

MAGDALENA WIERZCHOWIECKA¹, SŁAWOMIR SAMARDAKIEWICZ², ADAM WOŹNY³

¹*Zakład Hydrobiologii*

²*Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej*

³*Zakład Botaniki Ogólnej*

Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Umultowska 89, 61-614 Poznań

E-mail: m.wierzchowiecka@wp.pl

sas@amu.edu.pl

adaw@amu.edu.pl

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓRKI ROŚLINNEJ – PROCES O „WIELU TWARZACH”

WPROWADZENIE

Termin programowana śmierć komórki (ang. programmed cell death, PCD), oznacza aktywny proces eliminacji jej składników, prowadzący ostatecznie do śmierci, zachodzący podczas rozwoju, niekiedy także w odpowiedzi na warunki środowiskowe (GREENBERG 1996). Realizacja programu obumierania następuje dzięki uruchomieniu przez samą komórkę mechanizmów molekularnych i fizjologicznych, prowadzących do samounicestwienia jej protoplastu (CHARZYŃSKA 2004).

W przeciwieństwie do programowanej śmierci komórki u zwierząt, zainteresowanie tym procesem u roślin pojawiło się znacznie później. Dziś termin ten figuruje powszechnie w tytułach publikacji wielu czasopism botanicznych. Czy oznacza to, że proces ten jest już dobrze poznany? Zainteresowanie tematem przyczyniło się do znacznego poszerzenia wiedzy na temat okoliczności występowania oraz przebiegu PCD w organach roślin. Mimo to wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi.

Programowana śmierć komórki jest uznawana za jedno z najważniejszych zjawisk odpowiedzialnych za formowanie organów rośliny, a następnie utrzymanie w nich homeostazy. Jest to więc proces niezbędny na wielu etapach ontogenezy (ZAGÓRSKA-MAREK 2007).

Już w początkowym okresie rozwoju rośliny, PCD odpowiada za właściwe wykształcenie zarodka w czasie embriogenezy. Degradacji ulegają wówczas komórki tworzące np.

tapetum, bielmo, czy wieszadło, które spełniły właściwe sobie funkcje (WOJCIECHOWSKA 2001).

PCD warunkuje również prawidłową histogenezę niektórych tkanek. W przypadku aerenchimy, przestwory międzykomórkowe umożliwiające magazynowanie gazów, mogą powstawać w wyniku śmierci określonych komórek. Innym, dobrze opisanym przykładem jest obumieranie przyszłych członów naczyń w ksylemie, co warunkuje powstanie kanałów transportujących m.in. wodę w roślinie.

Szczególnie sprzeczne opinie dotyczą wzajemnych zależności między końcowym etapem rozwojowym, jakim jest starzenie, a programowaną śmiercią komórki. Podczas procesu starzenia, z organów które w efekcie obumierają (np. liście jesienia) zostają wycofywane zmagazynowane zasoby węgla i azotu do pozostałych części rośliny (SIMONOVA i MOSTOWSKA 2001, LAM 2004, ROGERS 2006, DELLA MEA i współaut. 2007). Niektórzy badacze sugerują, aby pojęcie „starzenie” odnosić jedynie do całych organów bądź roślin, natomiast proces PCD do zmian na poziomie jednej komórki (NOODE’N 2004). Inni autorzy uważają, że są to dwa odrębne procesy, w których starzenie poprzedza PCD (VAN DOORN i WOLTERING 2004). Zauważono również, że w obumierającym liście, jeżeli degradacja nie doprowadziła do nieodwracalnych zmian, istnieje możliwość zatrzymania mechanizmów niszczących i przywrócenia

pełnej żywotności jego komórkom. Zaproponowano, aby w przypadkach, w których proces obumierania jest jeszcze odwracalny, nazwać go starzeniem, a dopiero po przekroczeniu tej granicy traktować starzenie jako programowaną śmierć komórki (VAN DOORN i WOLTERING 2004, VAN DOORN 2005, MÜNTZ 2007). Większość autorów skłania się jednak do wniosku, że procesy te są w dużej mierze zsynchronizowane i starzenie uznaje się jako zaprogramowaną genetycznie, samobójczą śmierć komórki – PCD (BEERS i współaut. 2000, LAM 2004, NOODE´N 2004, VAN DOORN i WOLTERING 2004). Taki udział programowanej śmierci komórki podczas starzenia jest jednak typowy tylko dla roślin. W świecie zwierząt nie ma konieczności wycofywania zmagazynowanych zasobów węgla i azotu do tkanek żywych poprzez PCD. Starzenie komórek zwierzęcych nie musi się wiązać z ich śmiercią. Komórka stara nie proliferuje, zmienia się jej morfologia i metabolizm, ale może ona bardzo długo funkcjonować i żyć.

Do programowanej śmierci komórki zaliczyć należy również reakcję nadwrażliwości (ang. hypersensitive response, HR). Rośliny

nie mają typowego dla zwierząt układu odpornościowego. W ich przypadku często istnieje inna forma obrony w czasie ingerencji mikroorganizmu patogennego. Zasadniczym elementem takiej odpowiedzi może być HR (GREENBERG 2005). Zjawisko to polega na bardzo szybkim obumarciu protoplastów komórek zainfekowanych oraz sąsiadujących, co ułatwia zahamowanie rozprzestrzeniania się zakażenia w tkance (ZAGÓRSKA-MAREK 2007). Liczne badania wykazały, że degradacja umierających podczas HR komórek, dokonuje się na drodze programowanej śmierci (LAM 2004, 2005; LIU i współaut. 2005; VAN DOORN i WOLTERING 2005; PATEL i współaut. 2006; SEAY i współaut. 2006; VIANELLO i współaut. 2007).

Wymienione powyżej procesy, świadczą o konieczności występowania procesu PCD na wielu etapach ontogenezy rośliny. Przebieg zmian zachodzących na terenie obumierających komórek bywa również odmienny w zależności od różnic w ich budowie, wymaganego tempa zahamowania żywotności oraz końcowego przeznaczenia obumarłych komórek (LAM 2004, ZAGÓRSKA-MAREK 2007).

RÓŻNORODNOŚĆ PRZEBIEGU PROCESU PCD

AUTOFAGIA – PROCES DEGRADACJI KOMÓRKI, TYPOWY DLA ROŚLIN

W przypadku komórek zwierzęcych, organellami „odpowiedzialnymi” za trawienie zdegradowanych pozostałości komórki w procesie PCD, są lizosomy. Ze względu na to, czy są to lizosomy pochodzące z umierającej komórki, czy też z otaczających makrofagów, wyróżnia się dwa główne rodzaje programowanej śmierci u zwierząt – autofagię i apoptozę. Jednak o ile w przypadku autofagii lizosomy „pełnią wiodącą rolę” w procesie obumierania, to w przypadku apoptozy odpowiadają one jedynie za „usunięcie” pozostałości komórki (VAN DOORN i WOLTERING 2005, PISZCZEK i GUTMAN 2007).

W zdecydowanej większości przypadków programowanej śmierci u zwierząt występuje apoptoza (łac. *apoptosis*, opadanie liści) (ZHIVOTOVSKY 2002). Termin ten oznacza zaprogramowany genetycznie proces obumierania komórki, w którego końcowej fazie fragmenty struktury w postaci ciałek apoptotycznych zostają pochłonięte przez sąsiadujące makrofagi, a następnie strawione w lizosomach

(VAN DOORN i WOLTERING 2005, VIANELLO i współaut. 2007).

U roślin zjawisko takie nie zachodzi, co spowodowane jest głównie istnieniem ścian komórkowych, które uniemożliwiają proces wchłonięcia martwych pozostałości protoplastu przez sąsiadujące komórki (BASSHAM 2007, LAM 2004). U roślin podczas programowanej śmierci mamy do czynienia z procesem samotrąwienia – autofagią.

Autofagia (gr. *autós*-sam, *phágos*-pożerać) jest powszechnym zjawiskiem obserwowanym u grzybów, roślin i zwierząt, polegającym na trawieniu przez komórkę niektórych własnych elementów jej struktury (KLIONSKY i EMR 2000). Taką formę degradacji obserwowano podczas braku materiałów pokarmowych. Bierze ona udział w obiegu składników komórki, polegającym na wykorzystaniu produktów ich rozpadu do ponownej syntezy w innych częściach organizmu (WOJCIECHOWSKA 2001, BASSHAM 2007). Zjawisko trawienia przez komórkę jej własnych elementów jest charakterystycznym procesem dla PCD występującej u roślin. Dzięki autofagii,

zakres procesów degradacyjnych, podczas programowanej śmierci, zostaje ograniczony jedynie do protoplastu jednej komórki, która podlega umieraniu, bez włączania w mechanizmy PCD komórek sąsiednich.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania potwierdziły, że zjawiskiem dominującym podczas degradacji protoplastu w różnych przypadkach PCD jest właśnie autofagia (OBARA i współaut. 2001, WOJCIECHOWSKA 2001, LAM 2004, LIU i współaut. 2005, VAN DOORN i WOLTERING 2005, PATEL i współaut. 2006, ROGERS 2006, SEAY i współaut. 2006, BASSHAM 2007, VIANELLO i współaut. 2007). Kluczową rolę w procesie autofagii pełni organellum, które w swoim wnętrzu zawiera zestaw enzymów trawiących komponenty komórkowe. W przypadku zwierząt jest to lizosom, natomiast u roślin jest to wakuola lityczna (WOJCIECHOWSKA 2001, SANMARTIN i współaut. 2005, MÜNTZ 2007).

Wakuole to organella pełniące wiele funkcji, co więcej komórka może zawierać więcej niż jeden ich typ. Zróżnicowanie funkcji wakuoli jest uwarunkowane między innymi charakterem zgromadzonych w ich wnętrzu białek (MÜNTZ 2007).

Za degradację protoplastu podczas PCD odpowiada wspomniana już wakuola lityczna (ang. lytic vacuole, LV) (MÜNTZ 2007). Powstaje ona, gdy w soku wakuolarnym gromadzone są m.in. liczne enzymy hydrolityczne, co może prowadzić do znacznego zwiększenia jej objętości. Badania składu soku wakuolarnego komórek *Arabidopsis* pozwoliły zidentyfikować liczną grupę białek, które odpowiedzialne są za proces autofagii. Niektóre z nich odpowiadają za właściwości tonoplastu, inne za formowanie autofagosomów, czyli pęcherzyków otoczonych najczęściej podwójną błoną, czasem włączanych do wakuoli (BASSHAM 2007).

Enzymy, kodowane przez genom jądrowy i syntezowane w cytozolu, są dostarczane do wakuoli w świetle pęcherzyków błonowych – PPVs (ang. protease precursor vesicles). PPVs transportują m.in. cząsteczki wakuolarnych enzymów przetwarzających (ang. vacuolar processing enzymes, VPEs). Białka te, zostają włączone do pęcherzyków PPVs dzięki odpowiednim sekwencjom aminokwasowym na końcach ich łańcuchów peptydowych. Enzymy są dostarczane do wakuoli w formie nieaktywnej i dopiero w wyniku jej kwaśnego odczynu ulegają aktywacji (HATSUGAI i współaut. 2006, ROGERS 2006, MÜNTZ 2007, PISZCZEK i GUTMAN 2007).

W soku wakuolarnym VPEs odpowiadają za dojrzewanie i aktywację niektórych białek, które następnie biorą udział w mechanizmie destrukcyjnym w czasie PCD (HATSUGAI i współaut. 2006, ROGERS 2006, MÜNTZ 2007). Jednak, w zależności od typu komórki oraz rodzaju PCD jaki w niej zachodzi, skład enzymów w wakuoli może być różny. Może to świadczyć o odmiennych programach genetycznych prowadzących do śmierci komórki (MÜNTZ 2007). Ostatnie badania wskazują, że VPEs pełnią w komórce roślinnej funkcję kaspaz (ang. caspases), czyli białek regulacyjnych, których obecność jest typowa dla komórek zwierzęcych (SANMARTIN i współaut. 2005, HATSUGAI i współaut. 2006, DELLA MEA i współaut. 2007). Poza cząsteczkami VPEs, w wakuoli wykryto również dwie inne grupy związków podobnych do kaspaz: metakaspazy (ang. metacaspases) i saspazy (ang. saspases) (PISZCZEK i GUTMAN 2007). Wprawdzie zsekwencjonowany genom *Arabidopsis* nie ujawnił żadnych homologicznych genów kodujących u roślin kaspazy, to jednak VPEs, jak też metakaspazy i saspazy, wykazują podobną do tych związków, zarówno strukturę, jak i aktywność enzymatyczną (LAM 2005, HATSUGAI i współaut. 2006, PATEL i współaut. 2006, PISZCZEK i GUTMAN 2007). Obecnie prowadzone badania mają na celu określenie, które z białek podobnych do kaspaz stanowią sygnał inicjujący procesy degradacyjne w komórce oraz które z nich są charakterystyczne dla określonych rodzajów programowanej śmierci podczas rozwoju, starzenia czy w warunkach stresu (PISZCZEK i GUTMAN 2007).

RÓŻNY PRZEBIEG AUTOFAGII

Wakuola „wyposażona” w odpowiednie enzymy, podlega następnie kolejnym zmianom związanym z procesem autofagii. Ścieżki jakimi dalej przebiega ten proces mogą być różne. Wyróżnia się trzy główne typy autofagii: mikro-, makro- oraz megautofagię (VAN DOORN i WOLTERING 2005). Mikroautofagia to proces, podczas którego mały fragment cytoplazmy, poprzez inwaginację tonoplastu, zostaje włączony do wakuoli. Powstaje pęcherzyk wewnątrzwakuolarny, zwany ciałem autofagowym, którego zawartość zostaje uwolniona do soku wakuolarnego zaraz po strawieniu otaczającej go błony (VAN DOORN i WOLTERING 2005, KLIONSKY i EMR 2000). Makroautofagia jest podobna w przebiegu do mikroautofagii, jednak w tym przypadku do wakuoli zostaje włączony duży fragment cytoplazmy, często z występującymi w nim

organellami. Ponadto, obserwuje się tworzenie swoistych pęcherzyków – autofagosomów (BASSHAM 2007, ZAGÓRSKA-MAREK 2007). Struktury te prawdopodobnie wywodzą się z siateczki śródplazmatycznej. W pierwszym etapie ich powstawania formuje się otwarta struktura przedautofagowa (ang. preautophagic structure, PAS). Następnie dochodzi do połączenia końców błony i zamknięcia fragmentu cytoplazmy – powstaje autofagosom. Po fuzji zewnętrznej błony autofagosomu z tonoplastem tworzy się ciało autofagowe, po czym struktura ta wraz z zawartością zostaje strawiona przez enzymy soku wakuolarnego (KLIONSKY i EMR 2000, VAN DOORN i WOLTERING 2005, SEAY i współaut. 2006). Ostatnie badania wskazują jednak, że w niektórych przypadkach zanim zawartość autofagosomu zostanie strawiona przez enzymy wakuoli, zostaje on włączony do struktur podobnych do lizosomów, bądź endosomów. Odbywa się w nich pierwszy etap degradacji białek (BASSHAM 2007).

Do tej pory nie wiadomo do jakiego stopnia degradacja cytoplazmy podczas programowanej śmierci komórki jest zależna od dwóch wymienionych powyżej typów autofagii. Ponadto, makroautofagia do tej pory najczęściej była opisywana w komórkach zwierząt. Przebieg makroautofagii występujący w komórkach roślinnych jest jednak niemal identyczny. Co więcej badania genów odpowiedzialnych za mechanizm tego typu autofagii wskazują, że makroautofagia jest procesem wysoce konserwatywnym (KLIONSKY i EMR 2000).

Niewątpliwym postępem w badaniu makroautofagii występującej u roślin jest od niedawna stosowana metoda polegająca na oznaczaniu zielonym białkiem fluoryzującym (ang. green fluorescent protein, GFP) białek ATG8, znajdujących się w autofagosomach (BASSHAM 2007).

Jednym z potwierdzonych przypadków programowanej śmierci, w których zaobserwowano symptomy makroautofagii jest reakcja nadwrażliwości. Może o tym świadczyć obecność autofagosomów w komórkach atakowanych przez mikroorganizm patogeny, jak też w komórkach sąsiadujących (LIU i współaut. 2005). Badania wskazują również, że autofagia podczas HR jest głównym czynnikiem ograniczającym rozprzestrzenianie się obumierania komórek w tkance, poprzez autodestrukcję komórek zainfekowanych (GREENBERG 2005, SEAY i współaut. 2006, BASSHAM 2007).

Trzeci rodzaj autofagii – megautofagia, to proces, który w przeciwieństwie do mikro- i makroautofagii, odgrywa kluczową rolę w programowanej śmierci komórek roślinnych. Jednym z pierwszych objawów megautofagii jest intensywna synteza enzymów hydrolitycznych, których produkcja jest warunkowana aktywacją określonych genów. Proteazy cysteinowe, proteazy serynowe, endonukleazy (RNazy, DNazy), kwaśne fosfatazy, lipazy i inne białka są lokowane w soku wakuolarnym. Są to enzymy, które odgrywają zasadniczą rolę również podczas apoptozy komórek zwierząt. Następnie dochodzi do znacznego powiększenia objętości wakuoli, która ostatecznie zajmuje prawie cały protoplast (FUKUDA 2000). Kluczowym zjawiskiem towarzyszącym megautofagii jest przerwanie ciągłości tonoplastu, po którym uwolnione z wakuoli enzymy rozpoczynają proces degradacji składników komórki (WOJCIECHOWSKA 2001, HIGAKI i współaut. 2007). Do tej pory nie wiadomo co dokładnie odpowiada za przerwanie tonoplastu, zauważono jednak, że krótko przed tym faktem, błona ta przestaje być selektywnie przepuszczalna. Zjawisko takie było obserwowane podczas ksylogenezy w izolowanych komórkach mezofilu *Zinnia elegans* (OBARA i współaut. 2001). Poza ksylogenezą, megautofagia jest procesem typowym dla formowania aerenchymy czy elementów sitowych (VAN DOORN i WOLTERING 2005).

Niekiedy, w komórkach w których zachodzi programowana śmierć, można zauważyć symptomy świadczące o obecności co najmniej dwóch typów autofagii. Obserwowano również sytuacje, gdy po równoczesnym wystąpieniu mikro- i makroautofagii następowała megautofagia (VAN DOORN i WOLTERING 2005).

Choć autofagia jest procesem zdecydowanie dominującym na drogach prowadzących do samobójczej śmierci komórki, nie we wszystkich przypadkach można wykazać jej obecność; dotyczy to na przykład komórek bielma niektórych gatunków zbóż (VAN DOORN i WOLTERING 2005). Wskazuje to na możliwość występowania podczas programowanej śmierci nieznanego, jak dotąd, modelu degradacji komórki.

RÓŻNA SEKWENCJA „ZDARZEŃ STRUKTURALNYCH” PODCZAS PCD

Jak już wcześniej wspomniano, różna budowa komórek, ich przyszłe przeznaczenie oraz wymagane tempo zahamowania żywot-

ności ma wpływ na odmienny przebieg programowanej śmierci w poszczególnych jej przypadkach (LAM 2004).

Zaobserwowano, że często procesy PCD zachodzące podczas embriogenezy lub histogenezy można powiązać w jeden określony model obumierania protoplastu, który prowadzi do śmierci komórki (VAN DOORN i WOLTERING 2005). Taką grupę zjawisk określono jako PCD związaną z rozwojem (ang. developmental cell death, DCD). Stanowi ona zwykle końcowy etap różnicowania komórek bądź odpowiada za ich eliminację po spełnieniu swoich funkcji (VAN DOORN i WOLTERING 2005, DELLA MEA i współaut. 2007). Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały, że jedną z pierwszych zmian strukturalnych podczas DCD jest znaczny wzrost objętości wakuoli, która ostatecznie zajmuje prawie cały protoplast (VAN DOORN i WOLTERING 2005). Zmiany takie mogą więc świadczyć o udziale w tym procesie zjawiska megautofagii.

Krótko po wzroście objętości wakuoli, odnotowuje się szybki spadek liczby innych organelli. Zanik składowych komórki jest prawdopodobnie powodowany wypłynięciem enzymów hydrolitycznych w skutek przerwania ciągłości tonoplastu, po którym następuje zapadnięcie się wakuoli. Proces degradacji protoplastu zwykle zaczyna się od eliminacji siateczki śródplazmatycznej łącznie z rybosomami. Mitochondria oraz jądro komórkowe (poza chromatyną, która podlegała kondensacji już na początku procesu) wykazują zwykle dużą stabilność i ulegają degradacji dopiero w końcowych etapach autolizy. Nadal jednak nie wiadomo, jakie mechanizmy molekularne są odpowiedzialne za degradację wymienionych organelli (VAN DOORN i WOLTERING 2005).

Jak dotąd najlepiej poznanym przykładem programowanej śmierci komórki spośród procesów DCD jest ksylogeneza, szczególnie dobrze poznana u cynii *Zinnia elegans*. Proces kształtowania dojrziałych członów naczynia, któremu towarzyszy PCD, jest w większości przypadków ściśle uzależniony od formowania ściany komórkowej wtórnej (FUKUDA 2000, FUKUDA 2004). Własne obserwacje wykazały jednak, że w niektórych roślinach wodnych, ściana wtórna jest słabo wykształcona. W przypadku *Zinnia* natomiast, równolegle do wykształcania ściany komórkowej wtórnej dochodzi do wzrostu objętości wakuoli. Pierwsze procesy degradacyjne komponentów komórkowych zanotowano po

sześciu godzinach od powstania wspomnianej ściany (FUKUDA 2000). Jednak dopiero po przerwaniu ciągłości tonoplastu następuje szybka sekwencja zdarzeń prowadząca do lizy całego protoplastu. Dzięki zastosowaniu kamery video stwierdzono, że zaraz po tym obserwuje się zahamowanie ruchu cytoplazmy. Sugeruje to, że komórka utrzymuje aktywność fizjologiczną do czasu uwolnienia zawartości wakuoli, co stanowi etap krytyczny PCD (OBARA i współaut. 2001). Jednymi z pierwszych objawów obumierania komórki po przerwaniu tonoplastu są: degradacja zawartości chloroplastów oraz kondensacja chromatyny w jądrze komórkowym. Kondensacja chromatyny postępuje od zlokalizowanej w centralnej części nukleoplazmy, do obwodowej części jądra. Otoczka jądrowa pozostaje nienaruszona do późnych etapów PCD.

Równolegle do opisanych zmian w jądrze komórkowym przebiega degradacja DNA chloroplastowego (OBARA i współaut. 2001). Cięcie genomu prowadzące do jego fragmentacji następuje w wyniku działalności określonych endonukleaz. Do tej pory niewiele wiadomo na temat mechanizmu ich aktywacji. W komórkach *Zinnia elegans* udało się wyizolować endonukleazy działające przy pH 5,5 w obecności jonów cynku (WOJCIECHOWSKA 2001, SIMEONOVA i MOSTOWSKA 2001).

Model śmierci programowanej związanej z rozwojem, który najlepiej reprezentuje ksylogeneza, jest więc uzależniony w dużej mierze od wakuoli (VAN DOORN i WOLTERING 2005, LAM 2004, OBARA i współaut. 2001). Zmiany związane z tą organellą należą do jednych z najwcześniejszych i warunkują dalsze procesy prowadzące do degradacji protoplastu.

Dla komórek przechodzących programowaną śmierć podczas starzenia, przebieg zmian degradacyjnych różni się od opisanych powyżej. Jest to związane z koniecznością redystrybucji materiałów zapasowych z określonych organów jeszcze przed ich zamieraniem (SIMEONOVA i MOSTOWSKA 2001, LAM 2004, ROGERS 2006). Konsekwencją tego jest wydłużenie czasu obumierania komórek (VAN DOORN i WOLTERING 2004). Programowaną śmierć w trakcie starzenia wyróżniają szybko zachodzące zmiany na terenie chloroplastów (OBARA i współaut. 2001, ROGERS 2006). Proces degradacji tylakoidów, białek oraz DNA w stromie chloroplastów rozpoczyna się przed zaistnieniem zmian związanych z wakuolą (OBARA i współaut. 2001). Co więcej okazuje się, że jeszcze na etapie trwania niezakończonej syntezy białek w cytozolu po-

jawiają się symptomy świadczące o przerwaniu syntezy białek na terenie chloroplastów. W ich stromie dochodzi bowiem do utraty części poliribosomów i zaprzestania syntezy RNA spowodowanej brakiem aktywności polimerazy RNA (VAN DOORN 2005). Następuje również degradacja DNA, która, co ciekawe, trwa tutaj stosunkowo długo. Ilość białek w stromie gwałtownie spada.

Niekiedy, w czasie trwania procesu starzenia, obserwowano zjawisko wstrzymania procesów degradacyjnych z chwilą powtórnego wytworzenia funkcjonalnych chloroplastów, co spowodowało ponowne zazielenienie liści. Taki proces był zależny między innymi od ponownej aktywności polimerazy RNA w stromie chloroplastów (VAN DOORN 2005). Może to świadczyć, że w niektórych przypadkach chloroplasty odgrywają ważną rolę na ścieżce prowadzącej do degradacji komórki podczas procesu starzenia. Zmiany w jądrze komórkowym zachodziły w tym przypadku dopiero w ostatnich etapach PCD (OBARA i współaut. 2001). Polegały one między innymi na kondensacji chromatyny oraz fragmentacji DNA przez swoiste endonukleazy (SIMEONOVA i MOSTOWSKA 2001).

Dane te sugerują, że w przebiegu PCD podczas procesu starzenia udział wakuoli w enzymatycznej degradacji składników komórki zostaje poprzedzony zmianami na poziomie chloroplastów. W związku z tym białka obecne w soku wakuolarnym nie spełniają swojej funkcji aż do czasu, gdy proces obumierania stanie się nieodwracalny (MÜNTZ 2007). Ma to wpływ na możliwość zatrzymania procesu prowadzącego do śmierci komórki, jak też na wydłużenie jego trwania w czasie (FUKUDA 2000, OBARA i współaut. 2001, SIMEONOVA i MOSTOWSKA 2001, LAM 2004).

Inna sekwencja zmian strukturalnych występuje podczas programowanej śmierci komórki związanej z reakcją nadwrażliwości (HR). W trakcie tego procesu ważna jest przede wszystkim natychmiastowa odpowiedź na atak mikroorganizmu patogenicznego, w postaci śmierci wybranych komórek. Umożliwia to zahamowanie rozprzestrzeniania się zakażenia w tkance. W takim przypadku degradacja protoplastów przebiega

szybciej niż w przypadku procesu starzenia, a odzyskiwanie materiałów pokarmowych ma mniejsze znaczenie (LAM 2004). Zmiany związane ze wzrostem objętości wakuoli natomiast, tak samo jak w przypadku starzenia, należą tu do późniejszych (LAM 2004).

Pierwsze symptomy rozpoczętego procesu PCD w reakcji nadwrażliwości stanowią zmiany w mitochondriach i wpływ m.in. cytochromu *c* (VIANELLO i współaut. 2007). Do tej pory rola tego białka w przypadku roślin nie jest do końca wyjaśniona, wiadomo natomiast, że w komórkach zwierzęcych cytochrom *c* jest głównym czynnikiem regulacyjnym odpowiedzialnym za przebieg PCD (LAM 2004, GAO i współaut. 2007, VIANELLO i współaut. 2007). Inną cechą wyróżniającą programowaną śmierć komórki w HR od innych rodzajów PCD są wczesne zmiany zachodzące w jądrze komórkowym. Kondensacja chromatyny oraz fragmentacja DNA odbywają się bowiem jeszcze przed zapadnięciem się wakuoli, której tonoplast zostaje przerwany dopiero w ostatnich etapach PCD (LAM 2004, VIANELLO i współaut. 2007). Późne zmiany związane z wakuolą, po których następuje końcowa degradacja protoplastu, umożliwiają zajście wcześniejszego procesu związanego z uwolnieniem określonych związków z mitochondriów. W takim przypadku mitochondria są organellami mającymi duży wpływ na regulację PCD poprzez prawdopodobny wpływ cytochromu *c* (VIANELLO i współaut. 2007). Cechą wyróżniającą programowaną śmierć w reakcji nadwrażliwości od pozostałych jej rodzajów jest również obkurczanie cytoplazmy. Zjawisko to jest rzadko obserwowane w innych przypadkach PCD. W komórkach zakażonych mikroorganizmem odnotowywano również formowanie fragmentów cytoplazmy, które przypominały ciała apoptotyczne komórek zwierząt (LAM 2004).

Powyższe dane wskazują, że w trakcie programowanej śmierci komórki zachodzącej podczas procesów rozwojowych, starzenia czy reakcji nadwrażliwości, sekwencja zmian strukturalnych w protoplaście nie jest jednokowa. Procesy te różnią się również szybkością przebiegu.

PRÓBY WYODRĘBNIENIA RODZAJÓW PCD U ROŚLIN

Pierwszych obserwacji komórek przechodzących programowaną śmierć, które jednocześnie były jednymi z pierwszych obserwa-

cji mikroskopowych tkanek roślinnych, dokonał Lange w 1891 r. (VAN DOORN i WOLTERING 2004). Badał on niedojrzały człon naczy-

nia i stwierdził, że drastyczny spadek liczby organelli oraz ilości cytoplazmy w protoplaście nastąpił tuż przed śmiercią komórki, co potwierdzają aktualne badania. Co więcej, mimo że pojęcie programowanej śmierci nie było jeszcze znane, Lange określił takie zmiany jako ściśle związane z procesami rozwojowymi (VAN DOORN i WOLTERING 2004). Od tamtej pory poznano wiele innych przykładów PCD podczas ontogenezy roślin, a wiedza dotycząca tego zjawiska znacząco się poszerzyła. Z czasem okazało się jednak jaki to skomplikowany i zróżnicowany strukturalnie proces, wymagający dalszych, szczegółowych badań.

Termin „programowana śmierć komórki”, utworzony przez Lockshina i Williamsa na przełomie lat 1964/1965, początkowo wprowadzono tylko do zoologii. Do botaniki został przyjęty dopiero pod koniec lat 80., a upowszechnił się w połowie lat 90. XX w. (VAN DOORN i WOLTERING 2004, GREENBERG 2005, DELLA MEA i współaut. 2007), kiedy to obserwacje związane z eliminacją komórek w procesach regulacyjnych dowiodły jednoznacznie istnienia PCD u roślin.

Badania różnych etapów ontogenezy uświadomiły jak różnorodny strukturalnie jest to proces. Przez ostatnie dziesięciolecie dominowała opinia, że PCD u roślin w dużej mierze przypomina apoptozę – czyli programowaną śmierć typową dla komórek zwierząt. Wskazywała na to obecność swoistych symptomów takich jak: kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA w jądrze, obkurczanie protoplastu, formowanie fragmentów cytoplazmy podobnych do ciał apoptotycznych, udział enzymów podobnych do kaspaz, udział cytochromu *c*, czy obecność homologicznych genów sterujących procesami PCD w różnych rodzajach tego procesu u roślin. Przyczyniło się to do wprowadzenia terminu „śmierć podobna do apoptozy” (LAM 2004, HIGAKI i współaut. 2007, PISZCZEK i GUTMAN 2007). GREENBERG (1996) sugerował, że u roślin mogą występować co najmniej dwa rodzaje śmierci programowanej: śmierć podobna do apoptozy oraz druga o innym morfotypie, w którym brak symptomów typowych dla komórek zwierzęcych lub są one nieznaczące.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na udział wakuoli litycznej w PCD, która w komórkach roślin pełni funkcję podobną do lizosomów. W większości przypadków obserwacje te dotyczyły PCD podczas procesów rozwojowych związanych z embrio-

genezą czy formowaniem tkanek. Tak jak wcześniej wspomniano, grupę takich procesów określono jako PCD związana z rozwojem (DCD) (VAN DOORN i WOLTERING 2005, DELLA MEA i współaut. 2007). Przykłady tego typu eliminacji komórek lub ich protoplastu potwierdzają fakt, że rola PCD u roślin nie zawsze kończy się śmiercią, lecz jest początkiem nowego etapu w rozwoju rośliny (VAN DOORN i WOLTERING 2004). Okazało się ponadto, że to wakuola lityczna jest głównym „narzędziem” procesu autofagii. Nie wykluczono jednak możliwości istnienia typu śmierci podobnej do apoptozy (WOJCIECHOWSKA 2001). Zwrócono również uwagę na możliwość równoczesnego występowania w umierającej komórce zarówno symptomów autofagii roślinnej, jak i apoptozy (np. podczas somatycznej embriogenezy) (LAM 2004).

Wykazano także, że degradacyjna rola wakuoli litycznej dotyczy zdecydowanej większości przypadków programowanej śmierci u roślin, potwierdzając tym samym dominującą rolę autofagii (OBARA i współaut. 2001, WOJCIECHOWSKA 2001, LAM 2004, LIU i współaut. 2005, VAN DOORN i WOLTERING 2005, HATSUGAI i współaut. 2006, PATEL i współaut. 2006, ROGERS 2006, SEAY i współaut. 2006, VIANELLO i współaut. 2007). Niektórzy autorzy kwestionują obecnie poprawność terminu „śmierć podobna do apoptozy” (VAN DOORN i WOLTERING 2005, VIANELLO i współaut. 2007) sugerując, że jest on zbyt pochopnie stosowany do procesów obserwowanych u roślin. Określenie „podobna do apoptozy” może opisywać procesy typowe nie tylko dla tego procesu. Przykładem może być kondensacja chromatyny w wyniku reakcji na stres, czy też obkurczenie protoplastu podczas plazmolizy.

VAN DOORN i WOLTERING (2005) podjęli próbę wyodrębnienia rodzajów PCD u roślin. Wyróżnili oni: mikro-, makro- i megautofagię oraz czwarty rodzaj, w którym obecność autofagii nie jest w pełni udowodniona, określane jako „podobny do nekrozy” bądź „nielizosomalny”. Inni autorzy (BASSHAM 2007, MÜNTZ 2007) kwestionują jednak rolę mikro- oraz makroautofagii, podkreślając dominujące znaczenie megautofagii. Rodzaj podobny do nekrozy polega na zahamowaniu w protoplaście obumierającej komórki podstawowych procesów syntezy, któremu towarzyszy dezorganizacja błon, bez udziału wakuoli. Za przykład takiego rodzaju PCD VAN DOORN i WOLTE-

RING (2005) uznali śmierć komórki podczas reakcji nadwrażliwości.

W innych badaniach (GREENBERG 2005, PATEL i współaut. 2006, PISZCZEK i GUTMAN 2007) zasugerowano jednak, że w komórkach podlegających procesowi HR ważną rolę odgrywa autofagia, co podważa wspomniany wyżej podział. Temat ten nadal wzbudza liczne kontrowersje. Na podstawie sekwencji zmian morfologicznych reakcje nadwrażliwości można by zaliczyć do typu śmierci podobnej do nekrozy. Z drugiej jednak strony, proces ten jest regulowany przez geny *ATG*, które kodują niektóre białka odpowiedzialne za przebieg autofagii. Autofagia jest więc zjawiskiem, które z pewnością bierze udział w kontrolowaniu obumierania komórek w trakcie HR. Odpowiada również za zahamowanie rozprzestrzeniania się martwicy w tkance poprzez autodestrukcję komórek zakażonych (PISZCZEK i GUTMAN 2007). Potwierdza to przykład zainfekowania rośliny wirusem mo-

zaiki tytoniowej, gdzie po wyciszeniu genów odpowiedzialnych za autofagię, martwica komórek znacznie się rozprzestrzeniła (GREENBERG 2005).

Co ciekawe, niedawne badania udowodniły, że wakuolarne enzymy VPEs, metakaspazy i saspazy, są niezbędne do przeprowadzenia lizy protoplastu w każdym z poznanych rodzajów PCD u roślin (PISZCZEK i GUTMAN 2007), co może sugerować, że autofagia jest jej kluczowym mechanizmem.

Wiele kontrowersji wzbudza również zagadnienie występowania śmierci podobnej do apoptozy u roślin. Hilary Rogers (ROGERS 2006), akceptując podział stworzony przez van Doorna i Wolteringa, sugeruje jednak, że w niektórych przypadkach należy stosować termin „śmierć podobna do apoptozy”. Może o tym świadczyć obecność licznych symptomów typowych dla apoptozy w czasie obumierania komórek tapetum i łagiewki pyłkowej.

PODSUMOWANIE

Programowana śmierć komórki roślinnej jest niewątpliwie procesem o „wielu twarzach”. Różnorodność zachodzących zmian strukturalnych oraz ich odmienna kolejność w różnych przypadkach PCD sprawiają, że usystematyzowanie tego zjawiska i określenie jego rodzajów natrafia na wiele trudności. Wiadomo jednak, że procesem najczęściej występującym na drodze do obumarcia komórki roślinnej lub jej protoplastu podczas PCD jest autofagia. Nieznana jest jednak jak dotąd sekwencja proteolitycznej kaskady zachodzącej w czasie autofagii. Symptomy świadczące o autolitycznej aktywności wakuoli są zauważalne na różnych etapach PCD. W procesach rozwojowych zmiany związane z tą organellą należą do jednych z najwcześniejszych, mając wpływ na dalszą sekwencję zdarzeń strukturalnych w komórce. W przypadku starzenia, przejawy świadczące o udziale wakuoli w procesie autolizy występują w późniejszych etapach PCD. Natomiast w przypadku reakcji nadwrażliwości, zmiany takie obserwowano dopiero w końcowej fazie procesu. Nie zmienia to faktu, że we wszystkich tych przypadkach wakuola jest organellum niezbędnym na drodze prowadzącej do śmierci komórki.

Nadal jednak niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za przebieg PCD u roślin. Jest to również źródłem trudności przy akceptacji

nomenklatury pojęć związanych z tym procesem, takich jak: apoptoza czy autofagia. Zaszeregowanie mechanizmów związanych z obumieraniem komórki opiera się zwykle na ich cechach morfologicznych, co więcej obserwacje są zwykle przeprowadzane w warunkach *in-vitro*. Brak jest natomiast często odniesienia do mechanizmów na poziomie molekularnym. W związku z tym, czasopismo „Cell Death and Differentiation” powołało do życia Komitet ds. Nomenklatury (DELLA MEA i współaut. 2007). Komitet ten ustalił kryteria, wedle których można zdefiniować obserwowany proces obumierania komórki. Ponadto wprowadził zastrzeżenia co do stosowania niepoprawnych pojęć bądź koncepcji, które mogłyby być czynnikiem spowalniającym rozwój nauki dotyczącej śmierci komórki. Dodatkowe trudności pojawiają się często przy rozróżnianiu terminu obumierania, który jest procesem oraz śmierci, która jest jego zakończeniem (DELLA MEA i współaut. 2007).

Nierozstrzygnięte pozostaje pytanie, czy rośliny w przebiegu PCD stosują te same konserwatywne mechanizmy jak zwierzęta? W związku z tym, podjęto próby zidentyfikowania genów roślinnych sterujących procesami PCD. Wiele obecnie podejmowanych badań ma również na celu poznanie kluczowych regulatorów białkowych, odgrywających ważną rolę w przebiegu różnych typów

PCD. To jednak tylko niektóre z zagadnień wymagających odpowiedzi.

Programowana śmierć komórki roślinnej jest więc procesem, którego stopień poznania jest jeszcze ciągle daleki od wiedzy jaką

posiadamy na temat samobójczej śmierci komórek zwierzęcych. Stanowi to dodatkowy bodziec do intensywnych badań w celu lepszego poznania i pełnego zrozumienia tego zjawiska.

PROGRAMMED DEATH OF PLANT CELL – A PROCESS WITH MANY FACES

Summary

Programmed cell death (PCD) is a complicated phenomenon which can be characterized with a large variety of the course. It is one of the basic processes responsible for accurate functioning of plant organism. PCD appears frequently in many stages of ontogenesis, embryogenesis, histogenesis and senescence., PCD is also an important element

of plants defense against attack of pathogenic microorganism. Although the knowledge about PCD in plant cells has considerably broaden in the last decade, there are still many questions to be answered. The main purpose of this paper is an attempt to systematize reports about PCD in plant cell in relation to morphology of its course.

LITERATURA

- BASSHAM D. C., 2007. *Plant autophagy-more than a starvation response*. Curr. Opin. Plant Biol. 10, 587-593.
- BEERS E. P., WOFFENDEN B. J., ZHAO C., 2000. *Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death*. Plant Mol. Biol. 44, 399-415.
- CHARZYŃSKA M., 2004. *Programowana śmierć komórkowa (PCD) w rozwoju roślin wyższych*. Post. Biol. Kom. 31, 135-136.
- DELLA MEA M., SERAFINI-FRACASSINI D., DEL DUCA S., 2007. *Programmed cell death: similarities and differences in animals and plants. A flower paradigm*. Amino Acids 33, 395-404.
- FUKUDA H., 2000. *Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants*. Plant Mol. Biol. 44, 245-253.
- FUKUDA H., 2004. *Signals that control plant vascular cell differentiation*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 379-391.
- GAO C., XING D., LI L., ZHANG L., 2007. *Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure*. Planta 1-13.
- GREENBERG J. T., 1996. *Programmed cell death: a way of life for plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12094-12097.
- GREENBERG J. T., 2005. *Degrade or die: a dual function for autophagy in the plant immune response*. Dev. Cell 8, 799-801.
- HATSUGAI N., KUROYANAGI M., NISHIMURA M., HARA-NISHIMURA I., 2006. *A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death*. Apoptosis 11, 905-911.
- HIGAKI T., GOH T., HAYASHI T., KUTSUNA N., KADOTA Y., HASEZAWA S., SANO T., KUCHITSU K., 2007. *Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: In vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells*. Plant Cell Physiol. 48, 1414-1425.
- KLIONSKY D. J., EMR S. D., 2000. *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science 290, 1717-1721.
- LAM E., 2004. *Controlled cell death, plant survival and development*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 305-315.
- LAM E., 2005. *Vacuolar proteases livening up programmed cell death*. Trends Cell Biol. 15, 124-127.
- LIU Y., SCHIFF M., CZYMMEK K., TALLÓCZY Z., LEVINE B., DINESH-KUMAR S. P., 2005. *Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response*. Cell 121, 567-577.
- MÜNTZ K., 2007. *Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles*. J. Exp. Bot. 58, 2391-2407.
- NOODE N L. D., 2004. *Plant cell death processes*. Amsterdam, Elsevier, 1-18.
- OBARA K., KURIYAMA H., FUKUDA H., 2001. *Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in Zinnia*. Plant Physiol. 125, 615-626.
- PATEL S., CAPLAN J., DINESH-KUMAR S. P., 2006. *Autophagy in the control of programmed cell death*. Curr. Opin. Plant Biol. 9, 391-396.
- PISZCZEK E., GUTMAN W., 2007. *Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants*. Acta Physiol. Plant. 29, 391-398.
- ROGERS H. J., 2006. *Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die?* Ann. Bot. 97, 309-315.
- SANMARTIN M., JAROSZEWSKI L., RAIKHEL N. V., ROJO E., 2005. *Caspases. Regulating death since the origin of life*. Plant Physiol. 137, 841-847.
- SEAY M., PATEL S., DINESH-KUMAR S. P., 2006. *Autophagy and plant innate immunity*. Cell. Microbiol. 8, 899-906.
- SIMEONOVA E., MOSTOWSKA A., 2001. *Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia się liści*. Post. Biol. Kom. 28, 17-32.
- WOJCIECHOWSKA M., 2001. *Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin*. Post. Biol. Kom. 28, 317-333.
- VAN DOORN W. G., 2005. *Plant programmed cell death and the point of no return*. Trends Plant Sci. 10, 478-483.
- VAN DOORN W. G., WOLTERING E. J., 2004. *Senescence and programmed cell death: substance or semantics?* J. Exp. Bot. 55, 2147-2153.

- VAN DOORN W. G., WOLTERING E. J., 2005. *Many ways to exit? Cell death categories in plants*. Trends Plant Sci. 10, 117–122.
- VIANELLO A., ZANCANI M., PERESSON C., PETRUSSA E., CASOLO V., KRAJNAKOVA J., PATUI S., BRAIDOT E., MACRI F., 2007. *Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death*. Physiol Plant. 129, 242–252.
- ZAGÓRSKA-MAREK B., 2007. *Wzrost i różnicowanie*. [W:] *Biologia komórki roślinnej. Funkcja*. WOJ-TASZEK P., WOŹNY A., RATAJCZAK Ł. (red.), Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 603–614.
- ZHIVOTOVSKY B., 2002. *From the nematode and mammals back to pine tree: on the diversity and evolution of programmed cell death*. Cell Death Differ. 9, 867–869.