

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Института биологии и биотехнологии растений

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
of the Institute of Plant Biology and Biotechnology

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



СЕРИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ



SERIES

OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

5 (323)

**ҚЫРҚҮЙЕК – ҚАЗАН 2017 ж.
СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ 2017 г.
SEPTEMBER – OCTOBER 2017**

1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963

ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі, м. ғ. д., проф. **Ж. А. Арзықұлов**

Абжанов Архат проф. (Бостон, АҚШ),
Абелев С.К., проф. (Мәскеу, Ресей),
Айтқожина Н.А., проф., академик (Қазақстан)
Ақшулақов С.К., проф., академик (Қазақстан)
Алшынбаев М.К., проф., академик (Қазақстан)
Бәтпенев Н.Д., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Берсімбаев Р.И., проф., академик (Қазақстан)
Беркінбаев С.Ф., проф., (Қазақстан)
Бисенбаев А.К., проф., академик (Қазақстан)
Бишимбаева Н.К., проф., академик (Қазақстан)
Ботабекова Т.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Жансүгірова Л.Б., б.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин Қ.Ж., проф., академик (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Заядан Б.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ishchenko Alexander prof. (Villejuif, France)
Исаева Р.Б., проф., (Қазақстан)
Қайдарова Д.Р., проф., академик (Қазақстан)
Кохметова А.М., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Күзденбаева Р.С., проф., академик (Қазақстан)
Лось Д.А., prof. (Мәскеу, Ресей)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Макашев Е.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Муминов Т.А., проф., академик (Қазақстан)
Огарь Н.П., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Омаров Р.Т., б.ғ.к., проф., (Қазақстан)
Продеус А.П. проф. (Ресей)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Сапарбаев Мұрат проф. (Париж, Франция)
Сарбасов Дос проф. (Хьюстон, АҚШ)
Тұрысбеков Е.К., б.ғ.к., асс.проф. (Қазақстан)
Шарманов А.Т., проф. (АҚШ)

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2017

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р

академик НАН РК, д.м.н., проф. **Ж. А. Арзыкулов**

Абжанов Архат проф. (Бостон, США),
Абелев С.К. проф. (Москва, Россия),
Айтхожина Н.А. проф., академик (Казахстан)
Акшулаков С.К. проф., академик (Казахстан)
Алчинбаев М.К. проф., академик (Казахстан)
Батпенов Н.Д. проф. член-корр.НАН РК (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Берсимбаев Р.И., проф., академик (Казахстан)
Беркинбаев С.Ф. проф. (Казахстан)
Бисенбаев А.К. проф., академик (Казахстан)
Бишимбаева Н.К. проф., академик (Казахстан)
Ботабекова Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Джансугурова Л. Б. к.б.н., проф. (Казахстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., академик (Казахстан), зам. гл. ред.
Заядан Б.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Исаева Р.Б. проф. (Казахстан)
Кайдарова Д.Р. проф., академик (Казахстан)
Кохметова А.М. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Кузденбаева Р.С. проф., академик (Казахстан)
Лось Д.А. prof. (Москва, Россия)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Макашев Е.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Казахстан)
Огарь Н.П. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Омаров Р.Т. к.б.н., проф. (Казахстан)
Продеус А.П. проф. (Россия)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Сапарбаев Мурат проф. (Париж, Франция)
Сарбасов Дос проф. (Хьюстон, США)
Турсыбеков Е. К., к.б.н., асс.проф. (Казахстан)
Шарманов А.Т. проф. (США)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов
Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2017

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov, academician of NAS RK, Dr. med., prof.

Abzhanov Arkhat, prof. (Boston, USA),
Abelev S.K., prof. (Moscow, Russia),
Aitkhozhina N.A., prof., academician (Kazakhstan)
Akshulakov S.K., prof., academician (Kazakhstan)
Alchinbayev M.K., prof., academician (Kazakhstan)
Batpenov N.D., prof., corr. member (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bersimbayev R.I., prof., academician (Kazakhstan)
Berkinbaev S.F., prof. (Kazakhstan)
Bisenbayev A.K., prof., academician (Kazakhstan)
Bishimbayeva N.K., prof., academician (Kazakhstan)
Botabekova T.K., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bosch Ernesto, prof. (Spain)
Dzhansugurova L.B., Cand. biol., prof. (Kazakhstan)
Ellenbogen Adrian, prof. (Tel-Aviv, Israel),
Zhambakin K.Zh., prof., academician (Kazakhstan), deputy editor-in-chief
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Isayeva R.B., prof. (Kazakhstan)
Kaydarova D.R., prof., academician (Kazakhstan)
Kokhmetova A., prof., corr. member (Kazakhstan)
Kuzdenbayeva R.S., prof., academician (Kazakhstan)
Los D.A., prof. (Moscow, Russia)
Lunenfeld Bruno, prof. (Israel)
Makashev E.K., prof., corr. member (Kazakhstan)
Muminov T.A., prof., academician (Kazakhstan)
Ogar N.P., prof., corr. member (Kazakhstan)
Omarov R.T., Cand. biol., prof. (Kazakhstan)
Prodeus A.P., prof. (Russia)
Purton Saul, prof. (London, UK)
Rakhypbekov T.K., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Saparbayev Murat, prof. (Paris, France)
Sarbassov Dos, prof. (Houston, USA)
Turysbekov E.K., cand. biol., assoc. prof. (Kazakhstan)
Sharmanov A.T., prof. (USA)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz> / biological-medical.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2017

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 57 – 65

A. P. Kravchenko, G. A. Toxobayeva, A. Kausbekova, R. I. Bersimbaev

L. N. Gumilyov Eurasian National University, Institute of Cell Biology and Biotechnology,
Astana, Kazakhstan.
E-mail: ribers@mail.ru

**TOR COMPLEX 1 IMPACT ON ACTIVITY
AND GENES EXPRESSION OF THE ALDEHYDE
OXIDASE ENZYME IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Abstract. TOR (Target of Rapamycin) signaling pathway is present in most eukaryotic species and performs the main function that is responsibility for the coordination of growth, development and survival depending on the availability of nutrients, energy and the availability of various environmental signals. In this paper, using ATP-competitive inhibitor AZD-8055 affecting the activity of TOR complex 1 and *lst8-1* mutant line, we studied the effect of TOR complex 1 on activity and gene expression of the aldehyde oxidase enzyme in *Arabidopsis thaliana*. Our results showed that aldehyde oxidase activity and expression level of *AO1* and *AO2* genes were increased in *lst8-1* mutant line and upon partial inhibition of TOR complex 1 activity by 1 μM AZD-8055 ATP-competitive inhibitor treatment. Because LST8 protein is the main partner of TOR complex and AZD-8055 inhibitor affects its activity, it has been suggested that the TOR complex in certain conditions can act as a negative regulator of aldehyde oxidase activity.

Key words: TOR complex 1, *Arabidopsis thaliana*, LST8, aldehyde oxidase (AO), AZD-8055 inhibitor.

УДК 581.1

А. П. Кравченко, Г. А. Токсобаева, А. Каусбекова, Р. И. Берсимбаев

Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева,
Институт клеточной биологии и биотехнологии, Астана, Казахстана

**ВЛИЯНИЕ TOR КОМПЛЕКСА 1 НА АКТИВНОСТЬ И
ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ
У *ARABIDOPSIS THALIANA***

Аннотация. TOR (Target of Rapamycin) сигнальный путь присутствует у большинства видов эукариот и выполняет общую главную функцию для всех организмов: отвечает за координацию роста, развития и выживаемости в зависимости от наличия питательных веществ, энергии и наличия различных экологических сигналов. В настоящей работе с использованием АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055, воздействующего на активность TOR комплекса 1, а также при использовании мутантной линии *Arabidopsis thaliana lst8-1* было изучено влияние TOR комплекса 1 на активность и экспрессию генов альдегидоксидазы. При частичном ингибировании активности TOR комплекса 1 воздействием АТФ-конкурентного ингибитора и у мутантной линии *lst8-1* было установлено повышение активности фермента и уровня экспрессии *AO1* и *AO2* генов, кодирующих альдегидоксидазу. Ввиду того, что LST8 белок является главным партнером TOR комплекса 1, а AZD-8055 ингибитор влияет на его активность, было предположено, что TOR комплекс 1 в определенных условиях может выступать в качестве фактора негативной регуляции активности альдегидоксидазы.

Ключевые слова: TOR комплекс 1, *Arabidopsis thaliana*, LST8, альдегидоксидаза (АО), AZD-8055 ингибитор.

Введение. Модуляция роста и развития обеспечивается сложной сетью биохимических процессов и сигнальных путей во всех организмах. TOR сигнальный путь является одной из основополагающих сигнальных систем в клетках эукариот. TOR киназа относится к семейству фосфатидилинозитольных киназ и в клетках дрожжей и млекопитающих формирует, по крайней мере, два структурно и функционально различных комплекса: TORC1 и TORC2. Данные комплексы регулируют рост и размер клеток, активируя множество анаболических процессов, связанных с биогенезом органелл, включая биосинтез белков и липидов [1, 2].

В клетках млекопитающих TOR комплекс 1 включает белок RAPTOR, mLST8, PRAS40 и белок Deptor. mTORC1 комплекс участвует в регуляции синтеза белка путем фосфорилирования 4E-BP1 и S6K1-белков, и его принято также называть рапамицин-чувствительным комплексом в связи с тем, что последний, образуя комплекс с внутриклеточным рецептором FKBP12, способен ингибировать активность mTORC1 [3].

В состав TOR комплекса 2 входят mTOR, рапамицин-нечувствительный спутник mTOR - Rictor, mLST8, mSIN1, Protor 1 и Deptor. Установлено, что mTORC2 играет ключевую роль в пролиферации, метаболизме и выживании клеток, организации цитоскелета [4].

Геном *Arabidopsis thaliana* кодирует TOR и основные компоненты TOR комплекса 1. Изменение активности TOR киназы и уровня экспрессии TOR гена приводят к изменениям в росте и развитии растений. Более того, нарушение функций компонентов pTOR комплекса 1, *AtRaptor* и *AtLST8-1*, также приводит к задержке вегетативного роста, снижению апикальной доминантности и ненормальному развитию цветка, что подтверждает ключевую роль TOR сигнализации в управлении ростом и развитием растений [5-8].

Несмотря на последние открытия, связанные с функционированием TOR-сигнальной системы в целом, молекулярные функции и механизмы регуляции TOR киназы в растительных клетках остаются малоизученными, что объясняется отсутствием молекулярных и биохимических подходов для определения активности TOR киназы, эмбриональной летальностью *tor null* мутантов *Arabidopsis thaliana* и нечувствительностью к рапамицину наземных растений [9].

Ввиду того, что TOR киназа является консервативной среди эукариотических организмов, было изучено влияние АТФ-конкурентных ингибиторов нового поколения, недавно разработанных для TOR киназы человека, на рост *Arabidopsis thaliana*. Было показано, что данные ингибиторы тормозят рост корней *Arabidopsis thaliana* в доза-зависимой манере. Так, например, при ингибировании AZD-8055 одновременно с ростом корней наблюдалась задержка развития семядолей и листьев [10].

Использование ингибиторов нового поколения позволит исследователям лучше понять роль TOR в механизмах регуляции процессов роста и развития растительного организма. На сегодняшний день остаются малоизученными взаимоотношения TOR сигналинга с метаболизмом фитогормонов. Однако, известно что ауксин активирует TOR, который регулирует экспрессию ауксин-зависимых генов [11]. Результаты наших исследований указывают на вовлеченность TOR сигналинга в регуляцию метаболизма АБК у *Arabidopsis thaliana*, так у *lst8* мутанта и при ингибировании TOR киназы уровень гормона АБК был значительно снижен [12].

Как известно, фермент альдегидоксидаза участвует в биосинтезе двух гормонов: абсцизовой кислоты и индол-3-уксусной кислоты, которая принадлежит к семейству ауксинов [13, 14].

Фермент альдегидоксидаза (АО; ЕС 1.2.3.1) является широко распространенным цитозольным молибдоферментом, который катализирует окисление различных ароматических и неароматических альдегидов в их соответствующие карбоновые кислоты [15].

В модельном растении *Arabidopsis thaliana* альдегидоксидазу кодируют четыре гена *AO1-AO4*, образующие гомо- и гетеродимеры с различной субстрат-специфичностью. У *Arabidopsis thaliana* были идентифицированы две гомодимерные изоформы белков AO1 и AO2, также известные как АО α и АО γ , соответственно, и гетеродимер AO1/AO2, который также обозначают как АО β . В то время как AO1 гомодимер способен окислять индол-3-ацетальдегид до индол-3-уксусной кислоты с высокой эффективностью, AO2 гомодимер показывает большую специфичность к 1-нафталдегиду в качестве субстрата, который окисляется до нафтил-1-уксусной кислоты. Как известно, индол-3-уксусная кислота принадлежит к семейству ауксинов, что предполагает возможную физиологическую роль альдегидоксидазы в биосинтезе растительного гормона ауксина [16].

Кроме того, был обнаружен еще один гетеродимер, состоящий из АО2 и АО3 мономеров, известный как АОδ и характеризующийся высокой специфичностью к абсцизовому альдегиду – предшественнику растительного гормона абсцизовой кислоты (АБК), которая участвует во многих аспектах роста и развития растений, в том числе прорастание семян, вегетативный рост, а также адаптация к различным стрессам окружающей среды [17].

Ввиду того, что альдегидоксидаза катализирует различные окислительно-восстановительные реакции и участвует в процессах биосинтеза фитогормонов в растениях [13, 14], целью настоящей работы было изучение влияния мутации в гене *AtLST8-1*, кодирующего белок-партнер TOR комплекса 1 у растений, а также частичного ингибирования TOR посредством АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на активность и экспрессию генов альдегидоксидазы у *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы

Объект исследования и условия выращивания. Семена *Arabidopsis thaliana* линии Col-8 (растения дикого типа (WT), экотип “Columbia”) и линии SALK_02459 с вставкой в четвертом экзоне гена At3g18140 (*AtLST8-1*) получены из Ноттингемского центра арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Великобритания). Семена растений, несущих мутацию по гену *AtLST8-1* в гомозиготном состоянии (*lst8-1*), были предоставлены Christian Meyer (Институт Жан-Пьер Бургина, г. Версаль, Франция). Семена мутантной линии *lst8-1* и дикого типа стерилизовали в растворе Bayoclore и 96% этанола в объемном соотношении 1/10 в течение 5 мин, трижды промывали 96% этанолом. Семена высевали в чашки Петри на среду 0.4×Мурасиге-Скуга (МС) («Sigma», USA) с добавлением 1% сахарозы, 0.8% агара. Растения выращивали в контролируемой камере роста в условиях длинного дня 16/8 ч при температуре 18 °С и освещенности 80-90μЕ.

Обработка растений ингибитором AZD-8055. Для изучения влияния АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на рост *Arabidopsis thaliana*, семена дикого типа (WT) были посеяны на питательную среду МС. После прорастания, пятидневные проростки были перенесены на питательную среду 0.4×МС для контроля и с добавлением 0.5, 1 и 2 μМ AZD-8055 ингибитора. После чего растения выращивали в течение 8 дней в контролируемой камере роста в условиях длинного дня 16/8 ч при температуре 18 °С и освещенности 80-90μЕ.

Экстракция белка. Для экстрагирования белков с целью определения активности фермента альдегидоксидаза использовался буфер для экстракции следующего состава: 50 mM Трис-НСl (рН 7.5), 1 mM EDTA, 1 μМ молибдат натрия, 10 μМ FAD, 2mM дитиотреитол. Для предотвращения протеолиза в буфер для экстракции добавлялся набор ингибиторов протеаз (Roche). Растения гомогенизировали в жидком азоте, далее взвесив равное количество растительного материала для всех образцов, добавляли буфер из расчета 1:4 (вес/объем). После инкубации в течение 10 минут, центрифугировали при +4⁰С в течение 20 мин при 14000 об/ мин. Отбирали супернатант и использовали его для определения активности фермента. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд.

Native-PAGE. Электрофорез нативных белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 94,7 mM Трис-НСl буфер (рН 8.4). В качестве концентрирующего геля использовали 5% ПААГ, содержащий 15,8 mM Трис-Н₃РO₄ буфер, рН 6.9. Субстратный буфер для определения активности альдегидоксидазы (АО, ЕС 1.2.3.14) имел следующий состав: 50 mM Трис-НСl (рН 8.4), 1mM индолил-3-альдегида, 3,4 mM МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5Diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma, USA), 0,1 mM PMS(N-methylbenzopyrazine methyl sulfate) (Sigma, USA) [23]. Нативный гель инкубировали с вышеназванными субстратами при 37°С в течение 1 часа. Обработка результатов определения активности проводилась с помощью программного обеспечения Image J 1.46r (National Institute of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Определение активности альдегидоксидазы проводилось в трех независимых биологических повторностях. На рисунке 3 приведены результаты типичного эксперимента.

Выделение РНК. Выделение тотальной РНК из растительного материала проводилось классическим методом с использованием TRIZOL® Reagent. Для проведения обратной транскрипции использовался 1мкг тотальной РНК, MLV обратная транскриптаза (Thermo Scientific) и олигонуклеотиды-(dT) (Thermo Scientific).

Real-time qPCR. Экспрессию генов определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Eppendorf Realplex MasterCycler) с использованием флуоресцентного ДНК-связывающего красителя SYBR® Green I в соответствии с протоколом производителя. Для одной реакции использовалось 5 мкл кДНК, разбавленной в 5 раз. Для определения экспрессии генов использовались следующие праймеры: AO1 (At5g20960): forward 5- GACGGGCTCGGCAACAG -3, reverse 5- CATGAAAACCGGCGATACG -3; AO2 (At3g43600): forward 5- TGTCATGAAAAACGCGTACTCTCT-3, reverse 5- CTCTATCTTTGCCAGGGTTGGTT-3; EF1 α (At5g60390): forward 5-CTGGAGGTTTTGAGGCGGTA -3; reverse 5-CAAAGGGTCAAAGCAAGAAGA -3 и APT1 (At1g27450): forward 5-CGGGGATTTTAAGTGGAACA-3; reverse 5-GAGACATTTTGCGTGGGATT -3.

Относительный уровень экспрессии AO1 и AO2 генов нормализовали как уровень синтетического гена (SRG) с использованием двух генов домашнего хозяйства EF1 α и APT1 как было описано ранее в работе Vandesompele с соавтор. [18] по следующей формуле: $\%SRG = \sqrt{2^{(Ct_{EF1} - Ct_{goi})}} \times 2^{(Ct_{APT1} - Ct_{goi})}$.

Результаты

В экспериментах были использованы растения мутантной линии *Arabidopsis thaliana* SALK_02459, содержащие вставку Т-ДНК в четвертом экзоне гена At3g18140 (*AtLST8-1*), а также дикий тип (WT) в условиях выращивания с добавлением АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 для частичного снижения активности TOR комплекса 1 у *Arabidopsis thaliana*.

При наблюдении за ростом растений *A.thaliana* дикого типа и мутантной линии *lst8-1* были отмечены отличия в вегетативном росте. Как видно из представленных на рисунке 1 данных, по сравнению с диким типом *A.thaliana* у растений линии *lst8-1* наблюдается задержка развития листовых пластинок.

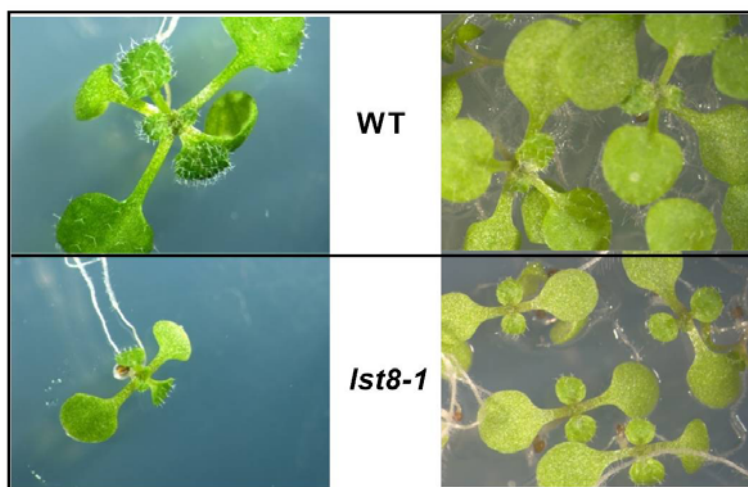


Рисунок 1 – Фенотипические особенности растений *A.thaliana* мутантной линии *lst8-1*.
WT – дикий тип, *lst8-1* – мутантная линия

Для оценки влияния АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на рост *A. thaliana*, растения дикого типа выращивали на стандартной среде МС и на среде МС с добавлением 0.5, 1 и 2 μ M AZD-8055 в течение 8 дней (рисунок 2). Растения в этих условиях характеризовались задержкой вегетативного роста (по сравнению с растениями дикого типа), при этом увеличение концентрации ингибитора было прямо пропорционально задержке роста.

Исходя из полученных результатов, наиболее выраженные фенотипические проявления у *Arabidopsis thaliana* наблюдались при использовании ингибитора концентрации 1 μ M AZD-8055. В то же время данная концентрация не приводила к явной задержке вегетативного роста и гибели растений. В связи с чем данная концентрация AZD-8055 использовалась в основной серии экспериментов.

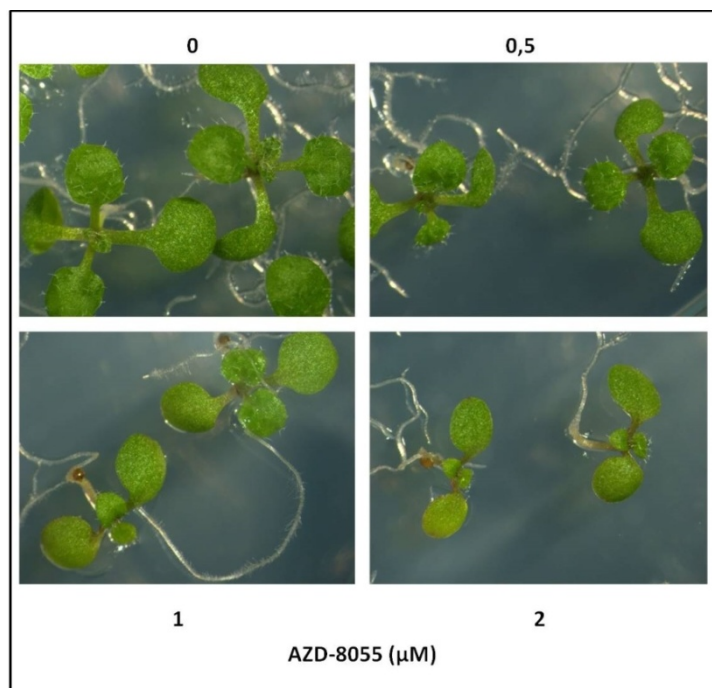


Рисунок 2 – Влияние различных концентраций АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на фенотипические особенности растений *A.thaliana*. Внешний вид растений дикого типа *A.thaliana* на 8-й день роста на среде МС с добавлением 0,5, 1 и 2 μM AZD-8055

В нашей работе мы определяли активность трех изоформ альдегидоксидазы: AO1, AO1/2, AO2. Известно, что изоформа AO1 вовлечена в процессы биосинтеза ключевого гормона роста растений ауксина, в то время как AO2 изоформа играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах.

Результаты исследований показали, что у *lst8-1* мутантной линии и в диком типе в условиях ингибирования 1 μM AZD-8055 были обнаружены существенные различия в активности всех изоформ альдегидоксидазы в сравнении с контролем (рисунок 3).

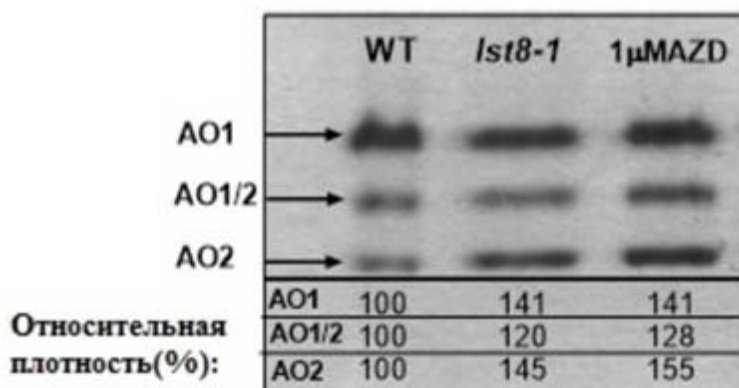


Рисунок 3 – Активность альдегидоксидазы растений *A. thaliana* дикого типа (WT), мутантной линии *lst8-1* и после обработки 1 μM AZD-8055

Как можно видеть из представленных на рисунке 3 данных, при использовании субстрата индолил-3-альдегида, активность изоформ AO1 и AO2 альдегидоксидазы у растений мутантной линии *lst8-1*, и у растений дикого типа, подвергшихся воздействию 1 μM AZD-8055 была выше, в среднем, в 1.5 раза, по сравнению с растениями контрольной группы. Активность третьей изоформы альдегидоксидазы (AO1/2) у растений мутантной линии *lst8-1* и дикого типа после обработки 1 μM AZD-8055 повышалась незначительно по сравнению с контролем.

Кроме того, в исследуемых образцах нами был проанализирован уровень экспрессии генов *AO1* и *AO2*, кодирующих соответствующие изоформы альдегидоксидазы. Так, на рисунке 4 показано, что уровень экспрессии *AO1* гена у мутантной линии *lst8-1* был в 2 раза выше в сравнении с диким типом, при этом экспрессия *AO2* гена также была более выражена у мутантной линии. В условиях роста дикого типа на среде МС с 1 μM AZD-8055, также наблюдалось увеличение экспрессии *AO1* и *AO2* генов в сравнении с контролем.

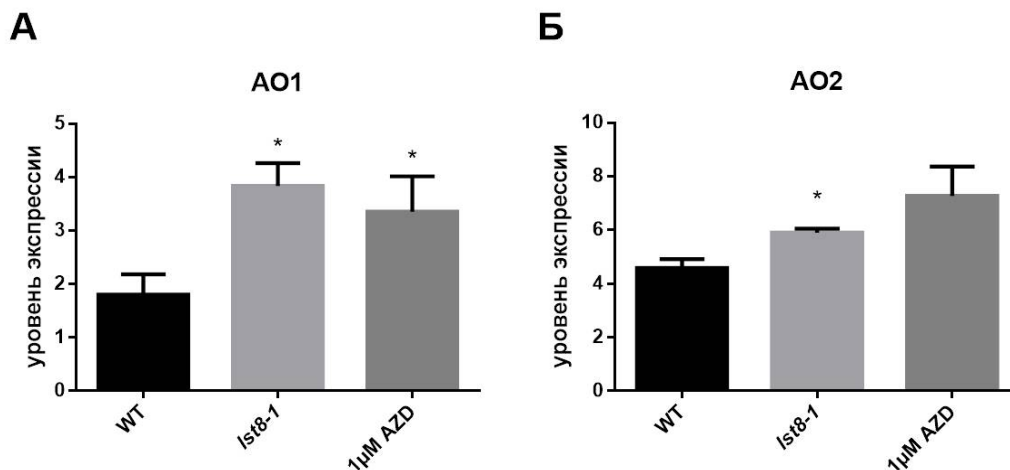


Рисунок 4 – Экспрессия генов *AO1* и *AO2*, кодирующих фермент альдегидоксидаза, у растений *A.thaliana* дикого типа (WT) и мутантной линии *lst8-1* и после обработки 1 μM AZD-8055.

А – уровень экспрессии *AO1* гена; Б – уровень экспрессии *AO2* гена

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что в условиях снижения активности TOR комплекса 1 наблюдается повышение экспрессии генов и активности *AO1* и *AO2* изоформ альдегидоксидазы.

Обсуждение

В данной работе изучено влияние мутации в *AtLST8-1* гене и АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на активность и экспрессию генов фермента альдегидоксидаза у *Arabidopsis thaliana*.

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что несмотря на различия в строении и стратегии роста у дрожжей, растений и животных, TOR сигналинг у высших организмов играет ключевую роль в координации процессов роста и развития в зависимости от наличия питательных веществ, энергии и внешних сигналов. Различные манипуляции с активностью TOR киназы и уровнем экспрессии TOR гена, нарушение функций компонентов TORC1 комплекса приводят к изменениям в росте и развитии растений, что подтверждает незаменимую роль TOR сигнализации в управлении ростом и развитием растений [19-21].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований по изучению TOR регуляции клеточных процессов в растительных клетках, некоторые вопросы остаются малоизученными. В частности, не исследованы взаимоотношения pTOR сигнальной системы с метаболизмом фитогормонов с точки зрения их взаимодействия в процессах роста и развития растений, а также в процессах адаптации к стрессовым условиям окружающей среды [22, 23].

Если исходить из положения о том, что TOR играет ключевую роль в процессах роста и развития растительного организма, то необходимо исследовать взаимоотношения TOR сигналинга с другими сигнальными системами клетки, запускаемыми фитогормонами. Фермент альдегидоксидаза участвует в биосинтезе двух гормонов: абсцизовой кислоты и индол-3-уксусной кислоты, которая принадлежит к семейству ауксинов.

В нашей работе в растениях со сниженной активностью TOR комплекса 1, обусловленной T-ДНК вставкой в гене *AtLST8-1*, а также использованием специфичного для TOR киназы ингибитора AZD-8055, установлено повышение активности изоформ *AO1* и *AO2*, а также экспрессии генов кодирующих эти изоформы. На основании полученных данных, мы предполагаем, что TOR

в определенных условиях может выступать в качестве фактора негативной регуляции активности фермента альдегидоксидаза.

В целом, однако, естественно предполагать, что TOR сигнальная система растений может вступать в сложные регуляторные взаимодействия с АБК и ауксин гормональными системами не только посредством альдегидоксидазы, но и других ферментных систем.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Martin D, Hall M. (2005) The expanding TOR signaling network, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17:158-166. DOI:10.1016/j.ceb.2005.02.008
- [2] Wullschlegel S, Loewith R, Hall M. (2006) TOR signaling in growth and metabolism, *Cell*, 124:471-484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016
- [3] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nature Reviews-Molecular Cell Biology*, 12:21-35. DOI: 10.1038/nrm3025
- [4] Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 307:1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148
- [5] John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C. (2011) Plant TOR signaling components, *Plant Signalling and Behavior*, 6:1700-1705. DOI: 10.4161/psb.6.11.17662
- [6] 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, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:6422-6427. DOI: 10.1073/pnas.092141899
- [7] Moreau M, Azzopardi M, Clement J, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Tacconat L, Renou JP, 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. DOI: 10.1105/tpc.111.091306
- [8] Anderson G, Veit B, Hanson M. (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth, *BMC Biology*, 3:144-153. DOI: 10.1186/1741-7007-3-12
- [9] Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B. (2015) TOR signalling in plants, *Biochem J*, 470:1-14. DOI: 10.1042/BJ20150505
- [10] Montane MH, Menand B. (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change, *Journal of Experimental Botany*, 64(14):4361-74. DOI: 10.1093/jxb/ert242
- [11] Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martinez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA. (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h, *EMBO J*, 32:1087-1102. DOI: 10.1038/emboj.2013.61
- [12] Kravchenko A, Citerne S, Jehanno I, Bersimbaev RI, Veit B, Meyer C, Leprince A-S. (2015) Mutation in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 467:992-997. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.028
- [13] Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of Arabidopsis thaliana, *Plant Physiol*, 116:687-693. PMID: PMC35127
- [14] Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:12908-12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197
- [15] Garattini E, Fratelli M, Terao M. (2008) Mammalian aldehydeoxidases: genetics, evolution and biochemistry, *Cell Mol Life Sci*, 65:1019-1048. DOI: 10.1007/s00018-007-7398-y
- [16] Akaba S, Seo M, Dohmae N, Takio K, Sekimoto H, Kamiya Y, Furuya N, Komano T, Koshiba T. (1999) Production of homo and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of Arabidopsis thaliana, *J Biochem*, 126:395-401.
- [17] Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsushashi W, Toyomasu T, Koshiba T. (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 134:1697-1707. DOI: 10.1104/pp.103.036970
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol*, 3. PMID: PMC126239
- [19] Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S. (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis, *Plant Cell*, 24:4850-4874. DOI: 10.1105/tpc.112.107144
- [20] Xiong Y, Sheen J. (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism, *Plant Physiol*, 164:499-512. DOI: 10.1104/pp.113.229948
- [21] Кравченко АП, Булгакова ОВ, Берсимбаев РИ. (2015) Влияние АТФ конкурентного TOR киназного ингибитора на рост корней и экспрессию гена AtTOR у *Arabidopsis thaliana*, *Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева*, 6:143-146.
- [22] Кравченко А.П., Берсимбаев Р.И. (2016) TOR-сигнализация у растений, *Известия НАН РК*, 2:125-137.
- [23] Берсимбаев РИ, Кравченко АП. (2016) Роль TOR сигнальной системы у *Arabidopsis thaliana* при солевом стрессе, *Материалы всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде»*, Иркутск, Россия. С.14.

REFERENCES

- [1] Martin D, Hall M. (2005) The expanding TOR signaling network, *Curr. Opin. Cell Biol*, 17:158-166. DOI:10.1016/j.ceb.2005.02.008
- [2] Wullschleger S, Loewith R, Hall M. (2006) TOR signaling in growth and metabolism, *Cell*, 124:471-484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016
- [3] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nature Reviews-Molecular Cell Biology*, 12:21-35. DOI: 10.1038/nrm3025
- [4] Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 307:1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148
- [5] John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C. (2011) Plant TOR signaling components, *Plant Signalling and Behavior*, 6:1700-1705. DOI: 10.4161/psb.6.11.17662
- [6] 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, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:6422-6427. DOI: 10.1073/pnas.092141899
- [7] Moreau M, Azzopardi M, Clement J, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Tacconat L, Renou JP, 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. DOI: 10.1105/tpc.111.091306
- [8] Anderson G, Veit B, Hanson M. (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth, *BMC Biology*, 3:144-153. DOI: 10.1186/1741-7007-3-12
- [9] Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B. (2015) TOR signalling in plants, *Biochem J*, 470:1-14. DOI: 10.1042/BJ20150505
- [10] Montane MH, Menand B. (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change, *Journal of Experimental Botany*, 64(14):4361-74. DOI: 10.1093/jxb/ert242
- [11] Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martinez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA. (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h, *EMBO J*, 32:1087-1102. DOI: 10.1038/emboj.2013.61
- [12] Kravchenko A, Citerne S, Jehanno I, Bersimbaev RI, Veit B, Meyer C, Leprince A-S. (2015) Mutation in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 467:992-997. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.028
- [13] Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of Arabidopsis thaliana, *Plant Physiol*, 116:687-693. PMID: PMC35127
- [14] Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:12908-12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197
- [15] Garattini E, Fratelli M, Terao M. (2008) Mammalian aldehydeoxidases: genetics, evolution and biochemistry, *Cell Mol Life Sci*, 65:1019-1048. DOI: 10.1007/s00018-007-7398-y
- [16] Akaba S, Seo M, Dohmae N, Takio K, Sekimoto H, Kamiya Y, Furuya N, Komano T, Koshiba T. (1999) Production of homo and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of Arabidopsis thaliana, *J Biochem*, 126:395-401.
- [17] Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsunashi W, Toyomasu T, Koshiba T. (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 134:1697-1707. DOI: 10.1104/pp.103.036970
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol*, 3. PMID: PMC126239
- [19] Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S. (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis, *Plant Cell*, 24:4850-4874. DOI: 10.1105/tpc.112.107144
- [20] Xiong Y, Sheen J. (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism, *Plant Physiol*, 164:499-512. DOI: 10.1104/pp.113.229948
- [21] Kravchenko AP, Bulgakova OV, Bersimbaev RI. (2015) Vlijanie ATF konkurentnogo TOR kinaznogo inhibitora na rost kornej i jekspressiju gena AtTOR u Arabidopsis thaliana, *Vestnik ENU im. L.N. Gumileva*, 6:143-146.
- [22] Kravchenko A.P., Bersimbaev R.I. (2016) TOR-signalizacija u rastenij, *Izvestija NAN RK*, 2:125-137.
- [23] Bersimbaev RI, Kravchenko AP. (2016) Rol' TOR signal'noj sistemy u Arabidopsis thaliana pri solevom stresse, *Materialy vsrossijskoj nauchnoj konferencii «Faktory ustojchivosti rastenij i mikroorganizmov v jekstremal'nyh prirodnyh uslovijah i tehnogennoj srede»*, Irkutsk, Rossija. S.14.

А. П. Кравченко, Г. А. Токсобаева, А. Каусбекова, Р. И. Берсимбаев

Клеткалық биология және биотехнология ҒЗИ, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті,
Астана, Қазақстан

**ARABIDOPSIS THALIANA ӨСІМДІГІНДЕГІ TOR 1 КОМПЛЕКСІНІҢ АЛЬДЕГИД ОКСИДАЗА
ФЕРМЕНТІНІҢ БЕЛСІНДІЛІГІ МЕН ГЕН ЭКСПРЕССИЯСЫНА ӘСЕРІ**

Аннотация. TOR (Target of Rapamycin) сигналды жолы эукариоттардың барша түрлерінде кездеседі және де барлық ағзаларға ортақ негізгі функцияны атқарады: өсу мен даму процестеріне жауап береді, сонымен қатар, қоректік заттар қоры, энергия мен экологиялық сигналдардың бар болуына байланысты тіршілікке қабілеттілікті реттейді. Берілген зерттеу жұмысында TOR 1 кешеніне әсер ететін, АТФ-бәсекелес ингибитор AZD-8055 және *lst8-1* мутантты қатарын пайдалана отырып, *Arabidopsis thaliana*-ғы TOR 1 кешенінің альдегидоксидаза ферментінің белсенділігі мен ген экспрессиясына әсері қарастырылды. *lst8-1* мутантты қатарындағы АТФ-бәсекелес ингибитордың көмегімен TOR 1 кешенінің белсенділігін ішінара тежеу арқылы альдегидоксидаза белсенділігі және *AO1* мен *AO2* гендер (альдегидоксидаза кодтайтын гендер) экспрессиясының жоғарылауы анықталды. LST8 белогі TOR 1 кешенінің басты серіктесі болуына, ал AZD-8055 ингибиторы оның қызметіне ықпал етуіне байланысты TOR 1 кешені белгілі бір жағдайларда альдегидоксиданың негативті реттеуші фактор ретінде бола алатындығы ұйғарылды.

Түйін сөздер: TOR кешені 1, *Arabidopsis thaliana*, LST8, альдегидоксидаза (АО), AZD-8055 ингибитор.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, Т. М. Апендиев*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 13.09.2017.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
15,5 п.л. Тираж 300. Заказ 5.