов калия в метаболизме и стрессоустойчивости растений

Калий — основной внутриклеточный катион и осмотик растений. После поглощения клетками корня, ионы K^+ загружаются в ксилему и транспортируются с потоком транспирации в побег, где K^+ попадает во флоэму и может далее перемещаться с флоэмным током в органы-акцепторы (такие как растущие листья, меристемы побега и др.) или же рециркулировать обратно к корням. Подвижный флоэмный пул K^+ можно рассматривать как «децентрализованное хранилище» энергии, обеспечивающей протекание процессов трансмембранного транспорта (Dreyer *et al.* 2017). Поглощение K^+ является основной движущей силой роста проростков; более того, обеспеченность калием влияет на устойчивость растений к патогенам (Zörb *et al.*, 2014).

Поглощение калия из почвы клетками корня происходит через несколько транспортных систем с высоким сродством (т.е. активных при концентрациях K^+ снаружи ниже 1 мМ), которые включают симпортеры H^+/K^+ , катион/ H^+ -антипортеры и каналы шейкерного типа, а также через систему транспорта с низким сродством, которая представлена каналами АКТ шейкерного типа. Эти каналы и транспортеры ингибируются специфическим блокатором тетраэтиламмонием (TEA^+ ; Szczerba *et al.*

2009). Другие системы транспорта K^+ на плазматической мембране клеток корня включают NSCC (неселективные катионные каналы), которые проницаемы для K^+ , но также и для Na^+ , Ca^{2+} и других катионов (Demidchik *et al.*, 2002). NSCC, активируемые гиперполяризацией, ингибируются TEA^+ ; напротив, потенциал-независимые NSCC не только не ингибируются TEA^+ , но могут даже в некоторой степени опосредовать поступление TEA^+ в клетки (Demidchik and Tester 2002). Именно эти каналы также представляют собой и основной путь проникновения ионов Na^+ в клетки корня и участвуют в механизмах солеустойчивости растений (Amtmann and Veilby 2010). Потеря K^+ из клеток корня может происходить через потенциал-чувствительные TEA^+ -ингибируемые NSCC, через потенциал-независимые TEA^+ -нечувствительные NSCC, а также через TEA^+ -чувствительные наружу-выпрямляющие калиевые каналы GORK/SKOR, расположенные на плазмалемме (Ache *et al.*, 2000, Nguyen *et al.*, 2017). Предполагается, что именно каналы GORK/SKOR выступают основными регуляторами гомеостаза калия в корнях в условиях стресса (Demidchik, 2018).

Следует отметить, что другие катионы могут мешать потокам K^+ на плазматической мембране клеток корня. Например, высокие уровни внешнего Na^+ значительно ингибировали поглощение K^+ корнями ячменя (Kronzucker *et al.*, 2008), в то время как высокие концентрации внешнего Ca^{2+} ингибировали как поступление Na^+ в клетки корня арабидопсиса, так и экструзию K^+ из клеток через потенциал-независимые NSCC (Shabala *et al.*, 2006).

Поскольку K^+ является основным осмолитом растительных клеток, регуляция его содержания в растениях и регуляция водного режима растений связаны. Например, в корнях риса как экспрессия гена, кодирующего внутрь-выпрямляющий K^+ -канал шейкерного типа OsAKT1, так и гидравлическая проводимость корневой плазматической мембраны снижались при воздействии блокаторами K^+ -каналов TEA^+ и CsCl (Liu *et al.*, 2006). Было показано, что SNARE-белок SYP121 регулирует транспорт к плазмалемме и распределение в ней как аквапоринов, так и K^+ -каналов шейкерного типа KAT1 и AKT1 (Sustr *et al.*, 2019). Таким образом, регуляция

обеспеченности клеток калием и водой связана на посттранскрипционном уровне. Интересно, что в то время как дефицит K^+ приводит к сильной индукции транскрипции генов, кодирующих системы транспорта K^+ внутрь клеток, блокаторы K^+ -каналов оказывают противоположный эффект.

Дефицит K^+ приводит к замедлению флоэмного транспорта и накоплению сахарозы в листьях, уменьшению соотношения «корень/побег» (что резко контрастирует с реакцией растений на дефицит других питательных веществ, когда соотношение «корень/побег», напротив, увеличивается; Hermans *et al.*, 2006), а также вызывает водный стресс (Sustr *et al.*, 2006). У проростков арабидопсиса дефицит K^+ тормозит удлинение корней; однако для этой реакции необходим функциональный канал AKT1 (Li *et al.*, 2017). Канал AKT1 представляется наиболее многообещающим кандидатом на роль сенсора уровней K^+ в корнях; ранее аналогичная роль была предложена для выпрямляющих GORK-каналов в корневых волосках (Ivashikina *et al.*, 2001). Аналогично, переносчик нитратов CHL1, возможно, играет роль сенсора нитратов (Ho *et al.*, 2009). В целом, все больше исследований показывают, что ионные каналы могут играть роль в восприятии и передаче сигналов, таких как обеспеченность нутриентами, а также абиотический стресс (Zhu 2016). Предполагается, что, сочетая обе функции, наружу-выпрямляющие калиевые каналы SKOR и GORK, локализованные в ксилеме и в эпидермисе и коре клеток корней, соответственно, играют роль сенсоров активных форм кислорода (АФК) (Garcia-Mata *et al.*, 2010, Demidchik, 2018).

На клеточном уровне о доступности K^+ , вероятно, сигнализируют изменения потенциала плазматической мембраны, которая гиперполяризуется во время дефицита K^+ , а также Ca^{2+} и АФК как вторичных мессенджеров. Долгосрочная адаптация к дефициту K^+ включает изменения в уровнях ряда фитогормонов и может привести к снижению цитозольных концентраций K^+ , что ингибирует пируваткиназу и другие ферменты (Leigh and Wyn Jones 1984, Ragel *et al.*, 2019). Однако вопрос о том, передаются ли сигналы о доступности K^+ на большие расстояния – от корней к побегам – менее хорошо изучен. Показано, что изменения уровней фитогормонов,

уменьшение высвобождения K^+ из ксилемы в побегах, а также индуцированные волны Ca^{2+} и изменение водного статуса могут выступать сигналами дефицита K^+ , которые передаются от корней к побегам; в то же время было высказано предположение, что сниженное содержание K^+ во флоэме сигнализирует корням о голодании побегов по калию (Ragel *et al.*, 2019). Более ранние исследования анализировали влияние нехватки K^+ на фотосинтетическую активность в присутствии других стрессов, таких как засуха (Pier and Berkowitz, 1987) или засоление (Ball *et al.*, 1987, Chow *et al.*, 1990). Примечательно, что авторы обнаружили, что воздействие на фотосинтез, вызванное самой по себе нехваткой K^+ , значительно превосходит эффекты, вызванные одновременной засухой или солевым стрессом. Основными реакциями на дефицит калия были снижение уровня хлорофиллов и уменьшение количества реакционных центров ФСII, вызванное главным образом ингибирующим воздействием низких уровней K^+ на биосинтез белка в хлоропластах. Недавно Kalaji *et al.*, (2014) проанализировали влияние дефицита ряда нутриентов, включая K и N, на растения кукурузы и томата с использованием измерений флуоресценции хлорофилла, и наблюдали общее снижение фотосинтетической эффективности. В нашей работе было показано, что блокирование поступления калия в проростки ячменя через TEA⁺-чувствительные системы поглощения калия приводило к развитию умеренного водного стресса, и в соответствии с этим активировало рост корней, а также активность ФСII (Voitsekhovskaja *et al.*, 2020).

Проводящие ткани - ксилема и флоэма - предположительно представляют собой наиболее удобный путь для передачи сигналов между корнем и побегом. Известно, что АБК влияет на мембранный потенциал, а также на функцию K^+ -каналов, как в замыкающих клетках устьиц, так и в клетках ксилемной паренхимы (Jezek and Blatt 2017, Roberts and Snowman, 2000). Таким образом, поскольку сенсорная функция была установлена для транспортера нитратов плазматической мембраны (Ho *et al.*, 2009) и предложена для АКТ1 (Li *et al.* 2017), можно предположить, что K^+ -каналы могут сигнализировать о доступности K^+

непосредственно через мембранный потенциал клеток ксилемы, что могло бы интегрировать сигналы дефицита воды, калия и солевого стресса и передавать эту информацию от корня к побегу.

Уровни клеточного K^+ тесно связаны с энергетическим метаболизмом и энергетическим статусом растительных клеток. Многие ферменты, которым для функционирования нужен K^+ , катализируют реакции, расходующие АТФ (Wu *et al.*, 2018). Кроме того, K^+ необходим для поддержания электрохимических градиентов, которые у растений зависят от потоков K^+ и H^+ через плазматическую мембрану, а также эндомембраны (Sze and Chanroj, 2018). Основной движущей силой транспорта ионов и растворенных веществ через клеточные мембраны является протондвижущая сила, которая зависит от разности концентраций протонов (ΔpH) по обе стороны мембраны. ΔpH зависит от работы ионных насосов, включая H^+ -АТФазы плазматической мембраны (P-АТФазы), вакуолярные H^+ -АТФазы (V-АТФазы) и H^+ -пирофосфатазы типов I и II. Примечательно, что активность P-АТФаз и H^+ -пирофосфатазы I типа регулируется K^+ (Gaxiola *et al.*, 2007). Поддержание pH внутри эндомембранных компартментов достигается путем транслокации протонов против градиента их концентрации за счет гидролиза АТФ. Однако перенос протонов через мембрану может быть обеспечен только при электрическом балансе. Потоки калия выполняют эту функцию не только в плазматической мембране и тонопласте, но также в хлоропластах и митохондриях, где от потоков K^+ зависят создание протондвижущей силы и синтез АТФ (Carraretto *et al.*, 2013, Trono *et al.*, 2015; Finazzi *et al.*, 2015). Таким образом, уровни K^+ связаны как с синтезом АТФ в хлоропластах и митохондриях, так и с гидролизом АТФ в ходе закисления апопласта, вакуоли и других кислых компартментов, таких как пузырьки Гольджи и TGN/эндосома (Bassil *et al.*, 2011a, 2011b).

За последние 15 лет было обнаружено, что калий, в зависимости от его цитозольных концентраций, играет важную роль в «метаболическом переключении» между программами катаболизма и анаболизма (Leigh and Wyn Jones, 1984, Armengaud *et al.*, 2004, Demidchik 2014, Shabala 2017). Это связано с тем, что ряд

метаболических ферментов для своей активности нуждается в K^+ , который не может быть заменен на Na^+ или какой-либо иной ион (Leigh and Wyn Jones, 1984). Так, у арабидопсиса калиевое голодание вызывает ингибирование более 50 ферментов, в том числе ферментов гликолиза и путей ассимиляции азота (Armengaud *et al.*, 2009). Более того, наличие K^+ необходимо для поддержания процессов биосинтеза белка (Leigh and Wyn Jones, 1984). У млекопитающих цитозольный K^+ инактивирует каспазы, а потеря K^+ клетками, напротив, приводит к апоптотической программируемой гибели клеток (ПКС) (Remillard *et al.*, 2004, Canu *et al.*, 2005). У растений вызванная стрессом потеря K^+ клетками может вызвать остановку роста, ингибирование путей биосинтеза и активацию катаболизма, а в долгосрочной перспективе также привести к индукции ПКС (Demidchik *et al.*, 2003, 2010). Однако, перед запуском ПКС потеря K^+ клетками может привести сначала к перенаправлению клеточной энергии на индукцию программ защиты и детоксикации, таких как автофагия (Demidchik *et al.*, 2017). Таким образом, наружу-выпрямляющие калиевые каналы GORK/SKOR могут стать многообещающей мишенью для улучшения выживаемости сельскохозяйственных культур в условиях стресса, поскольку через них, возможно, осуществляется переключение между клеточными процессами анаболизма и катаболизма за счет изменений уровня цитоплазматического калия (Shabala 2017, Rabadanova *et al.*, 2018, Wu *et al.*, 2018).

Особая роль отводится калию в обеспечении устойчивости сельскохозяйственных культур к засолению почв. Механизмы защиты растений от засоления включают экструзию ионов Na^+ из клеток корня, предотвращение их поглощения ксилемой, а также компартментализацию ионов Na^+ и Cl^- в вакуолях, чтобы обеспечить поддержание цитозольных и органелльных концентраций этих ионов ниже токсических значений (Wu *et al.* 2018). Калий играет важную роль в балансировании осмотического давления в клеточных компартментах (Shabala, 2017), а также в поддержании градиентов pH и электрического потенциала на плазматической мембране и на эндомембранах (Sze and Chanroj 2018). Все это вполне может объяснить тот факт, что в клетках мезофилла как корня, так и листа

критически важно поддерживать оптимальные концентрации K^+ во время солевого стресса (Demidchik *et al.*, 2010, Shabala *et al.*, 2005, 2006, Wu *et al.*, 2018).

Как рассмотрено выше, Ser/Thr протеинкиназа Target of Rapamycin (TOR) и комплекс киназы SnRK1 регулируют баланс между анаболическими и катаболическими процессами, а также представляют собой центральные регуляторы автофагии у растений. В то же время выдвинуто предположение, что цитозольные уровни K^+ служат «метаболическим переключателем» между анаболизмом и катаболизмом. В совокупности эти данные позволяют предположить, что цитозольные уровни K^+ могут влиять на активность киназ TOR или SnRK1 и передачу сигналов через эти киназные комплексы. Однако, данный вопрос в литературе не изучался.

В отличие от ортологичных киназ дрожжей и животных, у растений главными регуляторами TOR и SnRK1 выступают молекулы сахаров и сахарофосфатов. Киназный комплекс TOR растений активируется в присутствии глюкозы – единственного пока метаболита, для которого доказано прямое влияние на активность TOR у растений, а активность киназы SnRK1 растений регулируется главным образом сахарофосфатами. Столь важная роль сахаров и сахарофосфатов в регуляции баланса между анаболизмом и катаболизмом (соответственно киназным комплексам TOR и SnRK1), возможно, связана с тем, что именно сахара – продукты фотосинтеза - обеспечивают приток энергии в метаболизм растений. Поскольку активность SnRK1 зависит от энергетического статуса клетки, можно предположить, что эта киназа участвует, напрямую или опосредованно, в регуляции фотосинтетической продукции энергии в хлоропластах либо ее адаптации к потребностям клетки в энергии или сахарах. Однако, до настоящего времени данный вопрос не исследовался.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования и условия выращивания

Все эксперименты проведены на Резушке Таля - *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. (сем. Brassicaceae). Были использованы растения *A. thaliana* дикого типа экотипов Columbia (Col-0) и Landsberg erecta (Ler) (Ноттингемский центр Арабидопсиса, Великобритания), трансгенные линии KIN10RNAi1, KIN10RNAi2 (линии со сниженным уровнем экспрессии *KIN10*), KIN10OX1, KIN10OX2 (линии со сверхэкспрессией субъединицы *KIN10*), и трансгенная линия p35S::S6K1-FLAG со сверхэкспрессией гена *A. thaliana* S6K1 (AT3G08730), кодирующего основной субстрат фосфорилирования TOR - белок S6K1, меченый тегом FLAG. Линии *A. thaliana* с измененным уровнем экспрессии гена *KIN10* (AT3G01090) - каталитической субъединицы киназы SnRK1 была любезно предоставлена Dr Filip Rolland (Католический Университет г. Левен, Бельгия), а линия p35S::S6K1-FLAG была любезно предоставлена Dr. Jen Sheen (Гарвардская медицинская школа, Массачусетс, США).

Трансгенные линии KIN10OX и KIN10RNAi были сгенерированы коллективом авторов работы Baena-González et al., 2007. Для получения сверхэкспрессии *KIN10* последовательность была слита с гемагглютининовым тегом и полученный конструктор помещен между промотором 35S и терминатором NOS в вектор экспрессии pCB302. Для получения трансгенов со подавленной, но не полностью ингибированной экспрессией гена, использовали метод РНК-интерференции. Для этого на последние 238 п.н. кодирующей области *KIN10* были посажены праймеры в обеих ориентациях (праймеры: 5'-cgg gat ccc agc agc gca gat ggt atg-3', 5'-aggcctcatgccatggtcagaggactcggagctgag-3'), участки последовательности в обеих ориентациях, разделенные интроном, были клонированы в тот же вектор (Baena-González et al., 2007).

2.1.1. Поверхностная стерилизация семян *Arabidopsis thaliana*

Необходимое количество семян пересыпали в пластиковую пробирку типа Эппендорф и добавляли ~2 мл стерилизующего раствора. Инкубировали, периодически покачивая, в течение 8-12 мин в зависимости от генотипа. По истечении указанного времени с помощью пипетки Пастера отбирали стерилизующий раствор и семена 5 раз промывали автоклавированной

дистиллированной водой (dH₂O), перемешивая покачиванием. После промывки семена заливали 70% этанолом и выдерживали 3-5 минут, постоянно покачивая. После удаления этанола семена также 5 раз промывали стерильной dH₂O. Поверхностно стерилизованные семена ресуспендировали в стерильном 0,1% агаре.

Состав стерилизующего раствора (STS):

- 40% (об/об) Доместос (содержит гипохлорит натрия ~5% об/об)
- 0,2% (об/об) Tween 20 (Reagent grade, Helicon)
- 59,8% (об/об) dH₂O

2.1.2. Выращивание *A. thaliana* в стерильной культуре и грунте

2.1.2.1. Выращивание *A. thaliana* в стерильной культуре

В работе были использованы растения, выращенные на питательной среде Мурасиге – Скуга (MS; Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 1% сахара (сахароза/глюкоза), полным содержанием солей MS или с измененным набором солей (2.1.2.2). Среды стерилизовали в автоклаве Hirayama HVA-110 (HIRAYAMA, Япония) при температуре 121°C и повышенном давлении в течение 20 минут. В ламинарном боксе (ВЛ 1200, «САМПО», Россия) после остывания до ~60°C автоклавированные среды заливали в пластиковые чашки Петри и оставляли до полного застывания. На готовые среды высаживали семена, предварительно поверхностно стерилизованные и ресуспендированные в 0,1% агаре (Sigma-Aldrich, USA) с помощью стерильной пипетки Пастера или зубочистки. Чашки с семенами для стратификации помещали на двое суток в холодильник при +4°C. После стратификации чашки переносили в условия 20 - 22°C, влажность воздуха 80%, интенсивность освещения 120 мкмоль м⁻² с⁻¹, фотопериод 16 ч – день, 8 ч – ночь. Измерения проводили на 9-14 дневных проростках. Возраст растений определяли с момента прорастания.

Среда MS1 (pH 6.0):

- 4,405 г/л сухой смеси Murashige – Skoog, включающей микро- и макроэлементы, витамины (Duchefa Biochemie, P12965.01)
- 1% (м/об) сахароза (USP-NF grade, Helicon)
- 0,35% (м/об) фитагель (Sigma-Aldrich, P8169)

2.1.2.2. Выращивание *A. thaliana* в стерильной культуре на средах с различным содержанием калия

Среды составляли на основе MS1 (2.1.2.1), однако были внесены изменения. В качестве желирующего агента был взят агар (1 % м/об., Sigma-Aldrich, A1296), а не фитагель, поскольку в предварительных экспериментах с помощью атомно-адсорбционной спектрометрии было установлено, что содержание калия в агаре составило 0,04 мг/кг, тогда как в фитагеле – 3,2 мг/кг (Рабаданова К.К., 2017). Для экспериментов готовили среды следующего состава:

1. Среда с полным составом макро- и микроэлементов (в т.ч. 2 мМ К⁺) и 1% (м/об) сахарозы, что соответствует 30 мМ (Среда «K/Suc» - «нормальное содержание калия, сахароза»);
2. Среда с полным составом макро- и микроэлементов (в т.ч. 2 мМ К⁺) и с 30 мМ глюкозы (Среда «K/Glc» - «нормальное содержание калия, глюкоза»);
3. Среда со сниженным содержанием К⁺ (0,01 мМ) и 1% сахарозы (Среда «lowK/Suc» - «дефицит калия, сахароза»);
4. Среда со сниженным содержанием К⁺ (0,01 мМ) и 30 мМ глюкозы (Среда «lowK/Glc» - «дефицит калия, глюкоза»).

Полный состав питательных сред представлен в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Концентрации макроэлементов в питательных средах 1-4.

| Вещество /среда | Концентрация, мМ | | | |
|-----------------------------------|------------------|---------|------------|------------|
| | «K/Suc» | «K/Glc» | «lowK/Suc» | «lowK/Glc» |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| MgSO ₄ | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| KNO ₃ | 2 | 2 | - | - |
| KCl | - | - | 0,01 | 0,01 |
| CaCl ₂ | 0,5 | 0,5 | - | - |
| Ca(NO ₃) ₂ | - | - | 0,5 | 0,5 |
| NaCl | 1 | 1 | - | - |
| NaNO ₃ | - | - | 1 | 1 |

Таблица 2. Концентрации микроэлементов и витаминов в питательных средах 1-4.

| Вещество | Конечная концентрация, мкМ | Вещество | Конечная концентрация, мг/л |
|---|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| MnSO ₄ | 1,8 | Глицин | 2 |
| H ₃ BO ₃ | 45 | Мио-инозитол | 2 |
| ZnSO ₄ | 0,38 | Никотиновая кислота | 0,5 |
| CuSO ₄ | 0,16 | Пиридоксина гидрохлорид | 0,5 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0,015 | Тиамина гидрохлорид | 0,1 |
| CoCl ₂ | 0,01 | | |
| Fe(III)-Na-EDTA | 42,5 | | |

Для приготовления сред использовали реактивы со следующими характеристиками: сахароза (USP–NF grade, Helicon), D-глюкоза (Ч, Вектон), NaH₂PO₄ 2-х водный (Ч, Вектон), MgSO₄ 7-водный (ЧДА, Вектон), KNO₃ (ЧДА, Реактив), KCl (ХЧ, Реактив), CaCl₂ безводный (Ч, Вектон), Ca(NO₃)₂ 4-водный (Ч, Ленреактив), NaCl (ХЧ, Ленреактив), NaNO₃ (ХЧ, Ленреактив), MnSO₄ 5-водный (Ч, Ленреактив), борная кислота H₃BO₃ (ХЧ, Вектон), ZnSO₄ 7-водный (ХЧ, Ленреактив), CuSO₄ 5-водный (ЧДА, Ленреактив), аммоний молибденовокислый (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4-водный (ХЧ, Ленреактив), CoCl₂ 6-водный (Ч, Ленреактив), глицин (Pharma grade, Panreac), мио-инозитол (Duchefa Biochemie, Netherlands), никотиновая кислота (Roth, Germany), пиридоксина гидрохлорид (Roth, Germany), тиамина гидрохлорид (Roth, Germany), Fe(III)-Na-EDTA (100мМ FeSO₄*7H₂O (ХЧ, Ленреактив), 100мМ Na₂EDTA (ЧДА, Reanal, Венгрия), pH 5.5).

2.1.2.3. Выращивание *A. thaliana* в стерильной культуре на средах с добавлением 3-МА

Проростки выращивали на вертикальных чашках с тремя типами питательной среды:

1. Среда «нормальное содержание калия, сахароза» как описано в 2.1.2.2;
2. Среда «нормальное содержание калия, без сахарозы»;
3. Среда «дефицит калия, сахароза» как описано в 2.1.2.2.

В качестве желирующего агента использовали агар (0,75% м/об., Sigma-Aldrich, A1296). Через семь дней половину проростков с каждой чашки переносили в чашки, содержащие ту же среду и концентрацию агара, но с добавлением 5 мМ 3-метиладенина (3-МА) – ингибитор комплекса Р1ЗК, который добавляли в виде стерильного раствора к затвердевающему охлажденному до $\sim 60^{\circ}\text{C}$ агару. Для получения стерильного стока проводили фильтрацию раствора 3-МА (Sigma, Israel) через фильтр 0,22 мкм Syringe Filter (Jet Biofil) и стерильный шприц в ламинарном боксе (ВЛ 1200, «САМПО», Россия). Через два дня роста проростков на среде с 3-МА их собирали и готовили белковые экстракты для иммуноблоттинга, как описано в 2.2.3.1.

2.1.2.4. Выращивание *A. thaliana* в грунте

Семена растений *A. thaliana* поверхностно стерилизовали и выращивали в стерильной культуре согласно пунктам 2.1.1. и 2.1.2.1. Далее 14-дневные проростки переносили в почвенный грунт (грунт:торф 1:1) и выращивали до 6-7 недельного возраста при температуре 20 - 22°C, влажности воздуха 80%, интенсивности освещения 150 мкмоль м⁻² с⁻¹, фотопериод 16 ч – день, 8 ч – ночь.

2.1.2.5. Выращивание *A. thaliana* в грунте в условиях солевого стресса

Для создания солевого стресса экспериментальную группу взрослых растений через день, в течение 7 суток поливали 10% раствором Хогланда (Hoagland, Arnon, 1950) с добавлением NaCl (ХЧ, Ленреактив) в конечной концентрации 100 мМ из расчета 30 мл на горшок (0,5 л) с 4 растениями. Контрольную группу растений поливали с такой же периодичностью и тем же количеством 10% раствора Хогланда без добавления NaCl.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Морфометрические методы

Измерение длины корней и площади листовых пластинок производили с помощью программы UTHSCSA ImageTool for Windows version 3.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, USA) на фотографиях 11-дневных проростков, полученных с помощью Epson perfection 3200 Photo (Seiko Epson Corporation, Япония).

2.2.2. Методы молекулярной биологии

Для выделения РНК, как и для всех других молекулярно-биологических методов, примененных в данной работе, использовали только стерильную (автоклавированную) стеклянную и пластиковую посуду. Все растворы готовили на стерильной (автоклавированной) деионизированной воде. Процедуры обычно выполнялись на льду. Центрифугировали образцы, если не указано иное, в настольной центрифуге Eppendorf 5415 R (Германия) при максимальной скорости 13000 об/мин (16060×g). Образцы РНК хранили при -80°C , а ДНК – при -20°C .

2.2.2.1. Выделение тотальной РНК

Для молекулярных работ использовали навески растительного материала, предварительно замороженные в жидком азоте и хранившиеся при -80°C . Для выделения РНК использовали реагент «ExtractRNA» (Россия, Евроген, BC032).

Выделение проводили по следующей схеме:

- Навеску растительного материала (100мг), растирали в жидком азоте с добавлением поликлара АТ (Serva, Germany) и переносили в пластиковую пробирку типа Эппендорф.
- Добавляли 1 мл реагента «ExtractRNA», оттаивали при перемешивании на Vortex и инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 15 минут периодически помешивая.
- Центрифугировали лизат 10 мин при 12 000g и $t = +4^{\circ}\text{C}$
- Отбирали супернатант в новую пробирку
- К супернатанту добавляли 200 мкл хлороформа и 15 секунд сильно трясли в руке.
- Инкубировали в течение 5 минут при RT, периодически встряхивая

- Центрифугировали 15 минут при 12 000 g и $t = +4^{\circ}\text{C}$
- Отбирали верхнюю водную фазу в пробирку типа Эппендорф, избегая переноса интерфазы
 - В водную фазу добавляли 500 мкл 100% изопропанола, на каждый 1 мл реагента «ExtractRNA»
 - Инкубировали смесь 10 минут при RT
 - Центрифугировали образцы 10 минут на 12 000g при RT
 - Удаляли супернатант
 - К осадку добавляли 1 мл 75% этанола
 - Центрифугировали образцы 5 минут на 12 000g при RT
 - Удаляли этанол
 - Осадок высушивали под тягой в течение 5-7 минут
 - Для растворения РНК добавляли 20-30мкл dH_2O , нагретой до $t = +60^{\circ}\text{C}$ и перемешивали пипетированием.

Выделенную РНК хранили при -80°C . Качество РНК определяли спектрофотометрически по соотношению показателей OD260/280 и OD260/240, а также с помощью электрофореза в агарозном геле в камере Mini-Sub Cell GT (BioRad, США) с источником напряжения PowerPac Basic (BioRad). В работе использовали образцы со значениями OD260/280=1.8-2.0 и OD260/240= 2.0-2.2.

2.2.2.2. Очистка тотальной РНК от полисахаридов

При работе с листьями взрослых растений проводили очистку РНК от полисахаридов. После этапа удаления этанола в протоколе 2.2.2.1, добавляли следующие этапы:

- К осадку, содержащему РНК добавляли 1 мл 3М ацетата натрия 3-х водного (ХЧ, Вектон, Россия) ($\text{pH} = 5.2$), перемешивали на вортексе Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia) и инкубировали 5 минут на льду
 - Центрифугировали 10 минут при 12 000g и $t = +4^{\circ}\text{C}$
 - Удаляли супернатант

Далее продолжали выделение РНК как описано в 2.2.2.1.

2.2.2.3. Электрофорез РНК в агарозном геле

Электрофоретическое разделение РНК проводили в 1% агарозном геле на основе буфера ТАЕ с добавлением интеркалирующего красителя 0.3 мкг/мл этидиум бромида EtBr (БиолоТ, Россия) в течение 30 минут и напряжении 80В в камере Mini-Sub Cell GT (BioRad, США) с источником напряжения PowerPac Basic (Bio Rad). Гель-документацию проводили с помощью системы Gel Doc XR (Bio Rad, США).

ТАЕ буфер (рН 8.0):

- 40 mM Tris (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 1 mM Na₂EDTA (ЧДА, Reanal, Венгрия)
- 20 mM трихлоруксусная кислота (имп, Ленреактив)

2.2.2.4. Определение концентрации нуклеиновых кислот

Для измерения концентрации РНК использовали набор реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Q10211). Образцы и стандарты выдерживали при комнатной температуре в течение 5 минут, после чего производили измерения на Qubit 4 (ThermoFisher Scientific), согласно инструкции производителя.

2.2.2.5. Очистка тотальной РНК и постановка обратной транскрипции

Для удаления примесей геномной ДНК из полученных образцов тотальной РНК применяли обработку ДНКазой. Из каждого образца отбирали объем, содержащий 1мкг РНК и доводили до 8мкл dH₂O. К образцу добавляли 1 мкл 10x буфера для ДНКазы I, 1мкл ДНКазы I (ThermoFisher Scientific, Maxima First Standart cDNA Synthesis Kit, K1672) и инкубировали при 37°C 30 минут. По истечении этого времени образцы переносили на лед.

Процедуру синтеза кДНК проводили согласно рекомендациям производителя с использованием Maxima First Standart cDNA Synthesis Kit (K1672, ThermoFisher).

Готовили Master Mix из расчета на 1 образец:

- 4 мкл 5x Reaction Mix
- 2 мкл Maxima Enzyme Mix
- 4 мкл dH₂O

Смесь перемешивали на вортексе Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia) и добавляли к 10 мкл обработанной ДНКазой РНК. Инкубировали 10 мин при 25°C для активации фермента и 30 мин при 50°C на ThermoShaker TS-100 (BioSan, Латвия) для синтеза

кДНК. Инактивацию фермента проводили на термоблоке при 85°C в течение 5 минут, после чего образцы сразу переносили на лед до полного остывания икратно центрифугировали. Образцы хранили при -80°C.

2.2.2.6. Полимеразная цепная реакция

Для проверки качества очистки РНК и синтезированной кДНК ставили ПЦР с праймерами к убиквитину (табл.3). Из набора для проведения ПЦР (Синтол, Россия) готовили Master Mix из расчета на 1 реакцию:

- 0,25 мкл ДНК-полимеразы Taq (Синтол, 5 е.а./мкл)
- 2 мкл 10х буфера для ДНК-полимеразы
- 0,16 мкл dNTPs (25мМ)
- 1 мкл 5'- праймера (10пкмоль/мл)
- 1 мкл 3'- праймера (10пкмоль/мл)

В каждую пробирку типа Эппендорф с реакционной смесью добавляли по 1 мкл (5нг) ДНК/РНК и доводили объем до 20мкл. ПЦР проводили с в амплификаторе Thermal Cycler C1000 (BioRad, США). Программа состояла из следующих этапов:

- 1) Денатурация матрицы при 95°C – 5мин;
- 2) 34 цикла из:
 - а) Денатурация ДНК при 95°C – 30с;
 - б) Отжиг при 52°C – 30с;
 - в) Элонгация при 72°C – 75.;
- 3) Завершение синтеза ДНК при 72°C – 5мин

2.2.2.7. ПЦР в реальном времени

При постановке ПЦР-РВ использовали 10нг кДНК на 1 реакцию. Готовили Master Mix с использованием реагентов (Синтол, R-402), из расчета на 1 реакцию:

- 0,125 мкл ДНК-полимеразы Taq (Синтол, 5 е.а./мкл)
- 1 мкл 10х ПЦР-буфер + SYBR Green
- 1 мкл dNTPs (2,5мМ)
- 1 мкл MgCl₂
- 0,3 мкл 5'- праймера (10пкмоль/мл) (Евроген)
- 0,3 мкл 3'- праймера (10пкмоль/мл) (Евроген)
- 4,275 мкл dH₂O.

ПЦР в реальном времени проводили на Eco Real-Time PCR system (Illumina, США). Программа включала следующие этапы:

- 1) Стадия активации полимеразы при 50°C - 10мин
- 2) 42 цикла амплификации:
 - а) Денатурирование днк при 95°C – 15с;
 - б) Отжиг праймеров при $t=(T_m + 2^\circ\text{C}) - 30\text{с}$;
 - в) Элонгация при 72°C – 30с
- 3) Построение кривых плавления:
 - а) 95°C – 15с;
 - б) 55°C – 15с;
 - в) 95°C – 15с.

Для работы использовали только те пары праймеров, которые при предварительном тестировании давали один продукт при амплификации и имели эффективность $\geq 95\%$. Для расчета уровня экспрессии генов использовали следующую формулу: $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen T.D., Livak K.J., 2008). Праймеры, использованные в работе, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности праймеров для ПЦР и РВ-ПЦР.

Обозначения: Y=C/T, R=G/A.

| Ген | Праймер | Последовательность (5'-3') | Tm |
|------------------------|------------------|----------------------------|--------|
| Вырожденные праймеры | | | |
| Праймеры к убиквитину | | | |
| | Ubi(DKN)-forward | ATGCGATYTTTGTGAAGAC | - |
| | Ubi(DKN)-reverse | ACCACCACGRAGACGGAG | - |
| Специфические праймеры | | | |
| Референсные праймеры | | | |
| AT3G18780 | AtAct2- forward | TCCTCTCCGCTTTGAATT | 47,8°C |
| | AtAct2-reverse | CCAGCCTTCACCATACCG | 52,6°C |
| AT3G01090 | AtKIN10- forward | ACCACCTCATCGAATCGCTC | 55°C |
| | AtKIN10-reverse | GGATGAGCCCGAGACTGAAG | 60°C |
| AT3G29160 | AtKIN11- forward | ATTCTCGGATCTACTCCAAGACG | 47,8°C |
| | AtKIN11-reverse | ATCTCCCTCCTCACTTTCTCT | 47,6°C |

| | | | |
|-----------|-------------------------|-------------------------|--------|
| AT1G12000 | AtPFK2- forward | TTTGTCTGGAGGTCAGGCAC | 53,8°C |
| | AtPFK2-reverse | CACCGATAACCACCAACCCA | 53,8°C |
| AT2G36580 | AtPrK2- forward | AGCTTTAGCGGAGCCTTTGA | 51,8°C |
| | AtPrK2- reverse | AAGACCGAGACAACGACTCAC | 54,4°C |
| AT2G47510 | AtFum2- forward | CCGTCTTCCAAGTTTTACTGTCA | 53,5°C |
| | AtFum2- reverse | CCTTGGCAGCGCATTCTTC | 53,8°C |
| AT5G11670 | AtNADP-ME1- forward | CGTCTACGGTGAGGATTCCG | 55,9°C |
| | AtNADP-ME1- reverse | CGCTGCAGAGGAACAGTGTA | 53,8°C |
| AT3G17820 | AtGIS2- forward | GAGTGGGACGTGACACAGAG | 55,9°C |
| | AtGIS2- reverse | CGAGTATGGTCGTCTCAGCG | 55,9°C |
| AT5G07440 | AtGDH2_2- forward | AGCGAGCTTGAGAGGTTGAC | 53,8°C |
| | AtGDH2_2- reverse | AAGAAGAGCTTCGGTGGCAA | 51,8°C |
| AT5G53460 | AtNADH_GLT1- forward | TTTAAGGCCGAGTATGGCCG | 53,8°C |
| | AtNADH_GLT1- reverse | ACGCCTGTGTGTCCTCTAAA | 51,8°C |
| AT1G66200 | AtCglutS1- forward | TTGTACCGGTTGACACTGCC | 53,8°C |
| | AtCglutS1- reverse | ACGCAACGATCTTGTGAGTC | 51,8°C |
| AT1G37130 | AtNIA2_1- forward | AACAGCAACGCCGTGTA | 51,8°C |
| | AtNIA2_1- reverse | ATTGGGCTTTAGGGACGTGG | 53,8°C |

2.2.3. Методы работы с белками

2.2.3.1. Выделение суммарного белка из растительной ткани

Растворимую фракцию суммарного белка выделяли из навески растительного материала массой 200мг по протоколу (Shen H. et al., 2008) с небольшими модификациями. Навеску гомогенизировали в жидком азоте с добавлением Polyclar AT (Serva, Germany), добавляли 100 мкл предварительно охлажденного буфера MOPS (pH 7.6), содержащего 100 мМ MOPS (Ultra Pure Grade, Helicon), 100 мМ NaCl

(ХЧ, Ленреактив), 5% натрий додецилсульфат (SDS, Biotechnology Grade, Helicon), 0,5% β -меркаптоэтанол (Ferak Berlin, Germany), 10% глицерин (Ч, Реахим), 1 мМ левамизол (Sigma-Aldrich, Germany), 1 мМ фторид натрия (Sigma-Aldrich, Belgium), 2 мМ фенилметилсульфонил фторид (PMSF, HiMedia Laboratories, Индия), коктейль ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Switzerland) и оттаивали при постоянном помешивании на вортексе Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia). Гомогенат инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, затем в течение 4 минут при 90°C и переносили на лед. Центрифугировали на Sigma 1-14K (Sigma, Германия) в течение 8 мин при 12 000g и +4°C. Супернатант переносили в новую пробирку и хранили при -80°C.

2.2.3.2. Денатурирующий электрофорез белков в ПААГ

Разделение экстрагированных белков проводили методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидных гелях (Laemmli, 1970). Для этого предварительно собирали кассеты из обработанных 70% спиртом стеклянных пластин и силиконовых уплотнителей. Готовили растворы для разделяющего и концентрирующего гелей. Непосредственно перед заливкой геля в кассету добавляли полимеризаторы ТЕМЕД и персульфат аммония и перемешивали на вортексе Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia) в течение 10 с. Разделяющий гель в кассету заливали до расстояния 2 см от верхнего края гребня. Для образования ровной поверхности на разделяющий гель пипеткой Пастера наносили изопропанол (ХЧ, Вектон, Россия). После окончания полимеризации изопропанол удаляли, а поверхность промывали dH₂O. К раствору концентрирующего геля добавляли ТЕМЕД и персульфат аммония, перемешивали и заливали в кассету. Сразу после заливки в раствор концентрирующего геля вставляли гребенку для формирования карманов и оставляли до полной полимеризации.

Состав разделяющего геля:

- 0,375 М Tris-HCl (pH 8.8) (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 12% (м/об) акриламид (BioRad, США)
- 0,32% (м/об) бисакриламид (BioRad, США)
- 0,1% (м/об) SDS (Biotechnology Grade, Helicon)
- 0,1% (м/об) персульфат аммония (BioRad, США)
- 0,1% (м/об) ТЕМЕД (AppliChem, США)

Состав концентрирующего геля:

- 0,125 М Tris-HCl (pH 6.8) (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 4,8% (м/об) акриламид (BioRad, США)
- 0,13% (м/об) бисакриламид (BioRad, США)
- 0,1% (м/об) SDS (Biotechnology Grade, Helicon)
- 0,05% (м/об) персульфат аммония (BioRad, США)
- 0,2% (м/об) TEMED (AppliChem, США)

Кассеты помещали в камеру для электрофореза Mini-Protean (BioRad Laboratories, США) и заливали до отметки трис-глициновым электрофорезным буфером. В лунки концентрирующего геля наносили по 20 мкл образцов или 5 мкл маркера Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, США). Электрофорез проводили в два этапа, сначала 25 минут при 80В, а затем 2 часа при 120Вс помощью источника тока PowerPac HC (BioRad Laboratories, США). По окончании электрофореза концентрирующий гель удаляли, а разделяющий гель переносили в контейнер с dH₂O и инкубировали в течение 10 с.

Буфер для электрофореза (pH 8.8):

- 25мМ Tris (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 192мМ глицин (Pharma grade, Panreac)
- 0,1% SDS (Biotechnology Grade, Helicon)

2.2.3.3. Вестерн-блоттинг

Для проведения вестерн-блоттинга использовали мембрану из поливинилиденфторида Immun-Blot PVDF Membrane (BioRad Laboratories, США). Мембрану вырезали по размеру геля, активировали инкубацией в 100% метаноле (ХЧ, Вектон, Россия) в течение 10 с, промывали при активном покачивании на шейкере 10 мин в dH₂O и в 30 минут в буфере для переноса. Гель после промывки в воде инкубировали 10 минут в буфере для переноса при покачивании на шейкере.

Перенос белка с геля на PVDF мембрану осуществляли полусухим методом в Trans-Blot Turbo Blotting System (BioRad, США). Для переноса собирали «сэндвич», состоящий из 4 листов бумаги 3ММ (Whatman, Millipore), смоченных в буфере для переноса, PVDF-мембраны, геля и еще 4 листов бумаги 3ММ. Удаляли избыток

буфера пипеткой Пастера. Перенос осуществляли в течение 38 мин при силе тока 0,2А.

Буфер для переноса (рН 8.8):

- 25 мМ Tris (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 192 мМ глицин (Pharma grade, Panreac)
- 0,1% SDS (Biotechnology Grade, Helicon)
- 10% (об/об) метанол (ХЧ, Вектон)

Для контроля полноты перехода белка из геля на мембрану гели после процедуры переноса переносили в пластиковый контейнер (или чашку Петри) и окрашивали Кумасси (п. 2.2.3.4). Мембрану после переноса кратно промывали в dH₂O, затем в 100% метаноле и высушивали в вытяжном шкафу на чистой бумаге 3ММ в течение 15-20 мин. Для проверки качества переноса белка мембрану окрашивали красителем Понсо (п.2.2.3.5).

Высушенную мембрану активировали в 100% метаноле (10 с), затем промывали в dH₂O (10 с) и инкубировали в течение 12 ч в соответствующем для первичного антитела блокирующем буфере либо с обезжиренным сухим молоком Blotto (Santa Cruz Biotechnology, США), либо с бычьим сывороточным альбумином BSA (protease free, Sigma, SLCH3826) на основе TBS-T.

Для определения уровня фосфорилированности субстрата TOR – S6K1 были использованы первичные антитела против S6K1/2 (AS12 1855; Agrisera), фосфорилированной формы этой киназы по одному из сайтов фосфорилирования TOR phospho-S6K1 (T449) (ab207399; Abcam). Для детекции референсного белка гистона H3 использовали антитела AS10710 (Agrisera). После блокирующего буфера мембраны переносили в первичные антитела. Для антител S6K1/2 использовали разведение 1:10000, а мембрану инкубировали 1 ч 30 мин при комнатной температуре. Для антител phospho-S6K1 использовали разведение 1:1000, а мембрану инкубировали 12 ч при +4°C. По истечении времени инкубации каждую мембрану переносили в буфер, содержащий антитела к гистону в соотношении 1:5000, на 1 ч 30 мин при комнатной температуре. Далее мембраны промывали 4 раза по 6 минут в TBS-T и инкубировали в течение 1 часа во вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP-conjugated antibodies, AS09602, Agrisera), разведенных в соотношении 1:10000.

Буфер TBS-T (pH 7.5):

- 50 mM Tris-HCl (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 150 mM NaCl (ХЧ, Ленреактив)
- 0,1% (об/об) Tween 20 (Reagent grade, Helicon)

Блокирующий буфер:

- Для антител к S6K1/2 – 2,5% Blotto, non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology, США) в TBS-T
- Для антител к phospho S6K1/2 – 5% BSA в TBS-T
- Для антител к H3 – 2,5% Blotto, non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology, США) в TBS-T или 5% BSA (protease free, Sigma, SLCH3826) в TBS-T

Для хемилюминесцентной детекции вторичных антител использовали проявляющий раствор SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, США), содержащий люминол - субстрат пероксидазы хрена. Раствор равномерно наносили на всю поверхность мембраны и инкубировали в течение 5 минут. Затем избыток жидкости удаляли и производили съемку мембраны с использованием системы визуализации iBright FL1500 (ThermoFisher). Количественный анализ проводили с помощью программного обеспечения iBright Analysis Software. На первом этапе анализа производили коррекцию интенсивности сигнала бендов белка на уровень фона методом катящегося шарика с использованием оптимального радиуса шарика, подобранного вручную для исследуемого изображения. На втором этапе проводили двойное нормирование сигнала – на общий белок и на бэнды референсного белка.

2.2.3.4. Окрашивание ПААГ-геля Кумасси G-250

Полноту переноса белка проверяли окрашиванием геля Кумасси Brilliant G-250. Гель помещали в раствор Кумасси и кипятили в течение 30 с в микроволновой печи, после чего инкубировали 15 минут при помешивании до полного остывания. Далее гель переносили в обесцвечивающий раствор и так же кипятили 30 с. Затем гель инкубировали в обесцвечивающем растворе до получения прозрачного фона.

Раствор Кумасси:

- 20% (об/об) метанол (ХЧ, Вектон, Россия)

- 10% (об/об) ледяная уксусная кислота (ХЧ, Вектон, Россия)
 - 0,1% (об/об) бриллиантовый голубой Кумасси G-250 (имп., Вектон)

Обесцвечивающий раствор:

- 20% (об/об) метанол (ХЧ, Вектон, Россия)
- 10% (об/об) ледяная уксусная кислота (ХЧ, Вектон, Россия)

2.2.3.5. Окрашивание PVDF-мембраны Ponceau S

Для проверки качества переноса белка мембрану окрашивали красителем Ponceau S (High Purity Grade, Helicon). Для этого мембрану инкубировали при покачивании на качалке Mini Rocker-Shaker MR-1 (Biosan, Latvia) в течение 10 с в 100% метаноле, 5 мин в 0,2% растворе Ponceau S (далее Понсо) в 5% уксусной кислоте, и снова в 100% метаноле до проявления белковых бендов. Мембрану высушивали в вытяжном шкафу и фотографировали на iBright FL1500 (ThermoFisher, USA).

2.2.3.6. Построение зависимости интенсивности сигнала от концентрации белка и поиск линейного диапазона изменения концентраций

Для оптимизации условий вестерн-блоттинга и получения интенсивного сигнала Phospho-S6K было проведено определение линейного диапазона изменения концентрации белка. Гель с загрузкой белкового экстракта корней проростков в четырех концентрациях 20, 15, 10, 5 мкл (слева направо соответственно) приведен на рис. 6а,б.

Аналогичные процедуры по оптимизации условий вестерн-блоттинга и получения интенсивного сигнала были проведены для белков S6K1 и H3 (рис. 7 и 8). Проведено определение диапазона концентрации белка для получения интенсивного сигнала на гелях с серийным разведением белкового экстракта корней проростков (20, 15, 10, 5 мкл слева направо соответственно) (рис. 7б и рис. 8б).

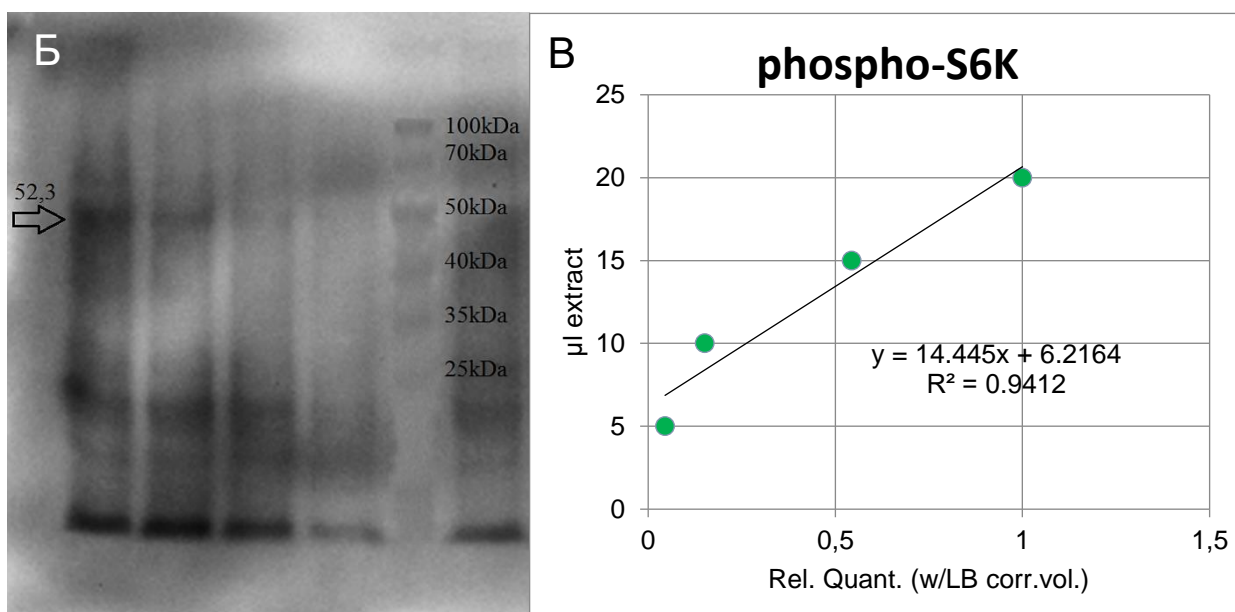
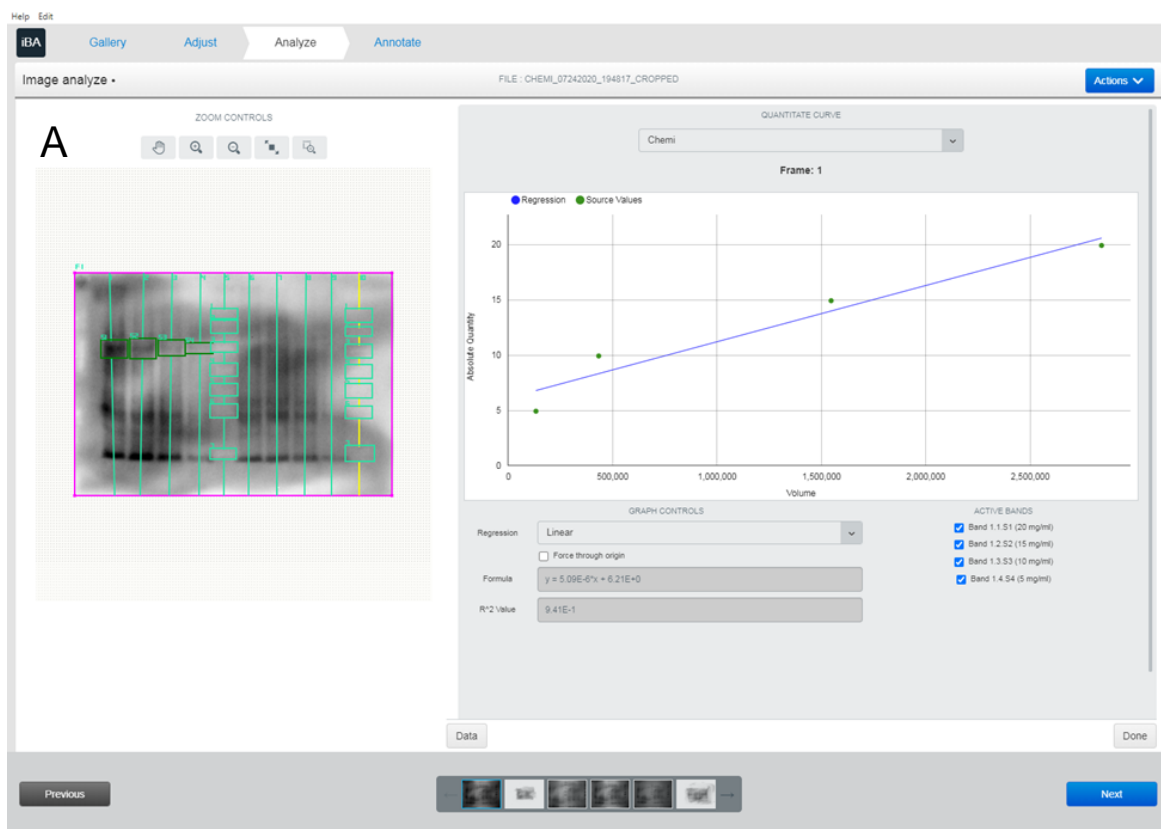


Рис. 6. Определение линейного диапазона изменения концентрации белка Phospho-S6K1. В качестве первичного антитела использовали антитело против фосфорилированной формы S6K1 (Phospho-T449) ab207399 (Abcam). Инкубация в антителах и промывка осуществлялись, согласно пп. 2.2.3.3. Получение сигнала было произведено с использованием детектирующего набора WestDura SuperSignal (ThermoFisher) и системы визуализации iBright FL1500 (ThermoFisher). Изображения были обработаны с помощью программного обеспечения iBright Analysis. А, принтскрин рабочего окна ПО iBright FL1500, показывающий бенды белка интереса и маркера молекулярного веса белков (слева) и график отношения уровня сигнала к количеству белка интереса (справа); Б, фрагмент геля, представленного на А,

который использовался для дальнейшего автоматического анализа с коррекцией на сигнал фона с использованием программного обеспечения iBright Analysis; **В**, график отношения уровня нормализованного сигнала после дополнительной коррекции (вычитание фона методом «катящегося шара») (ось X) к объему загруженного белкового экстракта (ось Y).

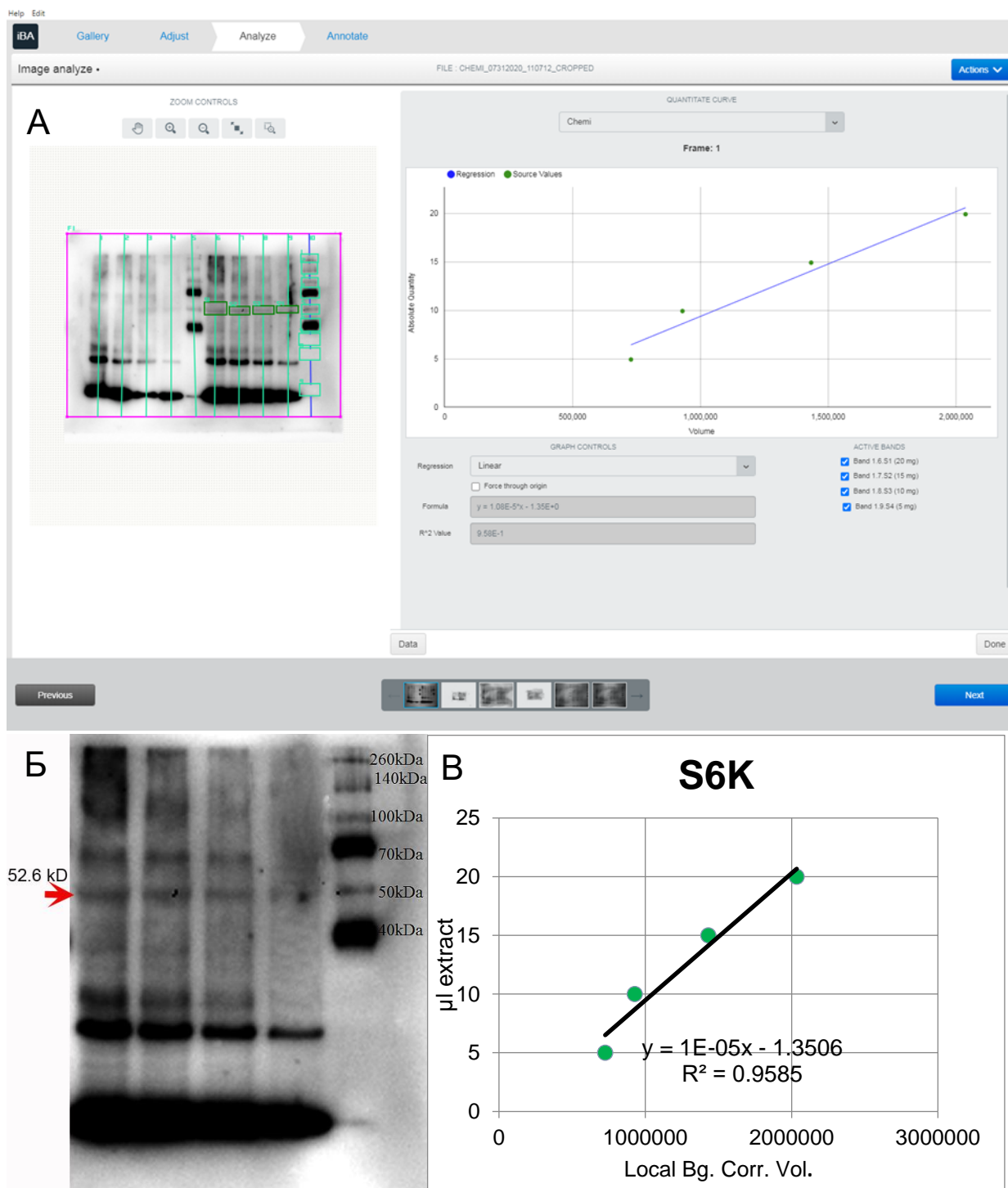


Рис. 7. Определение линейного диапазона изменения концентрации белка S6K1. В качестве первичного антитела использовали антитело против S6K1 Anti-S6K1 antibody AS12 1855 (Agrisera). Инкубация в антителах и промывка

осуществлялись, согласно пп. 2.2.3.3. Получение сигнала было произведено с использованием субстрата WestDura SuperSignal (ThermoFisher) и системы визуализации iBright FL1500 (ThermoFisher). Изображения были обработаны с помощью программного обеспечения iBright Analysis. **А**, принтскрин рабочего окна ПО iBright FL1500, показывающий бенды белка интереса и маркера молекулярного веса белков (слева) и график отношения уровня сигнала к количеству белка интереса (справа); **Б**, фрагмент геля, представленного на **А**, который использовался для дальнейшего автоматического анализа с коррекцией на сигнал фона с использованием программного обеспечения iBright Analysis; **В**, график отношения уровня нормализованного сигнала после дополнительной коррекции (вычитание фона методом «катящегося шара») (ось X) к объему загруженного белкового экстракта (ось Y). Необходимо отметить, что данная мембрана первично инкубировалась для детекции белка гистона H3, как описано в пп 2.2.3.3. После экспозиции мембрану промывали TBS-T (четыре раза по 5 мин) и использовали для детектирования S6K.

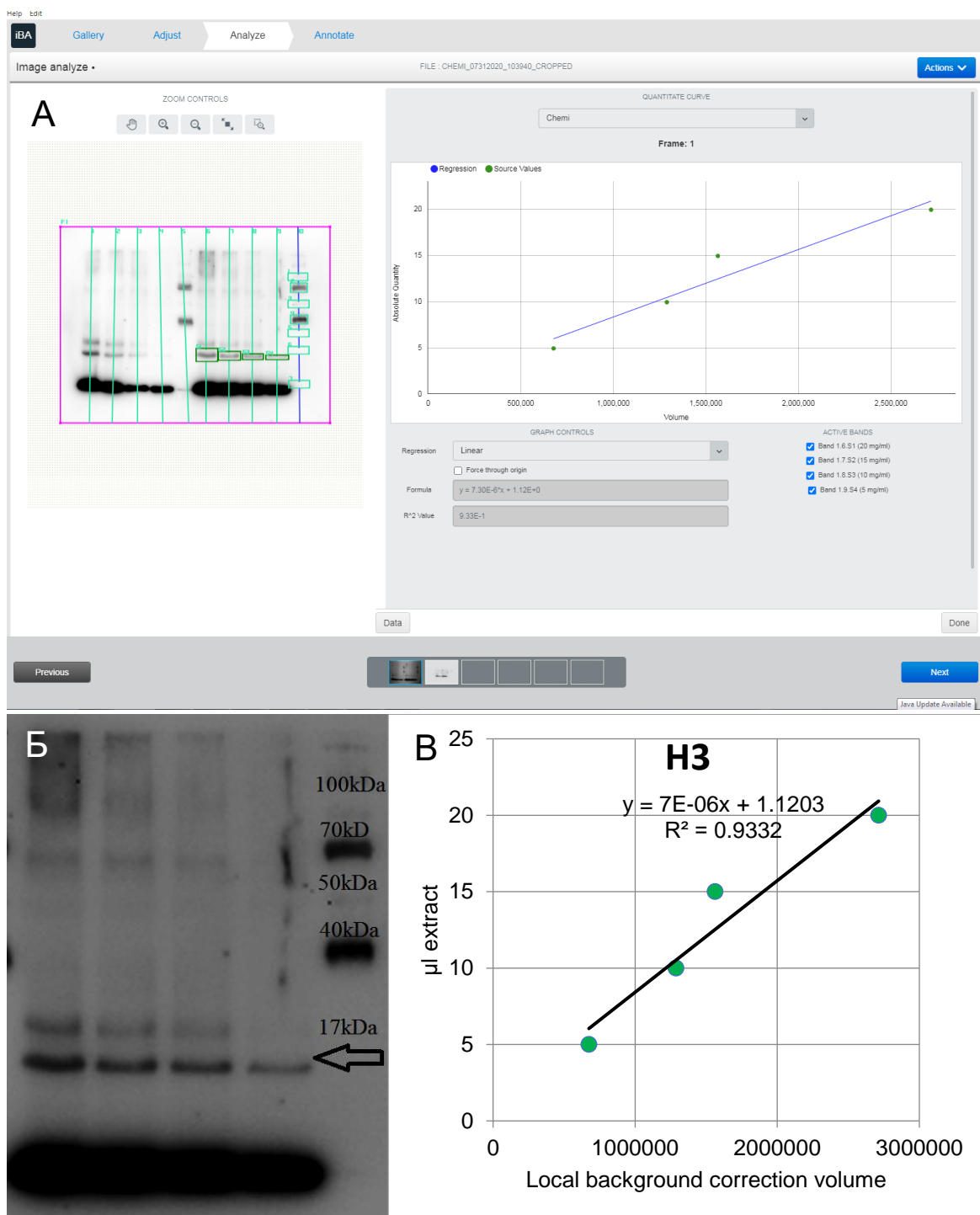


Рис. 8. Определение линейного диапазона изменения концентрации белка гистона H3. В качестве первичного антитела использовали антитело против Anti-H3 antibody AS10710 (Agrisera). Инкубация в антителах и промывка осуществлялись, согласно пп. 2.2.3.3. Получение сигнала было произведено с использованием субстрата WestDura SuperSignal (ThermoFisher) и системы визуализации iBright FL1500 (ThermoFisher). Изображения были обработаны с помощью программного обеспечения iBright Analysis. **А**, принтскрин рабочего окна ПО iBright FL1500, показывающий бенды белка интереса и маркера молекулярного веса белков (слева) и график отношения уровня сигнала к количеству белка интереса (справа); **Б**, фрагмент геля, представленного на **А**, который использовался для дальнейшего

автоматического анализа с коррекцией на сигнал фона с использованием программного обеспечения iBright Analysis; **В**, график отношения уровня нормализованного сигнала после дополнительной коррекции (вычитание фона методом «катящегося шара») (ось X) к объему загруженного белкового экстракта (ось Y). Необходимо отметить, что эту мембрану вторично инкубировали для обнаружения S6K, как описано в пп 2.2.3.3.

2.2.3.7. Определение эффективных концентраций ингибиторов TOR

Для поиска действующей концентрации ингибитора TOR проростки *Arabidopsis*, со сверхэкспрессией S6K выращивали на среде К/сахароза в течение девяти дней. Затем проростки инкубировали в буфере с добавлением AZD8055 (AZD) до конечной концентрации 0,5–10 мкМ, как указано на рис. 9, в присутствии либо в отсутствие рапамицина (конечная концентрация 1 мкМ). Время инкубации составляло 24 часа. В качестве контроля использовали общий белковый экстракт, из проростков, взятых непосредственно из чашек со средой. Количество наносимых экстрактов в лунки геля было идентичным. Разделяли электрофорезом и осуществляли блоттинг как указано в пп.2.2.3.2-2.2.3.3 с антителами S6K1 (phospho-T449) ab207399 (Abcam). Сигнал детектировали с помощью системы визуализации iBright FL1500 (ThermoFisher).

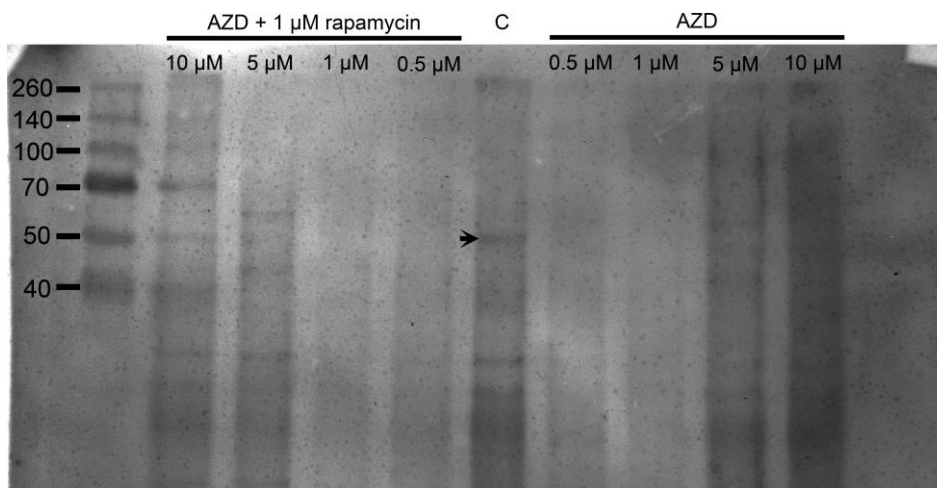


Рис. 9. Определение эффективных концентраций ингибиторов TOR. Для оценки ингибирования TOR были применены различные концентрации AZD8055 (AZD)/ AZD8055 (AZD)+рапамусин (1 мкМ). Стрелка указывает на полосу белка интереса (52 кДа). Цифры 40-260 обозначают молекулярную массу (кД) бендов многоцветной белковой лестницы маркера Spectra (ThermoFisher).

Инкубирующий буфер (рН 6.0):

- 100 мМ сорбитол (Ч, Вектон)

- 0,1 мМ КСl (ХЧ, Реактив)
- 0,1 мМ CaCl₂ (Ч, Вектон)
- 2 мМ Tris (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 1 мМ MES (Ultra Pure Grade, Helicon)

2.2.4. Определение уровня АТФ

АТФ-содержащие экстракты готовили по методу Lundin и Thore (1975) и Сурова с др., (2016) с небольшими модификациями. Навеску растительного материала массой 30 мг помещали в 1.5 мл пробирку типа Эппендорф и гомогенизировали микропестиком, непрерывно охлаждая пробирку в жидком азоте. К гомогенату добавляли двухкомпонентный буфер (0.51 М трихлоруксусная кислота (ТХУ, имп, Ленреактив), 17 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЧДА, Вектон)) в соотношении 2 мкл : 1 мг навески и инкубировали 15 мин на льду при +4°С в темноте. По истечению времени инкубации для нейтрализации ТХУ добавляли 9.24 мкл 3 М КОН. Экстракты центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g на центрифуге Sigma 1-14К (Sigma, Германия) и отбирали супернатант для анализа. Для определения содержания АТФ использовался набор ATP Determination Kit (A22066, ThermoFisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Измерения проводили на мультимодальном ридере Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoFisher, США). Детекцию интенсивности люминесценции люциферин-люциферазной реакции проводили на длине волны 560 нм. Абсолютное содержание АТФ в образцах рассчитывали с использованием калибровочной кривой (диапазон детектируемых концентраций от 0.1 нМ до 500 нМ) в программе SkanIt RE 6.1 Software (ThermoFisher, США).

2.2.5. Флуоресцентная микроскопия

2.2.5.1. Детекция и количественный анализ автофагосом с помощью окраски монодансилкадаверином

Растения, выращенные согласно п. 2.1.2.2, помещали корнями в буфер (200 мОсм), содержащий 0,05мМ монодансилкадаверина (MDC, Sigma-Aldrich) и инкубировали в течение 10 минут. Затем корни проростков дваждыкратно отмывались в буфере с идентичным составом без красителя и исследовали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии (Carl Zeiss Axio Imager.Z1, Германия) с использованием широкополосного фильтра для DAPI при возбуждении в диапазоне

длин волн светом 365/12 нм и детекцией эмиссии от 397 нм (Carl Zeiss, 488001-9901-000). Подсчет количества автофагосом проводили с использованием программного обеспечения ZEN (Zeiss, Германия) и UTHSCSA ImageTool for Windows version 3.0 (USA).

Буфер (рН 6.0, 200 мОсм):

- 30 мМ сахара (USP–NF grade, Helicon)
- 170 мМ сорбитол (Ч, Вектон)
- 0,1 мМ KCl (ЧДА, Реактив)
- 0,1 мМ CaCl₂ (Ч, Вектон)
- 2 мМ Tris (Ultra Pure Grade, Helicon)
- 1 мМ MES (Ultra Pure Grade, Helicon)

2.2.6. Импульсная флуориметрия

Измерения флуоресценции хлорофилла *a* проводили с помощью Dual-PAM 100 (Walz, Germany) на листьях взрослых растений, выращенных в грунте при поливе (согласно пп. 2.1.2.4 и 2.1.2.5). Перед анализом растения адаптировали к темноте в течение 1 часа.

2.2.6.1. Световые кривые

Изменение флуоресценции хлорофилла *a* и состояние ФСІ и ФСІІ оценивали через световые кривые. Для этого определяли F_0 (начальная флуоресценция) и F_m (максимальная флуоресценция) в темноте, а также P_m (максимальный сигнал P700, наблюдаемый при полном окислении ФСІ) после 5-секундного освещения дальним красным светом; за этим следовали 11 ступеней освещения актиничным красным светом (0, 18, 25, 34, 65, 107, 138, 228, 351, 543 и 837 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Продолжительность каждого шага составляла 30 секунд. Общее время записи световой кривой составляло 5 минут. В конце каждого этапа подавался насыщающий световой импульс длительностью 5000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ в течение 800 мс и определялся следующий набор параметров: фотохимический квантовый выход ФСІ, $Y(I)$; фотохимический квантовый выход ФСІІ, $Y(II)$; квантовый выход светоиндуцированного нефотохимического тушения флуоресценции, который соответствует регулируемому рассеянию энергии в ФСІІ, $Y(NPQ)$, и квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции в ФСІІ, $Y(NO)$.

$$Y(I) = 1 - Y(ND) - Y(NA)$$

$$Y(II) = \frac{F_m' - F_t}{F_m'}$$

$$Y(NO) = [NPQ + 1 + q_L * (F_m/F_0 - 1)]$$

$$Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO),$$

где F_m' - максимальная флуоресценция хлорофилла *a* в листьях, адаптированных к свету, F_t - стационарная флуоресценция, NPQ - нефотохимическое тушение, q_L - коэффициент фотохимического тушения, F_m - максимальная флуоресценция, F_0 - начальная флуоресценция в адаптированных к темноте листьях (Klughammer and Schreiber, 2008 а, б).

2.2.6.2. Электрохимический градиент на тилакоидных мембранах

Измерения проводили на Dual-PAM 100, оснащенном дополнительным P515/535 модулем, включающим в себя эмиттер Dual-EP515 и детектор Dual-DP515 (Walz, Германия). Эксперименты проводились с использованием протокола, описанного Дмитриевой и др. (Dmitrieva, 2021) на основе методов Шрайбера и Клюгхаммера (Schreiber, Klughammer, 2008; рис. 10). Сигнал поглощения P515 определяли двухлучевым методом на длинах волн 515 и 550 нм. Перед измерениями растения адаптировали к темноте в течение 1 часа. Для проведения измерений использовали скрипт. В начале скрипта программы включали измерительный источник света (PML, 515 и 550 нм) с интенсивностью $24 \mu E \text{ m}^{-2} \text{ c}^{-1}$ и подавали три насыщающих световых импульса по $5000 \mu E \text{ m}^{-2} \text{ c}^{-1}$ в течение 800 мс с интервалами в 30 с. Полученные кривые для каждого листа, использовали для расчета линейной скорости (V) и экспоненциальной скорости (g) синтеза АТФ согласно Сухов и др., 2016. После фазы восстановления, длившейся 10 с в темноте, включался актиничный красный свет ($630 \text{ нм}, 430 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ c}^{-1}$). После 10 мин освещения актиничный свет выключали, и в течение следующих 5 мин регистрировали кинетику быстрой релаксации электрохромного сдвига поглощения пигментов (ECS). Амплитуда относительного электрохромного сдвига (ECS_{pmf} , P515) и двух его компонентов, $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$, были оценены путем определения кинетики быстрой релаксации ECS. Снижение электрохимического градиента на тилакоидной мембране после

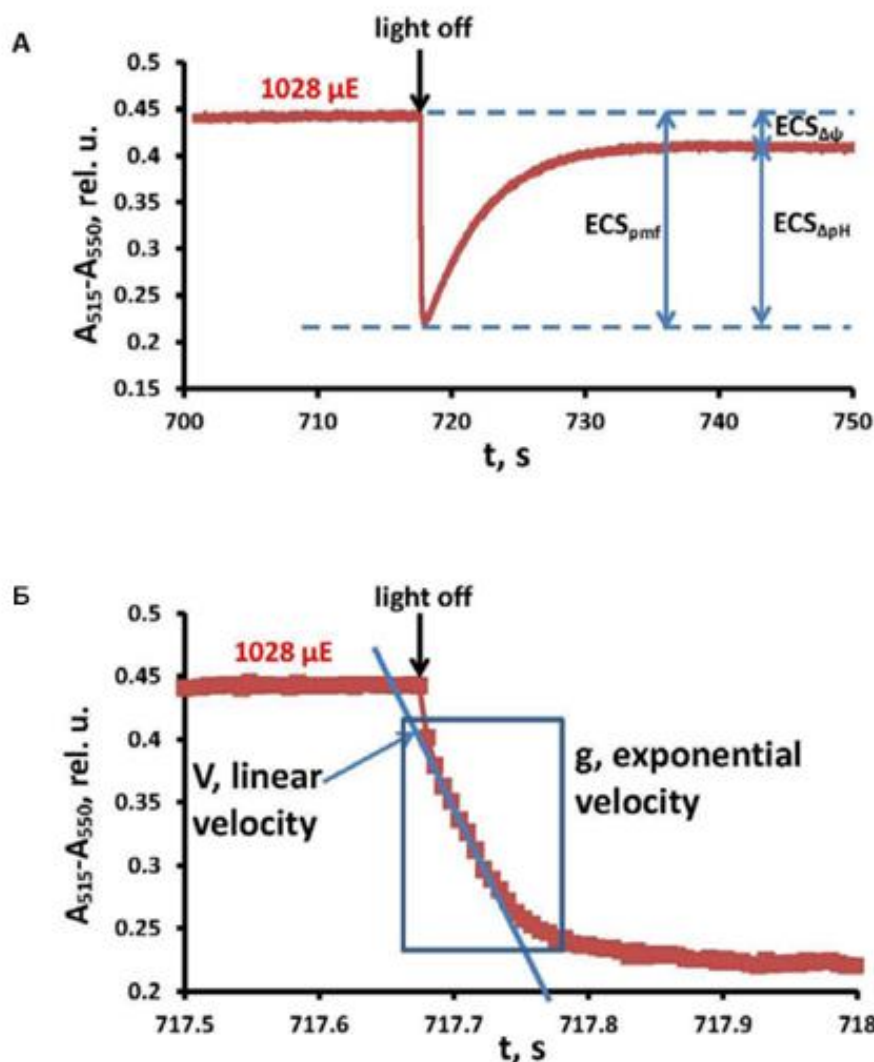


Рис. 10. Кинетика различий между поглощением света при 515 нм и 550 нм ($A_{515}-A_{550}$). Подавали актиничный красный свет интенсивностью 1028 мкЕ, который затем выключили (обозначено стрелками). После выключения света происходило быстрое снижение электрохимического градиента на тилакоидной мембране, которое коррелировало с уменьшением разницы в поглощении $A_{515}-A_{550}$ известной как электрохромный сдвиг. (А) Определение величин ECS_{pmf} (электрохромный сдвиг, пропорциональный движущей силе протонов), $ECS_{\Delta\psi}$ (электрохромный сдвиг, пропорциональный трансмембранному электрическому потенциалу) и $ECS_{\Delta pH}$ (электрохромный сдвиг, пропорциональный градиенту протонов по тилакоидной мембране). ECS_{pmf} можно разделить на компоненты $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$, поскольку в темноте восстановление сигнала происходит только за счет $ECS_{\Delta pH}$ (Сухов и др., 2016). (Б) Кривая, отображающая снижение разницы $A_{515}-A_{550}$ в ответ на выключение света. На этом увеличенном участке кривой определяют линейную (V) и экспоненциальную (g) скорости снижения ECS_{pmf} . Иллюстрации приведены из (Dmitrieva, 2021).

подачи насыщающего актиничного света коррелирует с разницей в поглощении A515-550 и является электрохромным сдвигом. В темноте компонент $ECS_{\Delta pH}$ восстанавливался, а разница между исходным уровнем поглощения света и уровнем после релаксации соответствовала $ECS_{\Delta \psi}$.

2.2.6.3. Скрипт для измерения электрохимического градиента и его компонентов

Program Start

Wait(s) =10

F ML-Int. =10

Wait(s) =1

P ML -Int =10

Wait(s) =1

SP Width = 800 ms

Wait(s) =1

AL -Int =13

Wait(s) =1

F ML On

Wait(s) =10

P ML On

Wait(s) =10

Balance

Wait(s) =10

Slow Kin. Acquisition Points = 512000

Wait(s) =1

Slow Kin Acquisition Rate = 2

Wait(s) =1

Slow Kinetics On

Wait(s) =2

Balance

Wait(s) =10

Begin of Repetition Block 02

I Wait(s) =15
I Sat-Pulse/Fast Kin.
I Wait(s) =15
End Repetition Block; Loops = 3
Wait(s) =10
AL On
Wait(s) =600
AL Off
Wait(s)=120
Slow Kinetics Off

2.2.7. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы R version 4.1.2 (2021-11-01) – “Bird Hippie” Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64. Достоверность различий в относительном уровне транскриптов генов интереса определяли с помощью t-критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0.05$. Достоверность различий между выборками по значениям других параметров оценивали методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки (Tukey HSD test) в программе R version 4.1.2 (2021-11-01) – “Bird Hippie” Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64, уровень значимости $P \leq 0.05$.

2.2.7.1. Скрипт для ANOVA с Tukey HSD test

В качестве примера представлен скрипт для сравнения данных площади листовой поверхности из файла ("R_Sshoot_4_medium.xlsx"), у проростков, выращенных на четырех типах сред ("Suc", "Glc", "low_K", "Glc_lowK").

```
library(Hmisc)
library(agricolae)
library(car)
library(openxlsx)
library(dplyr)
library(ggplot2)
```

```

Sshoot <- read.xlsx("R_Sshoot_4_medium.xlsx", sheet = 1)
Sshoot$variant <- factor(Sshoot$variant, levels = c("Suc", "Glc", "low_K", "Glc_lowK"))
Sshoot
str(Sshoot)
describe(Sshoot)
attach(Sshoot)
# boxplot
x11()
boxplot(rate ~ variant, las = 2, ylab = 'mm2')
bartlett.test(Sshoot ~ Variety)
#Тест Бартлетта применялся для определения отклонения распределения
полученных данных от нормального.
ana1 <- aov(rate ~ variant, data = Sshoot)
summary(ana1)
# Тест Шапиро использовался для проверки выбросов на соответствие
нормальному распределению.
shapiro.test(residuals(ana1))
#Постхок анализ
print(HSD.test(anova, "variant" ))
MultCompTest <- HSD.test( anova, trt = "variant", console = TRUE)
x11()
plot(MultCompTest)

```

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование влияние дефицита калия на активность киназы TOR и индукцию автофагии у проростков *Arabidopsis thaliana*

3.1.1. Влияние дефицита калия на морфометрические показатели проростков.

Для оценки влияния дефицита калия на ростовые показатели выращивали *Arabidopsis thaliana* экотипа Col-0 на 4 типах сред: 1) «K/Suc» - «нормальное содержание калия, сахароза»; 2) «K/Glc» - «нормальное содержание калия, глюкоза»; 3) «lowK/Suc» - «дефицит калия, сахароза»; 4) «lowK/Glc» - «дефицит калия, глюкоза» (п. 2.1.2.2). Измерения проводили на 11 сутки.

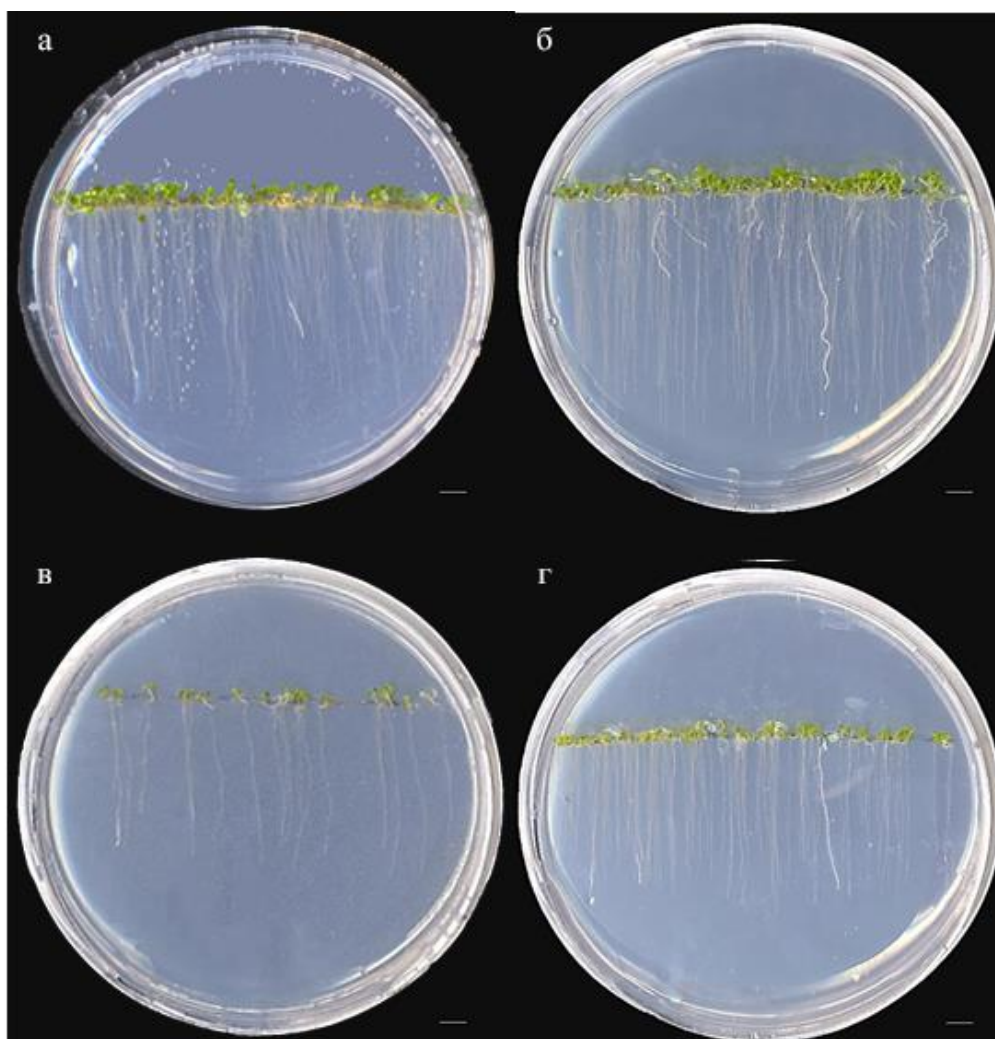


Рис. 11. Внешний вид проростков *Arabidopsis* линии Col-0 возрастом 11 суток, выращенных на средах с нормальным содержанием и дефицитом калия, а также с различным составом сахаров. а – нормальное содержание калия, сахароза; б – нормальное содержание калия, глюкоза; в – дефицит калия, сахароза; г – дефицит калия, глюкоза. Масштабная линейка 5мм.

Проростки, которые росли на средах с нормальным содержанием калия, имели более длинные корни и развитые побеги, а также у них визуально просматривалось большое количество корневых волосков (рис. 11 а,б). Проростки, выращенные на среде с нормальным содержанием калия и индуктором TOR-киназы - глюкозой, имели максимальные показатели длины корней (рис. 12). Значения этого параметра у растений, выращенных на среде с полным содержанием калия и сахарозой в качестве основного сахара, были близки к значениям у проростков со среды с нормальным содержанием калия и глюкозой. Значительное ингибирование роста корней наблюдалось у растений, выращенных на средах с дефицитом калия (рис. 11в,г). Измерения длины корня было проведено на 400 проростках для каждого варианта состава среды выращивания (n=400). Статистическая обработка результатов показала, что отличия по длине корня между растениями всех групп статистически достоверны (рис. 12).

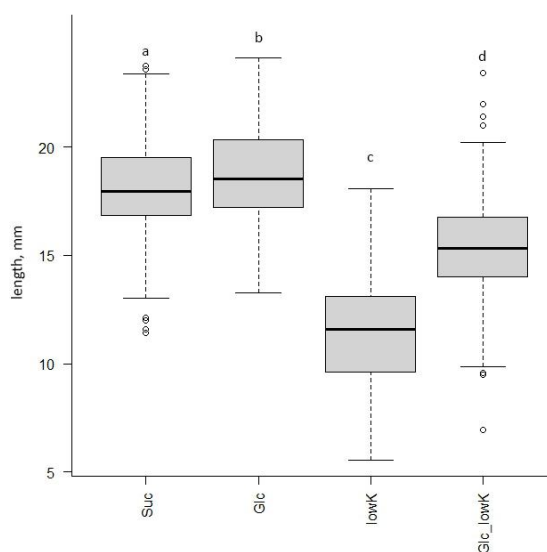


Рис. 12. Длина корней проростков *Arabidopsis* линии Col-0 возрастом 11 суток, выращенных на средах с нормальным содержанием и дефицитом калия, а также с различным составом сахаров. Suc – нормальное содержание калия, сахароза; Glc – нормальное содержание калия, глюкоза; lowK – дефицит калия, сахароза; Glc_lowK – дефицит калия, глюкоза. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений 150 измерений на каждый вариант среды по квартилям. Усы обозначают максимальные и минимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

Площадь листовой поверхности у проростков линии Col-0, выросших на средах с достаточным содержанием калия, но разным источником углерода (сахароза или глюкоза), статистически не отличалась (рис. 13). Дефицит калия приводил к достоверному снижению площади листовой поверхности, причем в наибольшей степени рост листьев был ингибирован при добавлении в питательную среду глюкозы (рис. 13). Для каждого типа среды было проведено измерение 150 проростков (n=150).

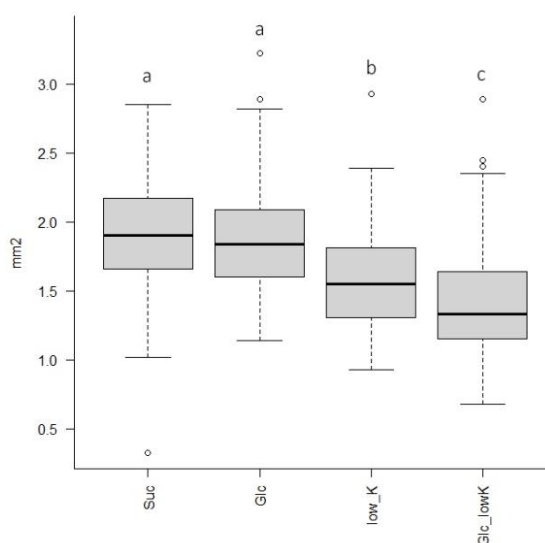


Рис. 13. Площадь поверхности листовой пластинки проростков *Arabidopsis* линии Col-0 возрастом 11 суток, выращенных на средах с нормальным содержанием и дефицитом калия, а также с различным составом сахаров. Suc – нормальное содержание калия, сахароза; Glc – нормальное содержание калия, глюкоза; low_K – дефицит калия, сахароза; Glc_lowK – дефицит калия, глюкоза. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений 150 измерений на каждый вариант среды по квартилям. Усы обозначают максимальные и минимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

3.1.2. Недостаток калия и энергетический обмен в клетках корней проростков

Для анализа влияния голодания по калию на энергетический обмен клеток определяли уровни АТФ в корнях 14-дневных проростков линии Col-0, выращенных на четырех типах сред согласно п. 2.2.4. Замена сахарозы в составе среды на глюкозу на фоне нормального уровня калия приводила к достоверному увеличению содержания АТФ в корнях проростков (рис. 14). Дефицит калия в среде

выращивания не приводил к снижению продукции АТФ у проростков, выращенных на среде с сахарозой, однако, достоверно снижал содержание АТФ у проростков, выращенных на среде с глюкозой (рис. 14).

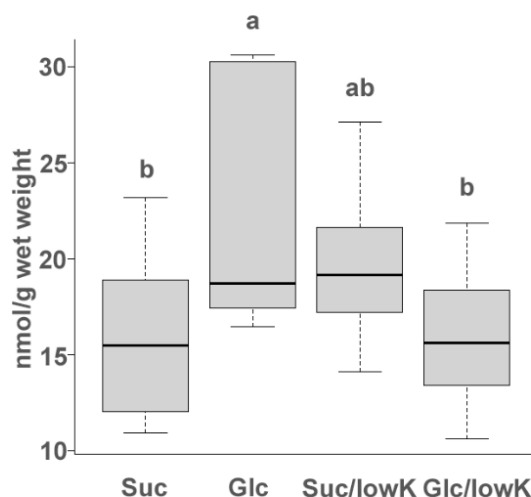


Рис. 14. Уровни АТФ в корнях проростков арабидопсиса Col-0, возрастом 14 суток, на средах с нормальным содержанием калия и с дефицитом калия, а также с различным составом сахаров. Suc – нормальное содержание калия, сахароза; Glc – нормальное содержание калия, глюкоза; Suc/lowK – дефицит калия, сахароза; Glc/lowK – дефицит калия, глюкоза. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений 6 биологических и 3 аналитических повторностей на каждый вариант среды (n=18) по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $P \leq 0,05$.

3.1.3. Роль калия в регуляции генов, кодирующих ферменты, участвующие в гликолизе, митохондриальном дыхании и ассимиляции азота

Чтобы определить влияет ли дефицит калия в среде выращивания на уровни экспрессии генов, кодирующие некоторые ферменты ассимиляции азота (*AT1G66200*, *AT1G37130*, *AT5G07440*, *AT3G17820*), гликолиза (*AT1G12000*) и метаболизма пирувата (*AT2G36580*), экстрагировали РНК и проводили пробоподготовку (п. 2.2.2.1-2.2.2.6) из корней 11-дневных проростков линии Col-0, выращенных на четырех различных средах и измеряли уровни экспрессии с помощью ПЦР-РВ (п. 2.2.2.7).

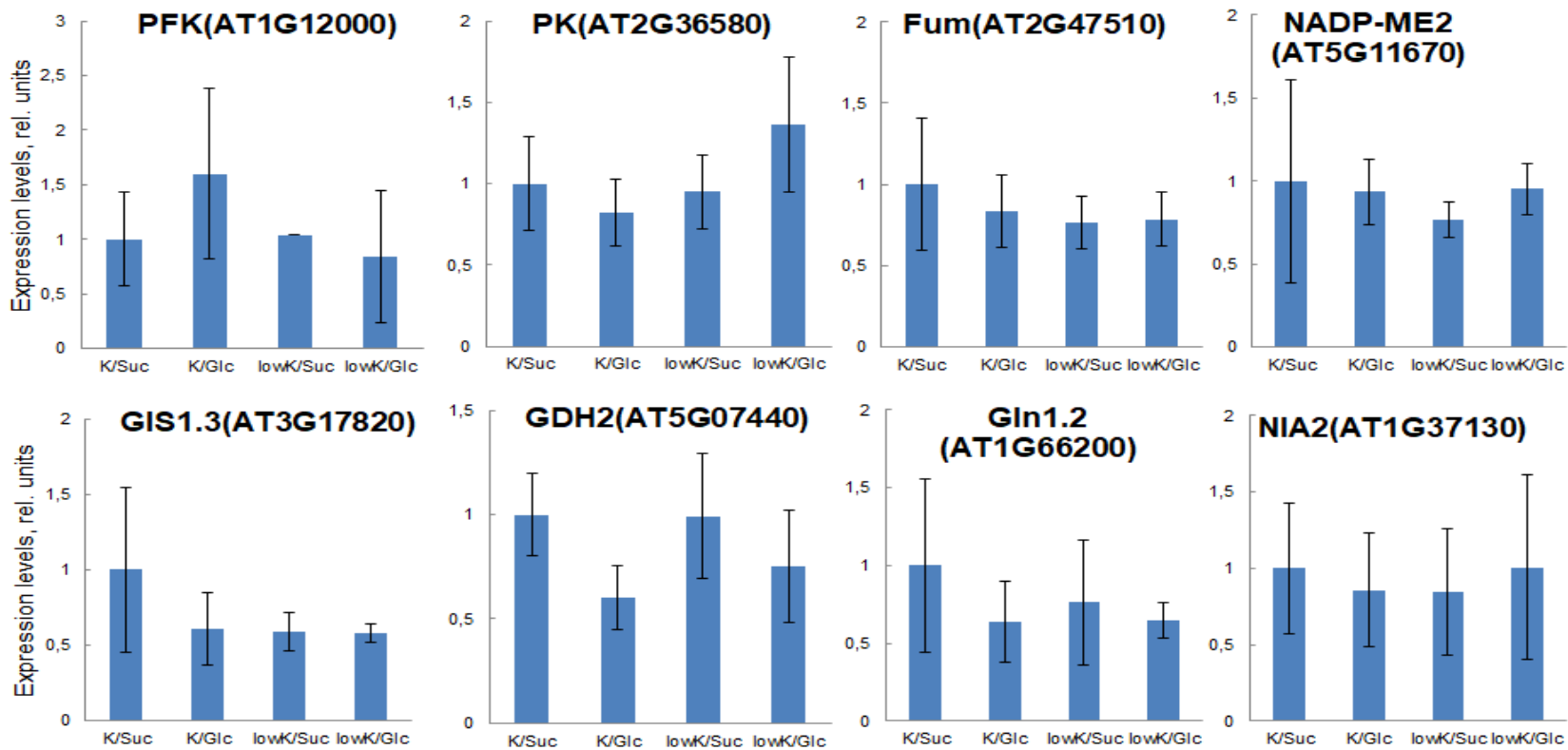


Рис. 15. Уровни экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза, митохондриального дыхания и ассимиляции азота у 11-дневных проростков Col-0, выращиваемых на средах с разным содержанием калия и сахаров. K/Suc – нормальное содержание калия, сахароза; K/Glc – нормальное содержание калия, глюкоза; lowK/Suc – дефицит калия, сахароза; lowK/Glc – дефицит калия, глюкоза. PFK – фосфофруктокиназа (*AT1G12000*); PK – пируваткиназа (*AT2G36580*); Fum – митохондриальная фумараза 1 (*AT2G47510*); NADP-ME2 – цитозольный НАДФ-малик энзим (*AT5G11670*); GIS 1.3 – цитозольная глутамин-синтетаза 1.3 (*AT3G17820*); GDH2 – митохондриальная глутамат дегидрогеназа 2 (*AT5G07440*); Gln1.2 – цитозольная глутаминсинтаза 1.2 (*AT1G66200*); NIA2 – нитрат-редуктаза 2 (*AT1G37130*).

Дефицит калия в среде выращивания не оказывал существенного влияния на изменения уровней экспрессии исследуемых генов (рис. 15), что позволяет предположить, что на этапе проростков основной причиной ингибирования активности пируваткиназы и других ферментов, участвующих в гликолизе и ассимиляции азота (Armengaud *et al.*, 2009) может выступать посттранскрипционная регуляция их активности.

3.1.4. Влияние дефицита калия в среде проращивания на деградацию общего белка проростков *Arabidopsis thaliana*

Чтобы выяснить вызывает ли дефицит K^+ в среде деградацию белка, и если да, то участвует ли в этом автофагия, провели эксперимент, в котором проростки линии Col-0 в течение 7 дней выращивали на контрольной среде («нормальный уровень калия, сахароза»), а затем на 2 дня переносили на среды с добавлением или без добавления ингибитора автофагии 3-метиладенина (3-МА), которые отличались как по содержанию калия, так и по наличию/отсутствию сахарозы (п. 2.1.2.3). Экстракцию тотального белка проводили согласно п. 2.2.3.1.

У проростков, перемещенных на контрольную среду с добавлением 3-МА наблюдались более выраженные белковые полосы, чем у проростков на контрольной среде без 3-МА, что свидетельствовало о протекании базального уровня деградации белка по механизму автофагии (рис. 16). Известно, что голодание проростков по сахарозе приводит к индукции автофагии и деградации белка по этому пути, и на геле соответственно наблюдалось исчезновение или ослабление большинства полос, но этот процесс ингибировался добавлением 3-МА (рис. 16). Проростки, перенесенные на экспериментальную среду с сахарозой и низким уровнем калия, также были подвержены деградации белка, которая подавлялась 3-МА (рис. 16). Таким образом, дефицит K^+ в питательной среде вызывает, деградацию белка в растительных клетках, которая опосредована автофагией.

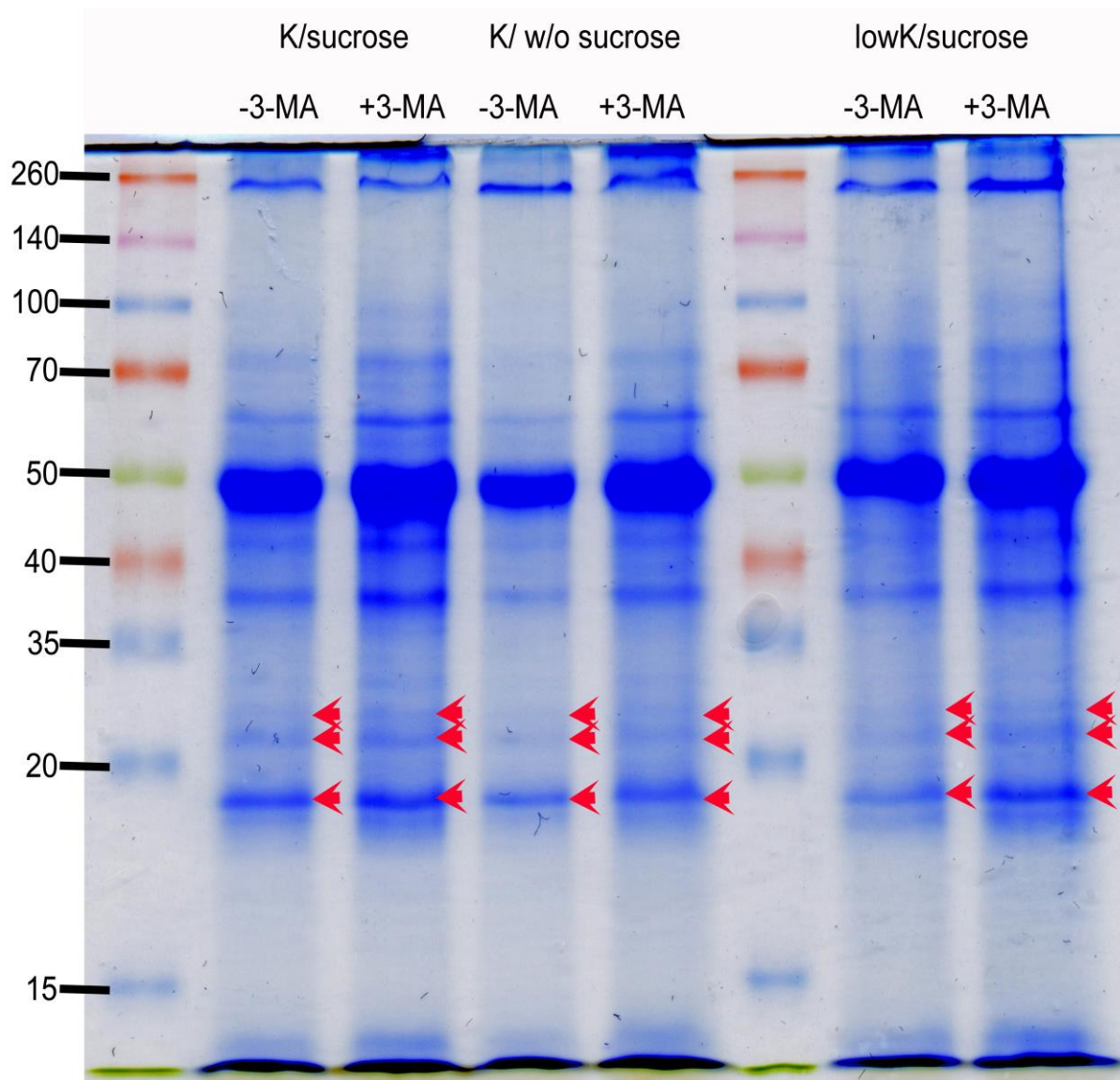


Рис. 16. Результат электрофоретического разделения в полиакриламидном геле тотального белка 11-дневных проростков Col-0 с питательных сред с разным содержанием калия и сахарозы. K/sucrose – нормальное содержание калия, сахароза; K/ w/o sucrose – нормальное содержание калия, без сахарозы; lowK/sucrose – низкий уровень калия, сахароза; -3-MA – питательная среда без добавления ингибитора автофагии; +3-MA – питательная среда с добавлением ингибитора автофагии.

3.1.5. Исследование изменения уровня активности TOR-киназы в условиях дефицита калия методом вестерн-блоттинга

Для изучения активности киназы TOR была использована мутантная линия 35S::S6K-FLAG со сверхэкспрессией гена, кодирующего рибосомальный белок S6K1 – один из важнейших субстратов TOR. Активность киназы TOR оценивали путем количественного определения соотношения общего белка S6K1 к его фосфорилированной форме pS6K1 (п. 2.2.3). В качестве положительного контроля

применялась обработка комбинацией ингибиторов 500 нМ AZD8055 + 1 мкМ рапамицин, в которую помещали корни проростков на 24 часа (2.2.3.1). Интересно, что полного ингибирования активности TOR достичь не удалось, что может быть связано с высокой активностью TOR в быстрорастущих тканях проростков (рис. 17а).

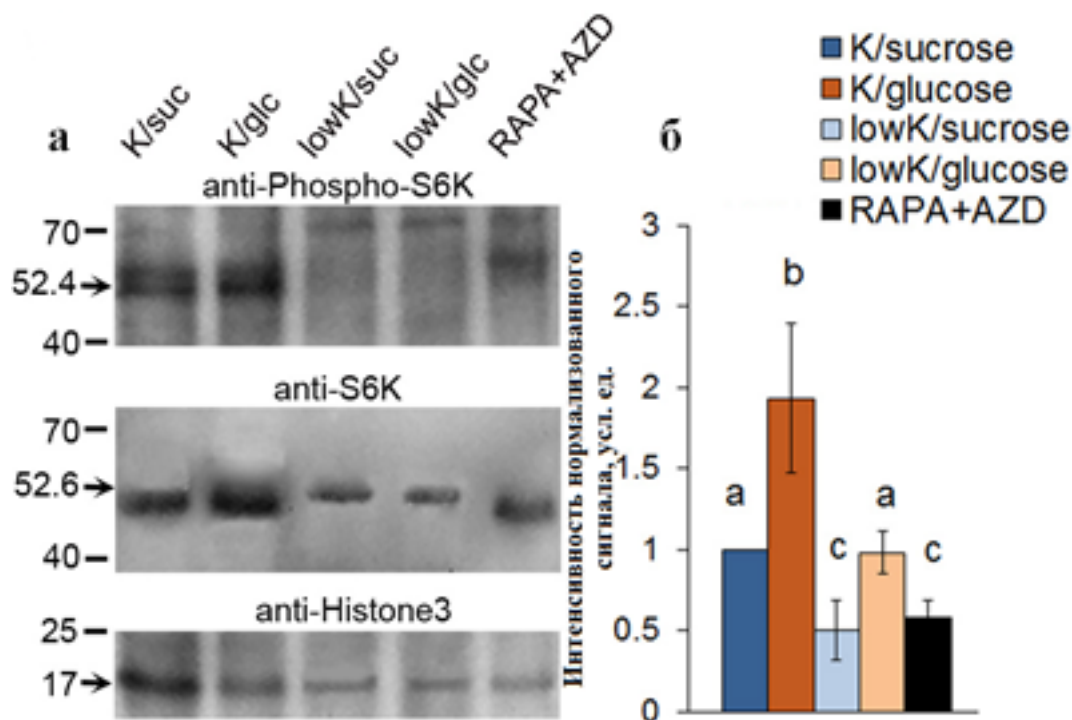


Рис. 17. Анализ активности TOR-киназы в проростках трансгенной линии *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующей конструкцию p35S:S6K1-FLAG, выращенных на четырех различных средах, как указано. **а**, анализ специфичности связывания антител с целевым белком методом иммуноблоттинга. В качестве положительного контроля ингибирования TOR использованы проростки из чашек K/Suc после 24 ч инкубации в смеси ингибиторов TOR AZD8055 (500 нМ) + рапамицин (1 мкМ) (RAPA+AZD). Стрелками указана масса соответствующих белковых полос (кДа). **б**, количественный анализ отношения интенсивностей сигнала pS6K по отношению к сигналу нефосфорилированного S6K с поправками на референсный сигнал гистона H3. Представлены средние арифметические значения трех биологических повторностей на вариант. Усы обозначают стандартное отклонение. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

Анализ активности TOR в корнях проростков, выращенных на четырех различных средах, описанных ранее, показал, что в присутствии глюкозы и нормальном содержании калия в среде выращивания уровни фосфорилирования

SnRK1 были в два раза выше, чем в присутствии сахарозы (рис. 176). В корнях проростков, выращенных на среде с сахарозой и дефицитом калия, уровни активности TOR были снижены в два раза по сравнению с таковыми на среде с сахарозой и нормальным содержанием калия, и были аналогичны уровням, наблюдаемым у проростков, инкубированных с рапамицином и AZD8055 - ингибиторами TOR (рис. 176). Активность TOR у проростков, выращенных на среде с глюкозой и низким содержанием калия, восстанавливалась до уровней, наблюдаемых для контрольной среды с сахарозой и нормальным уровнем содержания калия (вероятно, имело место «суммирование» положительного эффекта глюкозы и отрицательного эффекта дефицита калия), что позволяет предположить, что глюкоза и дефицит K^+ действуют независимо в сигнальном каскаде, регулирующем активность TOR.

3.1.6. Уровни экспрессии генов, кодирующих каталитические субъединицы SnRK1 - KIN10 и KIN11, у трансгенных линий *Arabidopsis*, экспрессирующих конструкции *p35S::KIN10* (KIN10OX) и *p35S::kin10(RNAi)* (KIN10RNAi)

При ингибировании общей активности SnRK1 путем подавления экспрессии гена, кодирующего KIN10, активность SnRK1 может частично восстанавливаться за счет другой каталитической субъединицы - KIN11 (Baena-Gonzalez et al., 2007). Поэтому были исследованы уровни экспрессии обоих генов, KIN10 и KIN11 (*AT3G01090* и *AT3G29160*), у используемых в работе трансгенных линий *Arabidopsis*, экспрессирующих конструкции *p35S::KIN10* (KIN10OX) и *p35S::kin10(RNAi)* (KIN10RNAi) (рис. 18, 19).

Уровень экспрессии *KIN10* во взрослых листьях растений дикого типа (Ler) был значительно выше, чем в проростках (рис. 18). У растений KIN10OX1 уровень экспрессии *KIN10* был в десятки раз выше, а у растений KIN10RNAi – ниже, чем у дикого типа, причем как в проростках, так и в листьях (рис. 18). Уровни экспрессии *KIN11* не отличались у линий Ler, KIN10OX1 и KIN10RNAi – ни у проростков, ни у

листьев взрослых растений (рис. 19). Таким образом, можно предполагать, что уровни экспрессии *KIN10* у используемых в работе трансгенных линий *Arabidopsis* *KIN10OX* и *KIN10RNAi* отражают уровень активности SnRK1.

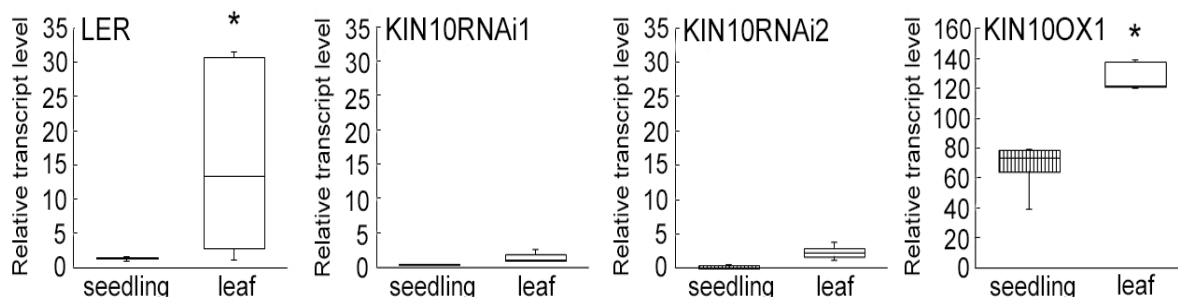


Рис. 18. Изменение уровней экспрессии *KIN10* *Arabidopsis thaliana* у проростков без стрессового воздействия (seedling) и в листьях взрослых растений (leaf), подвергшихся стрессу засолением. LER, дикий тип (экотип Landsberg erecta); *KIN10RNAi1*, *KIN10RNAi2* - независимые линии с подавлением экспрессии *KIN10*, *KIN10OX1* - линия-сверхэкспрессор *KIN10*. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. * отражает статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между проростками и листьями одной линии.

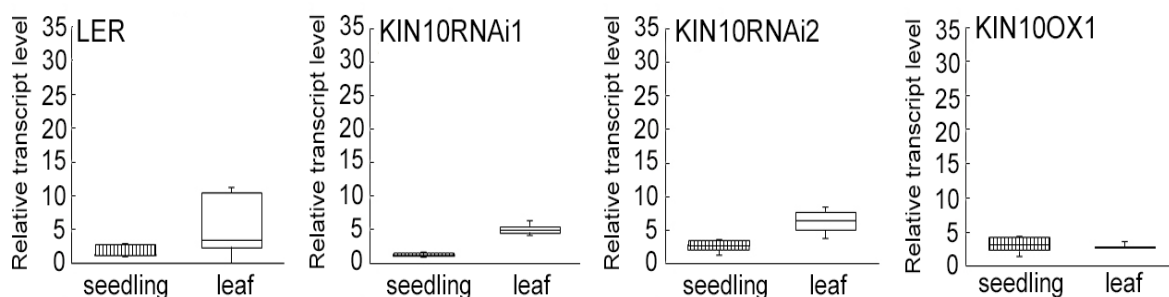


Рис. 19. Изменение уровней экспрессии *KIN11* *Arabidopsis thaliana* у проростков без стрессового воздействия (seedling), и в листьях взрослых растений, подвергшихся стрессу засолением. LER, дикий тип (экотип Landsberg erecta); *KIN10RNAi1*, *KIN10RNAi2* - независимые линии с подавлением экспрессии *KIN10*, *KIN10OX1* - линия-сверхэкспрессор *KIN10*. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения.

3.1.7. Изучение роли SnRK1 в активации автофагического потока при дефиците калия

Дефицит K^+ приводит к инактивации TOR (рис. 17), а также к усилению деградации белка по автофагическому пути (рис. 16). Для того, чтобы определить, влияет ли недостаток калия на активность автофагии путем непосредственного ингибирования TOR, или ингибирование опосредовано активностью киназы SnRK1, были проанализированы растения арабидопсиса со сверхэкспрессией гена, кодирующего каталитическую субъединицу SnRK1 – белок KIN10, а также линии RNAi с подавленной экспрессией этого гена. Детекцию и количественный анализ автофагосом проводили с помощью окраски монодансилкадаверином согласно п.2.2.5.1.

У проростков растений дикого типа Ler, выращенных на среде с низким содержанием калия, число автофагосом было значительно выше, чем в корнях растений, выращенных на средах с нормальным содержанием калия (рис. 20а, г).

В то же время у проростков линий KIN10OX со сверхэкспрессией KIN10, выращенных на четырех видах сред, наблюдалось большое количество автофагосом, которое не менялось в зависимости от типа сахара или изменения концентрации калия в среде выращивания (рис. 20б, д). Это указывает на увеличение автофагического потока по сравнению с диким типом, вызванное высокой конститутивной активностью SnRK1.

У проростков линий KIN10RNAi количество автофагосом было сходно с таковым в растениях дикого типа, выращенных на среде с нормальным содержанием калия, и не менялось в ответ на добавление глюкозы или при дефиците K^+ в среде роста (рис. 20в, е).

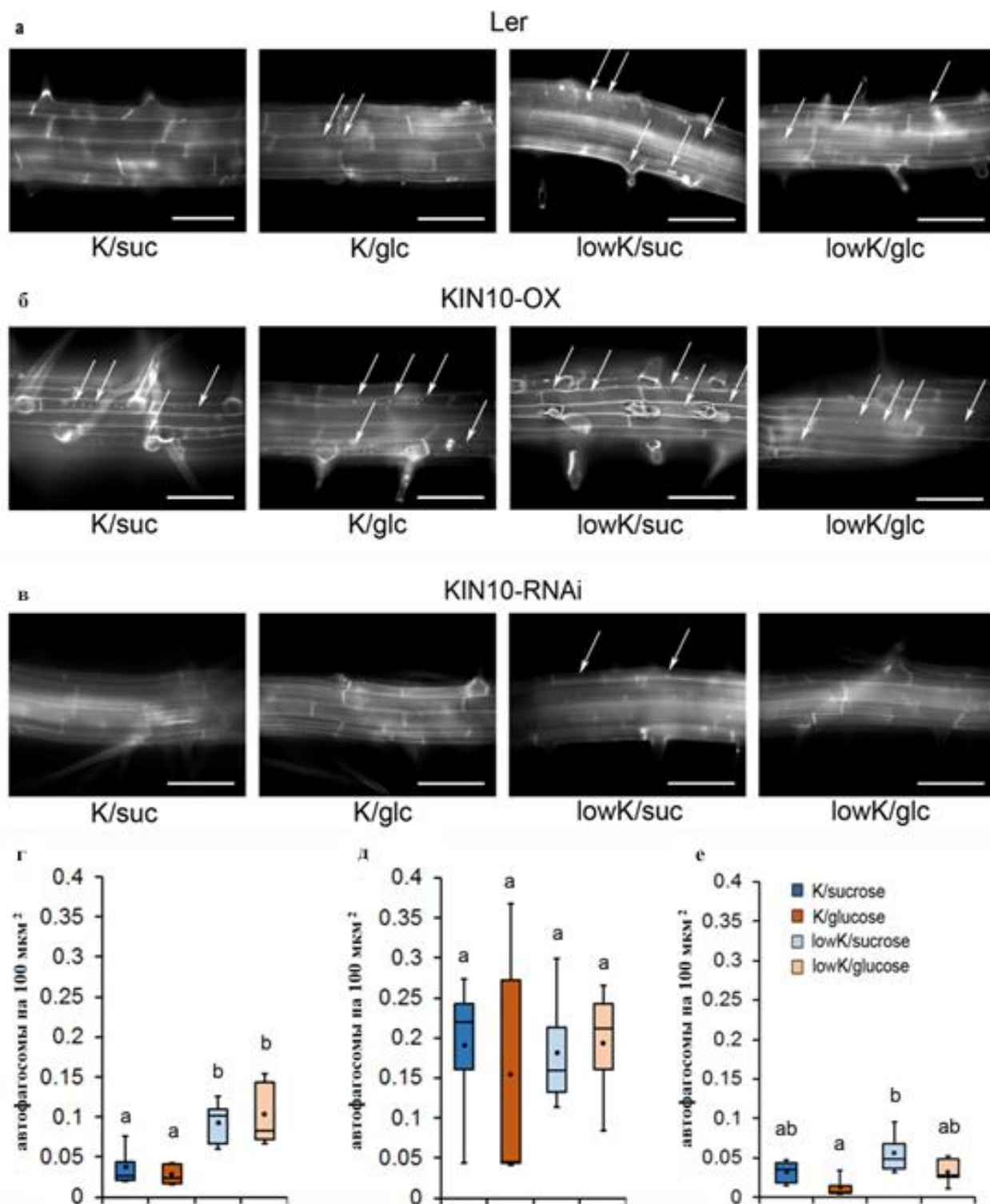


Рис. 20. Автофагосомы (окраска монодансилкадаверином) в клетках корней проростков *Arabidopsis thaliana*, выращенных на четырех средах. **а** - Ler, дикий тип, **б** - проростки со сверхэкспрессией *KIN10*, **в** – проростки с ингибированной экспрессией *KIN10*. Стрелки указывают на автофагосомы. **г**, количество автофагосом, показанное на **а**. **д**, количество автофагосом, показанное на **б**. **е**, количество автофагосом, показанное на **в**. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Масштабные линейки: **а**, **б**, **в** 100 мкм.

Эти данные свидетельствуют о том, что индукция автофагии у проростков, лишенных K^+ , может быть опосредована SnRK1. Возможно, дефицит K^+ влиял на активность TOR также через SnRK1.

3.2. Участие SnRK1 в регуляции процессов фотосинтеза

3.2.1. Фенотипические изменения растений под действием солевого стресса

Для того, чтобы выяснить роль основного сенсора энергетического статуса растений - киназы SnRK1 - в регуляции фотосинтетического метаболизма, была продолжена работа с линиями арабидопсиса со сверхэкспрессией гена, кодирующего KIN10, линиями RNAi с подавленной экспрессией этого гена и линией дикого типа Ler в качестве контроля.

Растения выращивали согласно п.2.1.2.4 и подвергали солевому стрессу как указано в п.2.1.2.5. Листья взрослых растений дикого типа (экотип Ler) на третьи сутки умеренного солевого стресса имели следы слабого хлороза. Кроме того, наблюдалось скручивание отдельных листовых пластинок. К пятым суткам эксперимента эти симптомы усиливались и просматривались на большей части взрослых листьев (рис. 21а-в).

Сходные фенотипические изменения развивались и у растений со сверхэкспрессией *KIN10* (KIN10OX1, KIN10OX2), но хлороз появлялся на третьи, а скручивание листьев только на пятые сутки солевого стресса (рис. 21ж-и).

В линиях с РНК-интерференцией *KIN10* (KIN10RNAi1, KIN10RNAi2) не было отмечено фенотипических изменений листьев, связанных со стрессовым воздействием ни на третьи, ни на пятые сутки солевого воздействия (рис. 21г-е).



Рис. 21. Фенотипические изменения растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а, б, в), линии с подавленной экспрессией *KIN10* KIN10RNAi1 (г, д, е) и линии со сверхэкспрессией *KIN10* KIN10OX1 (ж, з, и) при хроническом засолении, где а, г, ж – фотографии растений на первые сутки засоления; б, д, з – на третьи сутки засоления; в, е, и – на пятые сутки засоления. Масштабная линейка: 1 см.

3.2.2. Изучение показателей эффективности ФСІ и ФСІІ у растений с разным уровнем экспрессии *KIN10* при солевом стрессе

Были исследованы изменения важнейших показателей фотохимической активности фотосистем ($Y(II)$, $Y(I)$, $Y(NPQ)$) как описано в п.2.2.6.1. В листьях растений дикого типа Ler происходило достоверное снижение реального квантового

выхода ФСII $Y(II)$ при освещении средними интенсивностями актиничного света (107, 138, 228, 351 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) на третьи и пятые сутки солевого стресса относительно контрольных показателей (рис. 22а). У растений с подавленной экспрессией *KIN10* либо не наблюдалось изменений в $Y(II)$ (в линии *KIN10RNAi1*), либо происходило снижение $Y(II)$ к пятым суткам засоления (в линии *KIN10RNAi2*) (рис. 22б, в). В листьях двух линий сверхэкспрессоров *KIN10* - *KIN10OX1* и *KIN10OX2* обнаружены достоверное увеличение $Y(II)$ на третьи сутки засоления, и снижение данного параметра на пятые сутки засоления до значений у растений в контрольных условиях (рис. 22г, д).

Квантовый выход ФСI $Y(I)$ достоверно уменьшался под действием солевого стресса в диком типе *Leg* (в диапазоне значений 138–837 μM фотонов) к третьим суткам стресса, и не возвращался к уровню в контроле к пятым суткам солевого стресса (рис. 23а). У растений с подавленной экспрессией *KIN10* $Y(I)$ при солевом стрессе не изменялся либо достоверно снижался (*KIN10RNAi1* и *KIN10RNAi2*, соответственно) (рис. 23б,в). В листьях растений *KIN10OX1* и *KIN10OX2* происходило увеличение $Y(I)$ на третьи сутки солевого стресса, а затем наблюдалось снижение активности ФСI до уровня, наблюдаемого у растений в контрольных условиях, во всем диапазоне интенсивности освещения (рис. 23г, д).

Было оценено влияние засоления на квантовый выход регулируемого нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$ как одного из важнейших механизмов предотвращения разрушения ФСII от избытка поглощенных квантов света (рис. 24). В листьях арабидопсиса дикого типа *Leg* происходило достоверное повышение квантового выхода $Y(NPQ)$ к третьим суткам солевого стресса, которое имело те же значения показателя и к пятым суткам (рис. 24а).

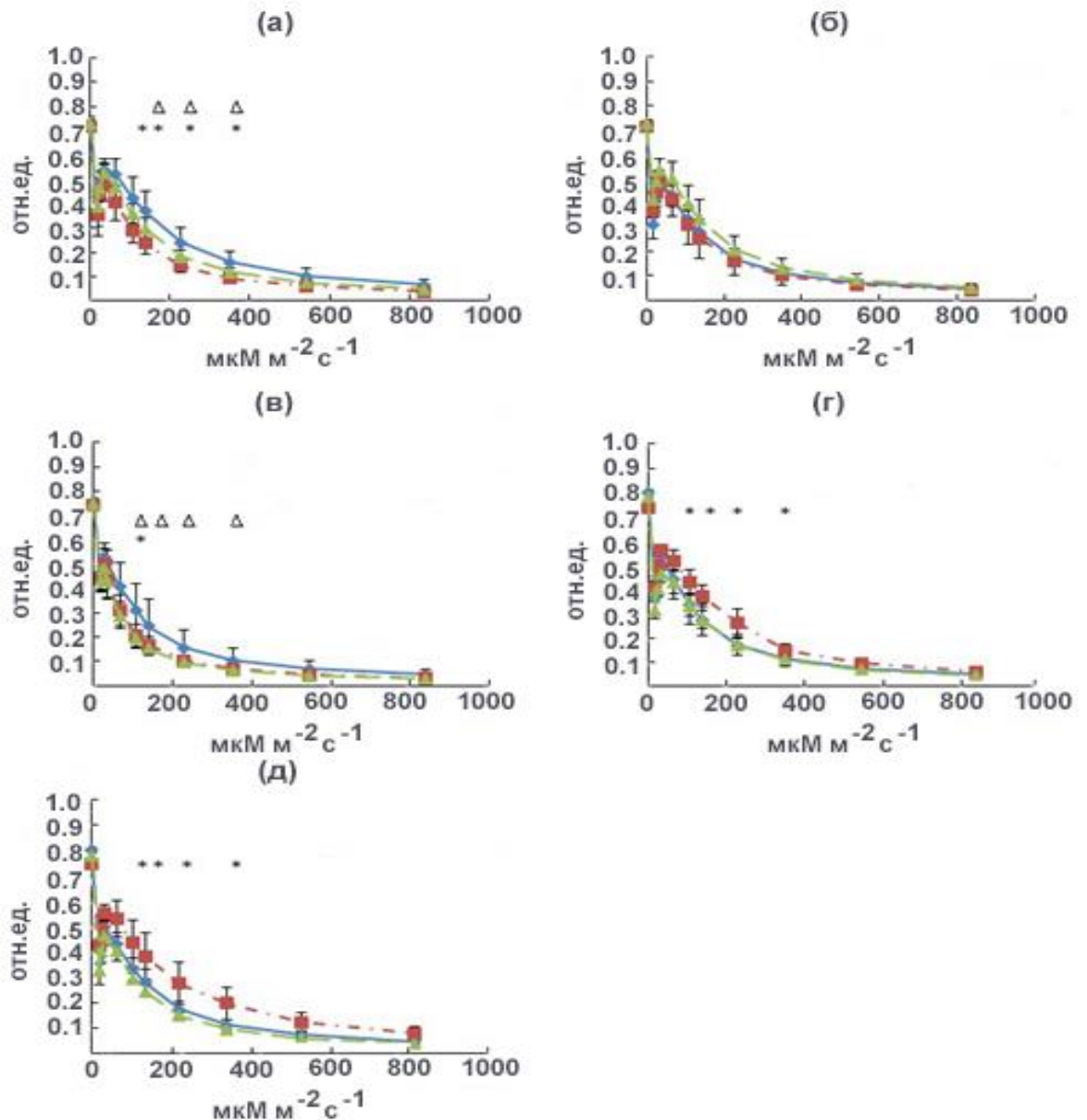


Рис. 22. Зависимость квантового выхода ФСII ($Y(II)$) от интенсивности света, измеренная в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), линий с подавленной экспрессией *KIN10* *KIN10RNAi1* (б) и *KIN10RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* *KIN10OX1* (г) и *KIN10OX2* (д), в контрольных условиях и при солевом стрессе. Синяя сплошная линия с маркерами-ромбами – значения, полученные на растениях в контрольных условиях; красная штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами – значения, полученные на 3 сутки хронического засоления растений; зелёная пунктирная линия с маркерами-треугольниками – значения, полученные на 5 сутки хронического засоления растений; * и Δ – достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 (*) либо на 5 (Δ) сутки солевого стресса, соответственно, согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Показаны средние арифметические значения 10 независимых измерений, выполненных на листьях 10 разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. Ось абсцисс - значения интенсивности освещения в $\mu\text{M photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; ось

ординат – значения параметра $Y(II)$ в относительных единицах.

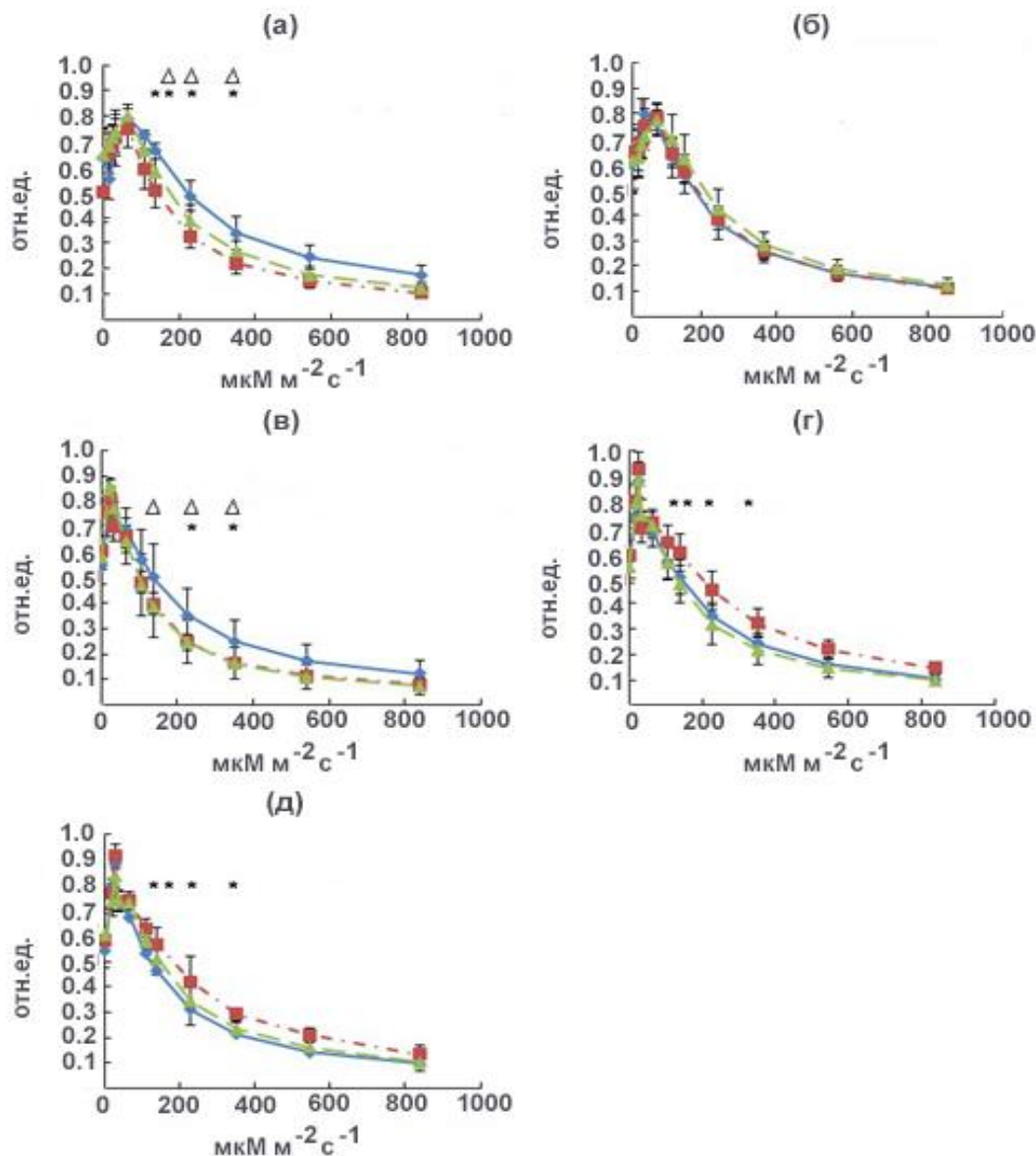


Рис. 23. Зависимость квантового выхода ФСИ ($Y(I)$) от интенсивности света, измеренная в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), линий с подавленной экспрессией *KIN10* - *KIN10RNAi1* (б) и *KIN10RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* - *KIN10OX1* (г) и *KIN10OX2* (д), в контрольных условиях и при солевом стрессе. Синяя сплошная линия с маркерами-ромбами – значения, полученные на растениях в контрольных условиях; красная штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами – значения, полученные на 3 сутки хронического засоления растений; зелёная пунктирная линия с маркерами-треугольниками – значения, полученные на 5 сутки хронического засоления растений; * и Δ – достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 (*) либо на 5 (Δ) сутки солевого стресса, соответственно, согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Показаны средние арифметические значения 10 независимых измерений, выполненных на листьях 10 разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. Ось абсцисс - значения интенсивности освещения в $\mu\text{М}$ фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$; ось ординат – значения параметра $Y(II)$ в относительных единицах.

В линиях KIN10RNAi уровень $\Upsilon(NPQ)$ либо не изменялся, либо повышался к пятым суткам засоления (KIN10RNAi1 и KIN10RNAi2, соответственно) (рис. 14б,в). В листьях обеих линий KIN10OX обнаружено снижение тепловой диссипации энергии к третьим суткам засоления (рис. 14 г, д). Кроме того, у линии KIN10OX1 значения квантового выхода нефотохимического тушения к пятым суткам не возрастали до уровня контрольных показателей растений KIN10OX1 (рис. 14 г) Изменений квантового выхода нерегулируемого тушения флуоресценции $\Upsilon(NO)$ не выявлено ни в одной из исследуемых линий арабидопсиса (табл. 4), что свидетельствует об отсутствии структурных нарушений пула ФСII под действием солевого стресса.

Таблица 4. Показатели квантового выхода нерегулируемого тушения флуоресценции $\Upsilon(NO)$ при освещении актиничным светом $351 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$

| | Ler | KIN10RNAi1 | KIN10RNAi2 | KIN10OX1 | KIN10OX2 |
|---------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|
| контроль | 0.34±0.02 | 0.39±0.03 | 0.43±0.02 | 0.33±0.02 | 0.39±0.02 |
| NaCl (день 1) | 0.36±0.01 | 0.43±0.04 | 0.43±0.02 | 0.35±0.04 | 0.40±0.03 |
| NaCl (день 3) | 0.36±0.02 | 0.43±0.02 | 0.43±0.01 | 0.33±0.02 | 0.40±0.04 |
| NaCl (день 5) | 0.36±0.03 | 0.44±0.02 | 0.41±0.03 | 0.36±0.03 | 0.41±0.06 |

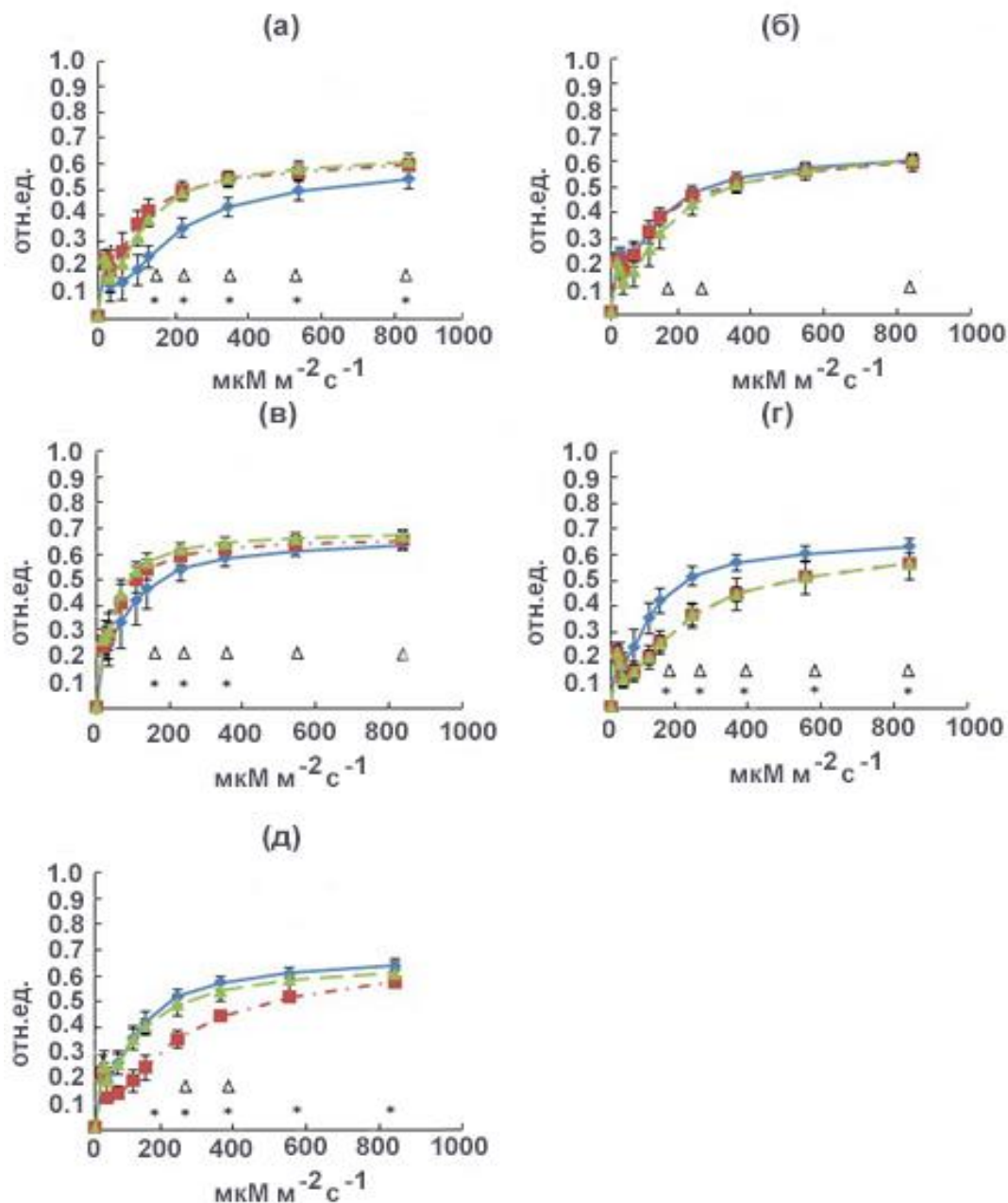


Рис. 24. Зависимость квантового выхода NPQ ($Y(NPQ)$) от интенсивности света, измеренная в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (а), линий с подавленной экспрессией *KIN10* *KIN10RNAi1* (б) и *KIN10RNAi2* (в), а также линий-сверхэкспрессоров *KIN10* *KIN10OX1* (г) и *KIN10OX2* (д), в контрольных условиях и при солевом стрессе; красная штрихпунктирная линия с маркерами-квадратами – значения, полученные на 3 сутки хронического засоления растений; зелёная пунктирная линия с маркерами-треугольниками – значения, полученные на 5 сутки хронического засоления растений; * и Δ – достоверные различия между измерениями в контроле и на 3 (*) либо на 5 (Δ) сутки солевого стресса, соответственно, согласно результатам дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$. Показаны средние арифметические значения 10 независимых измерений, выполненных на листьях 10 разных растений одного генотипа. Планки погрешности обозначают стандартное отклонение от среднего. По оси абсцисс отложены значения интенсивности освещения в μM фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; по оси ординат – значения параметра $Y(NPQ)$ в относительных единицах.

3.2.3. Электрохимический градиент и скорость синтеза АТФ

Чтобы сравнить относительную энергизованность тилакоидных мембран и эффективность работы АТФ-синтазы в хлоропластах линий арабидопсиса с различным уровнем экспрессии *KIN10*, исследовали амплитуду светоиндуцированной протондвижущей силы, пропорциональную ECS_{pmf} , а также относительные величины двух её компонентов: градиента трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\psi$) и градиента концентрации протонов (ΔpH) (рис. 25а–в), пропорциональных $ECS_{\Delta\psi}$ и $ECS_{\Delta pH}$ соответственно. Эксперименты проводили согласно п.2.2.6.2-2.2.6.3. У дикого типа Ler и у линий с РНК-интерференцией *KIN10* (*KIN10RNAi1*, *KIN10RNAi2*) статистически достоверных изменений показателей градиента электрохимического потенциала и его компонентов обнаружено не было. У линий-сверхэкспрессоров *KIN10* на тилакоидных мембранах хлоропластов при освещении формируется протондвижущая сила, амплитуда которой значительно ниже, чем у дикого типа и у растений с подавленной экспрессией *KIN10* (рис. 25а). Оказалось, что низкая амплитуда ECS_{pmf} у линий-сверхэкспрессоров определена относительно низким градиентом электрического потенциала $\Delta\psi$ и не связана с изменением компоненты ΔpH (рис. 25б, в). Для линий-сверхэкспрессоров *KIN10* также наблюдалась тенденция к снижению линейной скорости синтеза АТФ (V) (рис. 25г), при том, что экспоненциальная скорость синтеза АТФ (g), зависящая от уровня аденозинфосфатов и количества АТФ-синтазы, не отличалась от таковой в других линиях арабидопсиса (рис. 25д).

Важно отметить, что градиент концентрации протонов ΔpH не отличался у всех изученных генотипов в контрольных условиях и не изменялся при солевом стрессе (рис. 25в).

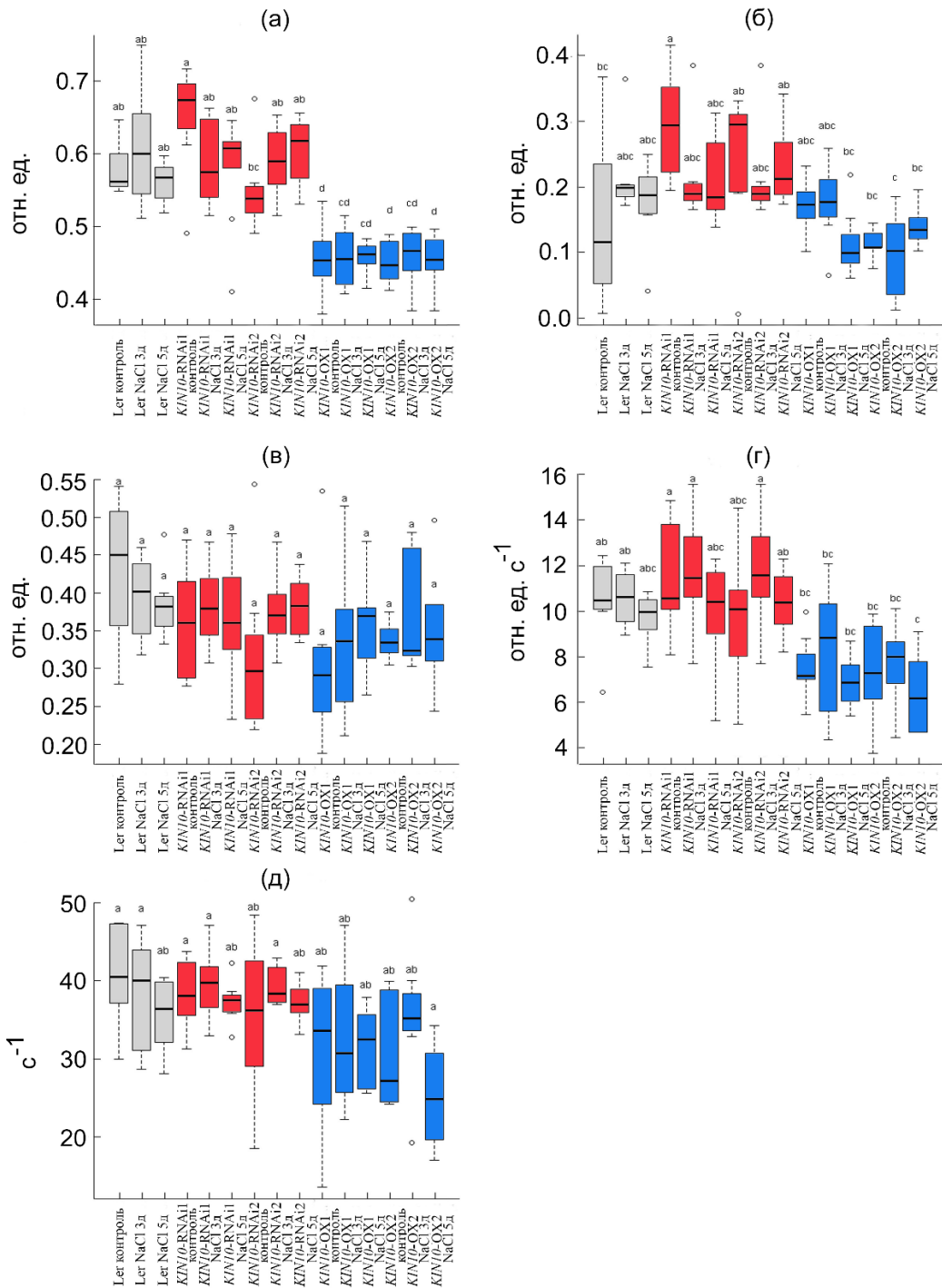


Рис. 25. Относительные уровни электрохимического градиента ECS_{pmf} (а), градиента электрического потенциала $ECS_{\Delta\psi}$ (б), градиента концентрации протонов $ECS_{\Delta pH}$ (в), линейной (г) и экспоненциальной (д) скорости синтеза АТФ в листьях растений дикого типа Ler (серый), линий с подавленной экспрессией *KIN10* (*KIN10RNAi1* и *KIN10RNAi2*, красный) и линий-сверхэкспрессоров *KIN10* (*KIN10OX1* и *KIN10OX2*, синий) при солевом стрессе. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. “Контроль” – значения показателя в оптимальных условиях роста, “NaCl 3д” и “NaCl 5д” – значения показателя на третьи и пятые сутки солевого стресса. Достоверность различий оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

3.2.4. Уровень продукции АТФ в проростках *Arabidopsis thaliana*

Сравнение содержания АТФ в проростках арабидопсиса дикого типа (Ler) и линий с измененным уровнем экспрессии *KIN10* в контрольных условиях и под действием солевого стресса (рис. 26) проводили согласно п. 2.2.4.

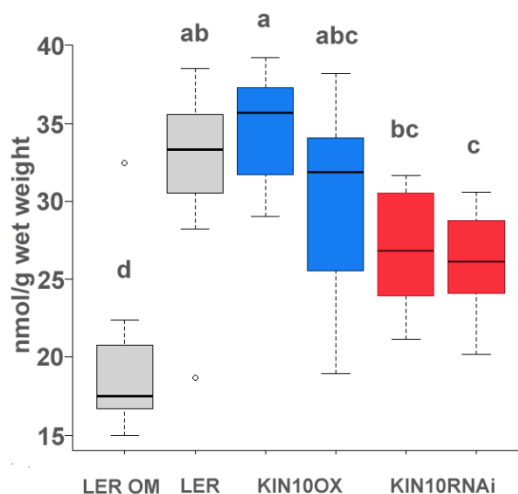


Рис. 26. Уровни АТФ в проростках *Arabidopsis thaliana* дикого типа Ler (серый), линий-сверхэкспрессоров *KIN10* (синий) KIN10OX1 и KIN10OX2, линий с подавленной экспрессией *KIN10* (красный) KIN10RNAi1 и KIN10RNAi2 после 16 ч солевого стресса. На бокс-плотах представлены медианы и распределение значений по квартилям. Эксперименты выполнены в пяти биологических и трех технических повторностях. Ler OM – растения дикого типа Ler, обработанные олигомицином. Усы обозначают минимальные и максимальные значения. Достоверность различий обозначена буквами и оценивалась методом множественного сравнения с применением дисперсионного анализа ANOVA и post hoc теста Тьюки при $p \leq 0,05$.

Для оценки вклада митохондриального дыхания в продукцию АТФ, использовали ингибитор АТФ-синтазы олигомицин (20мМ). У проростков линий KIN10OX, несмотря на высокий уровень экспрессии и, очевидно, каталитической активности SnRK1, продукция АТФ не отличалась от значений показателя у Ler, а у линий KIN10RNAi наблюдалась четкая тенденция к снижению содержания АТФ. Примерно половина суммарного содержания АТФ в проростках Ler генерировалась в результате окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий (рис. 26).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Хронический дефицит калия в среде выращивания оказывает ингибирующее воздействие на активность киназы TOR и активирует автофагию

Катионы калия играют ключевую роль в поддержании мембранного потенциала и энергетического метаболизма у большинства живых организмов. У растений калий является как главным клеточным катионом, так и основным осмотиком, а также играет важную роль в активации ферментов, синтезе белка, фотосинтезе, движении устьиц и флоэмном транспорте (Marschner, 2012). Цитозольный гомеостаз K^+ необходим для поддержания активности многих цитозольных ферментов, а дефицит K^+ приводит к ингибированию более 50 ферментов, в том числе гликолиза и ассимиляции азота (Armegaud et al., 2009). С большой вероятностью это относится и к животным клеткам, в которых также функционируют ферменты гликолиза. На основании незаменимости ионов калия для работы многих ферментов для растений высказывалось предположение, что уровни цитозольного калия, возможно, играют роль «переключателя» между анаболическими и катаболическими программами (Leigh and Wyn Jones 1984). Стресс-индуцированная потеря калия клетками корня *Arabidopsis* приводила к активации автофагии и развитию программированной клеточной смерти (ПКС; Demidchik et al., 2010; 2018), что можно рассматривать как активацию крупнейших клеточных программ катаболизма. Сходные эффекты отмечены и для клеток млекопитающих, где цитозольный K^+ инактивирует каспазы, а потеря K^+ клетками, напротив, приводит к апоптотической ПКС (Remillard et al., 2004; Canu et al., 2005). Таким образом, можно предположить, что роль калия как «переключателя» анаболизма и катаболизма универсальна, так же как его роль в поддержании ионного баланса и энергизации клеточных мембран. В настоящее время известно, что крупнейшим регулятором анаболизма и катаболизма в эукариотической клетке выступает киназа TOR, что позволяет предположить, что недостаток ионов K^+ может активировать катаболизм, действуя на активность TOR. Однако, до сих пор работы,

где бы исследовалась эта взаимосвязь, не проводились ни на растениях, ни на других живых организмах.

В настоящей работе использовали хронический дефицит калия в среде выращивания проростков *Arabidopsis thaliana*, чтобы выявить возможное влияние на активность киназы TOR. У таких проростков обнаруживалось статистически достоверное ингибирование роста корней и побегов (рис. 12 и 13), причем активатор TOR – глюкоза – ослабляла влияние недостатка калия на рост корней (рис. 12). Выращивание проростков на глюкозе в качестве основного сахара ожидаемо приводило к повышению содержания клеточного АТФ в корнях по сравнению с выращиванием на сахарозе, видимо, за счет активации гликолиза (рис. 14). Однако, данный эффект глюкозы полностью снимался недостатком K^+ , что соответствует сделанным ранее выводам о необходимости ионов для работы гликолитических ферментов (Armengaud *et al.*, 2009). В то же время не происходило изменения уровней экспрессии генов, кодирующих ряд этих ферментов (рис. 15).

В данной работе мы показали, что дефицит калия приводит к ингибированию активности киназы TOR (рис. 17). Это ингибирование может быть ослаблено добавлением в среду выращивания активатора TOR - глюкозы (рис. 17), что свидетельствует об отсутствии потребности в катионах калия для ферментативной активности TOR, то есть об отсутствии прямой регуляции TOR ионами калия. Можно предположить, что, поскольку активирующий эффект глюкозы и ингибирующий – недостатка K^+ - при совместном воздействии «суммировались», то оба фактора влияют на активность TOR через различные механизмы.

Ранее было показано, что индуцированная засолением быстрая потеря K^+ корнями *Arabidopsis thaliana* приводила к активации автофагии (Demidchik *et al.*, 2018). Однако, возможные механизмы активации автофагии, связанные с уровнем клеточного калия, до данной работы не изучались. В настоящей работе мы показали, что хронический дефицит калия в среде выращивания приводит к развитию автофагии в клетках корня проростков *Arabidopsis* (рис 16, рис 20). Этот эффект, по-видимому, обусловлен ингибированием киназы TOR. Известно, что основным

механизмом ингибирования TOR в клетках растений выступает киназа SnRK1. Также SnRK1 регулирует стресс-индуцированную автофагию, в том числе, при солевом стрессе, как посредством ингибирования активности киназы TOR, так и независимо от нее (Soto-Burgos et al., 2017; Wang et al., 2021). Поэтому возник закономерный вопрос об участии киназы SnRK1 в развитии автофагии, индуцированной в корнях проростков *Arabidopsis* дефицитом калия. Для ответа на этот вопрос использовали растения с измененным уровнем экспрессии гена каталитической субъединицы SnRK1 *KIN10* (рис. 18, рис. 19).

У растений дикого типа автофагия активировалась на средах с дефицитом калия (рис. 20 а, г). В то же время, сверхэкспрессия гена *KIN10* вызывала увеличение числа автофагосом даже в отсутствие стрессового воздействия (рис. 20 б, д). У таких растений дефицит калия не приводил к повышению уровня автофагического потока, возможно, потому, что активность SnRK1 в линиях-сверхэкспрессорах *KIN10* уже была максимальна. Напротив, в линиях с РНК - интерференцией *KIN10* дефицит калия не приводил к увеличению числа автофагосом выше значений, полученных при исследовании растений со сред с достаточным содержанием калия (рис. 20 в, е), что может быть связано с отсутствием чувствительности к изменениям, связанным с хроническим стрессированием. Таким образом, при стрессе, связанном с дефицитом калия, запуск автофагии обусловлен активностью киназы SnRK1; возможно, и ингибирование TOR также происходит через SnRK1, но для уточнения этого необходимы дополнительные исследования.

SnRK1 растений является сенсором энергии и активируется в ответ на снижение содержания фосфатов сахаров, а также, возможно, АТФ (Wurzinger et al., 2018). Дефицит калия ингибирует гликолиз (Armengaud et al., 2009), что в не способных к фотосинтезу клетках корней может приводить к снижению уровня клеточного АТФ; однако, статистически достоверных изменений в уровне АТФ (при добавлении в среду сахарозы в качестве основного сахара) обнаружено не было (рис. 14), и мы не можем предположить, что именно выступает фактором, активирующим

SnRK1 в условиях дефицита калия. Для ответа на данный вопрос также необходимы дополнительные эксперименты.

4.2. Киназа SnRK1 участвует в регуляции фотосинтетической активности хлоропластов в норме и в ходе ответа на солевой стресс

Жизнедеятельность растений как автотрофных организмов поддерживается в основном энергией света, за счет которой в клетках растений образуются АТФ и восстановитель для синтеза углеводов. Киназы AMPK, SNF1 и SnRK1 рассматриваются как сенсоры энергетического статуса клеток животных, дрожжей и растений, соответственно. В связи с этим можно было предположить, что у растений активность киназы SnRK1 будет оказывать влияние на процесс фотосинтеза, по крайней мере в стрессовых условиях. Несмотря на то, что фотосинтез опосредовано регулирует активность киназы SnRK1 сахарами (Ваена-González, Sheen, 2008), влияние SnRK1-киназы на фотосинтетический метаболизм изучено слабо. Солевой стресс оказывает комплексный негативный эффект на метаболизм растений, который связан с сокращением поглощения воды вследствие повышенного осмотического давления в ризосфере, с токсическим эффектом накопления катионов натрия и анионов хлора, а также с развитием окислительного стресса (Pan et al., 2021). Одной из мишеней солевого стресса у растений является фотосинтетическая функция хлоропластов (Awlia et al., 2016). Поэтому для выявления взаимосвязи между уровнем активности SnRK1-киназы и эффективностью функционирования фотосистем у растений арабидопсиса в работе использовался хронический солевой стресс. В качестве модельных объектов использовали растения, у которых различия в активности SnRK1 были генетически детерминированы уровнем транскрипции каталитической субъединицы KIN10 (показано, что уровень транскрипционной активности KIN10 коррелирует с киназной активностью SnRK1; Ваена-Gonzalez et al., 2007).

Проведенная в работе оценка фотосинтетической активности листьев исследуемых генотипов свидетельствовала о развитии адаптивных изменений в линиях с повышенным содержанием SnRK1-киназы (KIN10OX) на фоне солевого

стресса. У растений-сверхэкспрессоров *KIN10* к третьим суткам солевого стресса происходило увеличение реальных квантовых выходов ФСII и ФСI, и снижение нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), связанного с регулируемым формированием центров диссипации энергии (рис. 22, 23, 24). В то же время у растений дикого типа и растений со сниженным уровнем экспрессии *KIN10* солевой стресс, напротив, приводил к снижению квантовых выходов ФСII и ФСI и росту NPQ (рис. 22, 23, 24).

Вопреки ожиданиям, изменение уровня активности SnRK1-киназы не приводило ни к изменениям содержания АТФ в проростках, ни к существенному изменению работы АТФ-синтазы в листьях взрослых растений как в благоприятных, так и в стрессовых условиях (рис. 25, 26). В то же время нами впервые обнаружена функциональная особенность работы электронтранспортной цепи хлоропластов растений-сверхэкспрессоров *KIN10* - относительно низкая амплитуда формирующейся на свету транстилакоидной протондвижущей силы pmf, которая наблюдалась как при адаптации к солевому стрессу, так и при благоприятных условиях роста (рис. 25). Снижение амплитуды pmf у линий-сверхэкспрессоров *KIN10* было обусловлено низким градиентом электрического потенциала $\Delta\Psi$, а ΔpH не изменялся, что коррелировало с сохранением способности к развитию NPQ (рис. 24, 25). Известно, что поддержание сниженного $\Delta\Psi$ является защитным механизмом, препятствующим развитию фотоингибирования и повреждению ФСII в условиях, когда высокие значения электрохимического градиента на тилакоидной мембране увеличивают вероятность рекомбинации и образованию синглетного кислорода в реакционном центре ФСII (Davis et al., 2016). SnRK1-киназа является центральным регулятором защитных стрессовых ответов растений. Можно полагать, что в линиях со сверхэкспрессией SnRK1 индуцирован неизученный пока механизм, изменяющий потоки ионов через тилакоидные мембраны на свету, что противодействует накоплению в хлоропластах ионов натрия и хлора и обеспечивает поддержание активности фотосистем при солевом стрессе. Кроме того, увеличение активности SnRK1-киназы в линиях *KIN10OX* может приводить к усилению процессов

репарации хлоропластов с участием автофагии (Chen et al., 2017, Soto-Burgos et al., 2017), увеличивая устойчивость фотосинтеза к солевому стрессу. Напротив, снижение активности SnRK1-киназы методом РНК-интерференции приводило к отсутствию выраженного ответа на солевой стресс на уровне фотохимической активности хлоропластов (рис. 22-25). Конкретные молекулярные мишени SnRK1-зависимой сигнальной сети, которые участвуют в регуляции функций хлоропластов, еще предстоит изучить.

Обнаруженные в данной работе закономерности представлены в виде схемы на рис. 27.

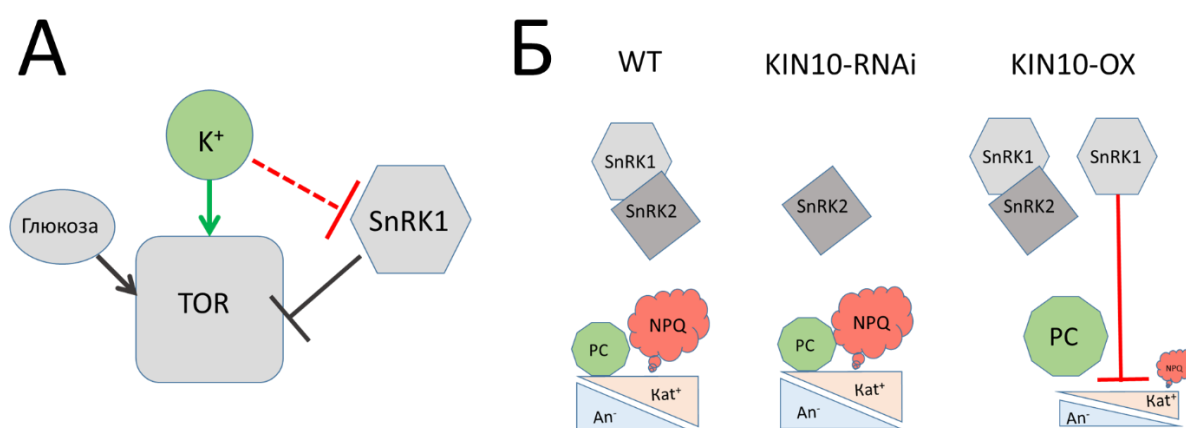


Рис. 27. Выявленные в данной работе особенности (А) регуляции киназы TOR уровнем клеточного калия и (Б) роли киназы SnRK1 в регуляции распределения энергии света между фотохимическими процессами (PC, photochemistry) и диссипацией (NPQ, non-photochemical quenching). Серым и черным цветами показаны известные ранее закономерности. Стрелки с заостренными концами обозначают активацию, стрелки с тупыми концами – ингибирование. Градиенты анионов (An⁻) и катионов (Kat⁺) обозначают размер градиента электрического потенциала $\Delta\Psi$ на тилакоидных мембранах хлоропластов.

ВЫВОДЫ

1. Хронический дефицит калия в среде выращивания проростков *Arabidopsis thaliana* вызывает следующие эффекты:

1а) снижение таких ростовых показателей, как длина корня и площадь листовой поверхности;

1б) значительное снижение ферментативной активности киназы TOR в корнях проростков, вероятно, по глюкозо-независимому пути;

1в) индукцию автофагии и увеличение количества автофагосом в клетках корней проростков; при этом уровень индуцированного дефицитом калия автофагического потока коррелирует с уровнем экспрессии каталитической субъединицы киназы SnRK1 - KIN10.

2. Повышение экспрессии каталитической субъединицы киназы SnRK1 - KIN10 в растениях *Arabidopsis thaliana* вызывает следующие эффекты:

2а) устойчивое снижение амплитуды формирующейся в хлоропластах на свету транстилакоидной протондвижущей силы, которое проявляется у растений как в оптимальных условиях выращивания, так и при солевом стрессе;

2б) рост реальных квантовых выходов ФСII и ФСI и снижение нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) при солевом стрессе, в то время как у растений дикого типа и растений со сниженным уровнем экспрессии *KIN10* солевой стресс, напротив, приводит к снижению квантовых выходов ФСII и ФСI и росту NPQ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю, к.б.н. Ольге Владимировне Войцеховской за предоставление интереснейшей темы исследования, за помощь, поддержку, критическую проработку полученных результатов, консультации на всех этапах работы и терпение, проявленное в течение всего периода аспирантуры и не только.

Автор искренне благодарит к.б.н. Елену Владимировну Тютереву за неоценимую помощь в освоении важнейших методов молекулярной биологии, ценные руководства и наставления, дружескую поддержку и теплоту.

Автор сердечно благодарит Рабаданову Камиллу Курбановну, Лукинского Юрия Владиславовича, Дмитриеву Валерию Александровну, Домашкину Валентину Владимировну, Жарову Дарью Алексеевну за непосредственную помощь в проведении экспериментов и освоении новых методов.

Автор выражает признательность сотрудникам лаборатории молекулярных и клеточных механизмов развития: заведующему лаборатории к.б.н. Кириллу Николаевичу Демченко, к.б.н. Елене Леонидовне Ильиной, Алексею Сергеевичу Кирюшкину за ценные советы и поддержку.

Автор выражает глубокую благодарность всему коллективу лаборатории молекулярной и экологической физиологии за дружескую и коллегиальную поддержку, которая помогала двигаться вперед даже в самые темные времена.

Работы, проведенные в рамках исследования, были поддержаны грантами РНФ (№18-16-00074, рук. Е.В. Тютерева) и РФФИ (№ 20-34-90138, рук. О.В. Войцеховская). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы

1. **Рабданова К.К.** (2017) Исследование индукции автофагии в растительной клетке в ответ на различные типы стресса: ВКР, Санкт-Петербург: СПбГУ, 47 с.
2. **Рабданова К.К., Тютерева Е.В., Мацкевич В.С., Демидчик В.В., Войцеховская О.В.** (2018). Клеточные и молекулярные механизмы контроля автофагии: потенциал для повышения стрессоустойчивости и продуктивности культурных растений. *Сельскохозяйственная биология*, **53**, 881-896.
3. **Тютерева Е.В., Муртузова А.В., Войцеховская О.В.** (2022). Автофагия и энергетический статус растительной клетки. *Физиология растений*. **69**, 115-131.
4. **Abraham R.T., Wiederrecht G.J.** (1996). Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol.* **14**, 483-510.
5. **Ache P., Becker D., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema M.R.G., Hedrich R.** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel, *FEBS Lett.* **486**, 93-98.
6. **Amtmann, A., Beilby, M.J.** (2010). The Role of Ion Channels in Plant Salt Tolerance. *Springer*, Berlin, Heidelberg.
7. **Anderson G.H., Veit B., Hanson M.R.** (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology*, **3**, 12.
8. **Andrade M., Bork P.** (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genetics*, **11**, 115-116.
9. **Armengaud P., Breitling R., Amtmann A.** (2004). The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* **136**, 2556-2576.
10. **Armengaud P., Sulpice R., Miller A.J., Stitt M., Amtmann A., Gibon Y.** (2009). Multilevel Analysis of Primary Metabolism Provides New Insights into the Role of Potassium Nutrition for Glycolysis and Nitrogen Assimilation in *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiology*, **150**, 772–785.

11. **Artins A., Caldana C.** (2022). The metabolic homeostat TOR: The balance of holding on or letting grow. *Curr Opin Plant Biol* ,**66**,102196.
12. **Avin-Wittenberg T., Baluška F., Bozhkov P.V., Elander P.H., Fernie A.R., Galili G., Hassan A., Hofius D., Isono E., Le Bars R., Masclaux-Daubresse C., Minina E.A., Peled-Zehavi H., Coll N.S., Sandalio L.M., Satiat-Jeunemaitre B., Sirko A., Testillano P.S., Batoko H.** (2018). Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *J Exp Bot.* **69**,1335-1353.
13. **Ávila-Castañeda A., Gutiérrez-Granados N., Ruiz-Gayosso A., Sosa-Peinado A., Martínez-Barajas E., Coello P.** (2014). Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN β 2 and AKIN β γ . *Frontiers in Plant Science*, **5**, 199.
14. **Aylett C.H., Sauer E., Imseng S., Boehringer D., Hall M.N., Ban N., Maier T.** (2016) Architecture of human mTOR complex 1. *Science*, **351**, 48-52.
15. **Baena-González E., Hanson J.** (2017). Shaping plant development through the SnRK1-TOR metabolic regulators. *Curr Opin Plant Biol.* **35**, 152-157.
16. **Baena-González E., Sheen J.** (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* **13**, 474-482.
17. **Baena-González E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J.** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, **448**, 938-42.
18. **Barrada A., Djendli M., Desnos T., Mercier R., Robaglia C., Montané M.H., Menand B.** (2019) A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in *Arabidopsis*. *Development.* **146**, dev171298.
19. **Bassil E., Ohto M.A., Esumi T., Tajima H., Zhu Z., Cagnac O., Belmonte M., Peleg Z., Yamaguchi T., Blumwald E.** (2011). The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell* **23**: 224–239.
20. **Bassil E., Tajima H., Liang Y.-C., Ohto M., Ushijima K., Nakano R., Esumi T., Coku A., Belmonte M., Blumwald E.** (2011). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ antiporters NHX1

and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell* **23**: 3482–3497.

21. **Ball J.T., Woodrow I.E., Berry J.A.** (1987) A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. *In Progress in Photosynthesis Research*, 221– 224.

22. **Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U.** (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*. **6294**, aac4354.

23. **Barker F.G. 2nd, Jannetta P.J., Bissonette D.J., Larkins M.V., Jho H.D.** (1996) The long-term outcome of microvascular decompression for trigeminal neuralgia. *The New England Journal of Medicine*, **334**, 1077-83.

24. **Bartel B., Farmer L. M., Rinaldi M. A., Young P. G., Danan C. H., Burkhart S. E.** (2014). Mutation of the *Arabidopsis* LON2 peroxisomal protease enhances pexophagy. *Autophagy*, 10 518–519 10.4161.

25. **Belda-Palazón B., Adamo M., Valerio C., Ferreira L.J., Confraria A., Reis-Barata D., Rodrigues A., Meyer C., Rodriguez P.L., Baena-González E.** (2020). A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. *Nat Plants*. 11, 1345-1353.

26. **Benjamin D., Colombi M., Moroni C., Hall M.N.** (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. **10**, 868-880.

27. **Bitrián M., Roodbarkelari F., Horváth M., Koncz C.** (2011). BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control and cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *The Plant Journal*, **65**, 829–842.

28. **Broeckx T., Hulsmans S., Rolland F.** (2016) The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *J Exp Bot* **67**, 6215-6252.

29. **Bosotti R., Isacchi A., Sonnhammer E.L.** (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in Biochemical Science*, **25**, 225-227.

30. **Broda M., Millar A. H., Van Aken O.** (2018). Mitophagy: a mechanism for plant growth and survival. *Trends Plant Sci*. **23**, 434–450.

31. **Britto, D.T., Kronzucker, H.J.** (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum*, **133**, 637-650.
32. **Burza A. M., Pekala I., Sikora J., Siedlecki P., Malagocki P., Bucholc M., Koper L., Zielenkiewicz P., Dadlez M., Dobrowolska, G.** (2006). Nicotiana tabacum osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 34299-34311.
33. **Cafferkey R., Young P.R., McLaughlin M.M., Bergsma D.J., Koltin Y., Sathe G.M., Faucette L., Eng W.K., Johnson R.K., Livi G.P.** (1993) Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Molecular Cell Biology*, **13**, 6012-6023.
34. **Caldana C., Li Y., Leisse A., Zhang Y., Bartholomaeus L., Fernie A.R., Willmitzer L., Giavalisco P.** (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **73**, 897–909.
35. **Caldana C., Martins M.C.M., Mubeen U., Urrea-Castellanos R.** (2019). The magic 'hammer' of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* **70**, 2217–2225.
36. **Canu N., Tufi R., Serafino A.L., Amadoro G., Ciotti M.T., Calissano P.** (2005). Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* **92**, 1228-42.
37. **Carraretto, L., Formentin, E., Teardo, E., Checchetto, V., Tomizioli, M., Morosinotto, T., et al.** (2013). A thylakoid-located two-pore K⁺ channel controls photosynthetic light utilization in plants. *Science* **342**, 114–118. doi: 10.1126/science.1242113
38. **Cao J., Spielmann M., Qiu X. et al.** (2019) The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, **566**, 496–502.
39. **Cao P., Kim S.J., Xing A., Schenck C.A., Liu L., Jiang N., Wang J., Last R.L., Brandizzi F.** (2019) Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in *Arabidopsis*. *ELife*, **8**, e50747.

40. **Chen L., Su Z.Z., Huang L., Xia F.N., Qi H., Xie L.J., Xiao S., Chen Q.F.** (2017). The AMP-activated protein kinase KIN10 is involved in the regulation of autophagy in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, **8**, 1201.
41. **Chen, L. F., Gao, H. S., and Wang, G. Q.**, Effects of intravitreal injection of ranibizumab on serum levels of vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor and glutamate in children with retinopathy of prematurity. *Maternal Child Health Care China*, 2018. **33**(02): p. 349–352.
42. **Chen J., Zhang J., Kong M., Freeman A., Chen H., Liu F.** (2021). More stories to tell: NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1, a salicylic acid receptor. *Plant Cell Environ.* **44**, 1716-1727.
43. **Chen L., Ren F., Zhou L., Wang Q.Q., Zhong H., Li X.B.** (2012). The *Brassica napus* calcineurin B-Like 1/CBL-interacting protein kinase 6 (CBL1/CIPK6) component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signalling. *J Exp Bot.* **17**, 6211-6222.
44. **Chen G.H., Liu M.J., Xiong Y., Sheen J., Wu S.H.** (2018). TOR and RPS6 transmit light signals to enhance protein translation in deetioliating *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci.* **115**, 12823-12828.
45. **Cho H.Y., Wen T.N., Wang Y.T., Shih M.C.** (2016). Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in *Arabidopsis* under submergence. *J Exp Bot.* **67**, 2745-2760.
46. **Chow W. S., Melis A., Anderson J. M.** (1990) Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *PNAS*, **87**, 7502-7506.
47. **Chresta C.M., Davies B.R., Hickson I., Harding T., Cosulich S., Critchlow S.E., Vincent J.P., Ellston R., Jones D., Sini P., James D., Howard Z., Dudley P., Hughes G., Smith L., Maguire S., Hummersone M., Malagu K., Menear K., Jenkins R., Jacobsen M., Smith G.C., Guichard S., Pass M.** (2010) AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* **70**, 288-298.

48. **Chung T.** (2019). How phosphoinositides shape autophagy in plant cells. *Plant Sci.* **281**,146-158.
49. **Couso, I., Smythers, A.L., Ford, M.M., Umen, J.G., Crespo, J.L., Hicks, L.M.** (2021), Inositol polyphosphates and target of rapamycin kinase signalling govern photosystem II protein phosphorylation and photosynthetic function under light stress in *Chlamydomonas*. *New Phytol*, **232**, 2011-2025.
50. **Crepin N., Rolland F.** SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis. *Curr Opin Plant Biol.* 2019 Oct;**51**:29-36. doi: 10.1016/j.pbi.2019.03.006. Epub 2019 May 3. PMID: 31030062.
51. **Crute B.E., Seefeld K., Gamble J., Kemp B.E., Witters L.A.** (1998)Functional domains of the α 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 35347-35354.
52. **Dai L., Wang B., Wang T., Meyer E., Kettel V., Hoffmann N., Mcfarlane H., Li S., Wu X., Picard K., Giavalisco P., Persson S., Zhang Y.** (2022). The TOR complex controls ATP levels to regulate actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **119**, e2122969119.
53. **Dai Q., Xu Z., Ma X. et al.** (2017) mTOR/Raptor signaling is critical for skeletogenesis in mice through the regulation of Runx2 expression. *Cell Death Differ*, **24**, 1886–1899.
54. **Dai, M., Xue, Q., Mccray, T., Margavage, K., Chen, F., Lee, J. H., et al.** (2013). The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 517–534.
55. **Dames S.A., Mulet J.M., Rathgeb-Szabo K., Hall M.N., Grzesiek S.** (2005). The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 20558-20564.
56. **Davies JP, Yildiz FH, Grossman AR** (1999) *Sac3*, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation. *Plant Cell* **11** 1179–1190

57. **Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D** .2010. Arabidopsis root K⁺ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* **123**, 1468–1479.
58. **Demidchik V.** (2014) Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *J Plant Physiol.* **171**, 696-707.
59. **Demidchik V., Maathuis F.J.M.,** (2010) editors. *Ion Channels and Plant Stress Responses*. Springer-Verlag; Berlin/Heidelberg, Germany: New York, NY
60. **Demidchik V., Shabala S.** (2017) Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: The role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated ‘ROS-Ca²⁺ Hub’ *Funct. Plant Biol.* . **45**, 9–27.
61. **Demidchik V., Shabala S.N., Coutts K.B., Tester M.A., Davies J.M.** (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *J. Cell Sci.* ;**116**:81–88.
62. **Demidchik, V., Davenport, R. J., and Tester, M.** (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annu Rev. Plant Biol.* **53**, 67–107.
63. **Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T.A., Pottosin, I.** (2018). Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. *New Phytol*, **220**, 49-69.
64. **Demidchik V., Tester M.** (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **128**, 379-387.
65. **Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicolai M., Bedu M., Robaglia C., Meyer C.** (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO reports*, **8**, 864–870
66. **Díaz-Troya S., Pérez-Pérez M.E., Florencio F.J., Crespo J.L.** (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*, **4**, 851-65.
67. **Dietrich K., Weltmeier F., Ehlert A., Weiste C., Stahl M., Harter K., Droege-Laser W.** (2011). Heterodimers of the *Arabidopsis* transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *The Plant Cell.* **23**, 381–395.

68. **Dobrenel T., Mancera-Martinez E., Forzani C., Azzopardi M., Davanture M., Moreau M., Schepetilnikov M., Chicher J., Langella O., Zivy M., Robaglia C., Ryabova L.A., Hanson J., and Meyer C.** (2016b). The Arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1611.
69. **Dong Y., Silbermann M., Speiser A., Forieri I., Linster E., Poschet G., Samami A. A., Wanatabe M., Sticht C., Teleman A.A., Deragon J.-M., Saito K., Hell R., Wirtz M.** (2017). Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. *Natural Communications*, **8**, 1174.
70. **Dong W., Zhang X., Liu W., Chen Y.J., Huang J., Austin E., Celotto A.M., Jiang W.Z., Palladino M.J., Jiang Y., Hammond G.R., Hong Y.** (2015) A conserved polybasic domain mediates plasma membrane targeting of *Lgl* and its regulation by hypoxia. *J Cell Biol.* **211**, 273-286.
71. **Dong P., Xiong F., Que Y., Wang K., Yu L., Li Z., Ren M.** (2015). Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **6**, 677.
72. **Edel, K. H., and Kudla, J.** (2015). Increasing complexity and versatility: how the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium* **57**, 231–246.
73. **Estruch F., Treitel M.A., Yang X., Carlson M.** (1992) N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics*, **132**, 639-50.
74. **Facchinelli F., Weber A.P.** (2011). The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Front Plant Sci.* **12**, 50.
75. **Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I.** (2014). Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biol Plant* **58**, 9–17 .
76. **Feiguelman G., Fu Y., Yalovsky S.** (2018). ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. *Plant Physiology*, **176**, 57-79.

77. **Figueroa C. M., Lunn J. E.** (2016). A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose, *Plant Physiology*, **172**, 7–27.
78. **Filipe O., De Vleeschauwer D., Haeck A. et al.** (2018) The energy sensor OsSnRK1a confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Scientific Reports*, **8**, 3864.
79. **Finazzi G., Petroustos D., Tomizioli M., Flori S., Sautron E., Villanova V., Rolland N., Seigneurin-Berny D.** (2015). Ions channels/transporters and chloroplast regulation. *Cell Calcium*, **58**, 86–97.
80. **Ford M.M., Smythers A.L., McConnell E.W., Lowery S.C., Kolling D.R.J., Hicks L.M.** (2019). Inhibition of TOR in *Chlamydomonas reinhardtii* Leads to Rapid Cysteine Oxidation Reflecting Sustained Physiological Changes. *Cells*. **8**, 1171.
81. **Forzani, C., G. Duarte, J. Van Leene, G. Clement, S. Huguet, C. Paysant-Le-Roux, R. Mercier, G. De Jaeger, A.-S. Leprince, and C. Meyer** (2019). Mutations of the AtYAK1 kinase suppress TOR deficiency in *arabidopsis*. *Cell Reports*, **27**, 3696–3708 e5.
82. **Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK.** (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*. **462**, 660-4.
83. **Fu L., Wang P., Xiong Y.** (2020) Target of Rapamycin Signaling in Plant Stress Responses. *Plant Physiology*, **182**, 1613-1623.
84. **Funakoshi M., Sasaki T., Nishimoto T., Kobayashi H.** (2002) Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci*. **99**, 745–750.
85. **García-Mata C., Lamattina, L.** (2010). Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytologist*, **188**, 977-984.
86. **Gaxiola R. A., Palmgren, M.G., Schumacher K.** (2007). Plant proton pumps, *FEBS Letters*, 581.
87. **Gissot L., Polge C., Jossier M., Girin T., Bouly J.P., Kreis M., Thomas M.** (2006). AKIN $\beta\gamma$ contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two

proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiology* **142**, 931–944.

88. **Gong D, Guo Y, Schumaker K, Zhu J.K.** (2004). The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in Arabidopsis *Plant Physiology*, **134**, 919–926

89. **Gong W., Li B., Zhang B., Chen W.** (2020) ATG4 Mediated *Psm* ES4326/*AvrRpt2*-Induced Autophagy Dependent on Salicylic Acid in *Arabidopsis Thaliana*. *Int J Mol Sci.* **21**, 5147.

90. **González A, Hall MN.** Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. (2017) *EMBO Journal*, **36**, 397-408.

91. **Halford N.G., Hey S.J.** (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*, **419**, 247-59.

92. **Heisel T., Li C., Grey K., Gibson S.** (2013). Mutations in HISTONE ACETYLTRANSFERASE1 affect sugar response and gene expression in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, **4**

93. **Hafrén A., Üstün S., Hochmuth A., Svenning S., Johansen T., Hofius D.** (2018) Turnip Mosaic Virus Counteracts Selective Autophagy of the Viral Silencing Suppressor HCpro, *Plant Physiology*, **176**, 649–662.

94. **Hao L., Wang H., Sunter G., Bisaro D.M.** (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, **15**, 1034–1048

95. **Hasan M.M., Liu X.D., Waseem M., Guang-Qian Y., Alabdallah N.M., Jahan M.S., Fang X.W.** (2022) ABA activated SnRK2 kinases: an emerging role in plant growth and physiology. *Plant Signal Behav*, **17**, 2071024.

96. **Hara-Nishimura I., Hatsugai N.** (2011).The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ.* **18**, 1298–1204.

97. **Hawley S.A., Davison M., Woods A., Davies S.P., Beri R.K., Carling D., Hardie D.G.** (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver

and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 27879-27887.

98. **Haydon M.J., Hearn T.J., Bell L.J., Hannah M.A., Webb A.A.** (2013). Metabolic regulation of circadian clocks. *Semin Cell Dev Biol.* **24**, 414-421.

99. **Haydon M.J., Mielczarek O., Frank A., Román Á., Webb A.A.R.** (2017). Sucrose and Ethylene Signaling Interact to Modulate the Circadian Clock. *Plant Physiol.* **175**, 947-958.

100. **Hermans C., Hammond J.P., White P.J., Verbruggen N.** (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* **11**, 610–617.

101. **Houimli, S. M., Denden, M., & Mouhandes, B. D.** (2010). Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress. *EurAsian Journal of BioSciences*, **4**, 96-104.

102. **Henninger M., Pedrotti L., Krischke M., Draken J., Wildenhain T., Fekete A., Rolland F., Müller M.J., Fröschel C., Weiste C., Dröge-Laser W.** (2022). The evolutionarily conserved kinase SnRK1 orchestrates resource mobilization during *Arabidopsis* seedling establishment, *The Plant Cell*, **34**, 616–632.

103. **Hrabak E.M., Chan C.W., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.G., Sussman M.R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.K., Harmon A.C.** (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, **132**, 666-80.

104. **Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C., Tsay Y.F.** (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*. **138**, 1184–1194.

105. **Huang, X., Zheng, C., Liu, F., Yang, C., Zheng, P., Lu, X.** (2019). Genetic analyses of the *Arabidopsis* ATG1 kinase complex reveal both kinase-dependent and independent autophagic routes during fixed-carbon starvation. *Plant Cell*. **31**, 2973–2995.

106. **Huss M., Ingenhorst G., König S., Gassel M., Dröse S., Zeeck A., Altendorf K., Wiczorek H.** (2002) Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J Biol Chem.* **277**, 40544-8.

107. **Imamura Y., Chandra J., Mukherjee P.K.** (2008). Fusarium and Candida albicans biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 171–182.
108. **Iqbal N., Khan N.A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A. and Khan M.I.R.** (2017). Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. *Front. Plant Sci.* **8**, 475.
109. **Ivashikina N., Becker D., Ache P., Meyerhoff O., Felle H. H., Hedrich R.** (2001). K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett.* **508**, 463–469.
110. **Izumi M., Nakamura S., Li N.** (2019). Autophagic turnover of chloroplasts: its roles and regulatory mechanisms in response to sugar starvation. *Front Plant Sci.* **10**, 280.
111. **Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Rüegg M.A., Hall A., Hall M.N.** (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, **6**, 1122–1128.
112. **Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Rüegg M.A., Hall A., Hall M.N.** (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, **6**, 1122–1128.
113. **Jamsheer K.M., Jindal S., Sharma M., Awasthi P. S. S., Sharma M., Mannully C.T., Laxmi A.** (2022). A negative feedback loop of TOR signaling balances growth and stress-response trade-offs in plants. *Cell Rep.***39**,110631.
114. **Jeon B.W., Hwang J.U., Hwang Y., Song W.Y., Fu Y., Gu Y., Bao F., Cho D., Kwak J.M., Yang Z., Lee Y.** (2008) The Arabidopsis Small G Protein ROP2 Is Activated by Light in Guard Cells and Inhibits Light-Induced Stomatal Opening. *The Plant Cell*, **20**, 75–87.
115. **Jeong S., Kim J. O., Jeong S. H., Bae I. K., and Song W.** (2015). Evaluation of peptide nucleic acid-mediated multiplex real-time PCR kits for rapid detection of carbapenemase genes in gram-negative clinical isolates. *J. Microbiol. Methods* **113**, 4–9.
116. **Jezeq M., Blatt MR.** (2017) The Membrane Transport System of the Guard Cell and Its Integration for Stomatal Dynamics. *Plant Physiol.* **174(2)**, 487-519.

117. **Jiao L., Liu X.** (2015) Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. *Science*, 350, aac4383.
118. **Jiang R., Carlson M .** (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 2099–2106.
119. **Jossier M., Bouly J.P., Meimoun P., Arjmand A., Lessard P., Hawley S., Grahame Hardie D., Thomas M .** (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **59**, 316–328.
120. **Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serôdio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yanniccari M., Zivcak M.** (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res*, **122**, 121–158.
121. **Kamiyama Y., Hirotani M., Ishikawa S., Minegishi F., Katagiri S., Rogan C.J., Takahashi F., Nomoto M., Ishikawa K., Kodama Y., Tada Y., Takezawa D., Anderson J.C., Peck S.C., Shinozaki K., Umezawa T.** (2021). *Arabidopsis* group C Raf-like protein kinases negatively regulate abscisic acid signaling and are direct substrates of SnRK2. *Proc Natl Acad Sci.* **118**, e2100073118.
122. **Kang H.M., Zaitlen N.A., Wade C.M., Kirby A., Heckerman D., Daly M.J., Eskin E.** (2008) Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics*, **178**, 1709-1723.
123. **Kang R., Zeng L., Zhu S., Xie Y., Liu J., Wen Q.** (2018). Lipid peroxidation drives gasdermin d-mediated pyroptosis in lethal polymicrobial sepsis. *Cell Host Microbe*. **24**, 97–108.e4.
124. **Kazibwe Z., Liu A.-Y., MacIntosh G. C., Bassham, D. C.** (2019). The Ins and Outs of Autophagic Ribosome Turnover. *Cells*. **8**, 1603 .

125. **Ketelaar T., Voss C., Dimmock S. A., Thumm M., Hussey, P. J.** (2004). *Arabidopsis* homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Lett.* **567**, 302–306.
126. **Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., King J. E., Latek R.R., Erdjument-Bromage H.,**
127. **Kim D.O., Jeong S.W., Lee C.Y.** (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, **81**, 321-326.
128. **Kim P. K., Hailey D. W., Mullen R. T., Lippincott–Schwartz J.** (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 20567–20574.
129. **Kleinow T., Bhalerao R., Breuer F, Umeda M., Salchert .K, Koncz C** (2000) Functional identification of an *Arabidopsis* snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast. *Plant J* **23**, 115-22.
130. **Klughammer C., Schreiber U.** (2008b). Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Application Notes*, **1**, 11–14.
131. **Klughammer C., Schreiber U.** (2008a). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes*, **1**, 27–35.
132. **Kravchenko A.N., Negassa W.C., Guber A.K., and Rivers M.L.** (2015). Protection of soil carbon within macro-aggregates depends on intra-aggregate pore characteristics. *Scientific Reports*, **5**, 16261.
133. **Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T** (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**, 1163–1177.
134. **Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, Bucholc M, Dobrowolska G.** (2011) SnRK2 protein kinases--key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS*. **15**, 859-72.
135. **Kunz J., Schneider U., Howald I., Schmidt A., Hall M.N.** (2000) HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 37011-20.

136. **Ladig R., Sommer M.S., Hahn A., Leisegang M.S., Pappasotiriou D.G., Ibrahim M., Elkehal R., Karas M., Zickermann V., Gutensohn M., Brandt U., Klösgen R.B., Schleiff E.** (2011) A high-definition native polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane complexes. *Plant J.* **67**, 181-194.
137. **Larsson C.** (2006) Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton, *Cellular Signalling*, **18(3)**, 276-284.
138. **Laureano-Marín A.M., Aroca Á, Pérez-Pérez M...E, Yruela I, Jurado-Flores A., Moreno I, Crespo J.L., Romero L.C., Gotor C.** (2020). Abscisic Acid-Triggered Persulfidation of the Cys Protease *ATG4* Mediates Regulation of Autophagy by Sulfide. *Plant Cell.* **32**, 3902-3920.
139. **Le Bars R., Marion J., Le Borgne R.** (2014). ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nat Commun* **5**, 4121.
140. **Leigh, R. Wyn Jones, R.** (1984) A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant Cell. *New Phytologist*, **97**, 1-13.
141. **Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M.X., Arondel V., Bates P.D., Baud S., Bird D., Debono A., Durrett T.P., Franke R.B., Graham I.A., Katayama K., Kelly A.A., Larson T., Markham J.E., Miquel M., Molina I., Nishida I., Rowland O., Samuels L., Schmid K.M., Wada H., Welti R., Xu C., Zallot R., Ohlrogge J.** (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book.* **11**, e0161.
142. **Li F., Chung T., Vierstra R.D.** (2014). AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **26**, 788-807.
143. **Li, F., Zhang, M., Zhang, C., Zhou, X.** (2020). Nuclear autophagy degrades a geminivirus nuclear protein to restrict viral infection in solanaceous plants. *New Phytol*, **225**, 1746-1761.

144. **Li L., Song Y., Wang K., Dong P., Zhang X., Li F., Li Z., Ren M.** (2015) TOR-inhibitor insensitive-1 (TRIN1) regulates cotyledons greening in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **6**, 861.
145. **Liao C.Y., Pu Y., Nolan T.M., Montes C., Guo H., Walley J.W., Yin Y., Bassham D.C.** (2023). Brassinosteroids modulate autophagy through phosphorylation of RAPTOR1B by the GSK3-like kinase *BIN2* in *Arabidopsis*. *Autophagy*. **19**, 1293-1310.
146. **Liang S., Lu K., Wu Z., Jiang S.C., Yu Y.T., Bi C., Xin Q., Wang X.F., Zhang D.P.** (2015). A link between magnesium-chelatase H subunit and sucrose nonfermenting 1 (SNF1)-related protein kinase SnRK2.6/OST1 in *Arabidopsis* guard cell signalling in response to abscisic acid. *J Exp Bot.* **66**, 6355-6369.
147. **Liang J., Zhang S., Yu W., Wu X., Wang W., Peng, F.** (2021). *PpSnRK1α* overexpression alters the response to light and affects photosynthesis and carbon metabolism in tomato. *Physiologia Plantarum*, **173**, 1808–1823
148. **Liu K.H., Niu Y., Konishi M., Wu Y., Du H., Sun Chung H., Li L., Boudsocq M., McCormack M., Maekawa S., Ishida T., Zhang C., Shokat K., Yanagisawa S., and Sheen J.** (2017). Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature*, **545**, 311–316.
149. **Liu, F., Hu, W., Li, F., Marshall, R. S., Zarza, X., Munnik, T.** (2020). AUTOPHAGY-RELATED14 and its associated phosphatidylinositol 3-kinase complex promotes autophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **32**, 3939–3960.
150. **Liu S., Chen M., Wang Y., Li H., Qi S., Geng J., Lu K.** (2023). Autophagy is regulated by endoplasmic reticulum calcium homeostasis and sphingolipid metabolism. *Autophagy*. **23**, 1-2
151. **Liu Y., Bassham D.C.** (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. **29**, e11883.
152. **Liu Y, Bassham D.C.**(2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol.* **63**, 215-37.

153. **Liu Y., Duan X., Zhao X., Ding W., Wang Y., and Xiong Y.** (2021). Diverse nitrogen signals activate convergent ROP2-TOR signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*, **56**, e1285.
154. **Lorenzo A M., Pedrotti B., Wurzinger D., Anrather A., Simeunovic C., Weiste C., Valerio K., Dietrich T., Kirchler T., Nägele J., Vicente C., Hanson J., Baena-González E., Chaban C., Weckwerth W., Dröge-Laser W., Teige M.** (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *eLife*. 4:e05828.
155. **Lovás M., Murová I., Mockovciaková A., Rowson N., Jakabský Š.** (2003) Intensification of magnetic separation and leaching of Cu-ores by microwave radiation. *Separation and Purification Technology*, **31**, 291-299.
156. **Luan S.** (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci.* 14, 37-42.
157. **Lumbreras V., Albà M.M., Kleinow T., Koncz C., Pagès M.,** (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Reports* **2**, 55–60.
158. **Lundin A., Thore A.** (1975) Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. *Applied Microbiology*, **30**, 713.
159. **Ma Q.J, Sun M.H., Lu J., Hu D.G, Kang H., You C.X, Hao Y.J.** (2020) Phosphorylation of a malate transporter promotes malate excretion and reduces cadmium uptake in apple. *J Exp Bot.* **71**, 3437-3449.
160. **Mao, H., Li, S., Nakashima, Z., Cheng, X., Li, F., Mei, F., Chen, N.** (2020) Regulatory changes in TaSNAC8-6A are associated with drought tolerance in wheat seedlings. *Plant Biotechnol. J.*, **18**, 1078–1092
161. **Mahfouz M.M., Kim S., Delauney A.J., Verma D.P.** (2005) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*, **18**, 477-90.
162. **Mair A., Pedrotti L., Wurzinger B., Anrather D., Simeunovic A., Weiste C., Valerio C., Dietrich K., Kirchler T., Nägele T., Carbajosa J.V., Hanson J., Baena-**

- González E., Chaban C., Weckwerth W., Dröge-Laser W., Teige M.** (2015) SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *ELife*, **4**, e05828.
163. **Mallén-Ponce M. J., Pérez-Pérez M. E., Crespo J. L.** (2022) Deciphering the function and evolution of the target of rapamycin signaling pathway in microalgae. *Journal of Experimental Botany*, **73**, 6993–7005.
164. **Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., Robaglia C.** (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 6422–6427.
165. **Minina E.A., Moschou P.N., Vetukuri R.R., Sanchez-Vera V., Cardoso C., Liu Q., Elander P.H., Dalman K., Beganovic M., Lindberg Yilmaz J., Marmon S., Shabala L., Suarez M.F., Ljung K., Novák O., Shabala S., Stymne S., Hofius D., Bozhkov P.V.** (2018). Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *J Exp Bot.* **69**, 1415-1432.
166. **Mishra D.** (2023). Closing the loop: Three musketeers of autophagy-ATG2, ATG18a, and ATG9. *Plant Physiology*, **193**, 177–178.
167. **Mohammed B., Bilooei S. F., Doczi R., Grove E., Railo S., Palme K.,** (2018). Converging light, energy and hormonal signaling control meristem activity, leaf initiation, and growth. *Plant Physiol.* **176**, 1365–1381.
168. **Mohannath G., Jackel J.N., Lee Y.H., Buchmann R.C., Wang H., Patil V., Adams A.K., Bisaro D.M .** (2014). A complex containing SNF1-related kinase (SnRK1) and adenosine kinase in *Arabidopsis*. *PLoS One.* **9**, e87592.
169. **Montané M. H., 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.
170. **Moreau M., Azzopardi M., Clément G., Dobrenel T., Marchive C., Renne C., Martin-Magniette M.-L., Taconnat L., Renou J.-P., Robaglia C., Meyer C.** (2012). Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GβL, a partner of the target of

Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell*, **24**, 463–481.

171. **Moreau M., M. Azzopardi, G. Clément, T. Dobrenel, C. Marchive, C. Renne, M.L. Martin-Magniette, L. Taconnat, J.P. Renou, C. Robaglia, C.** (2012). Meyer Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GbL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days

172. **Mugume, Y., Kazibwe, Z., Bassham, D. C.** (2020). Target of Rapamycin in control of autophagy: puppet master and signal integrator. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8259.

173. **Nakagami H., Sugiyama N., Mochida K., Daudi A., Yoshida Y., Toyoda T., Tomita M., Ishihama Y., Shirasu K.** (2010) Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiology*, **153**, 1161-1174.

174. **Nakagami H., Sugiyama N., Mochida K., Daudi A., Yoshida Y., Toyoda T., Crozet M., Milet E., Mirza D.** (2016) The impact of domestic regulations on international trade in services: evidence from firm-level data. *Journal of Comparative Economics*, **44**, 585-607.

175. **Nakamura S., Izumi M.** (2019). Chlorophagy is ATG gene-dependent microautophagy process. *Plant Signal Behav.* **14**, 1554469

176. **Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S.,** (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1345–1363.

177. **Nguyen H.M., Sako K., Matsui A., Suzuki Y., Mostofa M.G., Ha C.V., Tanaka M., Tran L.-S.P., Habu Y., Seki M.** (2017) Ethanol Enhances High-Salinity Stress Tolerance by Detoxifying Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana* and Rice. *Front. Plant Sci.* **8**, 1001.

178. **Noda, N.N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y. and Inagaki, F.** (2008), Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells*, **13**, 1211-1218.

179. **Nolan, T.M. , Brennan, B. , Yang, M. , Chen, J. , Zhang, M. , Li, Z. , Wang, X. , Bassham, D.C. , Walley, J. , Yin, Y.** (2017). Selective autophagy of BES1 mediated by DSK2 balances plant growth and survival. *Dev. Cell* **41**, 33–46.
180. **Nukarinen E., Nägele T., Pedrotti L., Wurzinger B., Mair A., Landgraf R., Börnke F., Hanson J., Teige M., Baena-Gonzalez E., Dröge-Laser W. , Weckwerth W.** (2016) Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, **6**, 31697.
181. **Ohta M., Guo Y., Halfter U., Zhu J.K.** (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci .* **100**, 11771-11776.
182. **Pandey P., Ramegowda V., Senthil-Kumar M.** (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, **16**, 723.
183. **Pandey, K. C., Sijwali, P. S., Singh, A., Na, B. K., and Rosenthal, P. J.** (2004). Independent intramolecular mediators of folding, activity, and inhibition for the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2. *J. Biol. Chem.* **279**, 3484–3491.
184. **Pankiv S., Clausen T.H., Lamark T., Brech A., Bruun J.A., Outzen H., Øvervatn A., Bjørkøy G., Johansen T.** (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* **282**, 24131-24145.
185. **Pedrotti L., Weiste C., Nägele T., Wolf E., Lorenzin F., Dietrich K., Mair A., Weckwerth W., Teige M., Baena-González E., Dröge-Laser W.** (2018) Snf1-RELATED KINASE1-Controlled C/S1-bZIP Signaling Activates Alternative Mitochondrial Metabolic Pathways to Ensure Plant Survival in Extended Darkness. *The Plant Cell*, **30**, 495–509.
186. **Peixoto B., Baena-González E.** (2022). Management of plant central metabolism by SnRK1 protein kinases, *Journal of Experimental Botany*, Volume **73**, 7068–7082

187. **Pereyra, C., Parola, R., Lando, A.P.** (2023). High Sugar Concentration Inhibits TOR Signaling Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul* **42**, 4309–4323.
188. **Pier P.A., Berkowitz G.A.** (1987) Modulation of water-stress effects on photosynthesis by altered leaf K⁺. *Plant Physiol.* **85**, 655- 661.
189. **Pierre, M., Traverso, J. A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., & Meinel, T.** (2007). N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **19**, 2804-2821.
190. **Pu Y., Luo X., Bassham D.C.** (2017) TOR-Dependent and -Independent Pathways Regulate Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **8**, 1204.
191. **Qi, H., Xia, F.N., and Xiao, S.** (2021). Autophagy in plants: Physiological roles and post-translational regulation. *J. Integr. Plant Biol.* **63**, 161–179.
192. **Qi, H., Xia, F.N., Xie, L.J., Yu, L.J., Chen, Q.F., Zhuang, X.H., Wang, Q., Li, F., Jiang, L., Xie, Q., and Xiao, S.** (2017). TRAF family proteins regulate autophagy dynamics by modulating AUTOPHAGY PROTEIN6 stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **29**: 890–911.
193. **Qi Y., Qi W., Liu S., Sun L., Ding A., Yu G.** (2020). TSPAN9 suppresses the chemosensitivity of gastric cancer to 5-fluorouracil by promoting autophagy. *Cancer Cell Int.* **20**, 4.
194. **Ragel P., Raddatz N., Leidi E.O., Quintero F.J., Pardo J.M.** (2019) Regulation of K⁺ Nutrition in Plants. *Front Plant Sci.* **10**, 281.
195. **Ramon M Ruelens P Li Y Sheen J Geuten K Rolland F .** (2013). The hybrid Four-CBS-Domain KIN subunit functions as the canonical subunit of the plant energy sensor SnRK1. *The Plant Journal.* **75**, 11–25.
196. **Ramon M, Dang TVT, Broeckx T, Hulsmans S, Crepin N, Sheen J, Rolland F** (2019) Default activation and nuclear translocation of the plant cellular energy sensor SnRK1 regulate metabolic stress responses and development. *Plant Cell.* **31**, 1614–1632
197. **Reggiori F., Klionsky D.J.** (2013). Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics.* **194**, 341-361.

198. **Remillard C.V., Yuan J.X.-J.** (2004). Activation of K⁺ channels: An essential pathway in programmed cell death. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, 49–67.
199. **Ren D., Villeneuve N.F., Jiang T., Wu T., Lau A., Toppin H.A., Zhang D.D.** (2011). Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **108**, 1433-1438.
200. **Ren M., Qiu S., Venglat P., Xiang D., Feng L., Selvaraj G., Datla R.** (2011) Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **155**, 1367–1382.
201. **Roberts S. K., Snowman B. N.**(2000) The Effects of ABA on Channel Mediated K⁺ Transport across Higher Plant Roots. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1585-1594.
202. **Rodland G. E., Tvegård T., Boye E. and Grallert B.** (2014). Crosstalk between the Tor and Gcn2 pathways in response to different stresses. *Cell Cycle* **13**, 453-461.
203. **Ruiz-Gayosso A., Rodríguez-Sotres R., Martínez-Barajas E., Coello P.** (2018). A role for the carbohydrate-binding module (CBM) in regulatory SnRK1 subunits: the effect of maltose on SnRK1 activity. *Plant J.* **96**,163-175.
204. **Sakr S., Wang M., Dédaldéchamp F., Perez-Garcia M.D., Ogé L., Hamama L., Atanassova R.** (2018). The Sugar-Signaling Hub: Overview of Regulators and Interaction with the Hormonal and Metabolic Network. *Int J Mol Sci.* **19**, 2506
205. **Salem M.A., Li Y., Wiszniewski A., Giavalisco 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 Journal*, **92**, 525–545.
206. **Sarbassov D.D., Ali S.M., Kim D.H., Guertin D.A., Latek R.R., Erdjument-Bromage H.,**
207. **Saxton R.A. and Sabatini D.M.** (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, **168**, 960-976.
208. **Saxton R.A., Sabatini D.M.** (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, **168**, 960-976.

209. **Scarpin M R, Leiboff S, O Brunkard J.** (2020) Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation *eLife* **9**:e58795
210. **Schepetilnikov M., Dimitrova M., Mancera-Martínez E., Geldreich A., Keller M., Ryabova L.A.** (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO Journal*, **32**, 1087-102.
211. **Schepetilnikov M., Makarian J., Srour O., Geldreich A., Yang Z., Chicher J., Hammann P., Ryabova L.A.** (2017) GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO Journal*, **36**, 886-903.
212. **Schepetilnikov M., Ryabova L.A.** (2019). Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants, *Plant Physiology*, **176**, 1095–1105
213. **Schmelzle T., Hall M.N.** (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, **103**, 253-262.
214. **Schwachtje J., Minchin P.E., Jahnke S., van Dongen J.T., Schittko U., Baldwin I.T.** (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **103**, 12935–12940.
215. **Semenov M.A., Halford N.G.** (2009) Identifying target traits and molecular mechanisms for wheat breeding under a changing climate. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 2791–2804.
216. **Shabala S.**, (2017) Signalling by potassium: another second messenger to add to the list?, *Journal of Experimental Botany*, **68**, 4003–4007.
217. **Shabala S., Demidchik V., Shabala L., Cuin T.A., Smith S.J., Miller A.J., Davies J.M., Newman I.A.** (2006). Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiology*. **141**, 1653–1665.
218. **Shabala, S., Cuin, T.A.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, **133**, 651-669.
219. **Shen H., Zhu L., Castillon A., Majee M., Downie B., Huq E.** (2008) Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-

INTERACTING FACTOR1 from *Arabidopsis* depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *Plant Cell*, **20**, 1586-1602.

220. **Shen W., Reyes M.I., Hanley-Bowdoin L.** (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiology*, **150**, 996–1005.

221. **Shi L, Wu Y, Sheen J.** (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development*. **145**, dev160887.

222. **Silva, T.F., Fonseca, A., Saraiva, I., Boaventura, R.A., Vilar, V.J., Silva, T.V.** (2016). Scale-up and cost analysis of a photo-Fenton system for sanitary landfill leachate treatment. *Chem. Eng. J.* **283**, 76–88.

223. **Smeekens S., Ma J., Hanson J., Rolland F.** (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol.* **13**, 274-279.

224. **Somssich M., Byoung Il Je, Simon R., Jackson D.** 2016; CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*. **143**, 3238–3248.

225. **Son O., Kim S., Kim D., Hur Y. S., Kim J., Cheon C. I.** (2018). Involvement of TOR signaling motif in the regulation of plant autophagy. *B Biochem. Biophys. Res. Commun.* **501**, 643–647.

226. **Song Y., Li L., Yang Z., Zhao G., Zhang X., Wang L., Zheng L., Zhuo F., Yin H., Ge X., Zhang C., Yang Z., Ren M., Li F.** (2019) Target of Rapamycin (TOR) regulates the expression of lncRNAs in response to abiotic stresses in cotton. *Frontiers in Genetics*, **9**, 690

227. **Song Y., Mohammed S.A., Khaled M., Abdul J., and Maozhi R.** (2021) Contributions of TOR Signaling on Photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 8959.

228. **Song Y., Zhao G., Zhang X., Li L., Xiong F., Zhuo F., Zhang C., Yang Z., Datla R., Ren M., and Li F.** (2017). The crosstalk between Target of Rapamycin (TOR) and jasmonic acid (JA) signaling existing in *Arabidopsis* and cotton. *Scientific Reports*, **7**, 45830.

229. **Soto-Burgos, J., and Bassham, D.C.** (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, **12**, e0182591.
230. **Soto-Burgos J., Zhuang X., Jiang L., Bassham D.C.** (2017) Dynamics of Autophagosome Formation. *Plant Physiol.* **176**, 219-229.
231. **Sugawara J., Hayashi K., Yokoi T., Cortez-Cooper M.Y., DeVan A.E., Anton M.A., Tanaka H.** (2005). Brachial-ankle pulse wave velocity: an index of central arterial stiffness? *J Hum Hypertens.* **19**, 401-406.
232. **Steinhorst, L., and Kudla, J.** (2013). Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1573–1581.
233. **Suam G., Charalampos R.** (2017). The TOR Signaling Pathway in Spatial and Temporal Control of Cell Size and Growth. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **5**
234. **Sugden C., Crawford R.M., Halford N.G., and Hardie D.G.** (1999a). Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant Journal*, **19**, 433–439.
235. **Sugden C., Donaghy P.G., Halford N. G., Hardie D. G.** (1999). Two SNF1-Related Protein Kinases from Spinach Leaf Phosphorylate and Inactivate 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase, Nitrate Reductase, and Sucrose Phosphate Synthase in Vitro, *Plant Physiology*, **120**, 257–274.
236. **Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Katicheva L., Semina M., Sukhov V.** (2016) Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves. *Journal of Plant Physiology*, **202**, 57.
237. **Sustr M., Soukup A., Tylova E.** (2019) Potassium in root growth and development. *Plants*, **8**, 435.
238. **Suttangkakul A., Li F., Chung T., 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.

239. **Szczerba, M. W., Britto, D. T., and Kronzucker, H. J.** (2009). K(+) transport in plants: physiology and molecular biology. *J. Plant Physiol.* **166**, 447–466.
240. **Sze H, Chanroj S.** (2018). Plant Endomembrane Dynamics: Studies of K⁺/H⁺ Antiporters Provide Insights on the Effects of pH and Ion Homeostasis. *Plant Physiol.* **177**, 875-895.
241. **Takahara T., Amemiya Y., Sugiyama R., Maki M., Shibata H.** (2020) Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *Journal of Biomedical Science*, **27**, 87.
242. **Takatsuka K., Hatakeyama J., Bessho Y., Kageyama R.** (2004) Roles of the *bHLH* gene *Hes1* in retinal morphogenesis. *Brain Res.* **1004**, 148-155.
243. **Tang R.J., Wang C., Li K., Luan S.** (2020) The CBL-CIPK Calcium Signaling Network: Unified Paradigm from 20 Years of Discoveries. *Trends in Plant Science*, **25**, 604-617.
244. **Tang, Y.Y., Hölzel, B. & Posner, M.** (2015).The neuroscience of mindfulness meditation. *Nat Rev Neurosci* **16**, 213–225.
245. **Tatebe H, Shiozaki K.** **Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways.** (2017) *Biomolecules*, **7**, 77.
246. **Tatebe H., Shiozaki K.** (2017) Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules*, **7**, 77.
247. **Tempst P., Sabatini D.M.** (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology*, **14**, 1296-302.
248. **Tempst P., Sabatini D.M.** (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, **110**, 163-175.
249. **Thalman M., Pazmino D., Seung D., Horrer D., Nigro A., Meier T., Kölling K., Pfeifhofer H.W., Zeeman S.C., Santelia D.** (2016). Regulation of Leaf Starch Degradation by Abscisic Acid Is Important for Osmotic Stress Tolerance in Plants. *Plant Cell.* **28**, 1860-1878.

250. **Thompson A.R., Doelling J.H., Suttangkakul A., Vierstra R.D.** (2005). Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the *ATG8* and *ATG12* conjugation pathways. *Plant Physiol.* **138**, 2097-2110.
251. **Trono D., Laus M. N., Soccio M., Alfarano M., Pastore D.** (2015) Modulation of Potassium Channel Activity in the Balance of ROS and ATP Production by Durum Wheat Mitochondria—An Amazing Defense Tool Against Hyperosmotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 213.
252. **Turck F., Zilbermann F., Kozma S. C., Thomas G., & Nagy F.** (2004). Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **134**, 1527-35.
253. **Upadhyaya, S., Rao, B.J.** (2019). Reciprocal regulation of photosynthesis and mitochondrial respiration by TOR kinase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Direct.* **3**, 1–17.
254. **Urrea-Castellanos R., Caldana C., Henriques R.** (2022). Growing at the right time: interconnecting the TOR pathway with photoperiod and circadian regulation, *Journal of Experimental Botany*, **73**, 7006–7015.
255. **Van Doorn W.G., Papini A.** (2013). Ultrastructure of autophagy in plant cells: a review. *Autophagy.* **12**, 1922-36.
256. **Voitsekhovskaja O.V., Apollonov V.I., Murtuzova A.V., Rabadanova C.K., Charnysh M.A., Drozdova I.V., Belyaeva A.I., Kovaleva O.N., Loskutov I.G., Pawlowski K., Demidchik V.V., Tyutereva E.V.** (2020) Photosynthetic activity as assessed via chlorophyll a fluorescence suggests a role of potassium channels in root to shoot signaling. *Photosynthetica*, **58**, 608–621.
257. **Voitsekhovskaja O. V., Schiermeyer A., Reumann S.** (2014). Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco *BY-2* suspension-cultured cells. *Frontiers in Plant Science.* **5**
258. **Wahl V., Ponnu J., Schlereth A., Arrivault S., Langenecker T., Franke A., Feil R., Lunn J.E., Stitt M., Schmid M.** (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* **339**, 704-707.

259. **Wang P., Wang T., Han J., Li M., Zhao Y., Su T., Ma C.** (2021) Plant Autophagy: An Intricate Process Controlled by Various Signaling Pathways. *Front. Plant Sci.* **12**, 754982.
260. **Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C.C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y.J., Du, Y., Xie, S., Zhang, C., Gao, J., Cao, M., Huang, X., Zhu, Y., Tang, K., Wang, X., Tao, W.A., Xiong, Y., and Zhu, J.K.** (2018). Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Molecular Cell*, **69**, e106.
261. **Wang P., Zhao Y., Li Z., Hsu C.C., Liu X., Fu L., Hou Y.J., Du Y., Xie S., Zhang C., Gao J., Cao M., Huang X., Zhu Y., Tang K., Wang X., Tao W.A., Xiong Y., Zhu J.K.** (2017). Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response. *Mol Cell*. **69**, 100-112.e6
262. **Wang, W.R., Liang, J.H., Wang, G.F.** (2020). Overexpression of *PpSnRK1α* in tomato enhanced salt tolerance by regulating ABA signaling pathway and reactive oxygen metabolism. *BMC Plant Biol* **20**, 128.
263. **Wang J., Guan H., Dong R., Liu C., Liu Q., Liu T, Wang L., He C.** (2019). Overexpression of maize sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1 genes, *ZmSnRK1s*, causes alteration in carbon metabolism and leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. **691**, 34-44.
264. **Wang, X., Gao, Y., Yan, Q.** (2016) Salicylic acid promotes autophagy via NPR3 and NPR4 in *Arabidopsis* senescence and innate immune response. *Acta Physiol Plant* **38**, 241.
265. **Wang Y., Yan H., Qiu Z., Hu B., Zeng B., Zhong C., Fan C.** (2019) Comprehensive analysis of SnRK gene family and their responses to salt stress in *Eucalyptus grandis*. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 2786.
266. **Warpeha K.M., Upadhyay S., Yeh J., Adamiak J., Hawkins S.I., Lapik Y.R., Anderson M.B., Kaufman L.S.** (2007). The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**, 1590–1600.

267. **Warpeha K.M., Upadhyay S., Yeh J., Adamiak J., Hawkins S.I., Lapik Y.R., Anderson M.B., Kaufman L.S.** (2007). The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**, 1590–1600.
268. **Weinl S., Kudla J.** The CBL-CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives.
269. **Williams S.P., Rangarajan P., Donahue J.L., Hess J.E., Gillaspay G.E.** (2014). Regulation of sucrose non-fermenting related kinase 1 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. **5**, 324.
270. **Wu, H., Zhang, X., Giraldo, J.P.** (2018) It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant Soil*. **431**, 1–17.
271. **Xie J., Wang X., C.G. Proud.** (2018) Who does TORC2 talk to? *Biochemical Journal*, **475**, 1721–1738.
272. **Xie J., Wang X., Proud C.G.** (2018) Who does TORC2 talk to? *Biochemical Journal*, **475**, 1721–1738.
273. **Xiong, Y., Contento, A.L., Bassham, D.C.** (2005). *AtATG18a* is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **42**, 535-546.
274. **Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q. Xiang C., Sheen J.** (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496, 181-186.
275. **Xiong Y., Sheen J.** (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 2836-42.
276. **Xiong Y., Wu V.W., Lubbe A., Qin L., Deng S., Kennedy M., Bauer D., Singan V.R., Barry K., Northen T. R., Grigoriev I.V., Glass N. L.** (2017). A fungal transcription factor essential for starch degradation affects integration of carbon and nitrogen metabolism. *PLoS Genetics*.

277. **Yamauchi S., Mano S., Oikawa K., Hikino K., Teshima K. M., Kimori Y.** (2019). Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 19187–19192.
278. **Yang X., Bassham D.C.** (2015). New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* **320**, 1-40.
279. **Yang Y.P., Hu F., Zheng F., Mao C.J., Hu W.D., Xiong K.P., Wang F., Liu C.F.** (2013) Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin.* **34**, 625-635.
280. **Yang Y., Guo Y.** (2018). Unraveling salt stress signaling in plants. *J Integr Plant Biol* **60**, 796–804.
281. **Yang H., Rudge D.G., Koos J.D., Vaidialingam B., Yang H.J., Pavletich N.P.** (2013) mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, **497**, 217-23.
282. **Yang Z., Klionsky D.J.** (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* **12**, 814-822.
283. **Yoon S.H., Chung T.** (2019). Protein and RNA Quality Control by Autophagy in Plant Cells. *Mol Cells.* **42**, 285-291.
284. **Young-H.C, Hong J.-W., Kim E.-C., Yoo S.-D.** (2012). Regulatory Functions of SnRK1 in Stress-Responsive Gene Expression and in Plant Growth and Development, *Plant Physiology*, **158**, 1955–1964.
285. **Yoshida S., Kono K., Lowery D.M., Bartolini S., Yaffe M.B., Ohya Y., Pellman D.** (2006) Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* **313**, 108-111
286. **Yoshimoto K.** (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1355-1365.
287. **Yoshimoto K., Ohsumi Y.** (2018). Unveiling the Molecular Mechanisms of Plant Autophagy—From Autophagosomes to Vacuoles in Plants, *Plant and Cell Physiology*, **59**, 1337–1344.
288. **Yun S., Linxuan L., Zhaoen Y., Ge Z., Xueyan Z., Lingling W., Lei Z., Fengping Z., Huan Y., Xiaoyang G., Chaojun Z., Zuoren Y., Maozhi R., Fuguang L.** (2019)

Target of Rapamycin (TOR) Regulates the Expression of lncRNAs in Response to Abiotic Stresses in Cotton. *Frontiers in Genetics*, 9, 690.

289. **Zhai Z., Keereetaweep J., Liu H., Feil R., Lunn J. E., Shanklin J.** (2018). Trehalose 6-phosphate positively regulates fatty acid synthesis by stabilizing WRINKLED1. *Plant Cell*, **30**, 2616–2627. **Zhang B., Shao L., Wang J, Zhang Y., Guo X., Peng Y., Cao Y., Lai Z.** (2021). Phosphorylation of *ATG18a* by *BAK1* suppresses autophagy and attenuates plant resistance against necrotrophic pathogens, *Autophagy*, **17**, 2093-2110.

290. **Zheng Z., Xu X., Crosley R.A., Greenwalt S.A., Sun Y, Blakeslee B., Wang L., Ni W., Sopko M.S, Yao C.** (2010). The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **153**, 99–113.

291. **Zhang Y., Li X.** (2019). Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Plant Biol.* **50**, 29-36.

292. **Zörb C., Senbayram M., Peiter E.** (2014) Potassium in agriculture--status and perspectives. *J Plant Physiol.* **171**, 656-669.