

KRZYSZTOF J. RAKOWSKI

**ROLA AKTYWNOŚCI AUTOLITYCZNEJ W PROCESACH RÓŻNICOWANIA
KOMÓRKOWEGO ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM
RÓŻNICOWANIA TKANEK WASKULARNYCH U ROŚLIN**

**ROLE OF AUTOLYTIC ACTIVITY IN CELL DIFFERENTIATION
WITH EMPHASIS TO PLANT VASCULAR TISSUE**

Rola autolizy w procesach różnicowania komórkowego

Procesy autolityczne, występujące w świecie organizmów roślinnych i zwierzęcych, dotyczą głównie trzech grup zjawisk:

- 1) rozkładu substancji i organelli komórkowych uczestniczących w metabolizmie,
- 2) trawienia przez komórkę jej najbliższego otoczenia,
- 3) hydrolizy własnej treści komórkowej w czasie funkcjonalnego różnicowania lub starzenia.

Wymienione procesy zachodzą na skutek działania enzymów hydrolitycznych. W komórkach zwierzęcych enzymy te zlokalizowano w obłonionych strukturach komórkowych (lizosomach) [8, 9, 31]. Natomiast w komórkach roślinnych enzymy te pierwotnie wykryto w sferosomach [2, 25, 37, 50, 51], a następnie w wakuolach, co doprowadziło do utożsamienia tych składników protoplastu komórki roślinnej z aparatem lizosomalnym komórek zwierzęcych [4, 23, 24, 26]. Aktywność enzymów hydrolitycznych wykryto ponadto w pęcherzykach, które uważano za pochodne endoplazmatycznego retikulum i aparatu Golgiego. Wydaje się jednak, że stanowią one stadium przejściowe w procesie tworzenia lizosomów i wakuoli [5, 33, 34, 38, 39, 40, 55].

W obrocie metabolicznym składników komórkowych, proces eliminacji części lub całych organelli polega na wytworzeniu, w pierwszej fazie, wakuoli autofagalnej czyli na otoczeniu całej organelli, jej części, lub obszaru cytoplazmy błoną cytoplazmatyczną, a w drugiej fazie na połączeniu ukształtowanej w ten sposób wakuoli z lizosomem pierwotnym, zawierającym enzymy hydrolityczne. W wyniku fuzji tych dwóch kompartmentów powstaje lizosom wtórny zwany autofagosomem [11, 12], w którym zachodzi degradacja odsegregowanych struktur cytoplazma-

tycznych [8]. W odniesieniu do komórek roślinnych przeważa pogląd, że obok mechanizmu opisanego wyżej, w procesie autolizy elementy cytoplazmatyczne włączane są do istniejącej już wakuoli zawierającej enzymy hydrolityczne i tam podlegają trawieniu [23, 24, 32]. Proces izolowania i trawienia obcych dla komórki struktur przebiega prawdopodobnie w sposób bardzo podobny do opisanego powyżej rozkładu elementów komórkowych.

Trawienie przez komórkę składników najbliższego otoczenia zachodzi głównie na drodze egzocytozy, w wyniku której pęcherzyki cytoplazmatyczne zawierające enzymy hydrolityczne przemieszczają się do plazmalemy i po połączeniu się z nią, wydzielają swoją zawartość poza obręb komórki. Dzięki występowaniu tego procesu wydzielniczego, rosnące intruzywnie wierzchołki komórek kambium, włókien drzewnych lub różnicujących się naczyń mogą rozkładać blaszki środkowe sąsiadujących komórek, co umożliwi powiększanie rozmiarów tych elementów [6, 18, 19, 20]. Podobny mechanizm leży też u podstaw procesu hydrolizy ściany komórkowej różnicujących się elementów drewna, wytwarzania się perforacji w ścianie łączącej człony naczyń [28, 35, 36], oraz wzrostu i różnicowania latyciferów [53]. Także przebudowa porów w płytach sitowych przewodzących komórek floemu uwarunkowana jest wydzielaniem enzymów hydrolitycznych wytworzonych w cytoplazmie [14]. Enzymy hydrolityczne mogą być też wydzielane poza obręb organizmu, jednak wówczas trawieniu nie ulegają własne tkanki, lecz ciała obce. Ten typ trawienia nie ma charakteru autolizy i w związku z tym nie będzie omawiany.

Procesy prowadzące do śmierci komórki w wyniku jej funkcjonalnego różnicowania lub starzenia, są u roślin często spotykane. W procesie starzenia się lub różnicowania komórki, elementy protoplazmatyczne mogą być sukcesywnie trawione w centralnej wakuoli [27, 58]. Jednak całkowita hydroliza treści komórkowej w czasie funkcjonalnego różnicowania zachodzi najczęściej po rozpadzie błony wakuolarnej, w wyniku czego następuje wyeksponowanie cytoplazmy na działanie enzymów trawiących znajdujących się w soku komórkowym. Opisanie procesy występują w czasie różnicowania się komórek czapeczki korzenia [3, 4, 15, 23, 24, 57]. Także tworzenie się lizogenicznych zbiorników i przewodów wydzielniczych [20] oraz funkcjonalne różnicowanie się pochodnych kambium na elementy waskularne ksylemu zachodzi w podobny sposób [56].

Rola autolizy w różnicowaniu tkanek waskularnych u roślin

Różnicowanie elementów komórkowych drewna i łyka wtórnego, realizowane jest w kilku fazach, które można stosunkowo łatwo zlokalizować, za pomocą mikroskopu świetlnego, na przekroju poprzecznym i promieniowym regionu kambialnego pnia drzewa. Fazom różnicowania komórek ksylemu odpowiada strefowe zróżnicowanie strukturalne [52]. Analogiczne strefowe zróżnicowanie we floemie jest trudne do zaobserwowania ze względu na niewielką liczbę komórek znajdujących w poszczególnych fazach dyferencjacji.

Cykl rozwojowy komórek ksylemu i floemu rozpoczyna się od podziałów peryklinarnych komórki inicjalnej i komórek macierzystych tworzących strefę kambialną. Pochodne kambium różnicując się na drewno i lyko, w następnej fazie rozwojowej powiększają swoje rozmiary w kierunku promieniowym tworząc strefę wzrostu promieniowego. Elementy komórkowe, kończące proces wzrostu promieniowego, rozpoczynają fazę maturacji, która w przypadku cewek drewna obejmuje wytworzenie ściany wtórnej i jamek otoczkowych oraz, w końcowym etapie, autolizę protoplastu [54], poprzedzoną rozpadem błony wakuolarnej [56]. Natomiast w wypadku komórek i rurek sitowych, faza maturacji obejmuje wykształcenie ściany wtórnej z polami sitowymi, zanik jądra, rozpad tonoplastu oraz uformowanie się charakterystycznych pasm cytoplazmatycznych [13]. W tym przypadku jednak autoliza nie zachodzi natychmiast, a komórka przewodząca lyka trwa przez dłuższy czas w stadium myktoplazmy rozumianej jako mieszanina cytoplazmy podstawowej zawierającej śluz oraz soku komórkowego [10]. Przyczyny tej różnicy w realizacji ostatniej fazy maturacji cewek drewna i komórek sitowych lyka nie są znane. Brak autolizy w przypadku różnicowania się komórek sitowych może wskazywać, że wakuole elementów przewodzących lyka nie zawierają enzymów autolitycznych lub że je posiadają, lecz występuje w nich jednocześnie czynnik zabezpieczający cytoplazmę przed rozkładem i umożliwiający pozostawanie jej w stanie myktoplazmy. Czynnikiem takim może być inhibitor blokujący aktywność autolityczną.

Badania aktywności autolitycznej proteaz we floemie *Pinus silvestris* wykazały występowanie tego typu enzymów w komórkach lyka [43]. Jednocześnie te same badania wykazały występowanie w komórkach floemu białkowego inhibitora silnie hamującego autolityczną aktywność kwaśnych proteaz ekstrahowanych z różnicującego się drewna sosny. Ten wynik wydaje się być szczególnie interesujący ze względu na brak informacji dotyczących występowania inhibitorów kwaśnych proteinaz u roślin [49]. Wydaje się być bardzo prawdopodobne, że wykryty inhibitor białkowy spełnia funkcję zabezpieczania własnych białek komórki sitowej przed autolityczną aktywnością kwaśnych proteaz, zwłaszcza w momencie kształtowania się myktoplazmy po rozpadzie błony wakuolarnej. Możliwość ochronnej roli inhibitorów proteaz brali także pod uwagę inni badacze przypisując im funkcję zabezpieczania białek cytoplazmatycznych przed niekontrolowaną autolizą [1, 22, 47].

Inna funkcja takiego inhibitora może polegać także na ochronie komórek lyka przed działaniem kwaśnych proteaz organizmów patogenicznych lub owadów. Na taką możliwość wskazują wyniki innych doświadczeń, w których obserwowano pojawienie się inhibitorów proteaz w miejscu zaatakowania rośliny przez patogena lub w miejscu zranienia [7, 16, 17, 30, 45, 59].

Brak analogicznego inhibitora w różnicującym się drewnie umożliwia nieograniczoną autolizę protoplastów elementów przewodzących w końcowej fazie ich maturacji.

Jednocześnie, obserwowane występowanie autolitycznych proteaz we wszystkich strefach różnicowania ksylemu [43, 44], wskazuje na możliwość udziału tych enzymów w procesach obiegu substancji i struktur komórkowych w poszczególnych

fazach rozwojowych komórek drewna. W końcowej autolizie protoplastu różnicujących się elementów waskularnych drewna, ich rola wydaje się być bardziej specyficzna dla ksylogenezy. Jednak występowanie podobnych enzymów także w łyku stwarza potrzebę przebadania ich też w innych systemach tkanek miękkich, by zdecydować o stopniu ich specyficzności.

Wielu badaczy wskazuje na możliwość hormonalnej indukcji lub aktywacji proteaz i innych enzymów uczestniczących w autolizie w różnych fazach rozwojowych komórki [21, 29, 41, 42, 46, 48, 60], oraz na możliwość hormonalnej regulacji nagromadzenia się lub zaniku inhibitorów proteaz [45]. Wyniki badań z zastosowaniem syntetycznej auksyny (IAA) [43, 44, 61] wskazują, że obecność auksyny może być czynnikiem decydującym o występowaniu autolitycznej aktywności proteaz w komórkach różnicującego się drewna. Natomiast obserwowana korelacja między poziomem aktywności proteolitycznej a występowaniem podziałów w strefie kambialnej może nie mieć charakteru przyczynowego, lecz może być spowodowana uzależnieniem tych dwóch procesów od wspólnego mechanizmu regulacji epigenetycznej związanego z auksyną.

LITERATURA

- [1] Baumgartner B., Chrispels M. J., 1976. Partial characterization of a proteinase inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. *Plant Physiol.* 58, 1—6.
- [2] Beneš K., Lojda Z., Horavka B., 1961. A contribution to the histochemical demonstration of some hydrolytic and oxydative enzymes in plants. *Histochemie* 2, 313—321.
- [3] Berjak P., 1968. A lysosome-like organelle in root cap of *Zea mays*. *J. Ultrastr. Research* 23, 233—242.
- [4] Berjak P., 1972. Lysosomal compartmentation: ultrastructural aspects of the origin, development and function of vacuoles in root cells of *Lepidium sativum*. *Ann. Bot.* 36, 73—81.
- [5] Brandes D., Bertini F., 1964. Role of Golgi apparatus in the formation of cytolysosomes. *Exptl. Cell Res.* 35, 194—217.
- [6] Charvat I., Esau K., 1975. An ultrastructural study of acid phosphatase localization in *Phaseolus vulgaris* xylem by the use of an azo-dye method. *J. Cell Sci.* 19, 543—561.
- [7] Clevelan T. E., Black L. L., 1982. Partial purification of proteinase inhibitor from wounded tomato plants. *Plant Physiol.* 69, 537—542.
- [8] De Duve C., 1969. The lysosomes in retrospect. W: *Lysosomes in biology and pathology*. Dingle J. T., Fell M. B. (ed.), str. 3—40. North-Holland, Amsterdam—London.
- [9] De Duve C., Wattiaux R., 1966. Function of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435—492.
- [10] Engelman E. M., 1965. Sieve element of *Impatiens sultani*. 2. Developmental aspects. *Ann. Bot.* 29, 103—118.
- [11] Ericson J. L. E., 1969. Mechanism of cellular autophagy. W: *Lysosomes in biology and pathology*. Dingle J. T., Fell H. B. (ed.), str. 345—394. North-Holland, Amsterdam—London.
- [12] Ericson J. L. E., Trump B. F., 1964. Electron microscopic studies of the epithelium of proximal tubule of the rat kidney. I. The intracellular localization of acid phosphatase. *Lab. Invest.* 13, 1427—1456.
- [13] Esau K., 1973. *Anatomia roślin*. Przekład pod red. H. Teleżyńskiego. PWRiL, Warszawa.
- [14] Esau K., Charvat I. D., 1975. An ultrastructural study of acid phosphatase localization in cells of *Phaseolus vulgaris* phloem by the use of aso-dye method. *Tissue & Cell.* 7 (4), 619—630.
- [15] Gahan P. B., Maple A. J., 1966. The Behaviour of lysosome-like particles during cell differentiation. *J. Exp. Bot.* 17, 151—155.

- [16] Green T. R., Ryan C. A., 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, vol. 175.
- [17] Green T. R., Ryan C. A., 1973. Wound-induced proteinase inhibitor in tomato leaves. Some effects of light and temperature in wound response. *Plant Physiol.* 51, 19—21.
- [18] Hejnowicz Z., 1963. Wzrost intruzywny, podziały poprzeczne i skośne we wrzecionowatych komórkach inicjalnych zranionej miazgi modrzewia. *Acta Soc. Bot. Pol.* 32, 493—503.
- [19] Hejnowicz Z., 1967. Interrelationships between cell length, rate of intrusive elongation, frequency of anticlinal divisions and survival of fusiform initials in cambium. *Acta Soc. Bot. Pol.* 36, 367—378.
- [20] Hejnowicz Z., 1973. *Anatomia rozwojowa drzew*. PWN, Warszawa.
- [21] Jacobsen J. V., Varner J. E., 1967. Gibberellic acid — induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant. Physiol.* 42, 1596—1600.
- [22] Katunuma N., Wakamatsu N., Takio K., Titani K., Kominami E., 1983. Structure, function and regulation of endogenous thiol proteinase inhibitors. W: *Proteinase inhibitors — medical and biological aspects*. Katunuma N., Umezawa H., Holzer H. (ed.), 135—145. Japan Scientific Societies Press Tokyo. Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York—Tokyo.
- [23] Matile Ph., 1969. Vacuoles as lysosomes of plant cells. *Biochem. J.* 111, 26—27.
- [24] Matile Ph., 1969. Plant lysosomes. W: *Lysosomes in biology and pathology*. Dingle J. T., Fell H. B. (ed.), 406—430. North-Holland, Amsterdam—London.
- [25] Matile Ph., 1968. Lysosomal enzymes in spherosomes (oil droplets) of tobacco endosperm. *Zeitschrift für pflanzenphysiologie.* 58 (3), 277—280.
- [26] Matile Ph., Wiemken A., 1967. The vacuole as the lysosomes of the yeast cell. *Archiv. für Mikrobiologie.* 56, 148—155. North-Holland, Amsterdam—London.
- [27] Matile Ph., Winkenbach F., 1971. Function of lysosomes and lysosomal enzymes in the senescing corolla of the morning glory (*Ipomea purpurea*). *J. Exp. Botany.* 22 (73), 759—771.
- [28] Meylan B. A., Butterfield B. G., 1981. Perforation plate differentiation in the vessels of hardwoods. W: *Xylem cell development*. Barnett J. R. (ed.), 96—114. Castle House Publications LTD.
- [29] Mikola J., Kolehmainen L., 1972. Localization and activity of various peptidases in germinating barley. *Planta (Berl.)*. 104, 167—177.
- [30] Mosolov V. V., Loginova M. D., Fedurkina N. V., Benken I. I., 1976. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. *Plant Science Letters.* 7, 77—80.
- [31] Novikoff A. B., 1961. Lysosomes and related particles. W: *The cell*. Vol. 2. J. Brachet, A. E. Mirsky (ed.), New York and London, Academic Press. 423—488. Wg De Dive (1969). W: *Lysosomes in biology and pathology*. Dingle J. T., Fell H. B. (ed.), str. 18. North-Holland, Amsterdam—London.
- [32] Novikoff A. B., Essner E., 1962. Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J. Cell Biol.* 15, 140—146.
- [33] Novikoff A. B., Essner E., Quintana N., 1964. Wg Cohn Z. A., Fedorko M. E. (1969). The formation and fate of lysosomes. W: *Lysosomes in biology and pathology*. Dingle J. T., Fell H. B. (ed.), 43—63. North-Holland, Amsterdam—London.
- [34] Novikoff A. B., Shin W. Y., 1964. The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagy vacuoles in rat liver cell. *J. Microscopie.* 3, 187—206.
- [35] O'Brien T. P., 1970. Further observations on hydrolases of the cell wall in the xylem. *Protoplasma.* 69, 1—14.
- [36] O'Brien T. P., Thimann K. V., 1967. Observations on the fine structure of the oat coleoptile. III. Correlated light and electron microscopy of vascular tissues. *Protoplasma.* 63, 443—478.
- [37] Olszewska M. J., Gabara B., 1964. Recherches cytochimiques sur la presence de certaines hydrolases au cours de la cytcinese chez les plantes superieurs. *Protoplasma.* 59, 163—179.
- [38] Poux N., 1952. Nouvelles observations sur la nature et l'origine de la membrane vacuolaire des cellules vegetales. *J. Microscopie.* 1, 55—66.
- [39] Poux N., 1970. Localisation d'activités enzymatiques dans le meristeme radiculaire de *Cucumis sativus* L. III. Activite phosphatique acide. *J. Microscopie.* 9, 407—434.

- [40] Poux N., 1973. Localisation d'activités enzymatiques en microscopie électronique application aux cellules végétales. *Annales Université et A.R.E.R.S.* 11, 81—94.
- [41] Penner D., Ashton F. M., 1967. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 42, 791—796.
- [42] Preston K. R., Kruger J. E., 1979. Physiological control of exo- and endoproteolytic activities in germinating wheat and their relationship to storage protein hydrolysis. *Plant Physiol.* 64, 450—454.
- [43] Rakowski K. J., 1987. Aktywność proteolityczna w rejonie kambialnym *Pinus silvestris* L. jako element specyfiki różnicowania drewna i łyka. Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Botaniki Leśnej, SGGW-AR w Warszawie.
- [44] Rakowski K., Wodzicki T. J., 1980. IV. Proteolytic activity in stem cambial region of pine. W: Natural regulators of seasonal cambial activity and xylem differentiation. Final technical report period: January 1, 1975 to December 31, 1980. Grant No: FG-Po-317.
- [45] Ryan C. A., 1968. Synthesis of chymotrypsin inhibitor I protein in potato leaflets induced by detachment. *Plant Physiol.* 43, 1859—1865.
- [46] Ryan C. A., 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24, 173—196.
- [47] Salmia M. A., 1980. Inhibitors of endogenous proteinases in scots pine seeds: fractionation and activity changes during germination. *Physiol. Plant.* 48, 266—270.
- [48] Schoerper R. L., Burger W. C., 1978. Development and localization of carboxypeptidase activity in embryo-less barley half-kernels. *Plant Physiol.* 62, 458—462.
- [49] Urbanek H., 1987. Rola enzymów w interakcji roślina wyższa — patogen. *Wiad. Bot.* 31 (1), 15—28.
- [50] Wałek-Czernecka A., 1962. Miss en evidence de la phosphatase acide (monophosphoesterase II) dans les spherosomes des cellules des écailles bulbaires d'*Alium cepa*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 31, 539—543.
- [51] Wałek-Czernecka A., 1965. The histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in spherosomes of plant cell. *Acta Soc. Bot. Pol.* 34, 573—588.
- [52] Wilson B. F., Wodzicki T. J., Zahner R., 1966. Differentiation of cambial derivatives: proposed terminology. *Forest Science.* 12 (4), 438—440.
- [53] Wilson K. J., Nessler C. L., Mahlberg P. G., 1976. Pectinase in asclepias latex and its possible role in laticifer growth and development. *Amer. J. Bot.* 63 (8), 1140—1144.
- [54] Wodzicki T. J., 1971. Mechanism of xylem differentiation in *Pinus silvestris* L. *J. Exp. Bot.* 22 (71), 670—687.
- [55] Wodzicki T. J., 1974. Powstawanie i rozwój wakuoli w komórkach roślinnych. *Wiad. Bot.* 18 (2), 101—109.
- [56] Wodzicki T. J., Brown C. L. 1973. Organization and breakdown of protoplasts in maturing pine tracheids. *Amer. J. Bot.* 60 (7), 631—640.
- [57] Wodzicki T. J., Brown C. L., 1974. Cytoplasmic segregation in onion root tip cells and formation of vacuoles. *Acta Soc. Bot. Pol.* 43 (4), 541—547.
- [58] Wodzicki T. J., Humphreys W. J., 1972. Cytodifferentiation of maturing pine tracheids: the final stage. *Tissue & Cell.* 4 (3), 525—528.
- [59] Wong P. P., Kuo T., Ryan C. A., 1976. Different accumulation of proteinase inhibitor I in normal and crown gall tissue of tobacco, tomato and potato. *Plant Physiol.* 57, 214—217.
- [60] Wright S. T. C., 1963. Cellular differentiation at the molecular level with special reference to proteins. *Symposia of the Society for Experimental Biology.* No. XVII. Cell differentiation. 18—39. Cambridge Univ. Press. Great Britain.
- [61] Zakrzewski J., Rakowski K., 1987. The effect of cambial zone isolation upon the autolytic system in maturing tracheids of pine (*Pinus silvestris* L.). *Acta Soc. Bot. Pol.* 56 (3), 399—405.

Dr Krzysztof J. Rakowski
Katedra Botaniki Leśnej
SGGW-AR w Warszawie
ul. Rakowiecka 26/30
02-528 Warszawa