

Tudi celice umirajo, mar ne?

Marina Dermastia

»Kdo ve, ali živeti pomeni biti mrtev in biti mrtev živeti? Morda smo v resnici mrtvi; некоč sem slišal govoriti modrece, da smo zdaj mrtvi in da so naša telesa grobovi ...« (Platon: Gorgija 492e, 493a.) (Iz angleščine prevedla Marina Dermastia.)



Tlak pred cerkvijo v mestu Logroño v Španiji. Foto: Marina Dermastia.

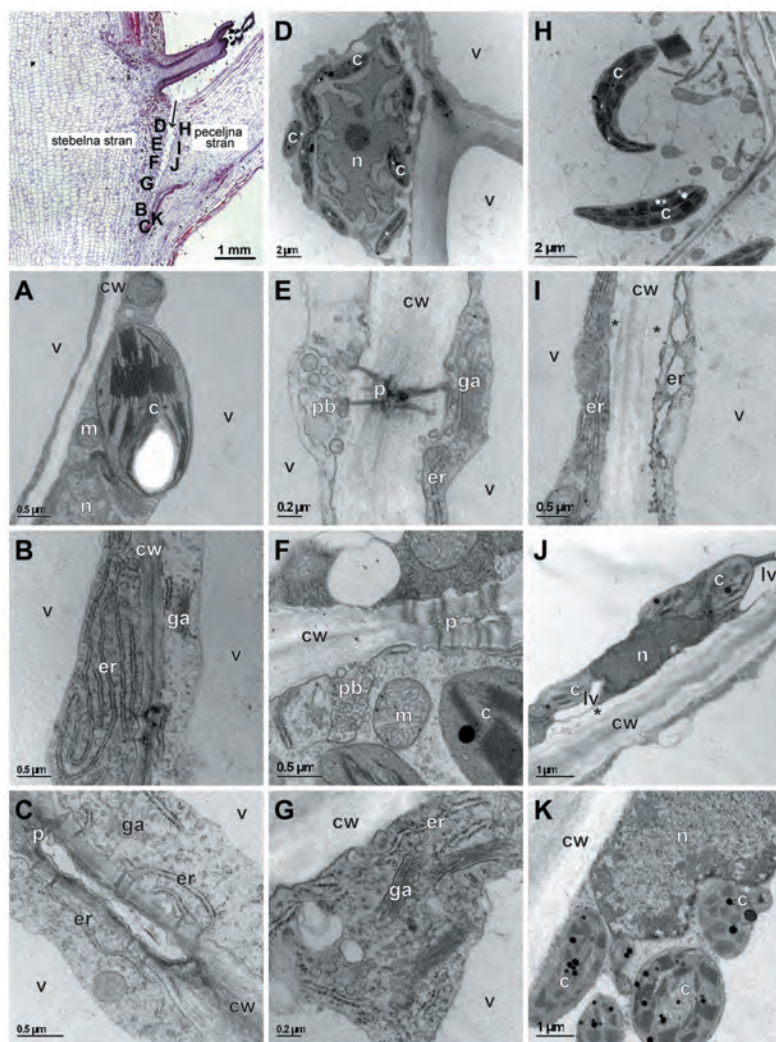
Smrt je neizbežna, a je nujen del življenja. S preučevanjem razvoja od jajčeca do odrasle živali pri modelnem organizmu - glisti *Caenorhabditis elegans* - so raziskovalci Sydney Brenner, Robert Horvitz in John Sulston ugotovili, da so nekatere celice v nekaterih razvojnih poteh razvojno predprogramirane, da bodo umrle. Za svoja odkritja genskega uravnavanja razvoja organov in programirane celične smrti so leta 2002 prejeli Nobelovo nagrado za fiziologijo oziroma medicino. Njihove raziskave so odkrile pomembne gene in beljakovine, ki jih ti geni kodirajo in so povezane s programom celične smrti.

Programirana celična smert pa ni omejena le na gliste. Tudi človeško telo se že v stopnji zarodka oblikuje z izbirnim odstranjevanjem in z nastajanjem novih celic. Po rojstvu se umiranje celic nadaljuje pri obnavljanju poškodovanih tkiv, pri odstranjevanju nevarnih celic in kot pomoč pri zaščiti pred patogenimi mikroorganizmi. Vsak dan človeško telo izdela in odstrani kar tisoč milijard celic. Seveda pa je program celičnega odstranjevanja zelo natančno uravnavan. Tudi rastlinske celice programirano umirajo kot del normalnih razvojnih programov, vključno z razvojem zarodka, razvojem prevodnih tkiv, razmnoževanjem, odpadanjem listov in plodov ter odstranjevanjem patogenov.

Apoptoza – izgubljeno s prevodom

Odpadanje zelenih in cvetnih listov ter plodov je pomemben proces v rastlinah, katerega se je v svoji znameniti knjigi *Pogled v rastline* dotaknil že starogrški filozof in »oče botanike« Teofrast. Po njegovem naj bi bilo odpadanje nujnih delov telesa pri rastlinah pomembna lastnost, ki rastline ločuje od živali. Odpadanju rastlinskih delov se v grščini reče »apoptosis« ($\alpha\pi\omicron\pi\tau\omega\sigma\iota\varsigma$). Na neki način paradokсно je izraz v živalski svet uvedel v sedemdesetih letih prejšnjega tisočletja James Cormack, profesor grškega

jezika na univerzi v Aberdeenu na Škotskem. Predlagal ga je raziskovalcem Kerrju, Wyllieju in Currieju z iste univerze, ki so kot prvi opisali različne vrste živalskih celic, umrlih na programirani način. Apoptoza, tako kot je opisana, ne ustreza več odpadanju rastlinskih delov. Namesto apoptoza odpadanju danes strokovno rečemo abscizija. V živalski celici je apoptoza proces celične smrti z značilnimi spremembami. Te se začnejo v jedru celice s kondenziranjem kromatina in cepitvijo DNA na posamezne dele, konča pa z odcepljanjem mehurčkov celič-



Ultrastrukture spremembe v celicah abscizinskega območja paradiznikovega lista. Mikrografija je posneta pod transmissijskim elektronskim mikroskopom. Položaj celic v tkivu je označen na sliki, posneti pod svetlobnim mikroskopom, v zgornjem levem kotu; puščica označuje smer ločitvene razpoke med listom in stebлом. Oznake organelov: c - kloroplast; cw - celična stena; er - endoplazemski retikel; ga - Golgijev aparat; lv - litična vakuola; m - mitohondrij; n - jedro; p - plazmodezme; v - vakuola. (A) - kontrola, (B) do (G) - stebelna stran abscizinskega območja, (H) do (J) - listna stran abscizinskega območja z izrazitimi znamenji programirane celične smrti. *The Plant Cell*, 23: 4146-4163; z dovoljenjem www.plantphysiol.org or www.plantcell.org. Copyright American Society of Plant Biologists.

ne membrane, v katerih je zapakirana snov mrtve celice. Mehurčke obdajo in vsebino nato predelajo sosednje, lahko tudi imunske celice. Odcepljanje mehurčkov s površine ni možno pri rastlinskih celicah, saj jim to onemogoča celična stena, ki obdaja celično membrano. Program apoptoze v rastlinskih celicah zato ne poteka, a določeni dejavniki, ki so vključeni v proces, delujejo tudi v rastlinski celici. Apoptozo sprožijo različni znotrajcelični in zunajcelični signali. Ne glede na sprožilec pa so v proces vedno vključene beljakovine kaspaze. Te neposredno razgrajujejo celične beljakovine in posredno deaktivirajo zaviralce (inhibitorje) celične smrti.

Podobnosti in razlike rastlinske programirane celične smrti z apoptozo

Čeprav je naše vedenje o rastlinski programirani celični smrti še zelo nepopolno, pa je bil prvi primer programirane celične smrti sploh opisan že davnega leta 1923 prav na rastlinah. Ruth F. Allen je takrat v znanstveni reviji *Journal of Agricultural Research* natančno opisala preobčutljivostno reakcijo po poskusu okužbe odporne sorte pšenice z žitno rjo. Preobčutljivostna reakcija danes velja za značilno obliko programirane celične smrti. Po prvih opisih apoptoze v živalskih celicah in pomanjkljivemu znanju o drugih programih celične smrti je apoptoza dolgo veljala kar za sinonim za programirano celično smrt. Danes vemo, da je takih programov veliko in da so zelo raznoliki. Rastlinske programirane celične smrti lahko razlikujemo po času, ki je potreben za razpad vakuole. Velika osrednja vakuola je značilni membranski organel rastlinske celice, ki zavzema pomemben del prostornine celice. V njeni notranjosti je vodna raztopina s številnimi encimi za razgradnjo beljakovin in nukleinskih kislin. V do sedaj razvozlanih genomih rastlin nismo našli genov, ki bi kodirali beljakovine, homologne kaspazam. Kljub temu pa smo dokazali biokemične reakcije, ki so podobne kaspaznim, a so v njih

vključene druge, kaspazam nesorodne beljakovine. To so predvsem metakaspaze in različni vakuolni encimi. Prav tako v rastlinah nismo našli drugih beljakovin, povezanih z apoptozo, a po laboratorijski vstavitvi genov za take beljakovine v rastlinski genom so bili ti dejavni. To nakazuje, da so vsaj določeni deli apoptotske poti prisotni v rastlinskih celicah in da so se deli samouničevalnih poti pri različnih skupinah organizmov v evoluciji razvijali neodvisno.

Avtofagija pri kvasnih, živalskih in rastlinskih celicah

Avtofagija je proces, ki ga prav tako povezuje s programirano celično smrtjo in je zelo ohranjen v evoluciji organizmov. Med avtofagijo se citoplazemske beljakovine in organeli prenesejo do vakuole ali prebavnih organelov lizosomov, v katerih se razgradijo. Avtofagija je nujna za vzdrževanje ravnotežja v celicah in organizmih in ima pomembno vlogo pri recikliranju hranil. Z avtofagijo se razgradi večina dolgoživih citosolnih beljakovin in organelov. Med procesom se okrog snovi, ki bo razgrajena, oblikuje dvojna membrana. Nastanejo membranska telesca, katerih zunanja membrana se zlije z membrano lizosoma ali vakuole. Znanstveniki so homologe živalskih avtofagnih genov odkrili tudi pri kvasnih in rastlinskih celicah.

Abscizija listov je asimetrična

Čeprav prevladuje splošno prepričanje, da je tudi abscizija oblika programirane celične smrti, pa do nedavnega za to trditev nismo imeli pravih dokazov. Zbrali smo jih v raziskavi razvoja češnjevih paradižnikov na znamenitem Volcani Centru v Izraelu, ki je tudi eden največjih proizvajalcev in izvoznikov češnjevih paradižnikov. Tamkajšnji znanstveniki si že dolgo časa prizadevajo vzgojiti sorto, pri kateri bi tudi povsem zreli plodovi ostali pritrjeni na steblo, saj so analize trga pokazale, da večina potrošnikov raje kupuje češnjeve paradižnike, ki so na



Imunolokalizacija beljakovine (temno vijolično obarvanje), vključene v programirano celično smrt, na listni (distalni) strani abscizinskega območja lista paradiznika.

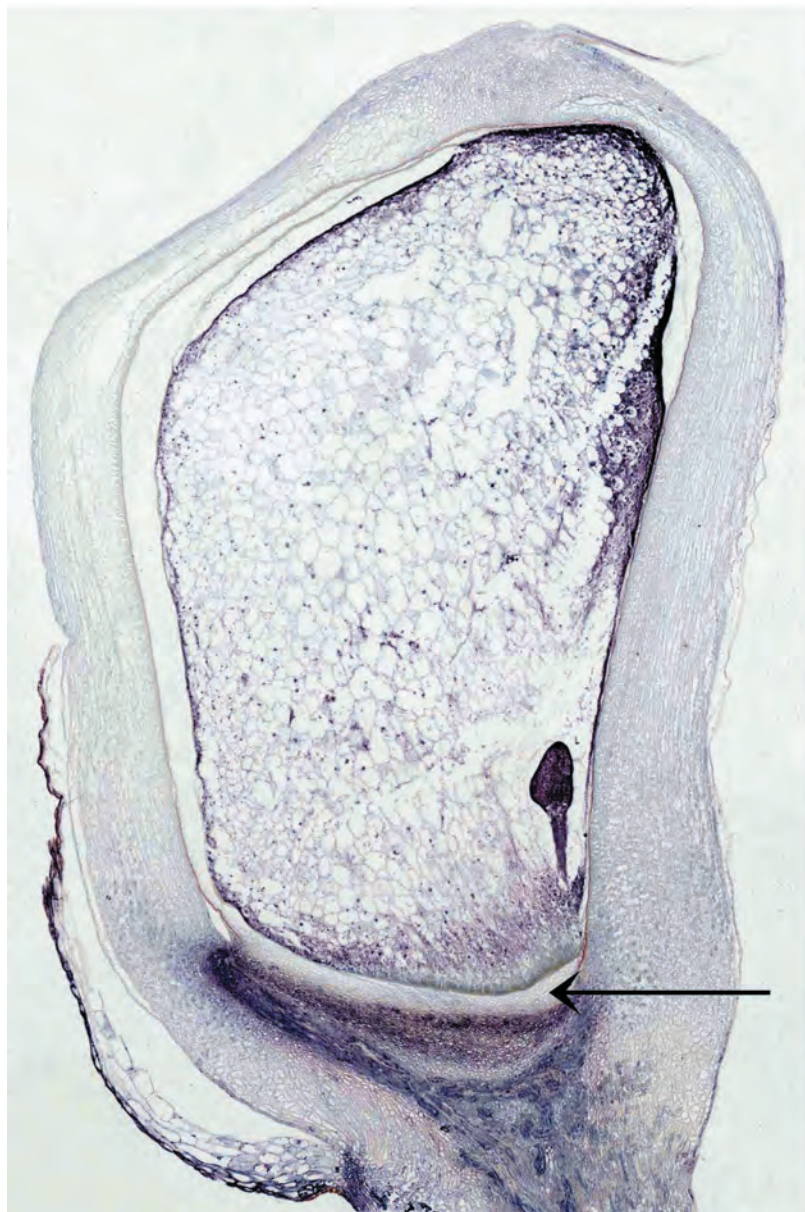
The Plant Cell, 23: 4146–4163; z dovoljenjem www.plantphysiol.org or www.plantcell.org. Copyright American Society of Plant Biologists.

steblih v grozdih, kot košarice s posameznimi plodovi. V raziskavi so sodelovali tudi raziskovalci Nacionalnega inštituta za biologijo, Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani in raziskovalci s Texas A&M University v ZDA.

Ne glede na življenjsko dobo vsi rastlinski listi končno odmrejo. Da mrtvi listi ne bi

ostali na stebelu oziroma da pri njihovem odpadanju ne bi prišlo do trganja tkiva, poškodb stebela in posledično možne naselitve bakterij ali gliv v odmrlem tkivu, mora rastlina proces nadzorovati. Osnova procesa je ločitev celic, do katere pride v naprej oblikovanem ločitvenem območju. To območje je na mestu, kjer je list pritrjen. Ločitveno območje sestavljajo celice, ki se po svoji obliki in delovanju ločijo od sosednjih celic. Abscizija poteka v štirih sledečih stopnjah. V prvi, zelo zgodnji stopnji se celice na mestu, kjer bo kasneje prišlo do ločitve, preoblikujejo v celice ločitvenega območja. V naslednji stopnji začnejo te celice odgovarjati na abscizinske signale, ki domnevno vključujejo rastlinske hormone. V tretjo stopnjo je vključen hormon etilen, ki dejansko vodi abscizijo, s sprožitvijo ločevanja. Ta stopnja vključuje sprožitev sinteze encimov za preoblikovanje ali razgradnjo celičnih sten. Z njihovim delovanjem se razgradijo osrednje lamele, ki povezujejo med seboj celice v ločitvenem območju. To končno vodi do dejanske ločitve lista od matične rastline. V zadnji stopnji, ki se prekriva s tretjo stopnjo in sledi ločitvi, se na površini izpostavljenega tkiva razvije zaščitna plast. Na ta način se na mestu ločitve oblikuje listna brazgotina.

Z uporabo naj sodobnejših raziskovalnih pristopov in molekularnih tehnik, s katerimi lahko raziskujemo posamezne celice v listu, se je izraelskim, slovenskim in ameriškim znanstvenikom odprl povsem nov svet v območju ločitvenega območja pri paradizniku in tudi drugih rastlinah. Abscizinski dogodki so asimetrično razporejeni med stebлом in organom, ki odpada. Raziskava je pokazala, da programirana celična smrt v resnici poteka, a presenetljivo, le na delu ločitvenega območja, ležečem na organu, ki bo odpadel. Razvoj ločitvene razpoke med stebлом in organom je postopen in prav tako postopno se, v nekaj plasteh celic ob ločitveni razpoki, širijo znamenja programirane celične smrti. Ob koncu procesa



Prerez koruznega zrna. S puščico je označeno območje prevodnega sistema, ki se razvije s programirano celično smrtjo.

Foto: Tomaž Rijavec.

se poveča tudi izražanje gena za encim, z znano vlogo v signaliziranju pri živalski programirani celični smrti. Opazovanje s presevnim elektronskim mikroskopom v območju programirane celične smrti je odkrilo ultrastrukturne spremembe celic, ki nakazujejo nov, še neopisan tip programirane celične smrti. Ta ima značilnosti različnih že

opisanih tipov, a tudi nekaj povsem novih. Zanimivo je, da so o zadnjih že poročali v stresnih procesih ali bolezenskih stanjih pri živalih.

Za razliko od programirane celične smrti na strani odpadajočega organa pa so celice v ločitvenem območju na stebelni strani nadpovprečno dejavne. Ugotovili so, da v

njih poteka intenziven membranski promet, povezan z izrazito povečano količino membranskih delov celice, ki naj bi se uporabila za izdelavo zaščitne plasti na izpostavljenem tkivu po odstranitvi organa s telesa rastline. Na ta način bi nastajala brazgotina.

Pomembnost rezultatov povečuje dejstvo, da je raziskava odkrila nekatere splošne zakonitosti abscizije pri rastlinah, saj so nekatere značilnosti opisanega procesa izražene tudi pri paradižniku nesorodnih modelnih rastlinah, kot sta navedeni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) in ena izmed vrst tobaka (*Nicotina glauca*).

Abscizija zrn in odkritje še neopisanega transportnega sistema pri travah

Preprečevanje abscizije zrelih zrn je bil eden najpomembnejših korakov pri udomačitvi trav. V znanstveni literaturi je na koruznih zrnih opisana tako imenovana črna plast, ki naj bi bila ostanek abscizinskega območja. Pomemben dokaz, da to ni res, je bila skupna raziskava znanstvenikov z Nacionalnega inštituta za biologijo, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete in Floridske univerze v Združenih državah Amerike, ki je pokazala, da imajo črna plast tudi zrna teozinta – divjega prednika koruze, pri katerem se zrna še raztresajo. Črna plast koruze in teozinta je del zrna, v katerem je potekla programirana celična smrt. Rezultat programa so nepoškodovane celične stene, znotraj ka-

terih pa je vsebina celic propadla. Preostale stene so dokaj prosto prehodne za snovi, raztopljene v vodi, na primer saharozo, kot glavno transportno obliko sladkorjev pri rastlinah. Ko v procesu programirane celične smrti v tem območju propadejo vse membrane, se prenos snovi iz materinske rastline v razvijajoče se zrno odvija povsem pasivno.

Celična smrt zagotavlja nadaljevanje življenja

Programirana celična smrt torej ni sinonim za smrt organizma. S samožrtvovanjem izbranih celic organizmi podaljšajo svoje lastno življenje in povečujejo sposobnost preživetja svojih potomcev. Glavni elementi, ki so povezani s programirano celično smrtjo pri rastlinah in živalih, so isti. To so odstranjevanje poškodovanih ali okuženih tkiv, na primer pri preobčutljivostni reakciji; povezava z razvojnimi procesi, kot na primer pri oblikovanju prevodnih sistemov, in zamenjava kratkoživečih celic, na primer listnih celic. Naše razumevanje molekulskih dogodkov med programirano celično smrtjo je nepopolno, a nove raziskave odpirajo tudi nove možnosti uporabe pridobljenega znanja. Ena od njih se kar ponuja – zdaj, ko vemo, zakaj, kako in kje poteka odpadanje rastlinskih organov pri paradižniku, bomo lažje načrtovali naslednje korake pri vzgoji nove sorte češnjevega paradižnika.

Literatura:

Bar - Dror, T., Dermastia, M., Kladnik, A., Tušek - Žnidarič, M., Pompe Novak M., Meir, S., Burd, S., Philosoph - Hadas, S., Ori, N., Sonogo, L., Dickman, M. B., Lers, A., 2011: *Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. The Plant Cell*, 23: 4146-4163.
 Dermastia, M., 2010: *Zgodba o teozintu - majhen korak za koruzo, a pomemben za ljudi. Proteus*, 72 (9-10): 441-446.
 Dermastia, M., 2011: *Češnjevi paradižniki in programirana celična smrt: uspeh raziskovalcev NIB: skupaj z izraelskimi in ameriški raziskovalci so objavili članek v prestižni reviji The Plant Cell. Delo (Ljubljana)*, 53 (301): 16.

Dermastia, M., Kladnik, A., Dolenc Koce, J., Chourey, P. S., 2009: *A cellular study of teosinte Zea mays ssp. parviglumis (Poaceae) caryopsis development showing several processes conserved in maize. American Journal of Botany*, 96: 1798-1807.
 Kladnik, A., Chamusco, K., Dermastia, M., Chourey, P. S., 2004: *Evidence of programmed cell death in post-phloem transport cells of the maternal pedicel tissue in developing caryopsis of maize. Plant Physiology*, 136: 3572-3581.
 Theophrastus (Hort A. F., prevajalec v angleški jezik), 1916: *Enquiry into plants, I. Books 1-5. Loeb Classical Library*. 504 pages. ISBN 0674990773.