POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 39 2012 NR 2 (159–172)

CHARAKTERYSTYKA I ROLA „KASPAZ ROŚLINNYCH" PODCZAS PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI U ROŚLIN

CHARACTERISTICS AND FUNCTION OF „PLANT CASPASES" DURING PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANTS

Łukasz SICZEK, Agnieszka MOSTOWSKA

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W niniejszym artykule przedstawiono i scharakteryzowano rolę „kaspaz roślinnych" w programowanej śmierci komórki u roślin. Programowana śmierć komórki jest procesem podczas którego w kontrolowany sposób dochodzi do jej obumierania. Kaspazy są cysteinowymi proteazami zaangażowanymi w proces apoptozy w komórkach zwierząt. Hydrolizują one wiązania peptydowe po reszcie kwasu asparaginowego. Rośliny posiadają kilka grup enzymów przypominających kaspazy – wakuolarne enzymy przetwarzające, saspazy, fitaspazy i metakaspazy – które jednak nie spełniają podstawowych kryteriów pozwalających na uznanie ich za kaspazy. Wakuolarne enzymy przetwarzające (VPE) należą do cysteinowych proteaz i mają aktywność kaspaz. Saspazy i fitaspazy, mimo obecności seryny w centrum aktywnym, również wykazują aktywność kaspaz. Metakaspazy natomiast nie mają aktywności kaspaz. VPE występują w wakuoli i aktywują enzymy odpowiedzialne za rozpad tonoplastu. Saspazy i fitaspazy działają częściowo wewnątrz i na zewnątrz komórki. Saspazy aktywują kaskadę enzymów proteolitycznych, natomiast fitaspazy mogą bezpośrednio degradować białka występujące w komórce. Metakaspazy biorą bezpośredni udział w degradacji ważnych dla komórki składników komórkowych, prawdopodobnie proces ten zachodzi w cytozolu. „Kaspazy roślinne", mimo pewnych podobieństw do kaspaz zwierzęcych, są jedynie ich funkcjonalnymi odpowiednikami, dlatego też nazwę tę piszemy w cudzysłowie. Degradując ważne dla komórki struktury lub białka, doprowadzają do jej śmierci.

Słowa kluczowe: programowana śmierć komórki, „kaspazy roślinne", wakuolarne enzymy przetwarzające, metakaspazy, saspazy, fitaspazy

Summary: Plant caspases and their function during programmed cell death in plants were presented in this article. Programmed Cell Death is a process during which cells die in a strictly controlled manner. Caspases are cysteine proteases which execute apoptosis in animal cells. They hydrolyze peptide bonds after aspartic acid residues. Plants possess some groups of enzymes which resemble caspases:

vacuolar processing enzymes, saspases, phytaspases, metacaspases, but do not fulfill basic criterions that allow considering them as caspases. Vacuolar processing enzymes (VPE) belong to cysteine proteases and possess caspase activity. Saspases and phytaspases, although having serine in the active center, possess also caspase activity. Metacaspases do not have caspase activity. VPE are localized in the vacuole and are responsible for breaking tonoplanst. Saspases and phytaspases act both inside and outside of the cell. Saspases activate a cascade of proteolytic enzymes, whereas phytaspases can directly degrade proteins in the cell. Metacaspases directly degrade important cell components, probably in the cytosol. Plant caspases, in spite of superficial similarities to animal caspases, are only their functional equivalents, therefore we use quotation mark. They degrade important for cell structures or proteins, leading to cell death.

Key words: programmed cell death, "plant caspases", vacuolar processing enzymes, metacaspases, saspases, phytaspases

WSTĘP

Programowana śmierć komórki (ang. *programmed cell death*, PCD) to fizjologicznie naturalny, zaprogramowany genetycznie proces, podczas którego następuje obumarcie komórki. PCD występuje powszechnie u wszystkich organizmów wielokomórkowych i jest niezbędna do ich prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania. PCD służy do eliminacji niepotrzebnych komórek, które: spełniły już swoją funkcję, występują w nadmiarze, uległy nieprawidłowemu rozwojowi lub różnicowaniu, których śmierć jest niezbędna do właściwego rozwoju tkanek lub narządów.

U zwierząt wyróżnia się trzy typy PCD: apoptozę, autofagię i nie lizosomalną śmierć komórki [10]. W przypadku roślin nie ustalono jeszcze ostatecznego podziału PCD na konkretne kategorie, powodem tego jest fakt, iż często jedna komórka umierając wykazuje cechy typowe dla kilku typów programowanej śmierci występujących u zwierząt [10]. Najbardziej powszechną formą PCD u roślin jest jeden z typów autofagii - megaautofagia, a organellami, będącymi odpowiednikiem lizosomów u zwierząt podczas megaautofagii, są wakuole lityczne gromadzące enzymy hydrolityczne.

PCD u roślin można też podzielić, według innego kryterium, na dwie kategorie. Do pierwszej kategorii zalicza się samobójczą śmierć komórek indukowaną przez organizmy patogenne (wirusy, bakterie, grzyby), do drugiej śmierć komórek podczas rozwoju organizmów roślinnych. O ile PCD pierwszej kategorii jest bardziej zróżnicowana, o tyle PCD drugiej kategorii ma dosyć prosty przebieg (przypomina autofagię) [10, 11, 34].

Kaspazy

Kaspazy (ang. *caspase, cysteine-dependent aspartate-directed protease*) to najważniejsze enzymy zaangażowane w proces apoptozy u zwierząt. Po zaindukowaniu komórki do popełnienia „samobójstwa", kaspazy wzajemnie się

aktywują oraz hydrolizują kluczowe dla funkcjonowania komórki białka, doprowadzając tym samym do jej śmierci.

Według zasad klasyfikacji enzymów, opracowanych przez Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej, kaspazy należą do klasy hydrolaz, podklasy proteaz i podpodklasy cysteinowych proteaz. Według klasyfikacji proteaz zawartej w bazie danych MEROPS, kaspazy należą do proteaz cysteinowych, do klanu CD, w obrębie którego tworzą rodzinę C14.

Przynależność do proteaz cysteinowych oznacza, że kaspazy mają w swoim centrum aktywnym charakterystyczny aminokwas (cysteinę), odpowiadający za właściwości enzymatyczne oraz, że charakteryzują się wspólnym dla tej grupy enzymów mechanizmem katalizy. Kaspazy hydrolizują wiązania peptydowe występujące po sekwencji czterech lub pięciu charakterystycznych aminokwasów. Ostatnim aminokwasem w rozpoznawanej sekwencji jest zawsze kwas asparaginowy (asparaginian). Wszystkie kaspazy przecinają wiązania peptydowe wyłącznie od strony grupy karboksylowej kwasu asparaginowego. Kaspazy są syntetyzowane i utrzymywane w postaci nieaktywnych proenzymów (prekursorów kaspaz) do czasu zainicjowania apoptozy [12].

„KASPAZY ROŚLINNE"

Po odkryciu kaspaz i ich roli w apoptozie u zwierząt, naukowcy zaczęli poszukiwać tych enzymów również u roślin. Okazało się, że w genomach roślinnych brak jest genów ortologicznych do genów kaspaz [2, 26, 29, 35]. Badania PCD u roślin doprowadziły jednak do odkrycia proteaz przypominających kaspazy. Dla uproszczenia będziemy nazywać kaspazopodobne proteazy występujące u roślin „kaspazami roślinnymi", pisząc tę nazwę w cudzysłowiu.

„Kaspazy roślinne" pod pewnymi względami przypominają kaspazy. Są one zaangażowane w przebieg PCD u roślin, część z nich wykazuje aktywność kaspaz, inne przypominają kaspazy strukturą lub sekwencją aminokwasów. Żadna z tych cech nie pozwala jednak na jednoznaczne uznanie tych enzymów za kaspazy. Według przyjętej klasyfikacji, za kaspazy uznawane są enzymy należące do cysteinowych proteaz i hydrolizujące wiązania peptydowe wyłącznie po reszcie kwasu asparaginowego [34].

Klasyfikacja „kaspaz roślinnych" jest trudna i niejednoznaczna w literaturze. Podjęliśmy próbę jej usystematyzowania. Zgodnie z klasyfikacją stosowaną przez większość badaczy [2, 35], możemy wśród nich wyróżnić 8 grup: YVADaza – VPE – wakuolarny enzym przetwarzający [24], DEVDaza [13], VEIDaza – fitaspaza [4, 7], IETDaza – sazpaza [4], VKMDaza – saspaza [8], LEHDaza [21], TATDaza i LEVDaza [4]. Aktywność tych grup „kaspaz roślinnych" wykryto w różnych typach komórek i tkanek u różnych gatunków podczas PCD (tab. 1). Najlepiej poznane i zbadane są YVADaza i DEVDaza [13, 24], jak się wydaje występujące powszechnie w roślinach, natomiast pozostałe, szczególnie te

zidentyfikowane w ostatnich kilku latach, są słabiej poznane. Kaspazo-podobna aktywność, która indukuje PCD jest hamowana odpowiednim inhibitorem (naturalnym lub syntetycznym) odpowiadającym stosownemu substratowi [2, 35]. Przykładowo aktywność dwóch najlepiej poznanych kaspaz roślinnych: YVADazy i DEVDazy jest hamowana za pomocą inhibitorów, odpowiednio dla kaspazy 1 – Ac-YVAD-CMK i dla kaspazy 3 – Ac-DEVD-CHO. Dowody na istnienie kaspazo-podobnych proteaz są więc pośrednie i nie dają jasnej informacji o ich aktywacji na poziomie pojedynczej komórki [35]. Są także znane przypadki, gdy stosowny inhibitor nie hamuje PCD, wskazując na ścieżkę niezależną od „kaspaz roślinnych" [23].

Osobną grupą są metakaspazy, których przynależność do grupy „kaspaz roślinnych" jest kontrowersyjna. Są one cysteinowymi proteazami (mają w swoim centrum aktywnym cysteinę), ale nie wykazują aktywności kaspaz [2].

TABELA 1. Rodzaje „kaspaz roślinnych", podano gatunek oraz komórki lub organy roślin z których wyizolowano dane enzymy (klasyfikacja za Bonneau i wsp. 2008, zmodyfikowane)
TABLE 1. Groups of plant caspases; with the species, cells and organs from which enzymes were isolated, are given (classification according to Bonneau et al.2008, modified)

„Kaspaza roślinna"	Gatunek/ komórki lub organy roślin
YVADaza - VPE	*Nicotiana tabacum, Arabidopsis thaliana/ liście*
DEVDaza	*Arabidopsis thaliana*
VEIDaza – fytaspaza?	*Picea abies*/ linie komórkowe*; Nicotiana tabacum"Xanti"*/ liście
IETDaza - saspaza	*Avena sativa*/ liście
VKMDaza - saspaza	*Avena sativa*/ liście
LEHDaza	*Nicotiana benthamiana*
TATDaza –fytaspaza?	*Nicotiana tabacum"Xanti"*/ liście
LEVDaza	*Papaver rhoeas*/ pyłek

Wakuolarne enzymy przetwarzające

Wakuolarne enzymy przetwarzające (ang. *vacuolar processing enzymes*, VPE) zostały odkryte u roślin ponad 20 lat temu, a scharakteryzowano je w ciągu kilku następnych lat [25]. Nazwa tych enzymów pochodzi od ich lokalizacji w komórkach roślin – są gromadzone na ogół w wakuoli. VPE mają aktywność YVADazy – enzymu rozpoznającego motyw YVAD (Tyr-Val-Ala-Asp) i są zaangażowane w PCD u roślin [17]. Białka homologiczne do VPE występują także w lizosomach u zwierząt [25].

VPE pod wieloma względami przypominają kaspazy. Są legumainami, zaliczanymi wspólnie z kaspazami do klanu CD proteaz cysteinowych, ale należą do odrębnej rodziny C13.

VPE przecinają wiązania peptydowe po kwasie asparaginowym, a także, co nie jest charakterystyczne dla kaspaz, po asparaginie. Wykazują aktywność kaspazy 1, rozpoznają i hydrolizują syntetyczne substraty kaspazy 1, ale nie substraty charakterystyczne dla innych kaspaz [17, 24].

VPE są syntetyzowane w cytozolu w formie proenzymów w odpowiedzi na czynnik inicjujący PCD. Po dostarczeniu do wakuoli, proenzymy te ulegają przekształceniu w formy aktywne [17]. Dotychczas u *Arabidopsis thaliana* odkryto cztery VPE, nazwane odpowiednio AtVPEα, AtVPEβ, AtVPEγ i AtVPEδ [15, 25].

Saspazy

W 2004 r. w liściach *Avena sativa* podczas PCD indukowanej wiktoryną, udało się zidentyfikować dwa rodzaje proteaz o specyficzności kaspaz, homologicznych do proteaz serynowych podobnych do subtilizyny. Te dwa enzymy mają aktywność VKMDazy oraz IETDazy [8].

Saspazy (ang. *serine-dependent aspartate-directed protease*) zawdzięczają swoją nazwę obecności w centrum aktywnym seryny (należą do proteaz serynowych) i hydrolizują wiązania peptydowe po reszcie kwasu asparaginowego [8]. W bazie danych MEROPS, w obrębie proteaz serynowych należą do klanu SB i rodziny S8 (rodzina subtilisiny). Saspazy, pomimo obecności seryny w swoim centrum aktywnym, wykazują aktywność kaspaz. Hydrolizują (z różną wydajnością) substraty ogólne kaspaz oraz substraty charakterystyczne dla kaspazy 6, 8 i 9. Z różną wydajnością są też hamowane przez odpowiednie inhibitory. Saspazy są syntetyzowane w formie nieaktywnych proenzymów konstytutywnie. Po zaindukowaniu PCD, jako aktywne enzymy, są uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej [8].

Fitaspazy

Fitaspazy są najpóźniej odkrytymi „kaspazami roślinnymi". Zostały one wyizolowane i ostatecznie scharakteryzowane w 2010 r. w komórkach *Nicotiana tabacum* i *Oryza sativa* [7]. Aktywność fitaspaz i ich udział w PCD zostały jednak wykryte już wcześniej [7].

Fitaspazy (ang. *plant asparatate-specific protease*) są, podobnie jak saspazy, serynowymi proteazami. Zostały również zakwalifikowane do klanu SB i rodziny S8. Wykazują jednak inną specyficzność niż wszystkie poznane dotąd „kaspazy roślinne". Fitaspazy hydrolizują wiązania peptydowe po reszcie kwasu asparaginowego i wykazują aktywność kaspaz. Z największą wydajnością hydrolizują jeden z substratów kaspazy 6, posiadają też pewną aktywność kaspazy 1, 3, 8 oraz 9. Aktywność fitaspaz hamowana jest najsilniej inhibitorem – Ac-VEID-CHO [7]. Pod tym względem fitaspazy są najbliższe zwierzęcej kaspazie 6 oraz VEIDazie zaangażowanej w PCD w czasie embriogenezy *Picea abies* [5].

Fitaspazy są syntetyzowane w formie nieaktywnych proenzymów. Po aktywacji są wydzielane na zewnątrz komórki, bez żadnych sygnałów inicjujących PCD. Po zaindukowaniu PCD fitaspazy są częściowo transportowane z powrotem do cytozolu. Wydaje się, że naturalnym miejscem ich akumulacji jest apoplast, a podczas PCD funkcjonują wewnątrz i na zewnątrz błony komórkowej [7].

Metakaspazy

Metakaspazy zostały po raz pierwszy odkryte i opisane w 2000 r. w wyniku poszukiwania w komputerowych bazach danych enzymów przypominających sekwencją aminokwasów kaspazy [6]. Enzymy te występują u roślin, grzybów i jednokomórkowych eukariontów. Proteazy przypominające metakaspazy występują również u wielu bakterii. Nie wykryto ich natomiast u zwierząt. Metakaspazy są syntetyzowane dopiero w warunkach inicjujących PCD [6], a zlokalizowane są głównie w cytozolu.

Według klasyfikacji MEROPS metakaspazy zostały umieszczone razem z kaspazami w obrębie proteaz cysteinowych, w klanie CD, w rodzinie C14. W obrębie tej rodziny tworzą podrodzinę C14B. Klasyfikacja i pokrewieństwo kaspaz i metakaspaz są sprawą sporną; niektórzy naukowcy uważają, że metakaspazy mogą być przodkami kaspaz [22]; inni postulują uznanie metakaspaz po prostu za kaspazy [6]. Metakaspazy przypominają kaspazy swoją strukturą i sekwencją aminokwasów. Jednak podstawową różnicą między kaspazami a metakaspazami jest to, że te drugie hydrolizują wiązania peptydowe od strony grupy karboksylowej argininy oraz lizyny, a nie kwasu asparaginowego. Metakaspazy nie wykazują aktywności kaspaz, co znaczy, że nie trawią substratów charakterystycznych dla kaspaz ani nie są hamowane przez ich inhibitory. Hydrolizują natomiast substraty, które nie są rozkładane przez kaspazy [6]. Metakaspazy, zależnie od ich sekwencji i struktury podzielono na metakaspazy I i II typu [6].

U *A. thaliana* odkryto 9 metakaspaz: trzy pierwsze (AtMC1, AtMC2, AtMC3) należą do typu I, pozostałe (AtMC4-9) do typu II [6].

ROLA „KASPAZ ROŚLINNYCH" PODCZAS PCD INDUKOWANEJ ATAKIEM PATOGENÓW

PCD u roślin może być wywołana przez różne rodzaje patogenów, takie jak wirusy, bakterie czy grzyby. W zależności od atakującego organizmu, PCD może przybierać dwie formy. Pierwszą z nich (indukowaną przez wirusy, bakterie i większość grzybów) jest reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*, HR), w wyniku której zainfekowane komórki same indukują swoją śmierć, żeby zapobiec dalszemu rozprzestrzenianiu się tych patogenów. Drugą z nich jest HR wywoływana przez patogeny określane jako nekrotrofy (niektóre grzyby), dla

których obumieranie komórek gospodarza jest korzystne, gdyż odżywiają się ich składnikami [10, 24].

Reakcja nadwrażliwości (HR)

Kluczowymi enzymami biorącymi udział w HR, a także w innych rodzajach PCD przypominającymi megaautofagię, w których dochodzi do pęknięcia wakuoli, są wakuolarne enzymy przetwarzające [20].

Modelowymi roślinami do badania HR są między innymi dwa gatunki tytoniu: *N. benthamiana* i *N. tabacum*. U tych roślin reakcję nadwrażliwości wywołuje się poprzez infekcję wirusem mozaiki tytoniu (TMV). Na początku HR następuje szybki wzrost stężenia i aktywności VPE w wakuoli. VPE prawdopodobnie aktywują enzymy odpowiedzialne za rozpad tonoplastu, co prowadzi do wyraźnych uszkodzeń zainfekowanych tkanek. Wyciszenie ekspresji dwóch genów VPE w komórkach *N. benthamiana* spowodowało brak typowych dla HR objawów po zainfekowaniu przez TMV [17]. Ponadto, kiedy VPE znajdą się w cytozolu mogą aktywować inne proteazy rozkładające białka komórki [17, 36]. Białka, które są aktywowane przez VPE i bezpośrednio zaangażowane w wykonanie PCD nie zostały jak dotąd poznane.

VPE mogą także aktywować enzymy proteolityczne potrzebne np. do degradacji wakuolarnego enzymu – inwertazy Fruct4 – w komórkach *A. thaliana* podczas HR wywołanej przez *Pseudomonas syringae*, a także enzymy degradujące składniki odżywcze podczas infekcji patogennego grzyba – *Botrytis cinerea*. Oznacza to, że VPE mogą także aktywować enzymy biorące bezpośredni udział w wykonaniu PCD [17, 28].

Niedawno odkryto działanie metakaspazy AtMC1 promującej PCD oraz AtMC2 o przeciwstawnym działaniu [9]. Antagonistyczne działanie tych metakaspaz przypomina sytuację występującą u zwierząt: kaspaza 12 hamuje aktywność kaspazy 1 [30]. Zarówno AtMC1 jak i AtMC2 są zaangażowane w kontrolę zasięgu rozprzestrzeniania się PCD podczas HR indukowanej przez *P. syringae*, a także inicjowanej wzrostem syntezy reaktywnych form tlenu [9]. Ostatnio potwierdzono także zaangażowanie metakaspazy 4 (AtMC4) w regulację PCD indukowanej działaniem *P. syringae* [33]. Ponadto, rośliny z mutacją w genie AtMC4 wykazywały wyraźnie mniejszą wrażliwość na mykotoksynę w porównaniu z roślinami dzikimi [33].

Stwierdzono także pośrednią rolę VPE w zamykaniu aparatów szparkowych podczas HR [38]. Ze względu na to, że szparki mogą być drogą inwazji patogenów, zazwyczaj przy infekcji bakteriami lub innymi patogenami dochodzi do ich zamknięcia. Wykazano to na przykładzie mutantów *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją genów VPE po zainfekowaniu przez trzy rodzaje toksyn: harpinę, Nep1 oraz boehmerinę, wytwarzanych przez przedstawicieli, odpowiednio bakterii, grzybów i lęgniowców [37, 38, 39]. Inne badania wskazują, że białka związane

z błoną wakuoli są zaangażowane w transdukcję sygnałów w komórkach szparkowych [32]. VPE są zlokalizowane w wakuoli i ich wyciszenie może wpłynąć na funkcjonowanie tonoplastu oraz może zahamować szlak przekazywania sygnałów w komórkach szparkowych. Skutkiem tego jest brak reakcji aparatów szparkowych na toksyny patogenów [38].

VPE pośrednio wspomagają reakcje odpornościowe roślin na atak patogenów podczas reakcji nadwrażliwości. „Kaspazy roślinne" mogą także brać bezpośredni udział w degradacji białek, które są wytwarzane przez atakujące patogeny.

W jednym z wielu badań mających na celu zidentyfikowanie enzymów o aktywności kaspaz, podczas PCD u roślin wykorzystano jako substrat białko VirD2, wytwarzane przez bakterię *Agrobacterium tumefaciens* [7]. Okazało się, że VirD2 jest hydrolizowane podczas reakcji nadwrażliwości wywołanej przez TMV w komórkach *N. tabacum* przez nieznane dotąd enzymy o aktywności kaspaz. Działanie tych „kaspaz roślinnych" jest hamowane przez syntetyczny inhibitor biotynyl-TATD-CHO [7]. Wyizolowanie enzymów hydrolizujących VirD2 (nazwanych fitaspazami) powiodło się jednak dopiero w 2010 r. [7]. Bakterie *A. tumefaciens* wywołują PCD przypominającą HR [16]. Jak dotąd nie zbadano czy fitaspazy hydrolizują VirD2 podczas PCD wywołanej przez te bakterie.

W 2009 r. odkryto nowy mechanizm obronny roślin przeciwko bakteriom, który może być uaktywniony przed wystąpieniem HR. Zaobserwowano, że w komórkach *A. thaliana* zainfekowanych *P. syringae,* doszło do uwolnienia związków o właściwościach antybakteryjnych [18]. Badania doprowadziły do wyizolowania pierwszego enzymu o aktywności kaspazy 3 – białka AtPBA1, które tworzy jedną z podjednostek katalitycznych proteasomów [18].

PCD wywołana przez nekrotroficzne patogeny

„Kaspazy roślinne" są zaangażowane w PCD wywołaną przez nekrotroficzne patogeny. Grzyb *Fusarium moniliforme*, produkujący toksynę fumonisinę B1 (FB1), został wykorzystany do indukcji PCD [24]. U mutantów nie eksprymujących VPE, toksyna ta nie wywołała żadnych objawów PCD. W jaki sposób fumonizyna B1 może wywoływać PCD? FB1 jest inhibitorem jednego z głównych enzymów w szlaku syntezy sfingolipidów występujących obficie w tonoplaście [14]. Zahamowanie ich syntezy może spowodować utratę integralności błony wakuoli i uwolnienie VPE oraz innych hydrolaz, które przeprowadzają PCD [24]. Sugeruje to, że udział VPE jest niezbędny do wystąpienia PCD pod wpływem nekrotroficznych patogenów.

Innym przykładem zaangażowania „kaspaz roślinnych" w przebieg PCD wywołanej przez nekrotroficzne grzyby jest reakcja komórek *Avena sativa* po zainfekowaniu przez grzyba *Cochliobolus victoriae,* produkującego toksynę wiktorynę [8]. Badania nad PCD wywołaną toksyną *C. victoriae* doprowadziły do odkrycia nowego rodzaju „kaspaz roślinnych" – saspaz oraz stwierdzenia, że

proteazy te biorą udział w hydrolizie enzymu karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO) [8]. Saspazy w przestrzeni międzykomórkowej, prawdopodobnie oddziałując z odpowiednim receptorem w błonie komórkowej, uruchamiają kaskadę proteaz prowadzącą do degradacji RuBisCO. Jak na razie, ani domniemany receptor, ani proteazy aktywowane przez saspazy nie zostały zidentyfikowane.

ROLA „KASPAZ ROŚLINNYCH" PODCZAS PCD INDUKOWANEJ CZYNNIKAMI ABIOTYCZNYMI

PCD u roślin jest indukowana przez wiele abiotycznych czynników, takich jak światło ultrafioletowe (UV), podwyższone stężenie reaktywnych form tlenu w środowisku czy herbicydy. Naświetlenie roślin UV, hodowla w obecności nadtlenku wodoru (H_2O_2) lub parakwatu, powodowało wzrost ekspresji genu metakaspazy 8 – AtMC8 i późniejsze obumieranie komórek na drodze PCD w miejscach narażonych na działanie tych stresorów. Ponadto, transgeniczne linie wykazujące nadekspresję AtMC8 okazały się bardziej wrażliwe na UV, H_2O_2 i parakwat. Ponieważ w komórkach tych roślin nie zaobserwowano znacznego wzrostu innych metakaspaz, wnioskowano, że AtMC8 jest specyficznie indukowana pod wpływem tych czynników [19]. Jednocześnie okazało się, że AtMC8 znajduje się w szlaku reakcji aktywowanych w wyniku stresu oksydacyjnego. Wszystkie z zastosowanych czynników stresowych indukują stres oksydacyjny, który z kolei aktywuje białka takie jak RCD1 (biorące udział w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w reakcje stresowe), co z kolei wpływa na ekspresję AtMC8 [19]. Mutanty rcd1 są niewrażliwe na stres oksydacyjny [1], a pod wpływem UV i parakwatu następuje u nich nie wzrost, lecz spadek ekspresji AtMC8 [19].

ROLA „KASPAZ ROŚLINNYCH" PODCZAS PCD ZWIĄZANEJ Z ROZWOJEM

PCD związana ze wzrostem, różnicowaniem się i dojrzewaniem roślin występuje powszechnie, począwszy od degeneracji tapetum pylnika i megaspor, poprzez formowanie komórek zalążka (osłonki zalążka, bielmo), kończąc na różnicowaniu struktur zarodka (wieszadełko, tkanka ksylemu). Obecnie jest wiele danych literaturowych na temat przebiegu PCD, ale niewiele z nich dotyczy roli kaspaz w tym procesie.

PCD osłonek zalążka

Osłonki zalążka pełnią funkcje ochronne: chronią zarodek przed uszkodzeniami mechanicznymi i atakiem patogenów. U *A. thaliana* osłonka wewnętrzna jest, w początkowym etapie rozwoju zarodka, zbudowana z trzech warstw komórek, z których w trakcie jego rozwoju dwie obumierają na drodze PCD. Ten rodzaj PCD jest typowym przykładem megaautofagii i zachodzi z udziałem jednego z czterech VPE u *A. thaliana,* AtVPEδ. AtVPEδ ulega intensywnej ekspresji w początkowych stadiach rozwoju embrionalnego, w komórkach tych warstw osłonek zalążka, które są kierowane na drogę PCD. AtVPEδ, prawdopodobnie tak jak pozostałe VPE, aktywuje enzymy hydrolityczne doprowadzające do degradacji błony wakuoli. Niestety ani enzymy hydrolityczne aktywowane przez te AtVPEδ, ani też ewentualny udział innych „kaspaz roślinnych" w tym procesie nie został dotychczas poznany [25].

PCD podczas somatycznej embriogenezy

Somatyczna embriogeneza u *P. abies* została dokładnie poznana i jej przebieg może być precyzyjnie kontrolowany [5]. PCD, której podlegają komórki proembriogenicznej masy (PEM) oraz wieszadełka podczas somatycznej embriogenezy przypomina autofagię. Analiza ekstraktów uzyskanych z komórek na różnych etapach embriogenezy wskazała, że komórki te zawierają pojedynczą proteazę lub grupę proteaz o aktywności przypominającej kaspazę 6 [5]. We wczesnej embriogenezie, podczas formowania i zaniku wieszadełka, enzymy o aktywności kaspazy 6 zlokalizowane są wyłącznie w tych komórkach zarodka, które są kierowane na drogę PCD, czyli w komórkach wieszadełka. Następnie, po zaniku wieszadełka aktywność VEIDazy prawie całkowicie zanika. Enzym o aktywności kaspazy 6 jest niezbędny do rozwoju zarodkowego *P. abies* [5].

Prawie równocześnie z odkryciem aktywności VEIDazy w komórkach *P. abies,* wyizolowano metakaspazę zakwalifikowaną do metakaspaz typu II – PaMCII [5], ulegającą aktywacji w tych samych komórkach i w podobnym czasie embriogenezy co VEIDaza. Odkrycie miejsca lokalizacji PaMCII w komórkach, pozwoliło na wyciągnięcie wniosku, że enzym ten bierze prawdopodobnie udział w degradacji składników jąder komórkowych podczas PCD w wieszadełku, podobnie jak kaspazy 3 i 6 podczas apoptozy u zwierząt. Jednocześnie stwierdzono, że metakaspaza *P. abies* nie może odpowiadać za aktywność VEIDazy, ponieważ, podobnie jak inne metakaspazy nie ma aktywności kaspaz [5]. Enzym o aktywności VEIDazy pozostaje nadal niezidentyfikowany (tab. 1); prawdopodobnie jest on spokrewniony z odkrytymi w 2010 r. fitaspazami, które również z największą wydajnością hydrolizują substraty z sekwencją VEID [7]. Udało się zidentyfikować białko TSN (ang. *Tudor staphylococcal nuclease*) – naturalny substrat PaMCII [31]. TSN jest powszechnie występującym,

konserwatywnym ewolucyjnie białkiem o właściwościach rybonukleazy, które w komórkach zwierząt wchodzi w skład kompleksów odpowiedzialnych za wyciszanie ekspresji genów poprzez degradację mRNA, bierze udział w regulacji ekspresji genów i jest degradowane podczas apoptozy przez kaspazę 3 [31]. Degradacja PaTSN podczas PCD, występującej w czasie somatycznej embriogenezy u *P. abies,* została potwierdzona jedynie w komórkach, które miały podwyższoną aktywność PaMCII, czyli w komórkach wieszadełka, podczas jego degeneracji. Wyciszenie ekspresji metakaspazy II zapobiegało hydrolizie PaTSN [31]. Obecność PaTSN wyłącznie w cytozolu wskazuje, że roślinne TSN nie może, jak jest w przypadku zwierząt, być zaangażowane w proces translacji i splicingu [31]. Rola tego ważnego dla funkcjonowania komórek roślinnych białka nadal nie jest poznana.

PCD bielma podczas rozwoju nasion

Udział enzymów o aktywności kaspaz podczas PCD został potwierdzony podczas rozwoju ziarniaków *Hordeum vulgare* [3, 27]. Bielmo w ziarniakach zróżnicowane jest na zewnętrzną warstwę aleuronową oraz bielmo właściwe, wypełniające większość objętości ziarniaków. Boren i wsp. [3] odkryli, że PCD w komórkach bielma związana jest, podobnie jak podczas rozwoju embrionalnego *P. abies*, z aktywnością enzymu przypominającego kaspazę 6 (VEIDaza). Aktywność VEIDazy była najwyższa w początkowym etapie rozwoju ziarniaków, potem aktywność tego enzymu znacznie spadła i pozostała na niskim poziomie, aż do ostatecznego uformowania się ziarniaków *H. vulgare*. Enzym przypominający kaspazę 6 został zlokalizowany w autofagosomach komórek bielma [3]. Stwierdzono również, że w PCD komórek owocni *H. vulgare* zaangażowany jest jeden z VPE występujący u tej rośliny – HvVPE4, którego ekspresję stwierdzono wyłącznie w początkowym etapie dojrzewania ziarniaków [27].

PODSUMOWANIE

PCD u zwierząt przebiega z udziałem kaspaz. U roślin doszło do wykształcenia bardziej złożonego i zróżnicowanego mechanizmu PCD, w który zaangażowane są różne rodzaje enzymów przypominających kaspazy, w tym VPE, saspazy, fitaspazy, metakaspazy oraz inne.

VPE przypominają aktywnością kaspazę 1; występują w wakuoli i prawdopodobnie aktywują enzymy odpowiedzialne za rozpad tonoplastu. Przerwanie ciągłości wakuoli doprowadza do uwolnienia do cytozolu enzymów hydrolitycznych, które degradują składniki komórki. Obecność VPE jest niezbędna podczas HR wywołanej infekcją wirusową lub bakteryjną. VPE są elementem mechanizmów obronnych roślin, biorą także udział w PCD – podczas rozwoju osłonek zalążka oraz spowodowanej stresem abiotycznym.

Metakaspazy to enzymy najbardziej przypominające kaspazy zwierzęce. Mają podobną sekwencję aminokwasów, są syntetyzowane i aktywowane w podobny sposób. Istotną różnicą między metakaspazami, a kaspazami jest to, że te pierwsze charakteryzują się innym mechanizmem katalizy. Metakaspazy występują w cytozolu i prawdopodobnie biorą bezpośredni udział w degradacji ważnych dla komórki składników. Dotychczas udział metakaspaz w PCD został dobrze udokumentowany w badaniach embriogenezy somatycznej *P. abies* oraz w kilku przypadkach HR.

Saspazy i fitaspazy to ,,kaspazy roślinne", które zostały najpóźniej odkryte. Wykazują zróżnicowaną aktywność przypominającą kaspazy. Funkcjonują częściowo wewnątrz i na zewnątrz komórki. Dotychczas udokumentowany został udział saspaz w aktywacji kaskady enzymów, prowadzącej do rozkładu RuBisCO w komórkach *A. sativa*. Jedyną potwierdzoną jak na razie funkcją fitaspaz jest hydroliza białka VirD2 podczas reakcji nadwrażliwości u *N. tabacum*.

Nie jest znany dokładny mechanizm w wyniku którego ,,kaspazy roślinne" przyczyniają się do śmierci komórki. Nie udało się także wykazać jednoczesnej aktywności wszystkich grup ,,kaspaz roślinnych" w jednej komórce. Jak na razie możemy być pewni, że PCD podczas HR nie przebiega wyłącznie z udziałem VPE, a podczas rozwoju embrionalnego wyłącznie z udziałem metakaspaz. Metakaspazy, funkcjonując w cytozolu, prawdopodobnie bezpośrednio (tak jak kaspazy) degradują ważne dla komórki białka, zakłócając tym samym jej funkcjonowanie. Saspazy i fitaspazy mogą pośrednio lub bezpośrednio wspomagać działanie metakaspaz. Mimo, że PCD u roślin przebiega według innego mechanizmu niż u zwierząt, ogólny cel tego procesu pozostał taki sam. Konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia roli jaką w procesie PCD spełniają ,,kaspazy roślinne".

LITERATURA

[1] AHLFORS R, LANG S, OVERMYER K, JASPERS P, BROSCHE M, TAURIAINEN A, KOLLIST H, TUOMINEN H, BELLES-BOIX E, PIIPPO M, INZE D, PALVA ET, KANGASJARVI J. Arabidopsis radical-induced cell dath1 belongs to the WWE protein–protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, athylene, and methyl jasmonate responses. Plant Cell 2004; **16**: 1925–1937.

[2] BONNEAU L, GE Y, DRURY GE, GALLOIS P. What happened to plant caspases ? J Exp Bot 2008; **59**: 491-499.

[3] BOREN M, HOGLUND A-S, BOZHKOV P, JANSSON C. Developmental regulation of a VEIDase caspase-like proteolytic activity in barley caryopsis. J Exp Bot 2006; **57**: 3747–3753.

[4] BOSCH M, FRANKLIN-TONG VE. 753. Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen. Proc Natl Acad Sci USA 2007; **104**: 18327–18332.

[5] BOZHKOV PV, SUAREZ MF, FILONOVA LH, DANIEL G, ZAMYATNIN AA, RODRIGUEZ-NIETO S, ZHIVOTOVSKY B, SMERTENKO AP. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2005; **102**: 14463–14468.

[6] CARMONA-GUTIERREZ D, FROHLICH K-U, KROEMER G, MADEO F. Metacaspases are caspases. Doubt no more. Cell Death and Differ 2010; **17**: 377-378.

[7] CHICHKOVA NV, TUZHIKOV AI, TALIANSKY M, VARTAPETIAN AB. Plant phytaspases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity. Physiol Plant 2012, Article first published online: 28 JAN 2012;
[8] COFFEEN WC, WOLPERT TJ. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in Avena sativa. Plant Cell 2004; **16**: 857–873.
[9] COLL NS, VERCAMMEN D, SMIDLER A, CLOVER C, VAN BREUSEGEM F, DANGL JL, EPPLE P. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. Science 2010; **330**: 1393-1397.
[10] VAN DOORN WG, WOLTERING EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Sci 2005; **10**: 117-122.
[11] VAN DOORN WG. Classes of programmed cell death in plants, compared to thoses in animals. J Exp Bot 2011; **62**: 4749-4761.
[12] EARNSHAW WC, MARTINS LM, KAUFMANN SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem 1999; **68**: 383-424.
[13] GAO C, ZHANG L, WEN F, XING D. Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. Plant Signal and Behav 2008; **3**: 197-203.
[14] GILCHRIST DG. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. Annu Rev of Phytopathol 1998. **36**: 393–414.
[15] GRUIS DF, SELINGER DA, CURRAN JM, JUNG R. Redundant proteolytic mechanisms process seed storage proteins in the absence of seed-type members of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. Plant Cell 2002; **14**: 2863–2882.
[16] HANSEN G. Evidence for Agrobacterium-induced apoptosis in maize cells. Mol Plant Microbe Interact 2000; **13**: 649–657.
[17] HARA-NISHIMURA I, HATSUGAI N, NAKAUNE S, KUROYANAGI M, NISHIMURA M. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. Curr Opin in Plant Biol 2005; **8**: 404–408.
[18] HATSUGAI N, IWASAKI S, TAMURA K, KONDO M, FUJI K, OGASAWARA K, NISHIMURA M, HARA-NISHIMURA I. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. Genes and Dev 2009; **23**: 2496-2506.
[19] HE R, DRURY GE, ROTARI VI, GORDON A, WILLER M, TABASUM F, WOLTERING EJ, GALLOIS P. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by UV and H2O2 in Arabidopsis. J Biol Chem 2008; **283**: 774–783.
[20] JONES AM. Programmed cell death in development and defense. Plant Physiol 2001; **125**: 94-97.
[21] KIM M, AHN J-W, JIN U-H, CHOI D, PAEK K-H, PAI H-S. Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. J Biol Chem 2003; **278**: 19406-15.
[22] KOONIN EV, ARAVIND L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. Cell Death and Differ 2002; **9**: 394-404.
[23] KRZYMOWSKA M, KONOPKA-POSTUPOLSKA D, SOBCZAK M, MACIOSZEK V, ELLIS BE, HENNIG J. Infection of tobacco with different Pseudomonas syringae pathovar leads to distinct morphotypes of programmed cell death. Plant J 2007; **50**: 253-264.
[24] KUROYANAGI M, YAMADA K, HATSUGAI N, KONDO M, NISHIMURA M, HARA-NISHIMURA I. Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 2005;. **280**: 32914–32920.
[25] NAKAUNE S, YAMADA K, KONDO M, KATO T, TABATA S, NISHIMURA M, HARA-NISHIMURA I. A vacuolar processing enzyme, δVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development . Plant Cell 2005; **17**: 876–887.
[26] PALAVAN-UNSAL N, ARISAN ED. Evidences for the presence of caspase-like activities in plants. Fen Bilimleri Dergisi 2011; **23**: 57-69.
[27] RADCHUK V, WEIER D, RADCHUK R, WESCHKE W, WEBER H. Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth. J Exp Bot 2011; **62**: 1217–1227.
[28] ROJO E, ZOUHAR J, CARTER C, KOVALEVA V, RAIKHEL NV. A unique mechanism for protein processing and degradation in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci USA 2003; **100**: 7389–7394.

[29] ROTARI VI, RUI H, GALLOIS P. Death by proteases in plants: whodunit. Physiol Plant 2005; **123**: 376-385.
[30] SALEH M, MATHISON JC, WOLINSKI MK, BENSINGER SJ, FITZGERALD P, DROIN N, ULEVITCH RJ, GREEN DR, NICHOLSON DW. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. Nature 2006; **440**: 1064-1068.
[31] SUNDSTRÖM JF, VACULOVA A, SMERTENKO AP, SAVENKOV EI, GOLOVKO A, MININA E, TIWARI BS, RODRIGUEZ-NIETO S, ZAMYATNIN JR AA, VALINEVA T, SAARIKETTU J, FRILANDER MJ, SUAREZ MF, ZAVIALOV A, STAHL U, HUSSEY PJ, SILVENNOINEN O, SUNDBERG E, ZHIVOTOVSKY B, BOZHKOV PV. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. Nat Cell Biol 2009; **11**: 1347–1354.
[32] VAHISALU T, KOLLIST H, WANG Y, NISHIMURA N, CHAN WY, VALERIO G, LAMMINMÄKI A, BROSCHE M, MOLDAU H, DESIKAN R, SCHROEDER JI, KANGASJÄRVI J. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. Nature 2008; **452**: 487–491.
[33] WATANABE N, LAM E., Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. Plant J 2011; **66**: 969-982.
[34] WOLTERING EJ, VAN DER BENT A, HOEBERICHTS FA. Do plant caspases exist? Plant Physiol 2002; **130**: 1764-1769.
[35] XU Q, I ZHANG L. Plant casapase-like proteases in plant programmed cell death. Plant Signaling and Behavior 2009; **4**: 902-904.
[36] YAMADA K, SHIMADA T, NISHIMURA M, HARA-NISHIMURA I. A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. Physiol Plant 2005; **123**: 369–375.
[37] ZHANG HJ, FANG Q, ZHANG ZG, WANG YC, ZHENG XB. The role of respiratory burst oxidase homologs in elicitor-induced stomatal closure and hypersensitive response in Nicotiana benthamiana. J Exp Bot 2009; **60**: 3109–3122.
[38] ZHANG H, DONG S, WANG M, WANG W, SONG W, DOU X, ZHENG X, ZHANG Z. The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from Nicotiana benthamiana in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure. J Exp Bot 2010; **61**: 3799–3812.
[39] ZHAO MG, TIAN Q, ZHANG WH. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. Plant Physiol 2007; **144**: 206–217.

Redaktor prowadzący – A.K. Kononowicz

Otrzymano: 12.04.2012
Przyjęto: 15.02.2012
Agnieszka Mostowska
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: mostowag@biol.uw.edu.pl