

Streszczenie

Proces PCD (programowana śmierć komórki) jest integralnym zjawiskiem wzrostu i rozwoju wszystkich organizmów, zarówno roślinnych, zwierzęcych, jak i jednokomórkowych. W przypadku roślin nie określono jednoznacznej klasyfikacji procesów PCD. Jednakże, wiadomo, że podobnie jak u organizmów zwierzęcych, śmierć komórkowa organizmów roślinnych może być wywołana czynnikami egzogennymi i/lub endogennymi.

W odniesieniu do organizmów roślinnych, grupą czynników mogącą zapoczątkować proces śmierci komórkowej są hormony roślinne, głównie należące do grupy cytokinin oraz etylen. Szereg badań przeprowadzonych w tym zakresie z wykorzystaniem modelowego układu badawczego jakim są 2-cm apikalne fragmenty korzeni siewek *Vicia faba* ssp. *minor* wskazuje, że jedna z naturalnych cytokinin – kinetyna – jest czynnikiem wywołującym specyficzne przejawy programowanej śmierci komórkowej, gdzie etylen i ROS (reaktywne formy tlenu) mogą być jednymi z wtórnych przekazników sygnału.

W badaniach niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano inhibitory receptcji etylenu takie jak STS (tiosiarcezan srebra) i NBD (2,5-norbornadien) oraz opracowano układ eksperymentalny, w którym materiał hodowano w warunkach kontrolnych i po działaniu kinetyny oraz po działaniu z tymi inhibitorami bez kinetyny, jak i z kinetyną.

Analizy przeprowadzono na kilku płaszczyznach organizacji struktury, funkcji i metabolizmu komórki z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych, spektrofluorometrycznych, mikroskopowych, ze szczególnym uwzględnieniem mikroskopii fluorescencyjnej, a także elektronowej.

Potwierdzono, że KIN (kinetyna) indukuje programowaną śmierć komórek kory pierwotnej korzeni siewek bobiku (KIN-PCD), co prowadzi do powstania przestworów aerenchymatycznych. Wielkość tych przestworów zależy od czasu wzrostu siewek w środowisku z kinetyną, przy czym 72 godzina jest kulminacyjna dla tego procesu.

Dowodzono, że KIN-PCD przejawia się tworzeniem wakuol litycznych, kondensacją chromatyny, ze szczególnym uwzględnieniem kondensacji heterochromatyny oraz wzrostem aktywności kinaz histonów korowych i spadkiem aktywności kinaz histonu H1, wzrostem aktywności kwaśnych fosfataz i aktywności nukleaz/DNaz kwaśnych i zasadowych, aktywności deaminazy ACC, aktywności CAT (katalazy), SOD (dysmutazy ponadtlenkowe) i LDH (dehydrogenaza mleczanowa), a także wzrostem płynności błon komórkowych i wzrostem ich przepuszczalności, stopniem zakwaszenia cytoplazmy, zawartości jonów potasu i wapnia w roztworach hodowlanych, aktywności podjednostek $\beta 1$ i $\beta 5$ proteasomów 26S, całkowitej zawartości cukrów, ze szczególnym uwzględnieniem cukrów rozpuszczalnych oraz spadkiem zawartości jonów potasu i zawartości ATP (adenozyno-5'-trifosforan) w korzeniach, ogólnej aktywności proteaz i nieznaczny spadek aktywności proteaz cysteinowych i zawartości białek.

Wykazano również, że kinetyna jest zarówno induktorem, jak i inhibitorem procesu śmierci komórkowej i indukuje śmierć komórkową z udziałem elementów szlaku syntezy i receptji etylenu. Wstępnie zakładano, że etylen jest wtórnym przekaznikiem śmierci komórkowej indukowanej kinetyną i rozpoczyna ten proces poprzez nadrzędne receptory ETR1 (ang. *ethylene triple reaction 1*). Jednakże, wydaje się, że głównym czynnikiem inicjującym te

zmiany, może nie być etylen, tylko ACC (kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy) oraz elementy szlaku transdukcji sygnałów zależnych od cytokinin. Dowodzą tego wyniki badań z udziałem inhibitorów receptorów etylenu, gdzie ostateczny efekt działania STS polegał na podnoszeniu żywotności komórek, braku zmian liczby kwaśnych pęcherzyków cytoplazmatycznych przy ich większej intensywności fluorescencji, zwiększeniu zawartości białek, zawartości O_2^* , natomiast NBD w tych przypadkach zachowywał się w sposób przeciwny i nie podnosił lub obniżał żywotności komórek, zwiększał liczbę kwaśnych pęcherzyków przy ich mniejszej intensywności fluorescencji, obniżał zawartość białek i zawartość nadtlenu, natomiast podwyższał aktywność fosfataz kwaśnych oraz nukleaz/DNaz kwaśnych i zasadowych.

Dowodzono również, że kinetyna wpływa stymulująco na produkcję etylenu, który poprzez specyficzne dla niego receptory uruchamia PCD. W proces ten, w sposób bezpośredni lub pośredni, są zaangażowane jony wapnia, które są jednymi z kluczowych wtórnych przekaźników sygnałów komórkowych. Niezależnym czynnikiem odpowiedzialnym za wykorzystanie jonów wapnia w transdukcji sygnałów może być sama kinetyna, która aktywuje kanały wapniowe w ER (retikulum endoplazmatyczne), następnie jony wapnia mogą aktywować syntezę i transport z mitochondriów do cytoplazmy cytochromu *c*, którego rola w śmierci komórkowej roślin jest potwierdzona, natomiast nie jest znany mechanizm jego działania. W przypadku jonów wapnia ważne jest ich pochodzenie i prawdopodobnie kolejność ich uwalniania do cytoplazmy ze źródeł magazynowania. Wapń pochodzący ze ściany komórkowej może kontrolować szlak syntezy etylenu poprzez CDPK (kinazy zależne od jonów wapnia) i poprzez kinazy szlaku transdukcji sygnału etylenowego, a przede wszystkim przez SIMKK/SIMK/MPK6 oraz MKK4 (ang. *mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 4*)/5-MPK6.

Nie jest wykluczony udział w indukcji KIN-PCD fosfolipidów błonowych, takich jak PA (kwas fosfatydowy) i PI (fosfatydyloinozitol) oraz kwasów tłuszczowych, głównie kwasu linolowego, które mogą wpływać na regulację transdukcji sygnałów szlaku cytokininowego poprzez czynniki RR (regulator odpowiedzi) oraz regulację syntezy etylenu na poziomie syntezy ACC i jego przemiany do etylenu. Równolegle może następować modulacja sygnału z udziałem PA, który wpływa hamująco na kinazę CTR1 (ang. *constitutive triple response 1*) szlaku etylenowego o ile przyjmujemy, że uczestniczy ona w procesie indukcji śmierci komórkowej zależnej od kinetyny.

Idąc tym tokiem myślenia, w którym kinetyna jest bezpośrednim czynnikiem indukującym zdarzenia związane ze śmiercią komórkową, to należy wskazać na czynniki HP (ang. *histidine-containing phosphotransfer protein*) szlaku cytokininowego, które przenoszą sygnał z receptorów cytokininowych bezpośrednio do jądra komórkowego. Czynniki HP mogą być również wykonawcą sygnalizacji zależnej od etylenu tym samym przejawy śmierci komórkowej mogą się uwidaczniać na różnych poziomach struktury i funkcji. Dodatkowo można sugerować, że czynniki HP poprzez RR z jednej strony mogą stymulować śmierć komórkową a z drugiej strony mogą ją hamować, co zaobserwowano w badaniach z udziałem kinetyny.

Magdalena Domiak

Summary

Programmed cell death (PCD) is an integral phenomenon to both animal and plant growth and development and also to unicellular organisms. In the case of plants there is no clear classification with regard to PCD. However, it is known that PCD might be caused by both exogenous and endogenous factors. Similarly, these factors might as well cause PCD in animals.

Regarding plants, the factors that could cause PCD are plant hormones, mostly belonging to the cytokinin group or a gaseous plant hormone – ethylene. Cortex cells of 2-cm apical parts of *Vicia faba* ssp. *minor* seedlings roots have been used as a scientific model in a lot of research. The studies revealed that kinetin – a natural plant hormone, is a compound that induces specific hallmarks of PCD. What is more, ethylene and ROS (reactive oxygen species) play a role of secondary messengers in the process.

In the studies which are described in the presented PhD dissertation, inhibitors of ethylene receptors, STS (silver thiosulfate) and NBD (2,5-norbornadiene) were used. For this particular studies a new experimental set was established. There were the following experimental variants: (I) untreated, treated (II) with kinetin, (III) with inhibitors and (IV) with kinetin and inhibitors.

The studies concerned several levels of cell structure, function and metabolism. Spectrophotometric, spectrofluorimetric and white and fluorescence light microscopic as well as transmission electron microscopic methods were used.

It was confirmed that kinetin induced PCD in cortex cells of 2-cm apical parts of *Vicia faba* ssp. *minor* seedlings roots. The process led to aerenchyma spaces formation which depends on time of seedling cultivation with kinetin. The 72nd h was the climax of the KIN-PCD.

It was proved that KIN-PCD displayed specific hallmarks of the well-established PCD in plants, i.e. lytic vacuole formation, heterochromatin condensation, an increase in core and a decrease in H1 activity of histone kinases, an increase in acidic phosphatases and acidic and basic nucleases/DNases, ACC deaminase, CAT (catalases), SOD (superoxide dismutases) and LDH (lactate dehydrogenase). Moreover, the following also increased potassium and calcium ions content in cultivation mixture, plasma membrane fluidity and its permeabilisation, acidification of cytoplasm, proteasome 26S β 1 and β 5 subunit activities, total sugars content, among them soluble ones while potassium, ATP (adenosine triphosphate) as well as total activity of proteases and activity of cysteine proteases decreased in root tissue.

Kinetin was discovered to be both an inducer and inhibitor of PCD in *Vicia faba* ssp. *minor*.

It was shown that kinetin induced PCD engaging ethylene synthesis and reception pathways. Initially it was established that ethylene was a secondary messenger of KIN-PCD, as it was supposed to begin the process *via* activation of its ETR1(ethylene triple reaction 1) receptor. However, it was suggested that ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) and compounds of cytokinin signalling pathways, but not ethylene, were the main factors of KIN-PCD initiation. These facts are confirmed by the results of the presented dissertation indicating that STS enhanced cell viability. The number of cytoplasmic acidic vesicles stayed at the same level after STS treatment, however intensity of their fluorescence increased. STS increased proteins and superoxide anion content while NBD did not.

It was also proved that kinetin stimulated ethylene biosynthesis which then activated receptors and KIN-PCD pathways. Calcium ions playing direct or indirect role in the process are the crucial secondary messengers in cell signalling. Participation of calcium ions in KIN-PCD is controlled by kinetin itself because it is able to activate calcium ion channels in endoplasmic reticulum. Then these ions freed from ER lumen into cytoplasm could activate cytochrome *c* synthesis and transport from mitochondria to cytoplasm. In the case of calcium ions, it is important where they come from and the sequence of their releasing from cell compartments. Calcium ions released from a cell wall might control ethylene synthesis pathway *via* CDPK (calcium-dependent protein kinases). What is more, ethylene synthesis pathway might be controlled by ethylene transduction pathway kinases, especially SIMKK/SIMK/MPK6 or MKK4/-MPK6.

Participation of membrane phospholipids such as PA and PI or fatty acids such as linoleic acid in KIN-PCD is also implied. These compounds might control cytokinin transduction and ACC/ethylene synthesis pathways *via* RR (response regulator) factors. In the pathways of PCD, PA might negatively affect CTR1 kinase.

Following the same reasoning in which kinetin is a direct PCD inducer, it should be noted that HP (histidine-containing phosphotransfer protein) cytokinin pathway factors translocate the signal from cytoplasm into nuclei. HP factors might be executors in ethylene dependent signalling pathways thus the PCD hallmarks are revealed at different levels of cell structure and function. Additionally, it is implied that HP factors *via* RR ones might stimulate cell death on the one hand and they might inhibit the PCD on the other. Such dual activity of kinetin was observed in the presented studies.

Magdalena
Dziak