

Received: 2015.05.21
Accepted: 2016.03.16
Published: 2016.12.20

Programowana śmierć komórek – strategia utrzymania komórkowej homeostazy organizmu

Programmed cell death – strategy for maintenance cellular organisms homeostasis

Mirosław Godlewski¹, Agnieszka Kobylińska²

¹Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

²Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Streszczenie

Programowana śmierć komórki (PCD) jest procesem, w którym dzięki zdolności komórek do samobójczej śmierci, mogą być eliminowane komórki zbędne i uszkodzone, co pozwala na utrzymanie fizjologicznej homeostazy organizmów wielokomórkowych. PCD jest złożonym, ściśle genetycznie regulowanym procesem występującym powszechnie w świecie żywym, w którym następuje destrukcja składników komórki przez syntetyzowane i/lub aktywowane endogenne hydrolazy. Komórki mogą też obumierać w wyniku - nekrozy, w której komórki są „zabijane” przez silnie działające czynniki abiotyczne. Proces apoptozy komórek jest indukowany przez sygnały pozakomórkowe i sygnały wynikające z monitorowania prawidłowości funkcjonowania komórki.

W artykule przedstawiono: występowanie PCD podczas ontogenezy zwierząt i roślin, klasyfikację rodzajów śmierci komórek u tych organizmów z opisem regulacji przebiegu, autofagii i apoptozy oraz nekrotycznej śmierci komórki, a także dyskusję dotyczącą obumierania komórek roślin w wyniku apoptozy. Omówiono też rolę białek rodziny Bcl-2 i innych białek w regulacji indukcji apoptozy oraz wykrycie u roślin (których genomy nie kodują tych białek) białek o analogicznej funkcji. Przedstawiono też skutki ekspresji pro- i antyapoptotycznych genów (z rodziny Bcl-2) zwierząt u transformowanych drożdży i roślin, a także wykorzystanie modelu tak transformowanych drożdży do identyfikacji w bibliotekach cDNA zwierząt i roślin genów zaangażowanych w indukcję i przebieg PCD.

Słowa kluczowe:

apoptoza • autofagia • białka rodziny Bcl-2 • nekroza • organizmy transgeniczne • programowana śmierć komórek

Summary

Programmed cell death (PCD) is a cellular suicide process, commonly found in organisms, that is important for elimination unnecessary and damaged cells during development and adaptation to abiotic and biotic environmental stresses. PCD is a complex and precise, genetically controlled cellular process, in opposite to non-programmed death, necrosis, in which cells are “killed” by strong abiotic factors. This article shows: the occurrence of PCD during animals and plants ontogenesis, classification of cell death types in these organisms with description of autophagy, apoptosis and necrotic cell death and with discussion on plant cell death by apoptosis. The role of Bcl-2 protein and other proteins involved in the regulation of apoptosis induction and detection in the plant's (whose genomes do not encode these proteins) proteins of analogous function is also discussed. The paper also presents the effects of the expression of animals pro- and anti-apoptotic genes transformed into yeast and plants, and the use of

Key words:	transformed yeast as model to identify in cDNA libraries animal and plant genes involved in regulation of the induction and course of the PCD. apoptosis • autophagy • Bcl-2 family proteins • necrosis • programmed cell death • transgenic organisms
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1226661
Word count:	7297
Tables:	–
Figures:	–
References:	151

Adres autora: dr hab. Mirosław Godlewski, Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: mgodlews@biol.uni.lodz.pl

WSTĘP

Programowana śmierć komórki (programmed cell death, PCD) jest procesem samobójczej śmierci, w którym mogą być eliminowane komórki zbędne i uszkodzone, co pozwala na utrzymanie fizjologicznej homeostazy organizmów wielokomórkowych. PCD jest złożonym, ściśle genetycznie regulowanym procesem, w którym następuje uruchomienie przez komórkę mechanizmów molekularnych i fizjologicznych, prowadzących do jej samounicestwienia. Proces PCD jest indukowany przez sygnały pozakomórkowe i wynikające z monitorowania prawidłowości funkcjonowania komórki. PCD zachodzi podczas całej ontogenezy, uczestniczy bowiem w histogenezie i formowaniu organów (rozwojowa PCD), a także w adaptacji do warunków środowiska i w reakcji na abiotyczny i biotyczny stres środowiskowy. U zwierząt i roślin komórki mogą też obumierać za pośrednictwem nieprogramowanej śmierci - nekrozy, w której komórki są „zabijane” przez silnie działające czynniki abiotyczne.

Zdolność do samobójczej śmierci komórek jest zjawiskiem powszechnym w świecie ożywionym. Opisano ją nie tylko u wielokomórkowych roślin i zwierząt, ale także u jednokomórkowych *Eukaryota* i u *Prokaryota*. U jednokomórkowych organizmów, u których także zidentyfikowano białka regulacji i przebiegu procesu PCD, samobójcza śmierć może być wykorzystywana m.in. przy regulacji liczebności populacji, różnicowaniu komórek (np. tworzeniu spor u bakterii) i w reakcji na abiotyczne czynniki środowiskowe [80,85,111,133].

Utrzymanie homeostazy organizmu wymaga nie tylko zdolności do eliminacji komórek, które mogą upośledzać funkcjonowanie organizmu, ale i genetycznie warunkowanego przeciwdziałania PCD, co przede wszystkim decyduje o przeżyciu komórki i całego organizmu. Przeszukanie spisu publikacji w *Pubmed* z użyciem słów

kluczowych: „antyapoptoza” i „geny przeżycia” wykazało, że opisano ponad 150 unikalnych genów zaangażowanych w przeciwdziałanie PCD. Poza tym w bazie danych *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>) stwierdzono obecność 785 antyapoptotycznych genów, przy czym ta druga lista obejmuje m.in. takie same geny u różnych gatunków organizmów i ich warianty. Wśród kilkunastu funkcjonalnych ich kategorii wyróżniono klasyczne antyapoptotyczne geny z rodziny Bcl-2 (B-cell-leukemia/lymphoma), IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) i c-FLIP (FLICE inhibitory protein), jak i liczne geny zaangażowane w różne procesy, a których odpowiednio zwiększony poziom ekspresji i aktywności ich produktów przeciwdziała indukcji PCD [97]. Liczbę antyapoptotycznych sekwencji w genomach zwiększają sekwencje kodujące microRNAs (i siRNA), które wiążąc się z odpowiednimi mRNA hamują ich translację. Małe RNA uczestniczą w regulacji licznych procesów komórkowych i fizjologicznych, w tym mogą uczestniczyć w regulacji PCD [97,116].

PCD PODCZAS ROZWOJU ZWIERZĄT I ROŚLIN

U zwierząt zjawisko obumierania komórek w wyniku samobójczej śmierci wykryto prawie pół wieku temu i nadal trwają badania mechanizmów jego regulacji i przebiegu. Badania rozpoczął Tata [120], który stwierdził, że obumieranie komórek ogona kijanki wymaga syntezy RNA i białek i nazwał ten proces „programowaną śmiercią komórki”. Pierwszy cytologiczny opis przebiegu PCD i nazwa *apoptosis* pochodzi z badań Kerr i wsp. [56] prowadzonych na wątrobie szczura poddanej doświadczalnemu niedokrwieniu oraz opisu PCD u nicienia *Caenorhabditis elegans* przez Ellis i Horvitz [31]. W późniejszych badaniach wykazano powszechność rozwojowej PCD u zwierząt. Opisano jej rolę w czasie gametogenezy, różnych etapach embriogenezy, organogenezy i odnowie tkanek, a także podczas eliminacji komórek nieprawidłowych (w tym nowotworo-

wych) i uszkodzonych przez stres abiotyczny i biotyczny [34,38].

U roślin, jak i u zwierząt, samobójcze obumieranie komórek obserwowano od embriogenezy do śmierci rośliny, a także podczas eliminacji komórek uszkodzonych przez różne stresy środowiskowe. W rozwojowej PCD są eliminowane komórki, które pełniły funkcję przez pewien okres (m.in. suspensora podczas rozwoju zarodka, komórki aleuronowe w ziarniakach), komórki niepotrzebne (m.in. czapeczki korzenia, zawiązków pręcików w jednopłciowych kwiatach), protoplasty komórek drewna ulegających różnicowaniu w naczynia, podczas kształtowania ciała rośliny (m.in. tworzenia perforowanych liści), tworzenia aerenchimy, podczas starzenia i zrzucania organów (m.in. liści, pędów, nadmiaru kwiatów) [79,91,136].

U roślin i u zwierząt kierowanie komórek w kierunku rozwojowej PCD zachodzi zgodnie z planem morfogenetycznym i jest regulowane przez czynniki endogenne, których działanie może być modyfikowane przez czynniki środowiskowe. U roślin rozwojowa PCD jest regulowana przez fitohormony i fitoregulatory, takie jak: etylen, kwas abscysynowy, jasmoniany, poliaminy, kwas salicylowy, a także przez NO i wyższe stężenia cytokinin, które w procesie prowadzącym do indukcji PCD mogą wykorzystywać receptory błonowe i wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne [22,62,98,150].

PRZEBIEG PROCESU OBUMIERANIA KOMÓREK U ZWIERZĄT I ROŚLIN

Obumieranie komórek u zwierząt i roślin, chociaż zawsze prowadzi do ich destrukcji, może być związane z różnicami strukturalno-funkcjonalnymi komórek różnych tkanek, a także zależeć od czynnika powodującego śmierć komórki i mechanizmu jego działania. W 1973 r. Schweichel i Merker [108] zaproponowali wyróżnienie I, II i III typu śmierci komórek, co odpowiada, odpowiednio, apoptozie, autofagii i nekrozie. Klasyfikacja była powszechnie akceptowana, obecnie Komitet do spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej (NCCD; Nomenclature Committee on Cell Death) zaleca, aby poszczególne rodzaje śmierci komórek były klasyfikowane nie tylko na podstawie cech morfologicznych, ale i cech biochemicznych [36]. Proponowana jest następująca klasyfikacja PCD u zwierząt: zewnętrzna apoptoza (extrinsic apoptosis), apoptoza kaspazozależna lub kaspazoniezależna (caspase-dependent or independent intrinsic apoptosis), regulowana nekroza (nekroptoza), śmierć autofagowa i katastrofa mitotyczna. Poza tym wyróżniono typy śmierci komórek, które przebiegają inaczej i zazwyczaj są charakterystyczne dla niektórych tkanek, np. anoikoza – opisana w komórkach adherentnych, paraptoza – indukowana przez insulinopodobny czynnik wzrostu I, degeneracja Walleriana – opisana w układzie nerwowym, entoza – w limfoblastach i niektórych nowotworach będąca „komórkowym kanibalizmem” (żywa komórka pochłania sąsiadującą żywą komórkę), keratynizacja – charakterystyczna dla komórek skóry [36,105].

U roślin, podobnie jak u zwierząt, przebieg procesu obumierania komórek może się różnić, co utrudnia klasyfikację typów śmierci komórek. W początkowym okresie badań, obumieranie komórek roślinnych opisywano jako apoptozopodobne, autofagopodobne lub jako nekrozę. Ogólnie, w PCD u roślin, analogicznie jak u zwierząt, obumieranie komórek może być związane z: uwalnianiem cytochromu c (cytochrome c, cyt c) z mitochondriów, aktywacją deoksyrybonukleaz (DNaz), proteaz kaspazopodobnych, akumulacją reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, ROS), a w przebiegu tego procesu może zachodzić m.in. degradacja DNA z tworzeniem tzw. „drabinek DNA” i zmiany w fosforylacji białek [21,46,79]. Niedawno van Doorn i wsp. [130] zaproponowali wyróżnienie dwóch głównych typów śmierci komórek roślinnych: „wakuolarną śmierć komórki” oraz „nekrozę”. Podczas wakuolarniej śmierci zawartość komórki jest degradowana w procesie autofagopodobnym i dzięki uwolnieniu hydrolaz z wakuoli litycznych po przerwaniu tonoplastu. Wakuolarna śmierć komórek zachodzi podczas programowej PCD, natomiast nekrotyczne obumieranie komórek jest spowodowane przez silnie działające czynniki abiotyczne.

U roślin opisano też przypadki, w których obumieranie komórek zachodzi w sposób mieszany lub nietypowy i nie są zaliczane do tych dwóch głównych typów śmierci [130]. W mieszany sposób, łącząc cechy wakuolarniej śmierci i nekrozy obumiera łagiewka pyłkowa po samoniezgodnym zapyleniu (self-incompatibility, SI) [137]. Swoiście przebiega proces obumierania i trawienia komórek bielma skrobiowego ziarniaków zbóż. Bielmo to obumiera podczas kiełkowania ziarniaków, a jego komórki i zgromadzone zapasy skrobi mogą być trawione przez enzymy hydrolityczne pochodzące z komórek warstw aleuronowych otaczających bielmo skrobiowe; u niektórych gatunków zbóż podczas PCD w bielmie nie obserwowano procesu autofagii [29,127].

W różny sposób mogą obumierać komórki roślin zakażonych patogenami. Szybkie obumieranie komórek, nazwane „reakcją nadwrażliwości” (hypersensitive response, HR), przeciwdziała rozprzestrzenianiu się infekcji, „zamyka” patogen w miejscu jego ataku. Wpływ patogenów na żywotność komórek gospodarza może zależeć od rodzaju interakcji roślina-patogen i cyklu rozwojowego patogena. Wzrost i rozwój patogenów zachodzi dzięki pobieraniu pokarmu z żywych roślin, przy czym biotroficzne patogeny (np. *Blumeria graminis*) pobierają pokarm z żywych, aktywnie metabolizujących komórek, natomiast pasożyty nekrotroficzne (np. *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Cercospora nicotianae*) pozyskują pokarm z martwych komórek, po uprzednim zabiciu komórki żywiciela [70]. Nekrotrofy uśmiercają komórki gospodarza dzięki wydzielanym toksynom m.in. wiktoryny, harpiny, AAL (z *Alternaria alternata*), fumonizyn, kwasu oksalowego oraz enzymom trawiennym [95,132]. Patogen może też spowodować PCD gospodarza przez wpływ na proces autofagii [70]. W miejscu ataku awirulentnego

patogena następuje znaczne podwyższenie stężenia Ca^{2+} w cytosolu, akumulacja ROS, wypływ jonów, zmiana pH, zmiana potencjału błon (DY_m), połączeń białek w ścianie komórkowej, depozycja kalozy oraz ekspresję genów obrony [10,69]. W przebieg HR są zaangażowane nie tylko mitochondria i enzymy hydrolityczne wakuoli, ale także chloroplasty, szczególnie w fazie wykonawczej HR [12,15,83]. Obumieranie komórek w HR rozpoczynają zmiany w mitochondriach i wypływ do cytoplazmy m.in. cytochrom c. Wcześniej zachodzą też zmiany w jądrze komórkowym – chromatyna ulega kondensacji a DNA fragmentacji. Tonoplast zostaje przerwany dopiero pod koniec procesu obumierania komórki [68,131]. Cechą odróżniającą programowaną śmierć w HR od innych jej rodzajów jest również obkurczanie cytoplazmy. W komórkach zakażonych patogenami obserwowano niekiedy powstawanie fragmentów komórki, które przypominały ciała apoptotyczne tworzone podczas apoptozy u zwierząt. Częstą sygnalową indukcją obumieranie sąsiadnych komórek mogą być ROI (reactive oxygen intermediates) i NO (nitric oxide) [23]. Obumieranie komórek w HR może wykazywać cechy nekrozy, jednak obumieraniu zakażonych komórek zazwyczaj towarzyszy zwiększenie rozmiarów wakuoli i może wymagać wakuolarnych enzymów przetwarzających (vacuolar processing enzymes, VPEs) uwolnionych po przerwaniu tonoplastu [102].

Klasyfikację van Doorna i wsp. [130], tj. wyróżnienie u roślin „wakuolarniej śmierci komórki” oraz „nekrozy”, później skorygował van Doorn [129]. Autor zastosował inne kryterium oceny przebiegu PCD i zaproponował rozróżnienie dwóch typów PCD u roślin: „autolitycznej” i „nieautolitycznej”. Podczas „autolitycznej” śmierci, która zachodzi podczas rozwojowej PCD i łagodniejszym działaniem stresu abiotycznego, następuje przerwanie tonoplastu i uwolnienie hydrolaz, co doprowadza do szybkiego „oczyszczenia” cytoplazmy, natomiast podczas „nieautolitycznej” śmierci w reakcji na atak patogenów, nie zachodzi lub może zachodzić przerwanie tonoplastu, ale już w martwych komórkach, nie następuje szybka destrukcja składników cytoplazmy. Podczas „autolitycznej” PCD tworzone są autofagosomopodobne struktury, następuje zwiększenie objętości wakuoli, obkurczanie jądra i kondensacja chromatyny oraz fragmentacja DNA, natomiast podczas „nieautolitycznej” śmierci komórki obserwowano pęcznienie organelli, ale nie następuje zwiększenie rozmiarów wakuoli. W przybliżeniu, „autolityczna” PCD odpowiada autofagowej PCD u zwierząt, natomiast „nieautolityczne” obumieranie komórek roślin przebiega podobnie jak nekroza u zwierząt.

APOPTOZA

Apoptoza jest obecnie najlepiej poznana postacią PCD u zwierząt. Opisano morfologiczny jej przebieg i poznano molekularne mechanizmy kontrolujące proces. Przebieg apoptozy charakteryzuje wiele cech morfologicznych i biochemicznych, w tym oprócz obkurczania

się komórki (dzięki modyfikacji cytoszkieletu) i w ten sposób utraty kontaktu między komórkami, następuje uszkodzenie struktury i funkcji mitochondriów, zachodzi też obkurczanie cytoplazmy, kondensacja i marginalizacja chromatyny w jądrze, DNA ulega fragmentacji z międzynukleosomowym rozcinaniem DNA (tworzeniem „drabinek” DNA), następuje fragmentacja jądra, natomiast zachowana jest integralność błony komórkowej, która może tworzyć pęcherzykowate uwypuklenia, a na zewnętrznej jej powierzchni jest eksponowana fosfatydylseryna. W końcowej części apoptozy (w fazie zniszczenia) zachodzi fragmentacja komórki z tworzeniem tzw. ciałek apoptotycznych wchłanianych następnie przez komórki sąsiednie lub wyspecjalizowane komórki żerne [32, 36].

Proces apoptozy może być indukowany przez kilka biochemicznych szlaków sygnalizacyjnych [11,20,115]: a) szlak zewnętrzny, w którym ligandy (np. cytokiny Fas-L, TNF) po związaniu z receptorami śmierci (death receptors, DR), przez białka adapterowe uruchamiają szlak prowadzący do aktywacji kaskady kaspaz, b) szlak wewnętrzny (mitochondrialny), w którym decyzyjną rolę o życiu i śmierci komórki pełnią mitochondria, z których jest uwalniany cytochrom c i inne białka zaangażowane w przebieg apoptozy; ten szlak prowadzi m.in. do aktywacji kaskady kaspaz, c) szlak sfingomielinowo-ceramidowy, który jest uruchamiany m.in. po związaniu zewnątrzkomórkowych ligandów z odpowiednimi receptorami błonowymi i w którym wtórnym przekaźnikiem jest ceramid, d) szlak indukowany stresem ER spowodowanym nagromadzeniem w świetle ER białek o błędnej modyfikacji i niewłaściwie zwiniętych, a które nie są eksportowane z ER oraz utratą homeostazy jonów Ca^{2+} . Sensorem/przekaźnikiem sygnału w UPR (unfolded protein response) jest zazwyczaj transbłonowe białko IRE1 α , które przenosi sygnał stresu do cytoplazmy i jądra, e) szlak pseudoreceptorowy, który opisano w cytotoksycznych limfocytach T (CTL) oraz w komórkach NK (natural killer), stanowiących istotny element układu immunologicznego człowieka; w jego przebieg są zaangażowane m.in. perforyna oraz granzym B.

W mitochondrialnym szlaku indukcji apoptozy proces obumierania komórki rozpoczynają zmiany struktury i funkcji mitochondriów, które prowadzą m.in. do uwalniania z nich IMS (intermembrane space) do cytoplazmy: cytochrom c, endo G (endonuclease G), AIF (apoptosis inducing factor), Smac/Diablo (second mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with a low pI) i proteazy serynowej Omi/HtrA2. Białka te w istotny, chociaż różny sposób, są zaangażowane w przebieg procesu obumierania komórki [60,79,97].

Uwalnianie proapoptotycznych substancji z IMS zachodzi dzięki zwiększeniu przepuszczalności błony zewnętrznej mitochondriów, tworzeniu megakanalów, powstaniu „dziur” przez które mogą wypływać z IMS substancje o większej masie cząsteczkowej. Uwalnianie białek z IMS zachodzi przez PTP (permeability transition

pore), które są kompleksami utworzonymi po związaniu z kanałami VDAC (voltage-dependent anion channels), takich białek jak: ANT (adenine nucleotide translocator), CypD (acyclophilin D) i innych molekuł w tym HK (hexokinase) [20,25,123]. Kanały VDAC, znane też jako eukariotyczne poryny, są umiejscowione w błonie zewnętrznej mitochondriów (outer mitochondrial membrane, OMM) w miejscach ich styku z błoną wewnętrzną (inner mitochondrial membrane, IMM). Rola kanałów VDAC polega na regulacji transportu metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą [113].

Wśród uwalnianych z IMS substancji istotną rolę w inicjacji degradacji składników komórki podczas apoptozy pełni cytochrom c, który wraz z innymi białkami, wchodzi w skład apoptosomu tworzonego w cytoplazmie. Apoptosom budują cząsteczki cyt c, opisywanego również jako Apaf-2 (apoptosis protease activating factor-2), cytosolowego białka Apaf-1 i prokaspazy-9 (Apaf-3). Powstanie apoptosomu wymaga obecności dATP lub ATP. Białko Apaf-1 zawiera na C-końcu łańcucha wielokrotnie powtórzoną sekwencję aminokwasową WDR, którą łączy się z cyt c oraz dATP/ATP. Akceptowany jest pogląd, że cyt c i dATP/ATP funkcjonują jako kofaktory i stymulują oligomeryzację Apaf-1 oraz jego zmiany konformacyjne. Prokaspaza-9 wiąże się w stosunku 1:1 z białkiem Apaf-1, inicjując nagromadzenie i aktywację jego cząsteczek. Czynna kaspaza-9 (po aktywacji prokaspazy-9 za pośrednictwem ograniczonej proteolizy) może aktywować kaspazy-3 (lub -7), która albo stymuluje kaskadę kaspaz i/albo dokonuje proteolizy białek komórkowych. Kaspaza-3 może aktywować także inne istotne dla przebiegu apoptozy enzymy, m.in. endonukleazę DFF40/CAD (caspase-activated DNase), kalpainę, granzym B [57,106,123]. Otwarcie kanałów PTP prowadzi nie tylko do uwalniania z IMS cyt c i innych białek promujących śmierć komórki, ale i utraty potencjału przez IMM ($\Delta\psi_m$), osmotyczne puchnięcie mitochondriów i rozpad OMM [60,79,106].

Istotnym elementem uruchamiającym wewnętrzny mitochondrialny szlak inicjacji apoptozy jest otwarcie kanałów PTP. Wykazano, że u zwierząt otwieranie PTP jest indukowane przez proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2 (Bax lub Bak), podwyższenie stężenia Ca^{2+} , ROS i NO, a także przez toksyny i uszkodzenia DNA, natomiast hamowane przez antyapoptotyczne białka (Bcl-2 and Bcl-x_L, CRD-9), a także przez CsA (cyclosporine A), która jest ligandem CypD [65,112,123,135]. Białka z rodziny Bcl-2 regulują funkcję PTP przez bezpośrednią interakcję z VDAC [123]. Niedawno wykazano, że antyapoptotyczne białka, takie jak Bcl-2, Bcl-x_L, HK-I i HK-II (hexokinases I i II) wiążą się z N-terminalnym α -helikalnym segmentem VDAC [1,4].

APOPTOZA A PCD U ROŚLIN

W początkowym okresie badań procesu obumierania komórek u roślin poszukiwano analogii z apoptozą, która była wcześniej poznana u zwierząt i proces ten u roślin

opisywano jako apoptozopodobny. U roślin i u zwierząt PCD prowadzi do destrukcji komórki przez endogenne hydrolazy, jednak mechanizmy regulacji i przebieg procesu obumierania komórek u tych organizmów mogą być w pewnych aspektach podobne, a w innych istnieją wyraźne różnice, które mogą wynikać z odmiennej drogi ewolucyjnej tych dwóch królestw po dywergencji z jednokomórkowego przodka, w tym różnic w budowie komórek. W komórkach roślin nie ma lizosomów, a kwaśne hydrolazy są zawarte w wakuolach (wakuole lityczne), poza tym komórki roślin tworzą ścianę komórkową, która zazwyczaj nie jest trawiona podczas PCD. Ponadto rośliny zawierają plastydy, z których chloroplasty mogą uczestniczyć w PCD [22,51,136].

Uzyskane dotychczas wyniki badań wskazują, że w regulacji apoptozy i PCD u roślin mogą uczestniczyć podobne oraz odmienne białka, chociaż mogą pełnić analogiczną funkcję. Genomy grzybów i roślin nie zawierają co najmniej kilku genów kodujących białka nieodzwonne w apoptozie. Przegląd bazy BLAST (basic local alignment search tool) wykazał, że w genomach roślin i grzybów nie ma sekwencji homologicznych z genami kodującymi białka z rodziny Bcl-2, a także kodującymi takie białka jak: kaspazy, Apaf-a/Ced-4, p53 [2,3,40].

Istotną rolę w indukcji apoptozy u zwierząt pełnią proapoptotyczne (Bax, Bak) i antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-x_L) białka z rodziny Bcl-2. Polipeptydy nie zostały wykryte u roślin, ale w bibliotece cDNA *Arabidopsis* zidentyfikowano geny *CDF1* i *CDF3* (cell growth defect factor), które w transformowanych drożdżach mają letalne, Bax-podobne działanie [55,58]. U roślin wykryto też białka zawierające sekwencje, z którymi mogą się wiązać poliklonalne przeciwciała anty-Bax i anty-Bcl-2 człowieka. Dion i wsp. [28] stosując metody Western-blot i immunocytochemiczne u *Chlamydomonas* oraz w liściach i merystemach korzeni *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus* i *Zea mays* wykazali obecność białka, z którym reagowały poliklonalne przeciwciała anty-Bcl-2 człowieka. Metodami immunocytochemicznymi w mikroskopie elektronowym wykazano, że jest ono umiejscowione głównie w mitochondriach, plastydach i jądrach. To białko u tytoniu ma masę cząsteczkową 28-29 kDa. Pozytywną reakcję wiązania poliklonalnych przeciwciał anty-Bax człowieka uzyskano w badaniach prowadzonych na wierzchołkach korzeni łubinu wąskolistnego (*A. Kobylińska*, Ł. Balcerzak i M. Godlewski, niepubl.). Ekspresja tych Bax-podobnych białek była wyraźnie skorelowana z obumieraniem komórek indukowanym przez ołów. W genomach roślin zidentyfikowano ortologi innych genów, które wpływają na apoptozę u zwierząt, w tym inhibitora Bax (Bax inhibitor 1, BI-1) i Bekliny-1, które podobnie jak u zwierząt, mogą regulować PCD u roślin [50,78].

Zaangażowanie mitochondriów w proces obumierania komórek u roślin jest powszechnie akceptowane [69, 131, 147] i podobnie jak u zwierząt, zachodzi ze zwiększeniem przepuszczalności błony mitochondrialnej. O mechanizmie tym u roślin wiadomo mniej, získano jednak dane

wskazujące, że w PCD mogą być zaangażowane kanały VDAC i że mogą być tworzone PTP. Na taką możliwość wskazuje zidentyfikowanie u badanych gatunków roślin po kilka izoform VDAC, zlokalizowanych głównie w mitochondriach, których poziom ekspresji w rozwoju roślin może być zależny organowo, od miejsca działania i od rodzaju stresu środowiskowego. Roślinne VDAC mają wiele elektrofizjologicznych i topologicznych właściwości podobnych do zwierzęcych VDAC, co sugeruje, że mogą u roślin pełnić podobną funkcję podczas rozwoju roślin, w rozwojowej PCD, a także śmierci komórek w reakcji na stres abiotyczny i w reakcji na patogeny [37,64,119].

U roślin podczas PCD z IMS mitochondriów są uwalniane do cytoplazmy różne substancje, które mogą pełnić analogiczną pro-PCD rolę jak podczas apoptozy u zwierząt. W badaniach prowadzonych na różnych gatunkach roślin wykazano uwalnianie cyt c z mitochondriów, przy czym jego rola w obumieraniu komórek roślin nie jest jasna [126,131,147]. Nie stwierdzano bowiem tworzenia apoptosomu i niewiele jest danych wskazujących, że u roślin cyt c może uczestniczyć w procesie PCD, a także, że może bezpośrednio uczestniczyć w aktywacji proteaz. Apoptosomopodobne struktury wykryto jednak u roślin podczas HR, tworzenie których jest aktywowane produktem genu czynnika odporności roślin *R* (resistance) będącego homologiem białka Apaf-1/CED-1 oraz sygnałem *avr* (pathogen avirulence). Te apoptosomopodobne struktury prawdopodobnie uczestniczą w aktywacji proteaz kaspazopodobnych [80].

Podczas apoptozy nukleaza endo G ulega translokacji IMS mitochondriów do jądra, gdzie tnie DNA na fragmenty oligonukleosomalne tworząc tzw. drabinki DNA [74]. U roślin dotychczas nie zidentyfikowano homologa tego białka, ale wykazano, że z IMS mitochondriów może być uwalniana Mg^{2+} -zależna DNaza, która po translokacji do jądra, może degradować DNA (na fragmenty 30 kb, a następnie ciąć DNA w międzynukleosomowych odcinkach) [8].

AIF jest flawoproteina z aktywnością oksydazy NADH obecną w IMS mitochondriów. Po otwarciu kanałów PTP ten czynnik przemieszcza się do jądra i może prowadzić do kondensacji chromatyny i cięcia DNA na duże fragmenty (50-300 kb) [79]. U *Arabidopsis* zidentyfikowano reduktazę MDAR (monodehydroascorbate reductase), która jest homologiczna do czynnika indukcji apoptozy - AIF [143].

Degradacja składników komórek podczas PCD wymaga zaangażowania proteaz. U zwierząt tkankowych w fazie wykonawczej apoptozy liczne peptydy są hydrolizowane przez kaspazy, natomiast genomy innych organizmów, w tym i roślin, nie zawierają ortologów genów kodujących te enzymy. U roślin zidentyfikowano natomiast proteazy o kaspazopodobnej aktywności, które mogą hydrolizować substraty kaspaz, a ich aktywność może być hamowana przez inhibitory specyficzne dla

kaspaz. Dotychczas zidentyfikowano kilka grup (rodzin) proteaz, które u różnych gatunków roślin i zależnie od roli PCD mogą osiągać różny poziom aktywności i który może ulegać wielokrotnemu zwiększeniu podczas PCD. Do tych proteaz należą: VPEs i metakaspazy, które są endopeptydazami cysteinowymi oraz saspazy, które są proteazami serynowymi [22,79,96]. VPEs są proteazami zlokalizowanymi w wakuoli i odpowiadają za dojrzewanie i aktywację niektórych białek. Podczas PCD aktywność VPEs ulega zwiększeniu i po przerwaniu tonoplastu mogą być uwalniane do cytoplazmy. Te proteazy mają 21% identyczność sekwencji z kaspazami, mogą swoście hydrolizować substraty kaspaz, a ich aktywność jest hamowana przez inhibitory kaspaz. Metakaspazy (I i II, którą wykryto tylko u roślin), chociaż zawierają kaspazopodobne domeny proteolityczne, ale mają inną swoistość substratową, mogą być aktywowane autokatalitycznie (metakaspaza II) i prawdopodobnie mogą aktywować inne kaspazopodobne proteazy podczas PCD u roślin. Serynowymi proteazami, które uczestniczą w degradacji białek komórki, są fitaspazy i saspazy. Są one proteazami substilizynopodobnymi hydrolizującymi różne substraty kaspaz, ich aktywność zwiększa się podczas PCD i jest hamowana przez inhibitory kaspaz. Fitaspazy ulegają konstytutywnej ekspresji i są obecne w apoplacie, a aktywowane po indukcji PCD przemieszczają się do wnętrza komórki. U roślin zidentyfikowano też podjednostkę PBA1 proteasomów, która może być zaangażowana w HR i PCD komórek tytoniu (BY-2) indukowaną przez szok gorący [125].

Tak więc, badania morfologicznego i molekularnego przebiegu PCD u roślin wskazują, że mimo podobieństw, w tym udziału podobnych lub analogicznych białek, to różnice między apoptozą a PCD u roślin są na tyle duże, że nie można uznać, że PCD u roślin zachodzi w wyniku apoptozy.

AUTOFAGIA

Autofagia jest katabolicznym procesem, w którym zbędne i nieprawidłowe długo żyjące białka oraz zbędne i uszkodzone organelle komórkowe (a także wewnątrzkomórkowe patogeny) oddzielane w pęcherzykach wraz z fragmentem cytoplazmy są następnie degradowane przez hydrolazy lizosomów (u zwierząt) lub wakuoli litycznych (u grzybów i roślin). Proces ten, obok systemu UPS (ubiquitin (Ub)/26S proteasome system), selektywnie zapobiega więc nagromadzeniu w komórkach zbędnych, często szkodliwych składników, a także ma istotne znaczenie w recyklingu białek i w utrzymaniu homeostazy komórki [9,73,110]. Autofagia jest wysoce zachowawczym procesem zachodzącym w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych.

Przebieg procesu autofagii został opisany u drożdży, a następnie u zwierząt i u roślin, przy czym u roślin wykryto podobne autofagosomo pęcherzyki otoczone dwiema błonami, między którymi było niskie pH oraz wykryto kwaśne hydrolazy [48,110,128]. U zwierząt

wyróżnia się trzy rodzaje autofagii: mikroautofagię, makroautofagię i autofagię związaną z białkami opiekuńczymi (chaperone-mediated autophagy, CMA) [105]. Podczas mikroautofagii mała porcja cytoplazmy jest pobierana przez inwaginację błony lizosomu (u zwierząt) lub wakuoli (u roślin), która następnie jest oddzielana jako pęcherzyk (ciało autofagowe) do wnętrza tych organelli, gdzie jest trawiona. [63]. Makroautofagia jest procesem bardziej złożonym: błony pęcherzyka pochodzącego prawdopodobnie z ER otaczają większą porcję cytoplazmy z organellami i tworzone są kubeczkowatego kształtu struktury preautofagowe. Następnie po połączeniu błon otaczających tę porcję cytoplazmy, powstaje pęcherzyk otoczony dwiema błonami, zwany autofagosomem. U zwierząt po połączeniu autofagosomu z lizosomem jego zawartość jest trawiona w utworzonych w ten sposób autolizosomach, zaś u roślin błona zewnętrzna autofagosomu łączy się z tonoplastem, a jego zawartość otoczona błoną wewnętrzną (ciało autofagowe) jest uwalniana do wakuoli litycznej i trawiona. Makroautofagia jest dominującym rodzajem autofagii i procesem najczęściej indukowanym w warunkach stresowych [48,128,145]. Autofagia związana z białkami opiekuńczymi (CMA) jest mechanizmem eliminacji cząsteczek białka przebiegającym zazwyczaj z udziałem białek opiekuńczych, które wychwytyują np. białka cytoplazmatyczne zawierające swoiste sekwencje sygnałowe o niewłaściwej konformacji, następnie są transportowane do lizosomów i trawione [77].

U roślin, oprócz mikro- i makroautofagii, kluczową rolę w PCD może pełnić megautofagia. W początkowym okresie tego rodzaju autofagii zachodzi intensywna synteza enzymów hydrolitycznych i ich lokowanie w soku wakuolarnym. Powoduje to znaczne zwiększenie objętości wakuoli, po czym tonoplast traci selektywną przepuszczalność, następuje przerwanie jego ciągłości, a enzymy hydrolityczne są uwalniane z wakuoli i rozpoczynają proces degradacji składników komórki [45,139]. Megautofagię obserwowano m.in. podczas ksylogenezy w izolowanych komórkach mezofilu *Zinnia elegans* i podczas formowania aerenchymy czy elementów sitowych [86,127]. Podczas PCD w komórce może zachodzić co najmniej dwa typy autofagii. Obserwowano również sytuacje, gdy po równoczesnej mikro- i makroautofagii następowała megautofagia [127].

W warunkach homeostazy fizjologicznej nasilenie procesu autofagii jest niewielkie, przyczyniając się do sprawnego obiegu białek w komórce oraz przeciwdziałania akumulacji uszkodzonych białek i organelli, natomiast intensywność tego procesu może ulegać znacznemu zwiększeniu przy niedoborze substancji pokarmowych, podczas różnicowania komórek, stresu ER, akumulacji ROS i działania innych stresów powodujących uszkodzenie molekuł i organelli [9,72,73]. Nadmierna autofagia może prowadzić do śmierci komórki (u zwierząt II typ PCD). Komórki obumierające w wyniku autofagii charakteryzują się intensywnym nagromadzeniem autofagosomów i wakuolizacją cytoplazmy.

Interesujące prożyciowe znaczenie ma nasilenie autofagii w sytuacji stresu pokarmowego. Przy niedoborze pokarmów recykliczacja składników komórki dostarcza substratów (aminokwasów, kwasów tłuszczowych i nukleotydów) do utrzymania homeostazy energetycznej komórki oraz syntezy niezbędnych makromolekuł [9,73,104]. Tak więc, autofagia z jednej strony ma istotne prożyciowe znaczenie, z drugiej zaś może być jednym z mechanizmów PCD. Sugeruje się, aby dla odróżnienia tej drugiej roli autofagii stosować określenie „autofagowa śmierć komórki”.

Autofagia, która jest strategią trawienia składników w żywych komórkach, musi być procesem ściśle kontrolowanym. W jej regulacji uczestniczą liczne geny ATG (także nazywane APG) (autophagy gene). U drożdży zidentyfikowano 31 genów ATG, podobnie liczne geny ATG zidentyfikowano u zwierząt i ich homologów u roślin (*Arabidopsis*, *Oryza sativa*, *Glycine max* i *Triticum* spp.) [44,73,81,118]. Większość tych genów reguluje kolejne etapy autofagii (tworzenie pęcherzyka, wydłużanie, dojrzewanie, fuzję, degradację). Wykazano, że poziom ekspresji genów ATG ulega zwiększeniu m.in. podczas różnicowania komórek (ksylemu u *Arabidopsis* genu ATG5), podczas starzenia, w reakcji na głodzenie pokarmowe i infekcję przez mikroorganizmy. Działanie białek ATG może być regulowane poprzez ich fosforylację oraz interakcję z innymi białkami (m.in. z innymi białkami ATG, z Bekliną 1 i z niektórymi kinazami) [13,66,87,122]. O znaczeniu genów ATG świadczą badania, w których stwierdzono, że ich inaktywacja może zwiększać wrażliwość na głodzenie pokarmowe, przyspieszać starzenie liści i wpływać na atak patogenów [93].

U zwierząt i roślin w regulacji autofagii główną rolę odgrywa Beklina 1, która może też pełnić i inne funkcje w komórkach, zwłaszcza związane z przemieszczaniem się pęcherzyków (m.in. endosomów). Wielofunkcyjność Bekliny 1 wynika z obecności w jej cząsteczce domeny BH3 (Bcl-2 homology 3), z którą mogą się wiązać antyapoptotyczne białka (Bcl-2, Bcl-x_L) oraz domeny CCD (coiled-coil domains) i ECD (evolutionarily conserved domain), które mogą być wykorzystywane do wiązania innych białek nieuczestniczących w procesie autofagii. Beklina 1 promuje tworzenie autofagosomów w kompleksie zawierającym białka sortujące VPS34 (vacuolar sorting protein 34) [35]. Kompleks Atg6/beklina 1 jest powszechnie obecny u różnych organizmów eukariotycznych [93]. O niezbędności ekspresji Bekliny 1 w rozwoju organizmów świadczą badania prowadzone na myszach. Wykazano, że mutacja obu alleli genu kodującego Beklinę 1 powoduje letalność we wczesnych okresach rozwoju zarodków, a utrata aktywności jednego allelu, także u ludzi, zakłóca rozwój i może doprowadzić do różnych chorób (w tym nowotworowych i neurodegeneracyjnych) [100,149]. Rośliny, podobnie jak inne organizmy eukariotyczne, syntetyzują Beklinę 1. U *Arabidopsis thaliana* i *Nicotiana benthamiana* wykazano, że jej ekspresja zapobiega przedwczesnej chlorozie i ogranicza PCD w reakcji na patogeny [35,78,93].

U zwierząt wykazano, że poziom ekspresji Bekliny 1 może wpływać nie tylko na nasilenie autofagii i autofagową śmierć komórek, ale może także mieć znaczenie w indukcji apoptozy. Wpływ tego białka na inicjację apoptozy wynika ze współzależności między regulacją autofagii i apoptozy, a pośrednio z prożyciowej roli autofagii. Stwierdzono bowiem, że hamowanie autofagii w większości przypadków zwiększa wrażliwość na stymulatory apoptozy, nasilenie autofagii może poprzedzać apoptozę, a komórki niezdolne do apoptozy mogą obumierać w procesie autofagii [61,124].

Dobrym przykładem regulacji jednocześnie apoptozy i autofagii jest wiązanie antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, CED-9) z proapoptotycznym białkiem (Bax lub Bak), a na ER z Bekliną 1 (w kompleksie Beklina 1/ATG6); Beklina 1 została wykryta jako białko związane z Bcl-2 [88,94,151]. Związanie Bcl-2 przez Beklinę 1 zmniejsza ilość białka Bcl-2 oddziałującą z proapoptotycznym białkiem (Bax, Bak) i w efekcie sprzyja otwieraniu PTP i indukcji apoptozy. Utworzenie kompleksu Beklina 1/białka Bcl-2 i Bcl-x_L ma działanie antyautofagowe. W komórkach poddanych stresowi Bcl-2 odłącza się od Bax a przyłącza do Bekliny-1, co prowadzi do hamowania autofagii i indukcji apoptozy [84]. Wpływ stresu na nasilenie autofagii i interakcję Bcl-2/Beklina 1 potwierdzono w badaniach prowadzonych na komórkach w sytuacji różnej dostępności pokarmów. W warunkach dobrej dostępności pokarmów, niska intensywność autofagii jest związana z wysokim poziomem kompleksów Bcl-2/Beklina 1, natomiast głodzenie, które stymuluje autofagię, powoduje znaczne zmniejszenie wiązania Bcl-2 z Bekliną 1 [95].

W kontroli autofagii uczestniczy inhibitor Bax (BI-1), który jest białkiem powszechnie obecnym w błonach ER komórek eukariotycznych [50]. Ogólnie, BI-1 jest inhibitorem PCD, działa jako integrator reakcji na stres modulując reakcje adaptacyjne. Ostatnio wykazano, że BI-1 hamuje autofagię poprzez wiązanie z IRE1α (inositol requiring enzyme 1α) [14,79]. IRE1α jest endorybonukleazą zlokalizowaną w błonach ER, aktywowaną przez autofosforylację i jest, oprócz PERK (dsRNA activated protein kinase-like ER kinase) i ATF6 (activating transcription factor 6), głównym sensorem przenoszącym do cytoplazmy i jądra sygnał UPR (unfolded protein response) podczas stresu ER. Ortologi IRE1 zidentyfikowano i sklonowano także u drożdży oraz u ryżu i *Arabidopsis*, jest więc prawdopodobne, że u roślin BI-1, analogicznie jak u zwierząt, może hamować autofagię stymulowaną przez stres ER [60,91].

NEKROZA

Nekrozę przeciwstawia się PCD jako śmierć patologiczną, pasywną, jako katastrofę bioenergetyczną wynikającą z wyczerpania zasobów ATP (i prawdopodobnie, NAD⁺). Nekroza, w przeciwieństwie do PCD, nie wymaga aktywacji genów (jest nieprogramowaną śmiercią komórki) i ATP, co różni ją od PCD [36, 114]. Nekroza zazwyczaj

obejmuje grupę komórek.

Morfologicznymi objawami nekrozy są: pęcznienie komórki i jej organelli oraz przypadkowa degradacja DNA, wczesne przerwanie ciągłości błony komórkowej i wypływ zawartości komórek, co u zwierząt powoduje reakcję zapalną [36,114]. U zwierząt stwierdzono, że nekrotyczną śmierć komórki często poprzedza podwyższenie poziomu Ca²⁺ w cytoplazmie, degradacja lipidów i aktywacja proteaz z rodziny kalpain. Zmiany w mitochondriach i lizosomach zachodzą później. W mitochondriach zahamowany jest proces oddechowy, co powoduje spadek poziomu ATP, stwierdzono też znaczne zwiększenie poziomu ROS i RNS (reactive nitrogen species), a także zwiększenie przepuszczalności błon, w tym błony lizosomalnej, co powoduje uwolnienie aktywnych katepsyn do cytoplazmy [19,36]. W badaniach ostatnich lat wykazano jednak, że nekroza może wymagać aktywacji pewnych genów i może być hamowana przez syntetyczny inhibitor – nekrostatynę [19, 36, 114]. Można więc u zwierząt wśród typów obumierania komórek wyróżnić „regulowaną nekrozę” (nekroptozę).

REGULACJA INDUKCJI APOPTOZY PRZEZ BIAŁKA RODZINY Bcl-2

U zwierząt w kierowaniu komórek na mitochondrialny szlak apoptozy istotną rolę odgrywają białka rodziny Bcl-2 (B-cell leukemia /lymphoma) [41,65]. U ssaków zidentyfikowano ponad 20 białek zaliczanych do tej rodziny. Wśród nich są białka o działaniu proapoptotycznym (Bax, Bak, Bcl-XS, Bid, Bik, Hrk i Bok) jak i o działaniu antyapoptotycznym (Bcl-SL, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-x_L, Bfl-1 Mcl-1, Brag-1 i A1). Białka rodziny Bcl-2 charakteryzują się obecnością od jednego do czterech motywów BH(1-4) (Bcl-2 homology domains), które są wykorzystywane przy tworzeniu homo- lub heterodimerów [42,47,79].

W komórkach zwierząt w warunkach homeostazy fizjologicznej proapoptotyczne, nieaktywne białko Bax jest białkiem cytosolowym, a antyapoptotyczne białko Bcl-2 jest zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, wykryto je także w błonie jądrowej oraz błonie ER [47]. Indukcja apoptozy jest związana z aktywacją i przemieszczaniem się proapoptotycznego białka Bax z cytosolu do mitochondriów, gdzie wiąże się ono z N-terminalnym α-helikalnym segmentem VDAC. Powoduje to otwarcie PTP i w ten sposób zwiększenie przepuszczalności ich błony zewnętrznej (MMP, mitochondrial membrane permeabilisation) dla substancji obecnych w IMS tych organelli [1,60,135]. Białka antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-x_L) tworzą heterodimery z Bax i przeciwdziałają otwieraniu PTP. Kierowanie komórki na szlak apoptozy jest więc zależne od stosunku poziomu ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych: jeśli w komórce jest nadmiar białka Bcl-2, to wiązuje ono całą pulę białka Bax, a pozostałe białko Bcl-2 tworzy homodimery, natomiast nadmiar białka Bax wiązuje całą pulę białka Bcl-2, a pozostała reszta Bax tworzy homodimery [18,47,109].

Tak więc mitochondria i poziomy białek pro- i antyapoptotycznych, od których zależy przepuszczalność błony zewnętrznej tych organelli, pełnią decyzyjną rolę w kierowaniu komórki na drogę apoptozy.

TRANSDUKCJA GENÓW RODZINY BCL-2 ZWIERZĄT DO DROŹDZY I ROŚLIN

PCD u drożdży i roślin, podobnie jak u zwierząt, prowadzi do hydrolitycznej destrukcji składników komórki, można więc oczekiwać u organizmów należących do tych trzech królestw drożdży, roślin i zwierząt, podobnego mechanizmu regulacji indukcji i przebiegu procesu umierania komórek. Istotną różnicą między indukcją apoptozy i indukcją PCD u drożdży i roślin jest brak zaangażowania białek z rodziny Bcl-2, bowiem genomy drożdży i roślin nie zawierają genów kodujących te białka. Takie geny są obecne tylko w genomach zwierząt tkankowych [2,3,85]. Sugeruje to, że w regulacji indukcji apoptozy u innych eukariontów zachodzi z udziałem innych, funkcjonalnie analogicznych białek [79].

Na możliwość obecności u drożdży i roślin białek o pro- lub antyapoptotycznym działaniu wskazuje z jednej strony wykrycie u roślin białek Bax- i Bcl-2-podobnych (m.in. zawierających sekwencje wiążące przeciwciała anty-Bcl-2 i anty-Bax człowieka [28], A. Kobylińska, Ł. Balcerzak i M. Godlewski, niepubl.), z drugiej zaś uzyskanie indukcji PCD u drożdży i roślin lub jej przeciwdziałaniu po transformacji genami zwierząt, kodującymi odpowiednio białka pro- i antyapoptotyczne.

Stosując podejście badawcze, w którym prowadzono funkcjonalny przesiew genów z bibliotek cDNA roślin, zidentyfikowano w bibliotece cDNA *Arabidopsis* geny *CDF1* i *CDF3* (cell growth defect factor-1), które u drożdży miały letalne, Bax-podobne działanie [55, 58]. Stosując takie podejście badawcze w bibliotekach cDNA roślin zidentyfikowano i inne liczne geny m.in. inhibitor Bax (*BI-1*) oraz Beklinę-1, które u Bax-transformowanych drożdży, podobnie jak u zwierząt, przeciwdziałały indukcji PCD przez Bax [35,50,142].

Do uzyskania wyników działania produkty białkowe musiały zawierać sekwencje kodujące (CDS) całe białka, a więc zawierające koniec -C, którego sekwencje transbłonowe są konieczne do wiązania z błonami oraz odcinki zawierające domeny BH3 wykorzystywane do dimeryzacji i interakcji z innymi białkami [39,54,67]. Z badań prowadzonych na drożdżach i na różnych gatunkach roślin wynika, że u transgenicznym organizmów produkty tych genów, analogicznie jak u zwierząt:

- umiejscawiają się w komórkach podobnie jak u zwierząt, tj. Bax w zewnętrznej błonie mitochondriów, a antyapoptotycznych genów (*Bcl-2*, *Bcl-x_L*, i *CED-9*) w mitochondriach, a także w chloroplastach [16,148],
- mają, analogiczny jak u zwierząt, wpływ na obumieranie komórek, tj. produkt proapoptotycznego genu (*Bax*

lub *Bak*) w komórkach drożdży i roślin indukuje PCD, natomiast kotransformacja antyapoptotycznymi genami (*Bcl-2*, *Bcl-x_L*, *Ced-1*) przeciwdziała letalnemu działaniu Bax.

Badania prowadzone na tytoniu i *Arabidopsis* wskazują, że heterologiczna ekspresja ludzkiego Bax indukuje szybkie, HR-podobne obumieranie komórek u tych roślin [67,148]. Z lokowaniem się Bax w mitochondriach były związane uszkodzenia budowy i funkcjonowania tych organelli. Przejawiały się zmianą kształtu mitochondriów z pałeczkowatych na okrągłe, ich puchnięciem, a także zakłóceniem fosforylacji oksydacyjnej, transportu elektronów, utratą mitochondrialnego potencjału transbłonowego, co prowadziło do zmniejszenia wytwarzania ATP, natomiast zwiększenia tworzenia ROS [27,67,148]. Ekspresja genu *Bax* myszy powodowała u *Arabidopsis* m.in. obkurczanie protoplastów, kondensację chromatyny i fragmentację DNA (z tworzeniem drabinek DNA), zwiększoną wakuolizację komórek, uszkodzenia błon mitochondriów, chloroplastów i utratę integralności błony komórkowej [6,148]. Ekspresja Bax myszy u *Catharanthus roseus* indukuje transkrypcję genów *Tdc* i *Str* (uczestniczących w szlaku biosyntezy terpenoidowych alkaloidów indolowych) i stymuluje akumulację białek obrony PR1 (defense-related protein) [140]. Obumieraniu komórek indukowanemu przez Bax u roślin przeciwdziałała, podobnie jak u zwierząt, nadekspresja białka BI-1 [54].

WPLYW TRANSFORMACJI GENAMI Z RODZINY BCL-2 NA WZROST I ROZWÓJ ROŚLIN

Produkty genów kodujących białka z rodziny Bcl-2 u transgenicznym roślin, oprócz specyficznego wpływu na indukcję PCD, mogą wpływać na inne procesy fizjologiczne. Efekty ektopowej ekspresji proapoptotycznych (*Bax*, *Bak*) lub antyapoptotycznych (*Bcl-2*, *Bcl-x_L*, *Ced-9*) genów zwierząt mogą się przejawiać wpływem na wzrost i rozwój transgenicznym roślin. przy czym efekty fenotypowe mogły zależeć od gatunku rośliny i poziomu ekspresji tych genów.

U Bax-transformowanego tytoniu stwierdzono, że ektopowa ekspresja mysiego genu *Bax* negatywnie wpływa na wzrost i rozmnażanie roślin (hamowanie wzrostu, przyspieszenie starzenia, chlorozę, zmniejszenie liczby kwiatów i nasion), chociaż może zwiększać odporność na niektóre patogeny [117,148]. U roślin transformowanych antyapoptotycznymi genami obserwowano brak wpływu, negatywną lub pozytywną modyfikację wzrostu i rozwój roślin. Dla przykładu, wyraźnych morfologicznych i fizjologicznych zmian, w porównaniu z kontrolą, nie obserwowano w badaniu tytoniu transformowanego antyapoptotycznymi genami (*Bcl-2*, *Bcl-x_L* lub *CED-9*) [26], w ryżu nadekspresja ludzkiego *Bcl-2*, w porównaniu z kontrolą, miała pozytywne działanie, a mianowicie: powodowała szybsze kiełkowanie nasion, wydłużanie korzeni, zwiększała żywotność wierzchołka korzeni i przeciwdziałała utracie chlorofilu [24], nato-

miast u transformantów pomidora nadekspresja Bcl-x_L i Ced-9 powodowała wyraźne osłabienie wzrostu i rozwoju roślin [141]. Z badań Dikmana i wsp. [26] prowadzonych na transformowanym tytoniu wynika, że wpływ ektopowej ekspresji genów antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-x_L lub CED-9) na wzrost i rozwój roślin może zależeć od poziomu ekspresji tych genów: negatywne działanie obserwowano przy wyższych, natomiast takiego działania nie stwierdzono przy niższych poziomach ich ekspresji.

WPLYW TRANSFORMACJI ROŚLIN PRO- I ANTYAPOPTOTYCZNYMI GENAMI ZWIERZĄT NA WRAŻLIWOŚĆ NA STRES ABIOTYCZNY I BIOTYCZNY

W badaniach prowadzonych na tytoniu i pomidorze transformowanych antyapoptotycznymi genami zwierząt (Bcl-2, Bcl-x_L, Ced-9) stwierdzono, że nadekspresja tych genów wyraźnie zwiększa tolerancję na stres abiotyczny, w tym: naświetlanie UV, zasolenie, suszę, niską i wysoką temperaturę, działanie jonów glinu, H₂O₂, działanie herbicydów (parakwatu, acifluorfenu i sufentrazonu), a także na stres biotyczny [17,26,75,134,141].

Transformacja roślin genami kodującymi białka z rodziny Bcl-2 zwierząt może wpływać na ich wrażliwość na atak patogenów, przy czym wpływ może zależeć od interakcji pasożyt-roślina-gospodarz (pasożyty nekrotroficzne vs. biotroficzne, hemibiotroficzne). Patogeny nekrotroficzne dzięki wydzielanym toksynom i enzymom trawiennym uśmiercają komórki gospodarza i pozyskują pokarm z martwych komórek. Nekrotrofy indukują HR, a więc czynniki działające pro-PCD sprzyjają rozwojowi infekcji.

Przeciwnie, w przypadku biotrofów, a także hemibiotrofów, które pobierają pokarm z żywych komórek gospodarza, odporność na infekcję zwiększa lokalne obumieranie komórek gospodarza, natomiast rozwojowi infekcji sprzyja przeciwdziałanie obumieraniu komórek. Dla przykładu, u ryżu transformowanego genem BI-1, którego produkt przeciwdziała indukcji PCD, obserwowano zwiększoną penetrację biotroficznego grzyba *Blumeria graminis* [49]. Ekspresja antyapoptotycznych genów zwierząt może zwiększać odporność roślin na patogeny nekrotroficzne. Wskazują na to badania prowadzone na tytoniu i pomidorze transformowanych antyapoptotycznymi genami zwierząt (Bcl-2, Bcl-x_L i Ced-9). U tych roślin wykazano, że konstytutywna ekspresja tych genów znacznie zwiększa odporność na nekrotroficzne grzyby (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora nicotianae* i *Botrytis cinerea*) oraz nekrogeniczny wirus CMV (Cucumber mosaic virus D satellite RNA) [26,82,141]. Ekspresja Bcl-2 chroniła tytoń przed indukcją HR powodowaną przez TMV (tobacco mosaic virus) [82]. Podobne obserwacje pochodzą z badań prowadzonych na bananie (*Musa* spp.), u którego transformacja antyapoptotycznymi genami (Bcl-2, Bcl-x_L, Ced-9) znacznie zmniejsza symptomy uszkodzenia i zwiększa odporność na *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* i była skorelowana z poziomem transkrypcji i poziomem białka kodowanego przez

te geny [95]. Transformacja zmutowanymi antyapoptotycznymi genami nie chroniła rośliny przed atakiem patogenów. Ekspresja u pomidora antyapoptotycznego genu p35 bakulowirusa blokowała PCD i powodowała szeroki zakres odporności na abiotyczne i biotyczne uszkodzenia [77]. U kukurydzy transformowanej antyapoptotycznymi genami po ekspozycji na *Agrobacterium* stwierdzono zmniejszenie obumierania komórek i dzięki temu zwiększenie częstości transformacji [43], natomiast wprowadzenie proapoptotycznego genu (Bax) zmniejszała częstość transformacji [117].

Badania wpływu ekspresji proapoptotycznego genu Bax na wrażliwość roślin na patogeny prowadzono rzadziej, chociaż odnotowano możliwość zwiększenia odporności na atak patogenów u roślin transformowanych tym genem. U transformowanego tytoniu stwierdzono, że ektopowa ekspresja genu Bax powoduje nie tylko lokalną HR-podobną PCD, ma negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin, ale może zwiększać w roślinie ekspresję genów obrony, w tym indukcję SAR (systemic acquired resistance) i chronić rośliny przed infekcją hemibiotroficznym grzybem *Phytophthora parasitica* i patogenną bakterią *Ralstonia solanacearum*, chociaż nie zwiększa odporności na TMV (tobacco mosaic virus). Odporność na *Phytophthora parasitica* była pozytywnie skorelowana z poziomem akumulacji białka Bax [67,117]. Zwiększenie odporności na atak patogenów u Bax-transformowanych roślin było związane ze zwiększeniem ekspresji genów obrony PR1a i PR1c (plant resistance related genes) [117].

DROŻDŻE TRANSFORMOWANE PRO- I ANTYAPOPTOTYCZNYMI GENAMI ZWIERZĄT JAKO MODEL BADAWCZY DO IDENTYFIKACJI PRO- I ANTY-PCD GENÓW ZWIERZĄT I ROŚLIN

Genomy drożdży nie zawierają genów kodujących białka z rodziny Bcl-2 [3], natomiast transdukcja proapoptotycznych genów (Bax, Bak) ssaków indukuje PCD komórek tych organizmów, a kotransdukcja antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-x_L lub Ced-9) genów zwierząt przeciwdziała obumieraniu komórek u Bax-transformowanych drożdży [107]. Produkty tych genów mają więc podobne działanie jak u zwierząt, co wskazuje, że mogą one w drożdżach wykorzystywać endogenną „maszynię” PCD. Wykazano, że heterogenna ekspresja genów Bax u drożdży prowadzi do wielu apoptozopodobnych skutków. Drożdże mogą więc być bardzo dogodnym modelem do funkcjonalnego przesiewowego sprawdzania wpływu genów z bibliotek cDNA różnych organizmów na żywotność komórek, do identyfikacji genów zaangażowanych w regulację i przebieg PCD, na co wskazywałyoby u kotransformantów Bax-podobne lub działanie anty-Bax.

Techniką funkcjonalnego przesiewu biblioteki cDNA człowieka, a następnie ryżu i *Arabidopsis* w Bax-transformowanych drożdżach zidentyfikowano gen BI-1 kodujący białko BI-1, które u zwierząt, roślin i grzybów jest umiejscowione w ER i ma działanie anty-PCD [53,142]. Stosując tę technikę badawczą w bibliotekach cDNA ssaków

ków zidentyfikowano inne liczne geny przeciwdziałające letalności Bax w drożdżach, w tym: gen *SMS1* (sphingomyelin synthase 1) myszy [146], gen *TMEM85* (transmembrane protein 85) człowieka [101] i gen *VOX6A1* człowieka, który koduje podjednostkę 6A1 oksydazy cyt c (cytochrome c oxidase subunit 6A1) [33].

Wykazano też, że anty-Bax działanie u drożdży mają produkty genów z bibliotek cDNA różnych roślin, m.in.: w bibliotece cDNA *Arabidopsis* genów: *AtEBP* (thylene-responsive element binding protein) [89,92], *AtVAMP* (vesicle-associated membrane protein) [71], *BAG* (Bcl-2-associated anthanogene) [138], *BAP* (biofilm associated protein) [144]. Dzięki wykorzystaniu komórek drożdży z biblioteki cDNA *Arabidopsis* wyizolowano geny *Cdf1* i *Cdf3* (cell growth defect factor), których ekspresja, podobnie jak ekspresja Bax ssaków, indukowała śmierć komórek drożdży [55,58]. W bibliotece cDNA pomidora wykazano anty-PCD działanie genów: *GST* (glutathione S-transferase) [52] i genu kodującego *LePHGPx* (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) [17], a w bibliotece cDNA soi genu *sAPX* (ascorbate peroxidase) [5].

Stosowanie techniki funkcjonalnego przesiewu bibliotek cDNA zwierząt i roślin w drożdżach transformowanych genami zwierząt kodującymi pro- i antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 pozwoliło na identyfikację genów zaangażowanych w proces PCD u tych organizmów. Znaczenie w PCD zidentyfikowanych genów wykazano następnie *in vivo* lub potwierdzono wcześniej poznany ich wpływ na żywotność komórki.

MECHANIZM WPŁYwu PRODUKTÓw GENÓw z RODZINY Bcl-2 ZWIERZĄT NA KOMÓRKI TRANSFORMOWANYCH ROŚLIN

Mimo że rośliny nie zawierają białek z rodziny Bcl-2, u roślin transformowanych kodującymi je genami ssaków obserwowano ich wpływ na indukcję lub przeciwdziałanie PCD. Wskazuje to, że białka z rodziny Bcl-2 wykorzystują u roślin endogenne mechanizmy procesu obumierania komórek i sugeruje, że u roślin mogą występować białka o analogicznej funkcji, jednak molekularny mechanizm ich działania nie jest znany.

Indukcja PCD przez Bax u transgeniczných roślin jest najprawdopodobniej spowodowana, analogicznie jak u zwierząt, przez wiązanie tego białka z VDAC i otwarciem PTP. Białka VDAC są obecne w OMM roślin, stwierdzono też, że indukcja PCD jest związana z uwalnianiem białek z IMS [37]. Potwierdzenie możliwości udziału VDAC w indukcji PCD u roślin transformowanych mysim Bax uzyskano też w badaniach prowadzonych na *Nicotiana benthamiana* [121]. Redukcja zawartości białka VDAC spowodowana mutacją kodujących je genów lub hamowaniem wiązania Bax z VDAC przez DIDS (dihydro-4,40 diisothiocyano-2,20-disulfonic acid), który jest inhibitorem kanałów anionowych, hamowała, chociaż nie całkowicie, indukcję PCD przez Bax. Indukcja PCD przez Bax, pomimo wykluczenia jego wiązania

z VDAC, sugeruje i inny sposób działania białka Bax na indukcję PCD. W badaniach prowadzonych na myszach stwierdzono, że delecja genów VDAC może nie wpływać na indukcję apoptozy przez proapoptotyczne białka (Bax i Bid), co wskazuje, że do indukcji mitochondrialnego obumierania komórek VDAC nie są konieczne [7]. Możliwość istnienia alternatywnej drogi indukcji PCD przez Bax u roślin sugerują badania, w których u *Arabidopsis* indukcja PCD zachodziła w sposób zależny lub niezależny od podwyższenia poziomu ROS [6].

Produkty antyapoptotycznych genów zwierząt (Bcl-2, Bcl-x_L, Ced-9) u transgeniczných roślin przeciwdziałają letalnemu działaniu Bax. Ich działanie może też polegać na wpływie na inne procesy komórkowe. Wykazano bowiem, że u ssaków Bcl-2 może się wiązać nie tylko z VDAC [123], ale i z innymi białkami. Bcl-2 może wiązać się z Bekliną 1 (dzięki obecności w jej cząsteczce domeny BH3) i w ten sposób może wpływać na proces autofagii i homeostazę Ca²⁺ [88]. Bcl-2 i Bcl-x_L może wpływać na wpływ Ca²⁺ z ER przez bezpośrednie wiązanie z kanałami IP3R i interakcję z pompami SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), które napełniają ER [30,103]. Antyapoptotyczne białka (Bcl-2, Bcl-x_L, Ced-9) mogą się też wiązać z IRE1α [14,79], która jest głównym sensorem przenoszącym do cytoplazmy i jądra sygnał UPR podczas stresu ER.

Obserwowany zazwyczaj pozytywny wpływ antyapoptotycznych genów zwierząt u transformowanych roślin, w tym zwiększanie ich odporności na stres abiotyczny i biotyczny, może polegać na utrzymaniu homeostazy ich organelli [99].

POSUMOWANIE

Utrzymanie funkcjonalnej homeostazy społeczeństwa komórek tworzących organizm wielokomórkowy wymaga usuwania komórek zbędnych i uszkodzonych. Ich eliminowanie odbywa się dzięki genetycznie uwarunkowanej zdolności komórek do samobójczej śmierci.

Kierowanie komórki na drogę samobójczej śmierci jest ściśle genetycznie kontrolowanym procesem fizjologicznym, który został nazwany „programowaną śmiercią komórek” (PCD). Proces PCD jest indukowany przez sygnały pozakomórkowe i sygnały wynikające z monitorowania prawidłowości funkcjonowania komórki. PCD zachodzi podczas całej ontogenezy, uczestniczy bowiem w histogenezie i formowaniu organów (rozwoju PCD), a także w adaptacji do warunków środowiska i w reakcji na abiotyczny i biotyczny stres środowiskowy. Zdolność do samobójczej śmierci mają także organizmy jednokomórkowe. Komórki mogą też obumierać w wyniku nekrozy (martwicy), w której zachodzi szybkie „zabicie” komórki przez silnie działające czynniki abiotyczne, bez angażowania swoistych genów i metabolizmu komórki. U zwierząt i roślin opisano co najmniej po kilka rodzajów przebiegu PCD. Procesy PCD zwierząt i roślin w wielu aspektach są podobne, a różnice w spo-

sobie obumierania komórek mogą wynikać z odmiennej drogi ewolucyjnej organizmów tych dwóch królestw po dywergencji z jednokomórkowego przodka, a także ze strukturalno-funkcjonalnych różnic między komórkami ich różnych tkanek. Genomy zwierząt i roślin zawierają liczne geny pro-PCD, i nie mniej liczne geny przeciwdziałające kierowaniu komórek na samobójczą śmierć. Jednak u drożdży i roślin nie wykryto co najmniej kilku genów odgrywających podstawową rolę

podczas apoptozy, natomiast u roślin zidentyfikowano geny kodujące białka o analogicznej funkcji. Dalsze poznanie molekularnego mechanizmu przebiegu PCD może mieć terapeutyczne znaczenie w leczeniu różnych chorób człowieka, a transdukcja pro- i antyapoptotycznych genów zwierząt do roślin może doprowadzić do uzyskania roślin uprawnych o szerokim zakresie odporności na działanie abiotycznych i biotycznych czynników środowiskowych.

PÍSMIENICTWO

- [1] Abu-Hamad S., Arbel N., Calo D., Arzoine L., Israelson A., Keinan N., Ben-Romano R., Friedman O., Shoshan-Barmatz V.: The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 1906–1916.
- [2] Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000; 408: 796–815.
- [3] Aravind L., Dixit V.A., Koonin E.V.: Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*, 2001; 291: 1279–1284.
- [4] Arzoine L., Zilberberg N., Ben-Romano R., Shoshan-Barmatz V.: Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 3946–3955.
- [5] Baek D., Jin Y., Jeong J.H., Lee H.-J., Moon H., Lee J., Shin D., Kang C.H., Kim D.H., Nam J., Lee S.Y., Yun D.-J.: Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Phytochemistry*, 2008; 69: 333–338.
- [6] Baek D., Nam J., Koo Y.D., Kim D.H., Lee J., Jeong J.C., Kwak S.S., Chung W.S., Lim C.O., Bahk J.D., Hong J.C., Lee S.Y., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Yun D.J.: Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Molec. Biol.* 2004; 56: 15–27.
- [7] Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J., Molkentin J.D.: Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 550–555.
- [8] Balk J., Chew S.K., Leaver C.J., McCabe P.F.: The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J.*, 2003; 34: 573–583.
- [9] Bassham D.C.: Plant autophagy—more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2007; 10: 587–593.
- [10] Bolwell G.P., Wojtaszek P.: Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 1997; 51: 347–366.
- [11] Bratton S.B., MacFarlane M., Cain K., Cohen G.M.: Protein complex activated during caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exptl. Cell Res.*, 2000; 256: 27–33.
- [12] Cacas J.L.: Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system? *Plant, Cell and Environ.*, 2010; 33: 1453–1473.
- [13] Cao Y., Klionsky D.J.: Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res.* 2007; 17: 839–849.
- [14] Castillo K., Rojas-Rivera D., Lisbona F., Caballero B., Nassif M., Court F. A., Schuck S., Ibar C., Walter P., Sierralta J., Glavic A., Hetz C.: BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1α branch of the unfolded protein response. *EMBO J.*, 2011; 30: 4465–4478.
- [15] Castillo-Olamendi L., Bravo-Garcia A., Moran J., Rocha-Sosa M., Porta H.: AtMCP1b, a chloroplast-localised metacaspase, is induced in vascular tissue after wounding or pathogen infection. *Funct. Plant Biol.*, 2007; 34: 1061–1071.
- [16] Chen S., Dickman M.B.: Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J. Exp. Bot.*, 2004; 55: 2617–2623.
- [17] Chen S., Vaghchhipawala Z., Li W., Asard H., Dickman M.B.: Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiol.*, 2004; 135: 1630–1641.
- [18] Chipuk J.E., Green D.R.: How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.*, 2008; 18: 157–164.
- [19] Christofferson D.E., Yuan J.: Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010; 22: 263–268.
- [20] Daniel P.T.: Dissecting the pathways to death. *Leukemia*, 2000; 14: 2035–2044.
- [21] De Pinto M.C., Locato V., De Gara L.: Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell and Environ.*, 2012; 35: 234–244.
- [22] Della Mea M., Serafini-Fracassini D., Del Duca S.: Programmed cell death: similarities and differences in animals and plants. A flower paradigm. *Amino Acids*, 2007; 33: 395–404.
- [23] Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C.: Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 13454–13459.
- [24] Deng M., Bian H., Xie Y., Kim Y., Wang W., Lin E., Zeng Z., Guo F., Pan J., Han N., Wang J., Qian Q., Zhu M.: Bcl-2 suppresses hydrogen peroxide-induced programmed cell death via OsVPE2 and OsVPE3, but not via OsVPE1 and OsVPE4, in rice. *FEBS J.*, 2011; 278: 4797–4810.
- [25] Desagher S., Martinou J.-C.: Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 2000; 10: 369–377.
- [26] Dickman M.B., Park Y.K., Oltersdorf T., Li W., Clemente T., French R.: Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 6957–6962.
- [27] Dimitrova I., Toby G.G., Tili E., Strich R., Kampranis S.C., Makris A.M.: Expression of Bax in yeast affects not only the mitochondria but also vacuolar integrity and intracellular protein traffic. *FEBS Lett.*, 2004; 566: 100–104.
- [28] Dion M., Chamberland H., St-Michel C., Plante M., Darveau A., Lafontaine J.G., Brisson L.F.: Detection of a homologue of bcl-2 in plant cells. *Biochem. Cell Biol.*, 1997; 75: 457–461.

- [29] Dominguez F., Cejudo F.J.: Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Front. Plant Sci.*, 2014; 5: 366.
- [30] Dremine E.S., Sharov V.S., Kumar K., Zaidi A., Michaelis E.K., Schoneich C.: Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and stabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). *Biochem. J.*, 2004; 383: 361–370.
- [31] Ellis H.M., Horvitz H.R.: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 1986; 44: 817–829.
- [32] Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007; 35: 495–516.
- [33] Eun S.Y., I.S. Woo I.S., H.S. Jang H.S., Jin H., Kim M.Y., Kim H.J., Lee J.H., Chang K.C., Kim J.H., Seo H.G.: Identification of cytochrome c oxidase subunit 6A1 as a suppressor of Bax-induced cell death by yeast-based functional screening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 373: 58–63.
- [34] Fuchs Y., Steller H.: Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011; 147: 742–758.
- [35] Funderburk S.F., Wang Q.J., Yue Z.: The Beclin 1–VPS34 complex – at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.*, 2010; 20: 355–362.
- [36] Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni F., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.-U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovskiy B., Melino G., Kroemer G.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012; 19: 107–120.
- [37] Godbole A., Varghese J., Sarin A., Mathew M.K.: VDAC is conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1642: 87–96.
- [38] Green D.R.: The end and after: How dying cells impact the living organism. *Immunity*, 2011; 35: 441–444.
- [39] Greenhalf W., Stephan C., Chaudhuri B.: Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 1996; 380: 169–175.
- [40] Greenwood M.T., Ludovico P.: Expressing and functional analysis of mammalian apoptotic regulators in yeast. *Cell Death Differ.*, 2010; 17: 737–745.
- [41] Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J.: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 1999; 13: 1899–1911.
- [42] Hanada M., Aimé-Sempé C., Sato T., Reed J.C.: Structure-function analysis of Bcl-2 protein: Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 11962–11968.
- [43] Hansen G.: Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2000; 13: 649–656.
- [44] He C., Klionsky D.J.: Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.*, 2009; 43: 67–93.
- [45] Higaki T., Goh T., Hayashi T., Kutsuna N., Kadota Y., Hasezawa S., Sano T., Kuchitsu K.: 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.*, 2007; 48: 1414–1425.
- [46] Hoebrechts F.A., Woltering E.J.: Multiple mediators of plant programmed cell death: Interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays*, 2003; 25: 47–57.
- [47] Hordyjewska A., Pasternak K.: Apoptyczna śmierć komórki. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005; 14: 545–554.
- [48] Huang W.P., Klionsky D.J.: Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct. Funct.*, 2002; 27: 409–420.
- [49] Hükelhoven R., Dechert C., Kogel K.H.: Overexpression of barley Bax inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 5555–5560.
- [50] Hükelhoven, R.: BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis*. 2004; 9: 299–307.
- [51] Jan, N., Mahboob-ul-Hussain, Andrabi, K.I.: Programmed cell death or apoptosis: do animals and plants share anything in common. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2008; 3: 111–126.
- [52] Kampranis S.C., Damianova R., Atallah M., Toby G., Kondi G., Tschlis P.N., Makris A.M.: A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 29207–29216.
- [53] Kawai M., Pan L., Reed J.C., Uchimiya 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.
- [54] Kawai-Yamada M., Jin L., Yoshinaga K., Hirata A., Uchimiya H.: Mammalian Bax-induced plant cell death can be downregulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 12295–12300.
- [55] Kawai-Yamada M., Saito Y., Jin L., Ogawa T., Kim K.M., Yu L.H., Tone Y., Hirata A., Umeda M., Uchimiya H.: A novel *Arabidopsis* gene causes Bax-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 39468–39473.
- [56] Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer*, 1972; 26: 239–257.
- [57] Kiliańska Z.M., Miśkiewicz A.: Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 129–152.
- [58] Kim K.M., Jun D.Y., Kim S.K., Kim C.K., Kim B.O., Kim Y.H., Park W., Sohn J.K., Hirata A., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Kim D.H., Sul I.W.: Identification of novel mitochondrial membrane protein (Cdf 3) from *Arabidopsis thaliana* and its functional analysis in a yeast system. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007; 17: 891–896.
- [59] Koizumi N., Martinez I.M., Kimata Y., Kohno K., Sano H., Christeels M.J.: Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol.*, 2001; 127: 949–962.
- [60] Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 99–163.
- [61] Kroemer G., Levine B.: Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 1004–1010.
- [62] Kunikowska A., Byczkowska A., Doniak M., Kaźmierczak A.: Cytokinins résumé: their signaling and role in programmed cell death in plants. *Plant Cell Rep.*, 2013; 32: 771–780.
- [63] Kunz J.B., Schwarz H., Mayer A.: Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 9987–96.
- [64] Kusano T., Tateda C., Berberich T., Takahashi Y.: Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Rep.*, 2009; 28: 1301–1308.
- [65] Kuwana T., Newmeyer D.D.: Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003; 15: 1–9.
- [66] Kwon S.I., Cho H.J., Jung J.H., Yoshimoto K., Park O.K.: The RabGTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 2010; 64: 151–164.

- [67] Lacomme C., Santa Cruz S.: Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 7956–7961.
- [68] Lam E.: Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 305–315.
- [69] Lam E, Kato N, Lawton M.: Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 2001; 411: 848–853.
- [70] Lenz H.D., Haller E., Melzer E., Kober K., Wurster K., Stahl M., Bassham D.C., Vierstra R.D., Parker J.E., Bautor J., Molina A., Escudero V., Shindo T., van der Hoorn R.A.L., Gust A.A., Nürnberger T.: Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant. J.*, 2011; 66: 818–830.
- [71] Levine A., Belenghi B., Damari-Weisler H., Granot G.: Vesicle-associated membrane protein of *Arabidopsis* suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 46284–46289.
- [72] Levine B., Kroemer G.: Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008; 132: 27–42.
- [73] Li F., Vierstra R.D.: Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci.*, 2012; 17: 526–537.
- [74] Li L.Y., Luo X., Wang X.: Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from the mitochondria. *Nature*, 2001; 412: 95–99.
- [75] Li W., Dickman M.B.: Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnol. Lett.*, 2004; 26: 87–95.
- [76] Li W.M., Yang Q.A., Mao Z.X.: Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol. Life Sci.*, 2011; 68: 749–763.
- [77] Lincoln J.E., Richael C., Overduin B., Smith K., Bostock R., Gilchrist D.G.: Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 15217–15221.
- [78] Liu Y., Schiff M., Czymbek K., Tallóczy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P.: Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 2005; 121: 567–577.
- [79] Lord C.E.N., Gunawardena A.H.L.A.N.: Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *Eur. J. Cell Biol.*, 2012; 91: 603–613.
- [80] Maruniewicz M., Wojtaszek P.: Pochodzenie i ewolucja śmierci komórki. *Post. Biol. Kom.*, 2007; 34: 651–667.
- [81] Meijer W.H., van der Klei I.J., Veenhuis M., Kiel J.A.: ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy*, 2007; 3: 106–116.
- [82] Mitsuhara I., Malik K.A., Miura M., Ohashi Y.: Animal cell-death suppressors Bcl-xL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 775–778.
- [83] Mühlenbock P., Szechynska-Hebda M., Plaszczyca M., Baudo M., Mateo A., Mullineaux P.M., Parker J.E., Karpinska B., Karpinski S.: Chloroplast signaling and lesion simulating disease1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008; 20: 2339–2356.
- [84] Mukhopadhyay S., Panda P.K., Sinha N., Das D.N., Bhutia S.K.: Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 2014; 555–566.
- [85] Nedelcu A. M.: Comparative genomics of phylogenetically diverse unicellular eukaryotes provide new insights into the genetic basis for the evolution of the programmed cell death machinery. *J. Mol. Evol.*, 2009; 68: 256–268.
- [86] Obara K., Kuriyama H., Fukuda H.: Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol.*, 2001; 125: 615–626.
- [87] Obara K., Sekito T., Ohsumi Y.: Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes-Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 2006; 17: 1527–1539.
- [88] Oberstein A., Jeffrey P.D., Shi Y.: Crystal structure of the Bcl-X_L-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3 only protein. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 13123–13132.
- [89] Ogawa T., Pan L., Kawai-Yamada M., Yu L.-H., Yamamura S., Koyama T., Ohme-Takagi M., Sato F., Uchimiya H.: Functional analysis of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to Bax and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant Physiol.*, 2005; 138: 1436–1445.
- [90] Okushima Y., Koizumi N., Yamaguchi Y., Kimata Y., Kohno K., Sano H.: Isolation and characterization of a putative transducer of endoplasmic reticulum stress in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.*, 2002; 43: 532–539.
- [91] Palavan-Unsal N., Buyuktuncer E.-D., Tufekci M.A.: Programmed cell death in plants. *J. Cell Mol. Biol.*, 2005; 4: 9–23.
- [92] Pan L., Kawai M., Yu L.H., Kim K.M., Hirata A., Umeda M., Uchimiya H.: The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS Lett.*, 2001; 508: 375–378.
- [93] Patel S., Dinesh-Kumar S.: *Arabidopsis* ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, 2008; 4: 20–27.
- [94] Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B.: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005; 122: 927–939.
- [95] Paul J.-Y., Becker D. K., Dickman M. B., Harding R. M., Khanna H. K., Dale J. L.: Apoptosis-related genes confer resistance to *Fusarium* wilt in transgenic 'Lady Finger' bananas. *Plant Biotechnol. J.*, 2011; 9: 1141–1148.
- [96] Piszczek E., Gutman W.: Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants. *Acta Physiol. Plant.*, 2007; 29: 391–398.
- [97] Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M. T.: Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1813: 238–259.
- [98] Prochazkova D., Wilhelmova N.: Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric. Oxide. Biol. Chem.*, 2011; 24: 61–65.
- [99] Qiao J., Mitsuhara I., Yazaki Y., Sakano K., Gotoh Y., Miura M., Ohashi Y.: Enhanced resistance to salt, cold and wound stresses by overproduction of animal cell death suppressors Bcl-xL and Ced-9 in tobacco cells - their possible contribution through improved function of organelle. *Plant Cell Physiol.*, 2002; 43: 992–1005.
- [100] Qu X., Yu J., Bhagat G., Furuya N., Hibshoosh H., Troxel A., Rosen J., Eskelinen E.L., Mizushima N., Ohsumi Y., Cattoretti G., Levine B.: Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1809–1820.
- [101] Ring G., Khoury C.M., Solar A.J., Yang Z., Mandato C.A., Greenwood M.T.: Transmembrane protein 85 from both human (TMEM85) and yeast (YGL231c) inhibit hydrogen peroxide mediated cell death in yeast. *FEBS Lett.*, 2008; 582: 2637–2642.
- [102] Rojo E., Martin R., Carter C., Zouhar J., Pan S., Plotnikova J., Jin H., Paneque M., Sa J., Baker B., Ausubel F.M., Raikhel N.V.: VPEg exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr. Biol.*, 2004; 14: 1897–1906.

- [103] Rong Y.P., Aromolaran A.S., Bultynck G., Zhong F., Li X., McColl K., Matsuyama S., Herlitz S., Roderick H.L., Bootman M. D., Mignery G. A., Parys J.B., De Smedt H., Distelhorst C.W.: Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol. Cell*, 2008; 31: 255–265.
- [104] Rose T.L., Bonneau L., Der C., Marty-Mazars D., Marty F.: Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol. Cell.*, 2006; 98: 53–67.
- [105] Rudnicka K. W., Szczesna E., Miszczyk E., Mikołajczyk-Chmiele M.: Apoptoza i autofagia – mechanizmy i metody detekcji. *Post. Biol. Kom.*, 2011; 38: 247–265.
- [106] Rupinder S.K., Gurpreet A.K., Manjeet S.: Cell suicide and caspases. *Vascul. Pharmacol.*, 2007; 46: 383–393.
- [107] Sato R., Hanada M., Bodrug S., Irie S., Iwama N., Boise L.H., Thompson C.B., Golernis E., Fong L., Wang H.G., Reed J.C.: Interactions among members of the bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 9238–9242.
- [108] Schweichel J.U., Merker H.J.: The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 1973; 7: 253–266.
- [109] Scorrano L., Korsmeyer S.J.: Mechanism of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 437–444.
- [110] Seay M., Patel S., Dinesh-Kumar S. P.: Autophagy and plant innate immunity. *Cell. Microbiol.*, 2006; 8: 899–906.
- [111] Shemarova I.V.: Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes. *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B*, 2010; 155: 341–353.
- [112] Shimizu S., Ide T., Yanagida T., Tsujimoto Y.: Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 12321–12325.
- [113] Shoshan-Barmatz V., Keinan N., Zaid H.: Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2008; 40: 183–191.
- [114] Smith C.C.T., Yellon D.M.: Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J. Cell. Mol. Med.*, 2011; 15: 1797–1806.
- [115] Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórki. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 420–428.
- [116] Subramanian S., Steer C.J.: MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, 2010; 223: 289–298.
- [117] Suomeng D., Zhengguang Z., Xiaobo Z., Yuanchao W.: Mammalian pro-apoptotic bax gene enhances tobacco resistance to pathogens. *Plant Cell Rep.*, 2008; 27: 1559–1569.
- [118] Suzuki K., Ohsumi Y.: Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 2007; 58: 2156–2161.
- [119] Takahashi Y., Tateda C.: The functions of voltage-dependent anion channels in plants. *Apoptosis*, 2013; 18: 917–924.
- [120] Tata J.R.: Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol.*, 1966; 13: 77–94.
- [121] Tateda C., Yamashita K., Takahashi F., Kusano T., Takahashi Y.: Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death. *Plant Cell Rep.*, 2009; 28: 41–51.
- [122] Thompson A.R., Doelling J.H., Suttangkakul A., Vierstra R.D.: Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol.*, 2005; 138: 2097–2110.
- [123] Tsujimoto Y., Shimizu S.: Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, 2007; 12: 835–840.
- [124] Ullman E., Fan Y., Stawowczyk M., Chen H., Yue Z., Zong W.: Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ.*, 2008; 15: 422–425.
- [125] Vacca R.A., Valenti D., Bobba A., de Pinto M.C., Merafina R.S., De Gara L., Passarella S., Marra E.: Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco Bright-Yellow 2 cells. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 917–922.
- [126] Vacca RA, Valenti D, Bobba A, Merafina RS, Passarella S, Marra E.: Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiol.*, 2006; 141: 208–219.
- [127] Van Doorn W. G., Woltering E. J.: Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.*, 2005; 10: 117–122.
- [128] van Doorn W. G., Woltering E. J.: What about the role of autophagy in PCD? *Trends Plant Sci.*, 2010; 15: 361–362.
- [129] van Doorn W.G.: Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J. Exp. Bot.*, 2011; 62: 4749–4761.
- [130] van Doorn W.G., Beers E.P., Dangel J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L.A.J., Petersen M., Smertenko A., Taliany M., VanBreusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P.V.: Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.*, 2011; 18: 1241–1246.
- [131] Vianello A., Zancani M., Peresson C., Petrusa E., Casolo V., Krajňáková J., Patui S., Braidot E., Marci F.: Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiol. Plant.*, 2007; 129: 242–252.
- [132] Wang H., Li J., Bostock R.M., Gilchrist D.G.: Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*, 1996; 8: 375–391.
- [133] Wang J., Bayles K.W.: Programmed cell death in plants: lessons from bacteria? *Trends Plant Sci.*, 2013; 18: 133–139.
- [134] Wang W., Pan J., Zheng K., Chen H., Shao H., Guo Y., Bian H., Han N., Wang J., Muyuan Zhu M.: Ced-9 inhibits Al-induced programmed cell death and promotes Al tolerance in tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 383: 141–145.
- [135] Wang, C., Youle, R.J.: The role of mitochondria in apoptosis. *Ann. Rev. Genet.*, 2009; 43: 95–118.
- [136] Wierzychowiecka M., Samardakiewicz S., Woźny A.: Programowana śmierć komórki roślinnej - Proces o „wielu twarzach”. *Kosmos*, 2008. 57: 43–52.
- [137] Wilkins K.A., Poulter N.S., Franklin-Tong V.E.: Taking one for the team: self-recognition and cell suicide in pollen. *J. Exp. Bot.*, 2014; 65 Special Issue: 1331–1342.
- [138] Williams B., Kabbage M., Britt R., Dickman M.B.: AtBAG7, an *Arabidopsis* Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 6088–6093.
- [139] Wojciechowska M.: Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin. *Post. Biol. Kom.*, 2001; 28: 317–333.
- [140] Xu M. J., Dong J. F.: Enhancing terpenoid indole alkaloid production by inducible expression of mammalian Bax in *Catharanthus roseus* cells. *Sci. China Ser. C-Life Sci.*, 2007; 50: 234–241.
- [141] Xu P., Rogers S.J., Roossinck M.J.: Expression of antiapoptotic genes bcl-xl and ced-9 in tomato enhances resistance to viral-induced necrosis and abiotic stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 15805–15810.

- [142] Xu Q., Reed J.C.: Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell*, 1998; 1: 337–346.
- [143] Yamada, T., Ichimura, K., Kanekatsu, M., van Doorn, W.G.: Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence of *Ipomoea nil* petals. *Plant Cell Physiol.*, 2009; 50: 610–625.
- [144] Yang H., Yang S., Li Y., Hua J.: The Arabidopsis BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol.*, 2007; 145: 135–146.
- [145] Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., Qin Z.H.: Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005; 26: 1421–34.
- [146] Yang Z., Khoury C., Jean-Baptiste G., Greenwood M.T.: Identification of mouse sphingomyelin synthase 1 as a suppressor of Bax-mediated cell death in yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2006; 6: 751–762.
- [147] Yao N., Eisfelder B.J., Marvin J., Greenberg J.T.: The mitochondrion - an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2004; 40: 596–610.
- [148] Yoshinaga K., Arimura S.-i., Hirata A., Niwa Y., Yun D.-J., Tsutsumi N., Uchimiya H., Kawai-Yamada M.: Mammalian Bax initiates plant cell death through organelle destruction. *Plant Cell Rep.*, 2005; 24: 408–417.
- [149] Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A.J., Heintz N.: Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 15077–15082.
- [150] Yun L. J., Chen W. L.: SA and ROS are involved in methyl salicylate-induced programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*, 2011; 30: 1231–1239.
- [151] Zhou F., Yang Y., Xing D.: Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.*, 2011; 278: 403–413.