

CZY MITOCHONDRIA INDUKUJĄ PROGRAMOWANĄ ŚMIERĆ KOMÓRKI W ROŚLINACH?

DO MITOCHONDRIA INDUCE PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANTS?

Joanna KOZIOŁ-LIPIŃSKA, Ewa SIMEONOVA, Agnieszka MOSTOWSKA

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

Streszczenie: W artykule przedstawiony został aktualny stan badań dotyczących roli mitochondriów w procesie programowanej śmierci komórki (PCD) roślin. Od dawna sugerowano, że roślinne mitochondria, podobnie jak zwierzęce, mogą indukować PCD. Dotychczasowe badania wskazują, że trudno jednoznacznie określić podobieństwo mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję oraz przebieg PCD w świecie zwierząt i roślin. Mitochondria roślinne zaangażowane są w proces PCD w odmienny sposób niż mitochondria zwierzęce w apoptozie. Proces starzenia się organów, tkanek i komórek roślinnych, który angażuje mechanizmy PCD, jest bowiem związany z redystrybucją metabolitów syntetyzowanych i magazynowanych podczas cyklu życiowego rośliny. Dotąd nie wiadomo, czy podczas PCD w mitochondriach roślinnych zawsze zachodzi zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (MPT) oraz załamanie się potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$). Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów roślinnych do cytozolu zarejestrowano w systemie *cell-free*. Rola cytochromu c oraz jego funkcja indukująca PCD w roślinach mogą sugerować wspólne ścieżki apoptozy zwierząt i PCD roślin. Dotychczasowe informacje dotyczące indukcji PCD podczas różnicowania się komórek w cyklu życiowym roślin nie wyjaśniają w pełni roli mitochondriów w tym procesie.

Słowa kluczowe: mitochondria roślinne, programowana śmierć komórki, potencjał transbłonowy mitochondriów.

Summary: In this paper current knowledge concerning the role of mitochondria in plant programmed cell death (PCD) is presented. It has been already suggested that plant mitochondria, similarly to animal ones, can induce PCD. Senescence process in plants which engages PCD mechanisms involves transport and redistribution of metabolites what require energy generated in mitochondria. It seems therefore that PCD in plants might proceed in different way than animal apoptosis. It is still not clear whether mitochondrial permeability transition (MPT) and decrease of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) always take place in plants. Release of cytochrome c into cytosol and its inducible role in PCD in free-cell system in plants may suggest the existence of some common pathways of animal apoptosis and plant PCD. In spite of many results concerning induction of PCD during differentiation process, existing data do not elucidate the role of mitochondria in this process.

Key words: plant mitochondria, programmed cell death, mitochondrial membrane potential.

1. WPROWADZENIE

Od dawna wiadomo, że mitochondria odgrywają kluczową rolę w apoptozie u zwierząt [36,38]. Wykazano między innymi, że w izolowanych jądrach bez ekstraktu zawierającego mitochondria apoptoza nie zachodzi, podczas gdy komórki bez jąder są zdolne do rozpoczęcia apoptozy [91]. Wykazano również, że pierwszymi symptomami apoptozy w większości analizowanych ludzkich i zwierzęcych komórkach apoptotycznych są zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (MPT) i zmiana potencjału transbłonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) [38]. Depolaryzacja błony mitochondrialnej przy wysokim stężeniu Ca^{2+} w cytozolu może prowadzić do otwarcia megakanałów, czyli porów w błonie mitochondrialnej (PTP), następnie powodować napływ wody do matriks, pęcznienie mitochondriów i w konsekwencji rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej białkowych czynników indukujących apoptozę: cytochromu c, czynnika AIF i prokaspaz [69,70].

Od końca lat dziewięćdziesiątych XX w. sugerowano, że roślinne mitochondria, podobnie jak zwierzęce, mogą być zaangażowane w programowaną śmierć komórki (PCD), a nawet indukować PCD [4,40]. Proces PCD w roślinach jest od dość dawna przedmiotem licznych badań [37,77]. Wiadomo, że w trakcie przebiegu wielu procesów w cyklu życiowym rośliny zachodzi PCD i bezpośrednio poprzedza śmierć wybranej grupy komórek, określonych organów lub całych organizmów [48]. Ma to miejsce między innymi w przypadku starzenia się liści [67], tapetum [5,49] podczas procesu ksylogenezy [86], a także podczas superczulej odpowiedzi (HR) na atak patogena [41]. Indukcja tych procesów oraz ich prawidłowy przebieg wymaga ekspresji szeregu specyficznych genów tzw. *senescence associated genes (SAGs)* [13,33,58]. PCD może być także indukowana różnymi stresami i czynnikami środowiskowymi [9,13,30,37,45,59]. Znanyymi wyznacznikami PCD w komórkach roślinnych, podobnie jak w przypadku apoptozy u zwierząt jest kondensacja chromatyny na terenie jądra, a także nieprzypadkowa internukleosomalna fragmentacja jądrowego DNA (nDNA) [8,23,37,-48,49,59,67]. Chociaż do tej pory nie znaleziono homologów kaspaz zwierzęcych w roślinach, to jednak w genomie *Arabidopsis* zlokalizowano geny kaspazo-podobnych białek [76] oraz stwierdzono obecność kaspazo-podobnych proteaz cysteinowych (CLP), których aktywność jest indukowana podczas PCD [10,81].

Mimo że nie znaleziono także strukturalnych homologów białek z rodziny BCL-2, takich jak BAX i BCL-2, które modulują funkcje kaspaz zwierzęcych, to znaleziono roślinny homolog inhibitora-1 białka BAX – BI-1 [65], który prawdopodobnie funkcjonuje jako kluczowy i powszechny (u zwierząt i u roślin) regulator szlaku śmierci [80].

Przedmiotem licznych badań jest obecnie analiza zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów i powiązanie tego zjawiska z PCD [22,47,50,68]. O ile rola mitochondriów w apoptozie u zwierząt, a w szczególności uwolnienie cytochromu c, została wykazana ponad wszelką wątpliwość, o tyle w PCD roślin wymaga dalszych badań. Wśród badaczy mechanizmów PCD w roślinach toczy się szeroka dyskusja, czy system sygnałowy indukcji PCD jest uniwersalny w świecie roślin i zwierząt, a szczególnie czy mitochondria w komórkach roślinnych są zaangażowane w przekazywanie sygnałów pro-apoptotycznych, tak jak to ma miejsce podczas apoptozy w komórkach zwierzęcych i ludzkich.

2. ROLA MITOCHONDRIÓW W AKTYWACJI MECHANIZMÓW PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ

2.1. Rola mitochondriów w indukcji apoptozy w komórkach zwierzęcych

Doniesienia z ostatnich lat dotyczące apoptozy w komórkach zwierzęcych wskazują na mitochondria jako ośrodki integracji oraz przekazywania sygnałów o indukcji apoptozy [28,36,38,40,47]. Ostatnio rozważana jest rola mitochondriów w indukowaniu PCD w drożdżach [62]. Wyniki dotychczasowych badań pozwoliły na stwierdzenie, iż jednym z pierwszych przejawów apoptozy w komórkach zwierzęcych i ludzkich w większości przypadków jest zmiana przepuszczalności błon mitochondriów (MPT) [11,34,88] oraz redukcja potencjału transbłonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) [1,36,38,87,88]. Wykazano, iż spadek $\Delta\Psi_m$ jest przyczyną nieodwracalności przebiegu apoptozy *in vivo* oraz *in vitro* [87,88]. W następstwie spadku $\Delta\Psi_m$ zachodzi rozprężenie procesu transportu elektronów i syntezy ATP, co generuje znaczące ilości reaktywnych form tlenu (ROS) w komórce [39,57,66,87], a następnie powoduje peroksydację komponentów wewnętrznej błony mitochondrialnej, co w konsekwencji prowadzi do nieodwracalnych zmian w jej strukturze [87]. Wykazano, że zarówno cyklosporyna (CsA) – inhibitor ssaków PT [11], jak i antyutleniacze, które wymiatają aniony ponadtlenkowe [79], mogą hamować MPT, co nie zawsze jest związane ze zmianą $\Delta\Psi_m$.

Udział mitochondriów w apoptozie został potwierdzony wówczas, gdy wykazano, że białka mitochondrialne zarówno pro-, jak i anti-apoptotyczne z rodziny BCL-2, tj. czynnik indukujący apoptozę (AIF) oraz cytochrom c, uczestniczą w fazie końcowej apoptozy (*execution phase*) [78]. W warunkach stresu następują zmiany pH w komórce, a także zmiany poziomu niektórych metabolitów – ATP, ADP, NADH, NADPH oraz fosforanu kreatyny, dochodzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} i wzrostu stężenia ROS, co indukuje otwarcie porów w błonie mitochondrialnej (PTP) i spadek $\Delta\Psi_m$ [34,36,38,88]. W konsekwencji, wskutek napływu wody do matriks, mitochondria pęcznieją, rozerwana zostaje błona zewnętrzna oraz z przestrzeni międzybłonowej uwolnione zostają do cytozolu białkowe czynniki pro-apoptotyczne: cytochrom c, AIF oraz prokaspazy 2, 3, 9 [2,28,32,35,71]. Wolny cytochrom c wiąże się, w obecności dATP, z czynnikiem Apaf-1 i pro-kaspazą 9, dzięki czemu aktywacji ulega kaspaza 9. Wyzwała to kaskadę aktywności kolejnych kaspaz – proteaz cysteinowych będących głównym składnikiem mechanizmów regulujących apoptozę. Uwolniony z mitochondriów do cytoplazmy cytochrom c stanowi kluczowy element systemu sygnałowego indukcji programowanej śmierci związanej z działaniem kaskady kaspaz. Natomiast czynnik AIF uwolniony z mitochondriów jest transportowany do jądra, gdzie zaangażowany jest w aktywację procesu fragmentacji nDNA [4,23].

2.2. Metody badania potencjału transbłonowego mitochondriów

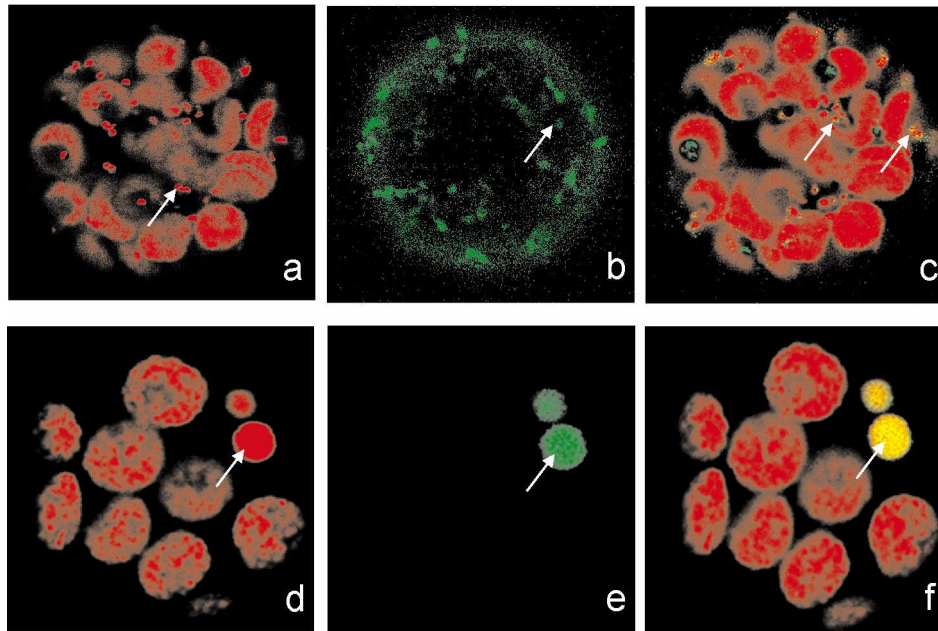
Jak przedstawiono powyżej, redukcja potencjału błonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) jest jednym z pierwszych przejawów PCD w komórkach ludzkich i zwierzęcych.

Pierwsze metody pomiaru $\Delta\Psi_m$ prowadzonego *in vitro* polegały na oznaczaniu gradientów stężenia jonów potasu K^+ lub radioaktywnych jonów rubidu $^{86}Rb^+$ w poprzek błony mitochondrialnej, po zastosowaniu walinomycyny (ruchomego nośnika, czyli jonoforu, katalizującego elektryczny uniport $^{86}Rb^+$ oraz K^+); [29]. W innych metodach monitorowania zmian wartości $\Delta\Psi_m$ wykorzystuje się dyfuzję lipofilnych cząsteczek do komórki i ich akumulację w matriksie mitochondrialnej, np. kationu tetrafenylofosfoniowego (TPP^+) [20,29]. Do fluorochromów powszechnie stosowanych do analizy $\Delta\Psi_m$ należą: rodamina 123 (Rh 123), tetrametylorodamina (TMR), ester metylowy tetrametylorodaminy (TMRM), ester etylowy tetrametylorodaminy (TMRE), safranina O, jodek 3,3'-diheksylokarbocyaniny ($DiOC_6(3)$) oraz oranż nonylakrydyny (NAO) [29,31,54,60,85]. W metodzie fluorescencyjnej umożliwiającej analizę kinetyki zmian potencjału transbłonowego mitochondriów jest wykorzystywane zjawisko fluorescencji rezonansowego przeniesienia energii (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). Metoda FRET oparta jest na interakcji pary fluorochromów, takich jak: NAO i TMR lub TMRM i fluorochrom MitoTracker Green [12,29], co pozwala na dokładne śledzenie zmian $\Delta\Psi_m$, oraz ich precyzyjną lokalizację, na przykład umożliwia obserwację redukcji $\Delta\Psi_m$ w pojedynczych mitochondriach w danej komórce [12].

Do analizy zmian $\Delta\Psi_m$ w ludzkich i zwierzęcych komórkach apoptotycznych zastosowano również sondę fluorescencyjną typu: jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny, JC-1 [1,29,87,88]. Lipofilne kationy JC-1 specyficznie wnikają do mitochondriów, akumulując się w ujemnie naładowanej matriksie mitochondrialnej w formie J-monomerów i J-agregatów. Formowanie się J-agregatów jest uwarunkowane powstawaniem wysoce ujemnego potencjału transbłonowego w mitochondrium o wartościach $\Delta\Psi_m$ bardziej ujemnych niż 140 mV [63,72]. J-agregaty w mitochondriach o wysoce ujemnym potencjale transbłonowym fluoryzują na czerwono. Monomery JC-1 wykazują zieloną fluorescencję wskazując na depolaryzację błony mitochondrialnej o wartościach dodatnich potencjału do -100 mV [63,72]. Redukcja potencjału, a tym samym depolaryzacja błony powoduje zanik czerwonej fluorescencji. Zielona fluorescencja monomerów może być nadal obserwowana, gdyż depolaryzacja błony nie powoduje całkowitego uwolnienia monomerów fluorochromu z mitochondriów [63,72]. Badania fluorometryczne $\Delta\Psi_m$ przy zastosowaniu fluorochromu JC-1 były prowadzone w komórkach zwierzęcych i ludzkich oraz w mitochondriach w warunkach *in vitro* stosując mikroskop fluorescencyjny i laserowy skaningowy mikroskop konfokalny oraz spektrofluorymetr i cytometr przepływowy [20,63,72]. Ostatnio zastosowano badania fluorometryczne po raz pierwszy do monitorowania $\Delta\Psi_m$ w mitochondriach roślinnych [68].

2.3. Rola mitochondriów w indukcji programowanej śmierci komórki w roślinach

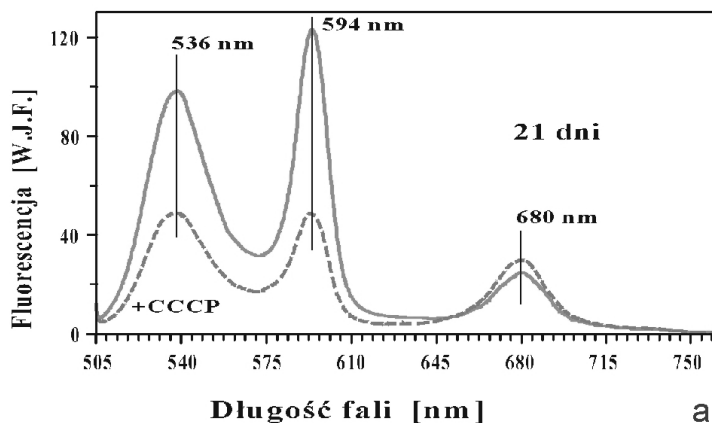
Jak wynika z przedstawionych powyżej danych, istnieje szereg doniesień o zaangażowaniu mitochondriów w mechanizmy regulujące indukcję programowanej śmierci w komórkach zwierzęcych i ludzkich. Ostatnie lata przyniosły pierwsze wyniki badań dotyczących roli mitochondriów podczas starzenia się i programowanej śmierci w komórkach roślinnych [22,40,46,47,68]. Mitochondria roślinne były poddane analizie $\Delta\Psi_m$ przy użyciu safraniny O oraz rodaminy 123, a także fluorochromu MitoTracker Orange [22,31,60] i fluorochromu JC-1, który specyficznie akumuluje się w mitochondriach roślinnych (ryc. 1 i 2) [68].



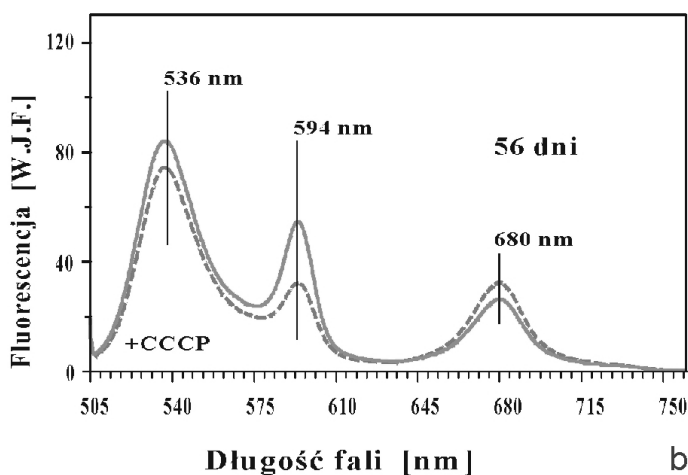
RYCINA 1a-c. Protoplasty mezofilu izolowane z zielonych liści 21-dniowych siewek *Pisum sativum* (a-c) barwione JC-1, oglądane w mikroskopie konfokalnym. Liczne mitochondria (strzałki) równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie. Czerwona fluorescencja mitochondriów (strzałki) wynika z wytworzenia się J-agregatów spowodowanego wysokim potencjałem transbłonowym (a), zielona fluorescencja mitochondriów (strzałki) wynika z wytworzenia się monomerów JC-1 spowodowanego niskim potencjałem transbłonowym (b), czerwona, zielona i pomarańczowa fluorescencja mitochondriów (strzałki) wynika z kolokalizacji, wewnątrz tego samego protoplastu, zarówno mitochondriów z wysokim jak i z niskim potencjałem transbłonowym (c); ryc. 1 d-f – protoplasty mezofilu izolowane z żółtych liści 56-dniowych siewek *Pisum sativum* (d-f) barwione JC-1, oglądane w mikroskopie konfokalnym. „Gigantyczne” mitochondria (strzałki) widoczne w cytoplazmie. Czerwona fluorescencja „gigantycznego” mitochondrium (strzałki) wynika z wytworzenia się J-agregatów spowodowanego wysokim potencjałem transbłonowym (d), zielona fluorescencja „gigantycznego” mitochondrium (strzałki) wynika z wytworzenia się monomerów JC-1 spowodowanego niskim potencjałem transbłonowym (e), żółta fluorescencja „gigantycznego” mitochondrium wynika z jednoczesnej fluorescencji J-agregatów i monomerów JC-1 wewnątrz tego samego „gigantycznego” mitochondrium (f)

Dzięki zastosowaniu JC-1 udało się wykazać, że w protoplastach zarówno izolowanych z młodych, zielonych liści *Pisum sativum*, jak i ze starzejących się żółtych liści tego gatunku występują jednocześnie dwie subpopulacje mitochondriów różniących się wartościami $\Delta\Psi_m$ (ryc.1 i 2) [68]. Obok mitochondriów wykazujących czerwoną fluorescencję J-agregatów świadczącą o zachowaniu wysoce ujemnego potencjału transbłonowego, w tej samej komórce obserwowano pulę mitochondriów wykazujących zieloną fluorescencję monomerów JC-1, świadczącą o redukcji $\Delta\Psi_m$ do wartości większej od -100 mV [63]. Jak wynika z analizy fluorescencyjnej $\Delta\Psi_m$ przeprowadzonej w mikroskopie konfokalnym, a także w spektrofotometrycznej, w starzejących się komórkach mezofilu obserwuje się wciąż pulę mitochondriów o wysoce ujemnym potencjale transbłonowym (ryc.1 i 2). Dodanie protonoforu – karbonylocyjanu-3-chlorofenylhydrazonu (CCCP), odpowiedzialnego za zniesienie gradientu elektrochemicznego

**Fluorescencja JC-1 w mitochondriach
komórek mezofilu 21-dniowego *Pisum sativum***



**Fluorescencja JC-1 w mitochondriach
komórek mezofilu 56-dniowego *Pisum sativum***



RYCINA 2a,b. Widma emisji fluorescencji monomerów JC-1 (maks. 536 nm), J-agregatów (maks. 594 nm) i chlorofilu (maks. 680 nm), zarejestrowane przy wzbudzeniu falą o długości 490 nm, w zawieszynie protoplastów mezofilu, izolowanych z liści *Pisum sativum* 21-dniowych (a) i 56-dniowych (b) roślin. Wraz z zaawansowaniem starzenia się roślin, odnotowano spadek intensywności fluorescencji J-agregatów (a,b) i w mniejszym stopniu monomerów JC-1(a,b) akumulowanych w mitochondriach protoplastów mezofilu, wyrażonej we względnych jednostkach fluorescencji. Dodanie do zawieszyny protoplastów CCCP powodowało wygaszenie zarówno fluorescencji J-agregatów, jak również monomerów JC-1

mitochondriów, powodowało wygaszanie głównie czerwonej fluorescencji J-agregatów (ryc. 2) [68]. CCCP przemieszczając się wahadłowo przez błonę może katalizować elektryczny uniport protonów i zwiększać przewodnictwo protonowe błony, co powoduje zmniejszenie siły protonomotorycznej Δp i potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ nawet do zera [56]. Wynik ten jest zgodny z danymi dotyczącymi zmiany $\Delta\Psi_m$ w zwierzęcych i ludzkich mitochondriach [63,72]. W protoplastach starzejących się roślin obserwowano zgrupowania mitochondriów, wśród których jedne mitochondria wykazywały w mikroskopie konfokalnym czerwoną, a inne zieloną fluorescencję JC-1 świadczącą o zróżnicowaniu wartości $\Delta\Psi_m$ [68]. Podobne zgrupowania mitochondriów o czerwonej i zielonej fluorescencji obserwowali także Leśniewska i wsp. [50] podczas PCD komórek tapetum pylnikowego u *Ornithogalum virens*. W jeszcze starszych liściach *Pisum sativum* zidentyfikowano ogromne mitochondria o średnicy około 2 μm pochodzące być może z fuzji drobnych mitochondriów (ryc. 1d-f) [68]. Te gigantyczne mitochondria wykazywały zarówno zieloną, jak też czerwoną fluorescencję JC-1, co dowodzi istnienia lokalnych różnic w wartości potencjału błonowego $\Delta\Psi_m$ w różnych obszarach błony pojedynczego mitochondrium [81]. Podobne różnice stwierdzono również na poziomie pojedynczego organelum w wielu typach komórek zwierzęcych [63,72].

Reasumując, analiza $\Delta\Psi_m$ podczas starzenia się mezofilu *Pisum sativum* przy użyciu JC-1, wykazała, iż zapoczątkowanie PCD w tym procesie nie jest sprzężone z redukcją wysoce ujemnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$ ok. -180 mV) we wszystkich mitochondriach danej komórki [68], jak to ma miejsce w większości zbadanych przypadków apoptozy w komórkach zwierzęcych czy ludzkich [1,36,87]. Na podstawie tych wyników trudno więc jednoznacznie stwierdzić, czy mitochondria są ośrodkiem przekazywania pierwszych sygnałów pro-apoptotycznych podczas PCD komórek mezofilu.

Istnieje szereg doniesień dotyczących roli mitochondriów roślinnych podczas PCD indukowanej różnymi czynnikami chemicznymi w kulturach roślin *in vitro* lub w układach eksperymentalnych, tzw. *cell free systems* [89,90,91]. Stwierdzono np., że wiktoryna, produkowana przez pasożytniczego grzyba *Cochliobolus victoriae*, może indukować PCD w genotypach owsa wrażliwych na wiktorynę. W tym przypadku pierwszym przejawem PCD *in vivo* jest redukcja $\Delta\Psi_m$ [22]. Izolowane z młodych liści owsa mitochondria, po inkubacji z wiktoryną, wykazują znaczącą zmianę MPT, której w określonych warunkach może towarzyszyć uwolnienie cytochromu c do płynu inkubacyjnego [22]. W przypadku PCD indukowanej witaminą K₃ (2-metylanoftochinon-1,4) w kulturze protoplastów *Nicotiana tabacum* L. oraz podczas PCD indukowanej wysoką temperaturą w odciętych liścieniach *Cucumis sativus* L. dochodzi do translokacji cytochromu c do cytoplazmy, co powoduje aktywację kaspazo-podobnych białek (CLP) [4,40]. W komórkach kukurydzy, w których indukowano PCD poprzez dodanie D-mannozy również stwierdzono uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy [40,73]. W systemie *cell-free*, cytochrom c z cytozolu marchwi indukował PCD przejawiającą się kondensacją chromatyny i fragmentacją nDNA [89,90,91]. Wyniki tych eksperymentów jednoznacznie dowodzą zaangażowania cytochromu c w regulację PCD, indukowanej w warunkach *in vitro*, a także wskazują na kluczową rolę cytochromu c w aktywacji CLP, odpowiedzialnych za uruchomienie fragmentacji jądrowego DNA oraz degradację lamin jądrowych [40,91].

W innych badaniach podczas naturalnej lub indukowanej PCD często rejestrowano uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, chociaż nie zawsze był to wystarczający czynnik do indukcji PCD. Podczas dojrzewania elementów naczyniowych *Zinnia elegans*, zarejestrowano depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c z mitochondriów, ale uwolnienie cytochromu c nie było wystarczające do indukcji PCD [86]. Podobnie w protoplastach *Arabidopsis* zmiana $\Delta\Psi_m$, którą rejestrowano przed typową dla PCD kondensacją chromatyny, poprzedzała wypływ cytochromu c, ale uwalnianie cytochromu c nie było także w tym przypadku konieczne do indukcji PCD [85]. W przypadku mitochondrialnego mutantu słonecznika, charakteryzującego się męską sterylnością, mitochondria w komórkach tapetum uwalniały cytochrom c do cytoplazmy, co rejestrowano wcześniej niż fragmentację nDNA i kondensację chromatyny [5]. Xu i Hanson [84] wykazali natomiast, iż podczas procesu starzenia się płatków kwiatowych *Petunia inflata*, który niewątpliwie angażuje mechanizmy PCD, we wczesnych etapach tego procesu nie zachodzi uwalnianie cytochromu c z błon mitochondriów.

W mitochondriach izolowanych z korzeni pszenicy i z bulw ziemniaka poddanych stresowi anoksji i wysokiemu stężeniu jonów Ca^{2+} [31,78], zarejestrowano otwarcie PTP i w konsekwencji pęcznienie tych organelli; procesy te, u obu gatunków, nie były wrażliwe na CsA – inhibitor ssaczych PTP [1]. Natomiast niski poziom jonów Ca^{2+} w cytoplazmie hamował PCD w komórkach *Arabidopsis* [52]. W przypadku mitochondriów pszenicy zarejestrowano wypływ cytochromu c, który nie był hamowany przez CsA [78]. Wrażliwość wyżej wymienionych procesów na CsA u innych gatunków wykazali natomiast Yu i wsp. [86], Tiwari i wsp. [75] i Arpagaus i wsp. [3]. Według Tiwari i wsp. [75] PCD indukowana H_2O_2 wzmagala u *Arabidopsis* tworzenie się ROS prowadzące do otwarcia PTP oraz uwolnienia cytochromu c, co powodowało ostatecznie śmierć komórek. Uwolnienie cytochromu c i śmierć komórek hamował inhibitor proteazy serynowo/cysteinowej, chociaż dodanie tego inhibitora jedynie częściowo hamowało otwarcie MTP [75]. Zarówno H_2O_2 , jak i NO indukowały PCD w zawiesinie komórek soi [15]; autorzy rejestrowali spadek $\Delta\Psi_m$, zmniejszenie zużycia tlenu, uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej i wypływ cytochromu c z mitochondriów [15]. Zastosowanie protonoforu – karbonylocyjanku-p-trifluorometoksyhydrazonu (FCCP) powodowało spadek $\Delta\Psi_m$, natomiast dodanie CsA – wzrost $\Delta\Psi_m$. Wzrost $\Delta\Psi_m$ spowodowany był bezpośrednio napływem jonów K^+ do mitochondriów i objawiał się pęcznieniem tych organelli [15,17,60,61]. Według wyżej wymienionych grup autorów mitochondria mają K^+ -selektywne kanały, regulowane przez stan redoks i otwierane przez CsA [60]. Mitochondrialne kanały K^+_{ATP} są, jak wynika z ostatnich doniesień, zaangażowane w PCD indukowaną H_2O_2 lub NO [15]. Tak więc pęcznienie mitochondriów i uwalnianie cytochromu c związane jest z aktywnością różnych porów/kanałów, PTP i K^+_{ATP} , które w odmienny sposób mogą być modulowane przez CsA [61].

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, cytochrom c uwalniany z mitochondriów zwierzęcych jest głównym czynnikiem uruchamiającym kaskadę kaspaz, a następnie procesy proteolityczne. W komórkach roślinnych wykryto aktywność proteaz cysteinowych [82] podobnych do kaspaz zwierzęcych. Te kaspazo-podobne białka (CLP)

zlokalizowano w niektórych roślinnych tkankach, np. w *Arabidopsis* [64], w tytoniu podczas PCD indukowanej działaniem patogena [18,26] i w kulturach pomidora podczas PCD-indukowanej chemicznie [19,24], a także podczas starzenia się drugorzędowych pędów grochu [10].

Ostatnie badania wykazały w roślinach obecność następujących typów proteaz cysteinowych: metakaspaz, np. VEIDazy, asparaginylo-specyficznych proteaz cysteinowych (ang. *legumains*), np. YVADazy, proteaz należących do enzymów VPE (ang. *vacuolar processing enzyme*) i proteaz serynowych podobnych do subtilizyny, np. szapazy. Wszystkie one mają strukturę podobną do zwierzęcych kaspaz, a także prawdopodobnie w podobny sposób zaangażowane są w PCD [82]. Roślinne CLP nie są blokowane przez te same inhibitory co zwierzęce kaspazy, co może wskazywać na to, że PCD u roślin, podobnie jak apoptoza u zwierząt, jest regulowana zarówno przez CLP, jak również przez inne proteazy [82].

W roślinach wykryto także receptoro-podobne białka R wykazujące podobieństwo strukturalne do czynnika Apaf-1. Białka R kodowane są przez rodzinę genów ulegających ekspresji podczas infekcji indukowanej przez patogena. Białka R zawierają domenę N-terminalną przypominającą receptor Toll/interleukina 1 (TIR) *Drosophila* i ssaków [47].

Istnieją doniesienia potwierdzające zaangażowanie w regulację PCD roślin białek będących funkcjonalnymi odpowiednikami białek z rodziny BCL-2 [47]. Jak wiadomo, białka BCL-2 oraz BAX w komórkach ssaków, stanowią kluczowy element systemu regulującego apoptozę, przebiegającą z udziałem mitochondriów zaangażowanych w przekazywanie sygnałów indukcji PCD. W komórkach drożdży oraz w komórkach roślinnych nie stwierdzono występowania genów kodujących białka BCL2 i BAX. Wiadomo jednak, iż ekspresja genu *BAX* w komórkach drożdży oraz w komórkach tytoniu wywołuje PCD [44], a dodanie białka BAX do zawiesiny mitochondriów tytoniu powoduje uwolnienie cytochromu c [40,44,47].

W 1998 roku Reed i współpracownicy [83] wyizolowali z komórek drożdży białko BI-1 (ang. *Bax inhibitor-1*) będące inhibitorem białka BAX [23]. Homologi BI-1 znaleziono w komórkach *Arabidopsis* i ryżu. Homologi BI-1 roślin mogą funkcjonować jako czynniki anty-apoptotyczne i prawdopodobnie wchodzi w interakcję lub modulują aktywność białek, które w roślinach odpowiadają funkcjonalnie białkom BCL-2 oraz BAX ssaków [16,42,47,65]. Wyizolowane z *Arabidopsis* białko AtBI-1 wykazuje największe podobieństwo do BI-1 ssaków. Oba zidentyfikowane roślinne homologi BI-1 wprowadzone do komórek drożdży blokowały PCD indukowaną białkiem BAX [42,47,65]. Innym roślinnym białkiem wykazującym właściwość blokowania PCD indukowanej przez BAX w komórkach drożdży jest S-transferaza/peroksydaza glutationowa zidentyfikowana u pomidora [46,47]. Ekspresja genu dla tej transferazy prowadzi do utrzymania określonego poziomu glutationu, niezbędnego do zachowania $\Delta\Psi_m$. W obecności białka S-transferazy/peroksydazy glutationowej odnotowano większą odporność komórek drożdży na stres oksydacyjny wywołany przez ROS. Uważa się bowiem, że indukcja PCD u drożdży przez białko BAX odbywa się poprzez ROS, których źródłem są mitochondria [51]. W przypadku PCD, mitochondrialne PTP stanowiłyby sensory stresu komórkowego,

odpowiedzialne za uwolnienie do cytoplazmy czynników indukcji PCD. Hipoteza ta ma szczególne znaczenie w zrozumieniu mechanizmów zaangażowanych w regulację PCD roślin związanej z HR. Wiadomo bowiem, iż odpowiedź obronna rośliny podczas patogenezы bazuje na wytworzeniu określonego poziomu ROS w komórkach. Stwierdzono także, iż krótkotrwały stres oksydacyjny może indukować śmierć komórek *Arabidopsis* w kulturze *in vitro*. Stres oksydacyjny wzmacnia transport elektronów, co intensyfikuje produkcję H₂O₂ [53,75] oraz powoduje obniżenie poziomu ATP. Zwiększona zawartość H₂O₂ powoduje zmianę przepuszczalności błon mitochondriów i uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy [53,55,75].

Wykazano, że tlenek azotu, jako potencjalna cząsteczka sygnałowa, może we współdziałaniu z hormonami i ROS, powodować otwarcie PTP, a tym samym indukować PCD [14,21,25,27,40]. W konsekwencji może nastąpić uwolnienie cytochromu c i innych czynników pro-apoptotycznych.

Niedawno, dzięki zastosowaniu tzw. *cell-free* systemu, który zawierał oczyszczone jądra *Arabidopsis* oraz mitochondria i/lub ekstrakt cytozolu, w przestrzeni międzybłonowej zidentyfikowano Mg²⁺-zależną nukleazę, podobną do mitochondrialnej endonukleazy G, indukującą kondensację chromatyny i fragmentację nDNA [6,48].

Analiza białek mitochondrialnych w zawieszinie starzejących się komórek *Arabidopsis* lub komórek poddanych PCD indukowanej stresem wysokiej temperatury wykazała wyraźny wzrost poziomu 11 białek mitochondrialnych, głównie antyoksydacyjnych, co wskazuje na duże znaczenie mitochondriów w procesie PCD [74]. Sugerowane jest również zaangażowanie pewnych glikoprotein w przekazywanie „sygnału śmierci” z komórki do komórki [74]. Ostatnio również zidentyfikowano w mitochondriach roślinnych białka związane z tioredoksyną, które prawdopodobnie regulują potencjał redoks w mitochondriach [7,66]. Zakłócenie funkcji proteasomów, które są zaangażowane w regulację zwierzęcej apoptozy, prowadzi, jak wykazali Kim i wsp. [43], do PCD komórek roślinnych.

3. PODSUMOWANIE

Przedstawiony powyżej przegląd wyników badań dotyczących zaangażowania mitochondriów podczas różnych wariantów PCD w komórkach roślinnych wskazuje, że trudno jednoznacznie określić podobieństwo mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję oraz przebieg PCD w świecie zwierząt i roślin. Mitochondria roślinne zaangażowane są w proces PCD w odmienny sposób niż mitochondria zwierzęce w apoptozie, w efekcie której powstają ciała apoptotyczne usuwane przez wyspecjalizowane komórki żerne czy makrofagi. Proces starzenia się organów, tkanek i komórek roślinnych, który angażuje mechanizmy PCD, jest bowiem związany z redystrybucją metabolitów syntetyzowanych i magazynowanych podczas cyklu życiowego rośliny [13]. Procesy związane z transportem i redystrybucją metabolitów wymagają dostarczenia energii, która jest generowana w mitochondriach.

Rola mitochondriów w indukcji PCD, zachodzącej jako jeden z etapów rozwojowych w cyklu życiowym rośliny, nadal pozostaje niewyjaśniona. Dane, dotyczące zmiany MPT, redukcji $\Delta\Psi_m$ i uwolnienia cytochromu c, odnoszą się głównie do PCD w komórkach roślinnych poddanych działaniu różnego typu stresów lub infekcji przez patogena. Cytochrom c, którego uwalnianie z mitochondriów oraz jego efekt indukujący PCD stwierdzono w systemie *cell-free* może sugerować pewne wspólne ścieżki apoptozy zwierząt i PCD u roślin.

Natomiast nieliczne informacje dotyczące indukcji PCD podczas różnicowania się komórek w cyklu życiowym roślin nie wyjaśniają w pełni roli mitochondriów w tym procesie.

LITERATURA

- [1] ANKARCORONA M, DYPBUKT JM, ORRENIUS S, NICOTERA P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Letters* 1996; **394**: 321–324.
- [2] ANNIS MG, SOUCE EL, DLUGOSZ PJ, CRUZ-AGUADO JA, PENN LZ, LEBER B, ANDREWS DW. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 2005; **24**(12): 2096–2103.
- [3] ARPAGAU S, RAWYLER A, BRAENDLE R. Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J Biol Chem* 2002; **277**: 1780–1787.
- [4] BALK J, LEAVER CJ, McCABE PF. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters* 1999; **463**: 151–154.
- [5] BALK J, LEAVER C. The *pet1-cms* mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 2001; **13**: 1803–1818.
- [6] BALK J, CHEW SK, LEAVER CJ, McCABE PF. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J* 2003; **34**: 573–583.
- [7] BALMER Y, VENSEL WH, TANAKA CK, HURKMAN WJ, GELHAYE E, ROUHIER N, JACQUOT J-P, MANIERI W, SCHURMANN P, DROUX M, BUCHANAN BB. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2642–2647.
- [8] BEERS EP. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 649–661.
- [9] BEERS EP, McDOWELL JM. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogenesis, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 561–567.
- [10] BELENGHI B, SALOMON M, LEVINE A. Caspase-like activity in seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *J Exp Bot* 2004; **55**(398): 889–897.
- [11] BERNARDI P, PETRONILLI V, DI LISA F, FORTE M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 112–117.
- [12] BRADY NR, ELMORE SP, VAN BEEK H, WESTERHOFF. Spatiotemporal coordination of membrane potential between rabbit ventricular cardiomyocyte mitochondria. *J Exp Med* 2000; **192**: 1001.
- [13] BUCHANAN-WOLLASTON V, MORRIS K. Senescence and cell death in *Brassica napus* and *Arabidopsis*. [w] Bryant JA, Hughes SG, Garland JM [red.] Programmed cell death in animals and plants. Oxford: BIOS Scientific Publishers 2000: 149–162.
- [14] CAPONE R, TIWARI BS, LEVINE A. Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 2004; **42**: 425–428.
- [15] CASOLO V, PETRUSSA E, KRAJŇÁKOVÁ J, MACRÍ F, VIANELLO A. Involvement of the mitochondrial K^+_{ATP} channel in H_2O_2 - or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *J Exp Bot* 2005; **56**(413): 997–1006.
- [16] CHAE H-J, KEN N, KIM H-R, CHEN S, GODZIK A, DICKMAN M, REED JC. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologues from animals, plants, and yeast. *Gene* 2003; **323**: 101–113.
- [17] CHIANDUSSI E, PETRUSSA E, MARCI F, VIANELLO A. Modulation of a plant mitochondrial K^+_{ATP} channel and its involvement in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 2002; **34**: 177–184.

- [18] CHICHKOVA NV, KIM SH, TITOVA ES, KALKUM M, MOROZOV VS, RUBTSOV YP, KALININA NO, TALIANSKY ME, VARTAPETIAN AB. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 2004; **16**(1): 157–171.
- [19] CLARKE A, DESIKAN R, HURST RD, HANCOCK JT, NEILL SJ. NO way back: nitric oxid and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* 2000; **24**: 667–677.
- [20] COSSARIZZA A, SAVIOLI S, FRANCESCHI C. Analysis of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) with fluorescent probes. *Post Biol Kom* 1997; **24**(4): 575–585.
- [21] CRAWFORD NM, GUO F-Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* 2005; **10**(4): 195–200.
- [22] CURTIS M, WOLPERT T.J. The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant J* 2002; **29**(3): 295–312.
- [23] DANON A, DELORME V, MAILHAC N, GALLOIS P. Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**: 647–655.
- [24] DE JONG AJ, HOEBERICHTS FA, YAKIMOVA ET, MAXIMOVA E, WOLTERING EJ. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 2000; **211**: 656–662.
- [25] DE STEFANO M, FERRARINI A, DELLEDONNE M. Nitric oxide functions in the plant hypersensitive disease resistance response. *BMC Plant Biol* 2005; **5**(1): 10.
- [26] DEL POZO O, LAM E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 1998; **8**: 1129–1132.
- [27] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585–588.
- [28] DESAGHER S, MARTINOU JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 369–377.
- [29] DYKENS JA, STOUT AK. Assessment of mitochondrial membrane potential *in situ* using single potentiometric dyes and novel fluorescence resonance energy transfer technique. *Meth Cell Biol* 2001; **65**: 285–309.
- [30] ESTELLE M. Proteases and cellular regulation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 254–260.
- [31] FORTES F, CASTILHO RF, CATISTI R, CARNIERI EGS, VERCESI A. Ca^{2+} induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**(1): 43–51.
- [32] GABRIEL B, SUREAU F, CASSELYN M, TEISSIE J, PETIT PX. Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp Cell Res* 2003; **289**(2): 195–210.
- [33] GAN S, AMASINO RM. Making sense of senescence. *Plant Physiol* 1997; **113**: 313–319.
- [34] GARCÍA N, ZAZUETA C, PAVÓN N CHÁVEZ E. Agaric acid induces mitochondrial permeability transition through its interaction with the adenine nucleotide translocase. Its dependence on membrane fluidity. *Mitochondrion* 2005; **5**: 272–281.
- [35] GOLDSTEIN JC, MUNOZ-PINEDO C, RICCI JE, ADAMS SR, KELEKAR A, SCHULER M, TSIEN RY, GREEK DR. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* 2005; **12**(5): 453–462.
- [36] GRĄDZKA I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 2000; **46**(1): 2–16.
- [37] GREENBERG JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12094–12097.
- [38] HALESTRAP AP, GILLESPIE JP, O'TOOLE A, DORAN E. Mitochondria and cell death: a pore way to die? [w] Bryant JA, Hughes SG, Garland JM [red.] Programmed cell death in animals and plants. Oxford: BIOS Scientific Publishers 2000: 149–162.
- [39] JAMES AM, COCHEME HM, MURPHY MP. Mitochondria-targeted redox probes as tools in the study of oxidative damage and ageing. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**(9): 982–986.
- [40] JONES AM. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci* 2000; **5**(5): 225–230.
- [41] JONES AM. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 2001; **125**: 94–97.
- [42] KAWAI M, PAN L, REED J.C, UCHIMIVA H. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett* 1999; **464**: 143–147.
- [43] 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**(21): 19406–19415.
- [44] LACOMME C, SANTA CRUZ S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7956–7961.

- [45] LAM E, PONTIER D, DELL POZO O. BAXing in the hypersensitive response. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 419–421.
- [46] LAM E, DEL POZO O. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* 2000; **44**: 417–428.
- [47] LAM E, KATO N, LAWTON M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 2001; **411**: 848–853.
- [48] LAM E. Controlled cell death, plant survival and development. *Plant Cell Biol* 2004; **5**: 305–315.
- [49] LEŚNIEWSKA J, SIMEONOVA E, SIKORA A, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Application of comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Soc Bot Pol* 2000; **69**: 101–107.
- [50] LEŚNIEWSKA J, SIMEONOVA E, CHARZYŃSKA M. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential in anther tapetum. *Sex Plant Reprod* 2004; **16**: 283–288.
- [51] LEVINE A, BELENGHI B, DAMARI-WEISLER H, GRANOT D. Vesicle-associated membrane protein of *Arabidopsis* suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. *J Biol Chem* 2001; **276**(49): 46284–46289.
- [52] LI J, WANG D-Y, LI Q, XU Y-J, CUI K-M, ZHU Y-X. PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic *Arabidopsis* plants possibly by delaying cytosolic Ca²⁺ elevation. *Cell Calcium* 2004; **35**: 71–77.
- [53] MAZEL A, LEVINE A. Induction of cell death in *Arabidopsis* by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. *Free Rad Biol Med* 2001; **30**(1): 98–106.
- [54] MEDINA JM, LÓPEZ-MEDIÁVILLA C, ORFAO A. Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. *FEBS Letters* 2002; **510**: 127–132.
- [55] MILLAR H, CONSIDINE MJ, DAY DA, WHELAN J. Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. *IUBMB Life* 2001; **51**: 201–205.
- [56] NICHOLLS DG, FERGUSON SJ. Bioenergetyka 2. tłum. Lilla Hryniewiecka. Wydaw. Nauk., PWN, Warszawa 1995.
- [57] NOHL H, GILLE L, STANIEK K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2005; **69**: 719–723.
- [58] NOODÉN LD, GUIAMÉT JJ, JOHN I. Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 1997; **101**: 746–753.
- [59] PENNEL RI, LAMB C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 1997; **9**: 1157–1168.
- [60] PETRUSSA E, CASOLO V, BRAIDOT E, CHIANDUSSI E, MACRI F, VIANELLO A. Cyclosporin A induces the opening of a potassium-selective channel in higher plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**(2): 107–117.
- [61] PETRUSSA E, CASOLO V, PERESSON C, BRAIDOT E, VIANELLO A, MACRI F. The K⁺_{ATP} channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria. *Mitochondrion* 2004; **3**: 297–307.
- [62] POZNIAKOVSKY AI, KNORRE DA, MARKOWA OV, HYMAN AA, SKULACHEV VP, SEVERIN FU. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 2005; **17**(168): 257–269.
- [63] REERS M, SMILEY ST, MOTTOLA-HARTSHORN C, CHEN A, LIN M, CHEN L. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1. *Methods Enzymol* 1995; **260**: 406–417.
- [64] SAFADI F, MYKLES DL, REDDY ASN. Partial purification and characterization of a Ca²⁺-dependent proteinase from *Arabidopsis* root. *Arch Biochem Biophys* 1997; **348**: 143–151.
- [65] SANCHEZ P, DE TORRES ZEBALA M, GRANT M. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J* 2000; **21**: 393–399.
- [66] SCHOLZ-STARKE J, GAMBALE F, CARPANETO A. Modulation of plant ion channels by oxidizing and reducing agents. *Arch Biochem Biophys* 2005; **434**: 43–50.
- [67] SIMEONOVA E, SIKORA A, MOSTOWSKA A, CHARZYŃSKA M. Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 2000; **214**: 93–101.
- [68] SIMEONOVA E, GARSTKA M, KOZIOŁ-LIPIŃSKA J, MOSTOWSKA A. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* 2004; **223**: 143–153.
- [69] SKULACHEV VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *IUBMB Life* 2000a; **49**: 365–373.
- [70] SKULACHEV VP. How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Radic Med* 2000b; **29**(10): 1056–1059.

- [71] SMAILI SS, HSU Y-T, YUOLE RJ, RUSSELL JT. Mitochondria in Ca^{2+} signalling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 2000; **32**: 35–46.
- [72] SMILEY ST, REERS M, MOTTOLA-HARTSHORN C, LIN M, CHEN A, SMITH TW, STEEL GD, CHEN L. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3671–3675.
- [73] STEIN JC, HANSEN G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol* 1999; **121**: 71–79.
- [74] SWIDZINSKI JA, LEAVER CJ, SWEETLOVE LJ. A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* 2004; **65**: 1829–1838.
- [75] TIWARI BS, BELENGHI B, LEVINE A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* 2002; **128**: 1271–1281.
- [76] UREN AG, O'ROURKE K, ARAVIND L, PISABARRO MT, SESHGIRI S, KOONIN EV, DIXIT VM. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000; **6**: 961–967.
- [77] VAN DOORN WG, WOLTERING EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* 2005; **10**(3): 117–122.
- [78] VIROLAINEN E, BLOKHINA O, FAGERSTEDT K. Ca^{2+} -induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress. *Ann Bot* 2002; **90**: 509–516.
- [79] WANG X-J, WANG Z-B, XU J-X. Effect of salvianic acid A on lipid peroxidation and membrane permeability in mitochondria. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**: 441–445.
- [80] WATANABE N, LAM E. Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Mol Plant Pathol* 2004; **5**: 65–70.
- [81] WOLTERING EJ, VAN DER BENT A, HOEBERICHTS FA. Do plant caspases exist? *Plant Physiol* 2002; **130**: 1764–1769.
- [82] WOLTERING E. Death proteases come alive. *Trends Plant Sci* 2004; **9**(10): 469–472.
- [83] XU Q, REED JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1998; **1**: 337–346.
- [84] XU Y, HANSON MR. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *Petunia*. *Plant Physiol* 2000; **122**: 1323–1333.
- [85] YAO N, EISFELDER BJ, MARVIN J, GREENBERG JT. The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2004; **40**: 596–610.
- [86] YU X-H, PERDUE TD, HEIMER YM, JONES AM. Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Diff* 2002; **9**: 189–198.
- [87] ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, ZANIM C, DECAUDIN D, MACHO A, HIRSCH T, SUSIN SA, PETIT PX, MIGNOTTE B, KROEMER G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; **182**: 367–377.
- [88] ZAMZAMI N, SUSIN SA, MARCHETTI P, HIRCH T, GÓMEZ-MONTERREY I, CASTEDO M, KROEMER G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; **183**: 1533–1544.
- [89] ZHAO Y, JIANG Z, SUN Y, ZHAI Z. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters* 1999a; **448**: 197–200.
- [90] ZHAO Y, SUN Y, JIANG Z, ZHAI Z. Apoptosis carrot nuclei in *in vitro* system induced by cytochrome c. *Chin Sci Bull* 1999b; **44**(16): 1497.
- [91] ZHAO Y, WU M, SHEN Y, ZHAI Z. Analysis of nuclear apoptotic process in a cell-free system. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 298–306.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 13.09.2005 r.

Przyjęto: 02.01.2006 r.

ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa,

e-mail: mostowag@biol.uw.edu.pl