

Struktura molekularna i funkcje wakuolarnych enzymów procesujących w ontogenezie roślin

STRESZCZENIE

Wakuolarne enzymy procesujące (VPE) to roślinne proteazy należące do rodziny proteaz C13. Specyficzną aktywność VPE scharakteryzowano dzięki porównaniu ich do kaspaz zwierzęcych. VPE pełnią wiele ważnych funkcji na różnych etapach ontogenezy roślin, odgrywając rolę nie tylko w prawidłowym rozwoju organizmu roślinnego, ale także w reakcjach roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Szczególnie ważną rolę VPE odnotowuje się w przetwarzaniu białek wakuolarnych, umożliwiającą wytworzenie ich dojrzałych i aktywnych form. Dowiedziono, że VPE uczestniczą w programowanej śmierci komórki roślinnej, ale mimo szacunkowych dowodów, sugerujemy udział VPE również w autofagii. Bazując na danych literaturowych dotyczących autofagii u drożdży, formułujemy hipotezę, że VPE w trakcie autofagii w komórkach roślinnych są zaangażowane w degradację ciał autofagowych – jednego z końcowych etapów autofagii.

WSTĘP

Wakuolarne enzymy procesujące (ang. *Vacuolar Processing Enzymes*, VPE), znane są również jako endopeptydazy asparaginyłowe bądź legumainy. Nazwa enzymów wywodzi się z ich lokalizacji w wakuoli i funkcji polegającej na proteolitycznym przetwarzaniu białek wakuolarnych. VPE są jednymi z najistotniejszych proteaz roślinnych o aktywności kaspazo-podobnej. Szczegółowe badania dotyczące funkcji VPE nadal są dość ograniczone, jednak ze względu na specyficzną aktywność i właściwości strukturalne podobne do zwierzęcej kaspazy-1, enzymy te zyskały w ciągu ostatnich dwóch dekad większą uwagę ze strony badaczy [1-3]. VPE znajdowano początkowo w nasionach, jednak zidentyfikowano je również w tkankach wegetatywnych roślin [4]. Udział VPE zauważalny jest w różnych procesach na wszystkich etapach ontogenezy roślin. Jednym z istotnych procesów zachodzących w komórkach roślinnych jest autofagia, w trakcie której w wakuoli powstają ciała autofagowe. Domniemaną rolę VPE w autofagii roślinnej opisuje się na podstawie analogii do proteaz drożdżowych. Dane pochodzące z badań nad drożdżowymi proteinazami A i B [5,6], umożliwiły charakterystykę możliwej roli VPE w degradacji ciał autofagowych u roślin. Niemniej jednak, obecnie wciąż nie ma dostępnych wielu danych literaturowych wskazujących na udział VPE w wyżej wymienionym etapie autofagii. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie zgromadzonych dotychczas danych na temat struktury molekularnej VPE oraz pełnionych przez te enzymy funkcji w komórkach roślinnych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na możliwe zaangażowanie w programowaną śmierć komórki i autofagię.

KLASYFIKACJA VPE

Wakuolarne enzymy procesujące (EC 3.4.22.32) klasyfikuje się jako endopeptydazy asparaginyłowe, czyli hydrolityczne enzymy należące do proteaz [7-9]. Zalicza się je do rodziny C13, którą charakteryzuje występowanie aktywnej reszty cysteinowej w centrum katalitycznym [7,8]. VPE zalicza się więc do endopeptydaz cysteinowych, które wyróżniają się wysoką specyficznością substratową. Specyficzność substratowa VPE polega na katalizowaniu cięcia proteolitycznego przy asparaginie (Asn) lub kwasie asparaginowym (Asp) od strony grupy karboksylowej [7,9,10]. Dla wielu wakuolarnych pro-białek jest to niezbędne, by mogło dojść do ich aktywacji lub dojrzewania [8,9]. Mimo, że VPE przynależy do proteaz cysteinowych, nie wykazuje dużego podobieństwa pod względem sekwencji z pozostałymi proteazami tego klanu. Wyjątek stanowią reszty cysteinowe (Cys) i histydynowe (His) w centrum katalitycznym enzymu. Są to bowiem stałe elementy dla każdej endopeptydazy cysteinowej [7].

W wyniku analizy genomu i badań proteomicznych rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) wyróżniono cztery izoformy wakuolarnych enzymów procesujących: α VPE, β VPE, γ VPE i δ VPE. Na podstawie różnic w sekwencjach

lic. Marta Przybylak,
mgr Karolina Wleklik,
lic. Alan Stafiej,

prof. UAM dr hab. Sławomir Borek ✉

Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_497

✉ autor korespondujący: borek@amu.edu.pl

Słowa kluczowe: autofagia, ciało autofagowe, kaspazy, programowana śmierć komórki, proteazy

Wykaz stosowanych skrótów: ATG – geny i białka związane z autofagią (ang. *AuTophagy-related genes and proteins*); HR – reakcja nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*); PCD – programowana śmierć komórki (ang. *Programmed Cell Death*); TMV – wirus mozaiki tytoniowej (ang. *Tobacco Mosaic Virus*); TOR – kompleksy kinaz o nazwie „cel rapamycyny” (ang. *Target of Rapamycin*); VPE – wakuolarne enzymy procesujące (ang. *vacuolar processing enzymes*)

Podziękowania: Praca związana z grantem Narodowego Centrum Nauki nr 2016/23/B/NZ3/00735

aminokwasowych i profilach ekspresji wymienione cztery izoformy zostały pierwotnie pogrupowane w 3 typy: typ wegetatywny (α VPE i γ VPE), typ zarodkowy (β VPE) oraz typ niescharakteryzowany (δ VPE), który zidentyfikowano w warstwach okrywy nasiennej *Arabidopsis thaliana* [8,9,11]. Przyjęta klasyfikacja nie jest jednak niepodważalna, gdyż zaobserwowano ekspresję oraz aktywność danego typu wakuolarnych enzymów procesujących w innych tkankach niż założono w pierwotnej klasyfikacji. Dobrym tego przykładem są wyniki badań nad rolą poszczególnych izoform VPE u *A. thaliana* – za przetwarzanie białek zapasowych u tej rośliny w głównej mierze odpowiada β VPE, ale również α VPE i γ VPE biorą udział w tym procesie [8,9]. Z kolei ekspresja wegetatywnego typu VPE (α VPE i γ VPE) zachodzi również w zarodku w trakcie dojrzewania nasion [8]. Potwierdza to, że w przedstawionej klasyfikacji wakuolarnych enzymów procesujących występują pewne nieścisłości. Nie jest to jednak jedyny sposób usystematyzowania izoform VPE. Badania genomowe wykazały, że VPE mają szeroki zakres występowania wśród roślin lądowych. Na podstawie drzewa filogenetycznego VPE, złożonego z kilku kladów, sporządzono nowy system klasyfikacyjny. Zgodnie z nim, wyróżnienie typu γ VPE i β VPE nastąpiło u roślin okrytonasiennych, w tym jednoliściennych i wczesnych dwuliściennych. U nagonasiennych nie obserwuje się rozróżnienia między powyższymi typami VPE. Trzeci typ, δ VPE, pojawił się u dwuliściennych właściwych, a czwarty, α VPE, wykazano jak dotąd tylko u roślin z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) [8,9].

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA VPE

STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI ENZYMU

Molekularną strukturę wakuolarnych enzymów procesujących pierwotnie scharakteryzowano na podstawie dojrzałej formy oczyszczonej z nasion łącznika pospolitego (*Ricinus communis*). Masa cząsteczkowa wyizolowanego enzymu wynosi 37 kDa [12]. Translacja mRNA kodującego VPE odbywa się na polisomach związanych z błonami plazmatycznymi. W jej wyniku powstaje prekursor pre-probiałkowy ppVPE. Prekursor ten złożony jest z elementów takich jak: peptyd sygnałowy, krótki N-końcowy pro-peptyd, domena proteazowa oraz długi pro-peptyd końca C [7,13]. Pierwotny produkt translacji podlega kotranslacyjnej modyfikacji, podczas której odłączony zostaje peptyd sygnałowy. Na tym etapie, pro-VPE (pVPE) zostaje przetransportowane ze światła siateczki śródplazmatycznej do wakuoli, gdzie na skutek rozszczepienia domen końca C i N przekształca się w aktywną formę (VPE). VPE to enzymy autokatalityczne, co oznacza, że w kwasowych warunkach panujących w wakuoli podlegają auto-aktywacji, nie wymagając w tym celu udziału innych czynników [2,7]. Proteolityczne odcięcie fragmentu końca C o masie cząsteczkowej równej 14 kDa, powoduje przekształcenie prekursora wakuolarnych enzymów procesujących o masie 51 kDa w dojrzałą formę enzymu o masie 37 kDa [14]. Eliminacja długiej domeny końca karboksylowego jest niezbędna aby aktywować VPE, gdyż peptyd ten pełni funkcję auto-inhibycyjną, w wyniku czego centrum katalityczne enzymu jest maskowane [8,15]. Usunięcie pro-peptydu końca C umożliwia odsłonięcie miejsca katalitycznego enzymu i jego aktywację w kwaśnym pH

wakuoli odpowiedzialnej m.in. za magazynowanie białek [7,15]. W efekcie rozszczepienia, pro-peptyd końca karboksylowego nadaje stabilność w warunkach neutralnego pH oraz przyczynia się do modulacji aktywności VPE. Z tego względu C-końcowy pro-peptyd określa się mianem legumainowej domeny stabilizacji i modulacji aktywności (ang. *Legumain Stabilization and Activity Modulation (LSAM) domain*) [7].

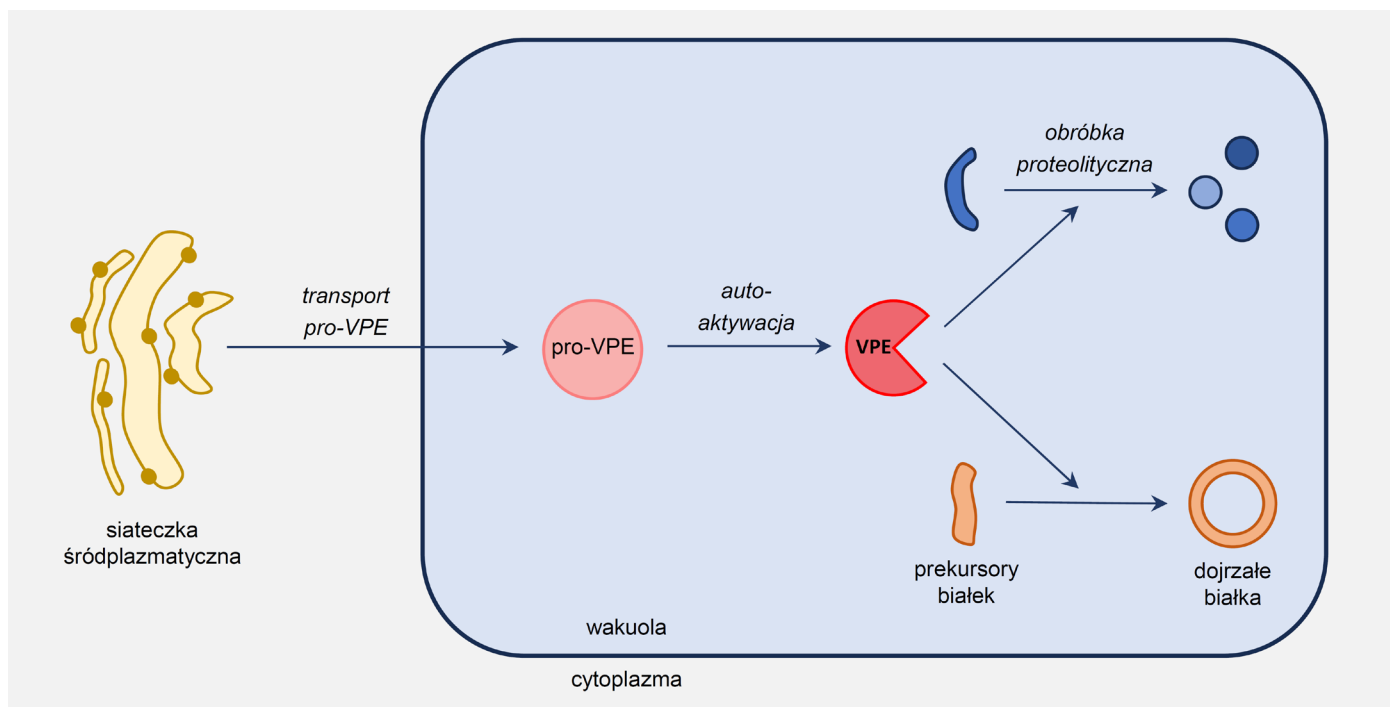
PODOBIEŃSTWO VPE DO KASPAZ

Charakteryzując strukturę molekularną wakuolarnych enzymów procesujących, nie sposób pominąć ich podobieństw do zwierzęcych kaspaz. Dotychczas w genomie roślinnym nie zidentyfikowano genów homologicznych kaspaz, jednakże niektóre enzymy roślinne (między innymi VPE, katepsyna B, saspazy i fitaspazy) wykazują cechy podobne do tych zwierzęcych enzymów [2,16]. Dzięki informacjom z bazy danych MEROPS wiadomo, że w obrębie proteaz cysteinowych wyszczególniono kilkanaście klanów. Jednym z nich jest klan CD, do którego należą zarówno kaspazy jak i wakuolarne enzymy procesujące [17,18]. Z uwagi na podobieństwo VPE do kaspaz, VPE określa się mianem kaspaz roślinnych. Jest to określenie potoczne, wynikające z faktu, że legumainy charakteryzują się aktywnością podobną do kaspazy-1 (YVAD-azy). Aktywność ta polega na rozpoznawaniu i cięciu substratów białkowych w miejscu sekwencji aminokwasowej YVAD (Tyr-Val-Ala-Asp), zarówno przez VPE jak i kaspazę-1 [9]. Ze względu na specyficzność cięcia przy asparaginie, kaspazy jak i wakuolarne enzymy procesujące są cysteino-zależnymi proteazami asparaginyłowymi [17]. Identyczność w obrębie sekwencji VPE i kaspazy-1 jest jednak szczątkowa. Mimo to, na podstawie trójwymiarowych hipotetycznych struktur VPE i kaspazy-1, dowiedziono, że obydwa enzymy mają podobną kieszeń substratową, która tworzona jest przez reszty aminokwasowe danego enzymu [16]. Dojrzałe wakuolarne enzymy procesujące zawierają podobną do kaspazy-1 diadę katalityczną, czyli dwie reszty aminokwasowe odpowiedzialne za mechanizmy katalityczne. Diadę katalityczną VPE, na którą składa się histydyna i cysteina, można porównać do diady His-237 oraz Cys-285 w ssacej kaspazie-1 [13,16]. Pomimo podobieństw VPE do kaspazy-1, występowanie tych enzymów w obrębie komórki jest rozbieżne. Miejscem działania kaspaz w komórce zwierzęcej jest cytoplazma, natomiast wakuolarne enzymy procesujące lokalizowane są w wakuoli [9]. W tkankach wegetatywnych VPE występują w wakuolach litycznych, a w nasionach lokalizowane są w wakuolach magazynujących białka [2,18]. Ponadto aktywna forma wakuolarnych enzymów procesujących ma strukturę monomeryczną, w przeciwieństwie do dimerycznych kaspaz [9].

FUNKCJE VPE

ROLA VPE W DOJRZEWANIU I AKTYWACJI BIAŁEK

Specyficzność substratowa VPE względem Asn i Asp to cecha, dzięki której enzymy te biorą udział w przetwarzaniu różnych białek wakuolarnych [8]. Część prekursorowych form białek wakuolarnych cechują liczne dojrzałe rejony białkowe, a VPE zaangażowane są w przetwarzanie tych prekursorów, co umożliwia wytworzenie z pojedyn-



Rycina 1. Schemat powstawania dojrzałych form białek wakuolarnych katalizowany przez wakuolarny enzym procesujący (VPE). Pro-VPE syntetyzowane jest na siateczce śródplazmatycznej granularnej, a następnie transportowane jest do wakuoli, gdzie na skutek działania niskiego pH ulega auto-aktywacji. Dojrzałe VPE jest odpowiedzialne za przetwarzanie (w tym cyklizację) i aktywację innych białek wakuolarnych.

czego prekursora wielu zróżnicowanych funkcjonalnie białek [8,16] (Ryc. 1). Przykładem wakuolarnych białek przetwarzanych przez VPE są białka zapasowe. Udział wakuolarnych enzymów procesujących w przetwarzaniu tych białek wykazano na podstawie badań nad mutantami β VPE *Arabidopsis thaliana* i ryżu siewnego (*Oryza sativa*) [8]. Do białek zapasowych należy między innymi albumina 2S i globulina 12S [8,9]. Białka zapasowe nasion początkowo syntetyzowane są w formie białek prekursorowych, które podczas procesu dojrzewania nasion są proteolitycznie przetwarzane przez VPE [8]. Mutacja β VPE przyczyniła się do gromadzenia prekursorów białek zapasowych w obrębie nasion. Wskazuje to na znaczenie β VPE w procesie dojrzewania tych białek. Zaobserwowano ponadto, że potrójny mutant VPE *A. thaliana* (typu α , β oraz γ) także nie przeprowadzał obróbki proteolitycznej białek zapasowych w nasionach. Pozwoliło to na wysnucie wniosku, że poza β VPE, również γ VPE zaangażowane jest w przetwarzanie białek zapasowych [8]. Niemniej jednak u podwójnego mutantu VPE (typu α oraz γ) nie stwierdzono braków w procesie przetwarzania białek magazynujących, dlatego uznano, że β VPE ma kluczowe znaczenie w dojrzewaniu białek zapasowych nasion. Wykazano również, że silna ekspresja β VPE zachodzi na etapie dojrzewania nasion *A. thaliana*, kiedy gromadzenie prekursorów białkowych jest zintensyfikowane. Z kolei ekspresja wakuolarnych enzymów procesujących typu α oraz γ jest charakterystyczna dla wcześniejszych etapów rozwoju nasion, a na etapie dojrzewania nasion jest mniej intensywna niż β VPE. Analiza zebranych danych pozwoliła zatem na wskazanie β VPE jako kluczowego elementu w przetwarzaniu białek zapasowych nasion *A. thaliana* [8].

Rozszczepianie wiązań peptydowych nie jest jednak jedyną reakcją katalizowaną przez VPE. Inną ważną reakcją katalizowaną przez te enzymy jest ligacja, w wyniku której powstają peptydy cykliczne [8,16]. Ligacja białek katalizowana przez VPE została zbadana na hybrydowej formie γ VPE - *AtLEG*. Charakteryzuje się ona budową dwułańcuchową (standardowe VPE ma strukturę pojedynczego łańcucha) oraz występowaniem pro-domeny LSAM na końcu karboksylowym. Występowanie LSAM umożliwia stabilizację w neutralnym pH i reguluje aktywność wakuolarnych enzymów procesujących. Obojętne pH soku wakuolarnego to warunki sprzyjające ligacji, jednak VPE może przejawiać aktywność ligazy bądź proteazy w różnych warunkach pH, niekoniecznie tylko w pH obojętnym [9]. Dodatkowo, na podstawie badań prowadzonych na nasionach słonecznika wykazano, że VPE bierze udział w transpeptydacji, czyli w reakcji, w której z białka prekursorowego generowane są peptydy cykliczne. Przykładem takiego białka jest kalata B1. Jest to białko obronne, zidentyfikowane u afrykańskiej rośliny *Oldenlandia affinis*, które hamuje wzrost owadów zagrożających roślinom. Badania te potwierdziły zatem znaczenie VPE w kontekście przetwarzania białek obronnych [7,16]. Kalata B1 nie jest jednak jedynym białkiem obronnym przetwarzanym przez VPE. Dowiedziono, że wśród białek obronnych przetwarzanych przez wakuolarny enzym procesujący jest jedna z chitynaz znajdująca się w liściach tytoniu oraz inhibitory proteiny zlokalizowane w znamionach słupka tytoniu i liściach pomidora [16].

UDZIAŁ VPE W ODPOWIEDZI NA BIOTYCZNE I ABIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE

Rośliny, tak jak i inne organizmy, narażone są na działanie czynników stresogennych. Wyróżniamy abiotyczne oraz

biotyczne czynniki stresowe. Do abiotycznych czynników stresowych należy np.: ekstremalnie wysoka temperatura, zasolenie, susza, mróz, chłód, deficyt lub nadmiar składników odżywczych, niewystarczająca ilość światła, jony toksycznych metali, intensywne promieniowanie, środki chemiczne (takie jak pestycydy), gazowe i pyłowe zanieczyszczenia (NO_x , O_3 , SO_2), uszkodzenia mechaniczne lub niedobory tlenu (np. w warunkach zalania lub obecności pokrywy lodowej). Do biotycznych czynników stresowych zalicza się głównie atak patogenów (grzybów, bakterii, wirusów), nicieni i owadów oraz niekorzystne oddziaływanie innych roślin, np. różnego rodzaju allelopatie lub zbyt intensywne zagęszczenie w łanie [19,20]. Działanie bodźców stresowych mobilizuje roślinę do aktywacji mechanizmów obronnych. Mechanizmy te mają na celu ochronę przed stresorami i umożliwienie roślinie zaadaptowanie się do istniałych warunków środowiska [20]. W przypadku stresu biotycznego mechanizm obronny rośliny może stanowić synteza białek wakuolarnych, które zaangażowane są w reakcję antystresową. Wykazano to na przykładzie różnych roślin. W warunkach stresu biotycznego u tytoniu nastąpiła synteza chitynazy, u rodziny *Solanaceae* wytworzyły się inhibitory proteinaz, natomiast u ryżu i grochu (*Pisum sativum*) zaobserwowano syntezę lektyn [8]. Wszystkie wymienione białka syntetyzowane są w postaci prekursorów probiałkowych, które w kolejnym etapie ulegają przekształceniu do form dojrzałych poprzez rozszczepienie od strony reszty asparaginowej na końcu karboksylowym. Reakcja ta jest katalizowana właśnie przez wakuolarnie enzymy procesujące [8]. Patogeny i zranienia nie są jednak jedynymi czynnikami biotycznymi indukującymi ekspresję VPE. Wykazano, że do zaangażowania wakuolarnych enzymów procesujących w odpowiedź na stres biotyczny przyczyniają się także związane z tym stresem hormony roślinne, między innymi kwas jasmonowy i kwas salicylowy [7]. Ważnym elementem ochrony przed patogenami jest udział VPE w wytwarzaniu kalaty B1. W związku z tym, wakuolarnie enzymy procesujące uważane są za istotne elementy odporności roślin [7]. Mobilizacja poszczególnych izoform VPE w celu indukcji reakcji obronnej może nastąpić w warunkach, podczas których działają różne rodzaje czynników stresowych. Zaobserwowano to u ryżu, w którym niektóre izoformy VPE reagują zarówno na hormony roślinne jak i na abiotyczne czynniki stresowe. Wykazano, że etylen, urazy mechaniczne i kwas salicylowy powodowały zwiększenie ekspresji dwóch izoform – α VPE i γ VPE, a kwas jasmonowy zainicjował niewielki wzrost ekspresji γ VPE [7]. Ekspresja β -VPE w tkankach wegetatywnych i nasionach jęczmienia (*Hordeum vulgare*) może zachodzić w odpowiedzi na stresory biotyczne jak i abiotyczne. Do regulatorów indukujących ekspresję β VPE w tkankach wegetatywnych jęczmienia w odpowiedzi na stres zalicza się: kwas jasmonowy, salicylowy, abscysynowy i tlenek azotu, natomiast w nasionach odpowiedź na stres indukowana jest przez kwas giberelinowy [7].

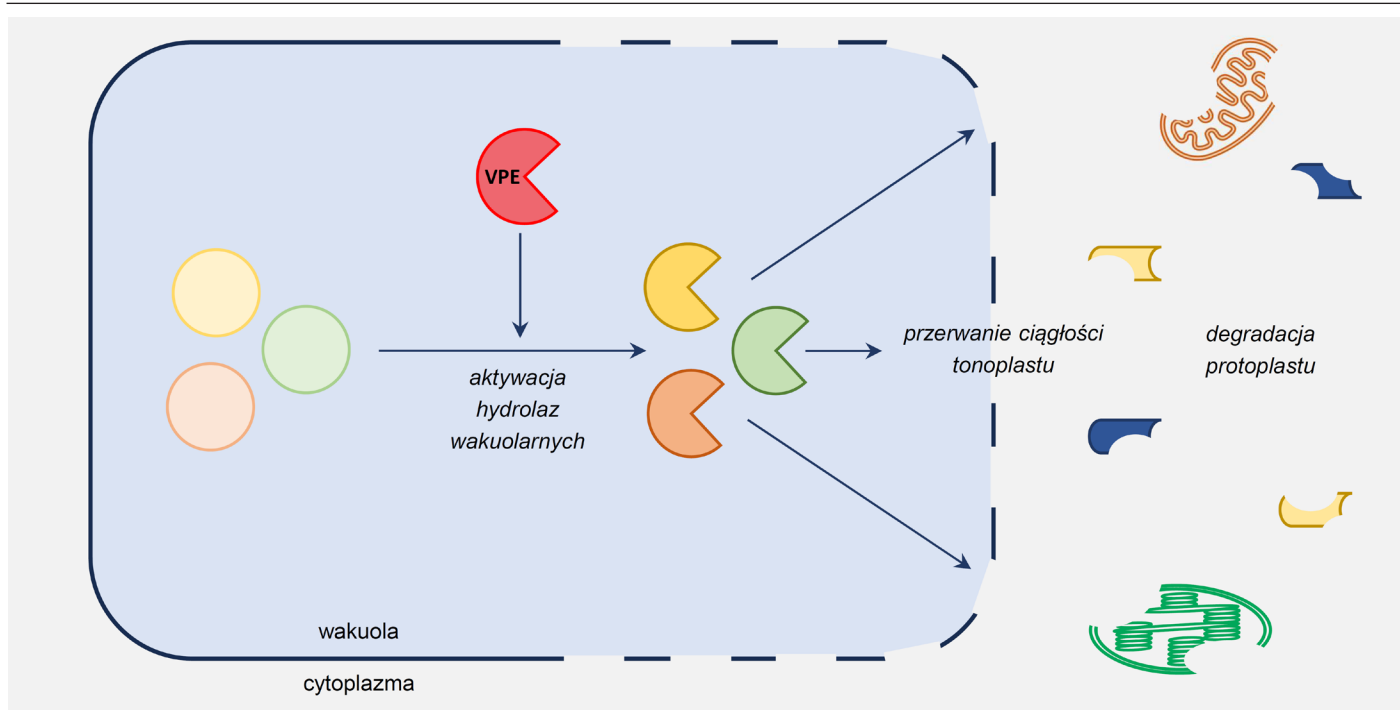
Niedawno odkryto, że VPE może uczestniczyć w procesach warunkujących ruchy aparatów szparkowych w odpowiedzi na czynniki stresowe [21]. Zamknięcie aparatu szparkowego może być konsekwencją ataku patogenów lub działania czynników abiotycznych. Sugerowałoby to, że VPE jest kluczowym czynnikiem zaangażowanym w kon-

trołę najwcześniejszych fizjologicznych odpowiedzi rośliny na atak patogena [21]. Znaczenie VPE w regulacji rozwarcia aparatów szparkowych zbadano u mutantu γ VPE *A. thaliana*. Składniki umożliwiające utrzymanie właściwego ciśnienia w wakuoli, a zatem niezbędne w celu otwarcia aparatu szparkowego, mogą być aktywowane przez VPE. W związku z tym zasugerowano, że deficyt wakuolarnych enzymów procesujących u mutantu stanowi kluczowy czynnik przyczyniający się do zamykania aparatów szparkowych [8]. Co więcej, VPE zaangażowane jest również w zamykanie aparatów szparkowych na skutek inokulacji elicytorem [21]. Elicytor jest substancją (np. białkową) imitującą patogen, aktywującą receptory rozpoznające cechy molekularne właściwych patogenów. W związku z tym elicytory aktywują szlaki sygnałowe inicjujące reakcję obronną organizmu roślinnego [22]. Zarówno elicytory, molekularne wzorce powiązane z patogenami (PAMP) oraz patogeny przyczyniają się do zamykania aparatów szparkowych [21]. Na podstawie badań przeprowadzonych na tytoniu, wykazano, że zamykanie aparatów szparkowych w efekcie rozpoznania elicytora jest hamowane na skutek wycieszenia ekspresji VPE. Inokulacja elicytorem powoduje akumulację tlenu azotu w aparatach szparkowych, natomiast w warunkach deficytu VPE, akumulacja tej cząsteczki sygnałowej została stłumiona. VPE regulując poziom tlenu azotu skumulowanego w aparatach szparkowych, przyczynia się do zamykania aparatów szparkowych w wyniku działania elicytora [21].

ROLA VPE W PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

Programowana śmierć komórki (ang. *Programmed Cell Death*, PCD), to mechanizm, który przyczynił się do sukcesu ewolucyjnego zarówno organizmów roślinnych jak i zwierzęcych. Mimo że PCD została odkryta z końcem XIX wieku, większe zainteresowanie ze strony badaczy zyskało dopiero w latach 50. XX wieku. Pierwsze badania dotyczące programowanej śmierci komórki skupiały się jednak głównie na organizmach zwierzęcych [23]. U roślin PCD zaobserwowano prawie na wszystkich etapach rozwoju organizmu. Do etapów tych należy tworzenie się okrywy nasiennej, wyrastanie korzeni bocznych, mechanizm samoniezgodności pyłkowej, degradacja komórek aleuronowych oraz procesy starzenia liści i kwiatów [3,8]. Podczas programowanej śmierci dana komórka uruchamia zróżnicowane mechanizmy molekularne, które mają za zadanie utrzymać równowagę między ilością wytworzonych komórek, a ich degradacją [23]. W odróżnieniu od śmierci komórki w wyniku losowych zdarzeń, PCD podlega genetycznej kontroli [16]. Paradoksalnie, śmierć poszczególnych komórek ma na celu utrzymanie całego organizmu przy życiu. Programowaną śmierć komórki określa się zatem jako integralny proces rozwojowy, decydujący o przetrwaniu organizmu [23].

Analiza morfologiczna roślin umożliwiła podział roślinnej programowanej śmierci komórki na dwa typy [3]. Wyróżniamy autolityczną i nieautolityczną PCD. W typie autolitycznym błona wakuoli pęka, a cytoplazma ulega zniszczeniu. Podczas nieautolitycznej PCD również dochodzi do przerwania ciągłości tonoplastu, jednak w przeciwieństwie do autolitycznej, nie dochodzi do szybkiego zniszczenia cytoplazmy [9]. Kolejnym czynnikiem pozwalającym na wyodrębnienie tych dwóch typów programo-

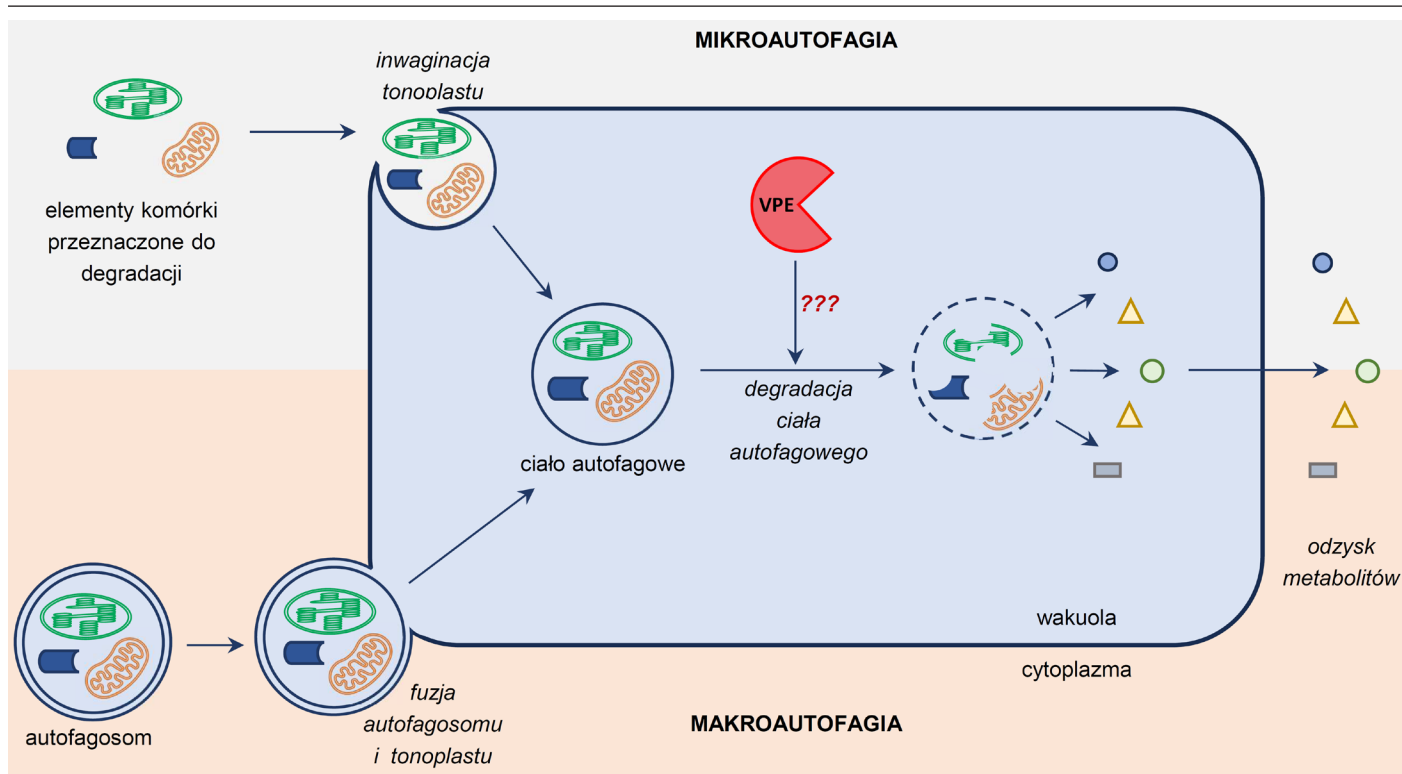


Rycina 2. Rola VPE w przebiegu programowanej śmierci komórki (PCD) roślinnej. Jednym z kluczowych etapów PCD roślin jest przerwanie ciągłości tonoplastu i następująca po nim degradacja protoplastu. Sugeruje się, że wakuolarnie procesujące (VPE) aktywują hydrolazy wakuolarnie odpowiedzialne za dezintegrację błony wakuolarniej.

wanej śmierci komórki jest m.in. rodzaj oddziałującego na roślinę czynnika stresowego. Autolityczna PCD występuje w warunkach łagodnego stresu abiotycznego, czy podczas rozwoju rośliny [3,9], uczestniczy w objętościowym wzroście wakuoli oraz kondensacji chromatyny [9]. Z kolei PCD nieautolityczna jest charakterystyczna dla odpowiedzi na biotyczne czynniki stresowe i zaangażowana jest w obronę przed patogenami. Niemniej jednak, pomimo wymienionych powyżej różnic, zarówno nieautolityczna jak i autolityczna PCD przyczynia się do wzrostu objętości wakuoli [3,9]. Oprócz opisanego podziału programowanej śmierci komórki, w literaturze funkcjonuje także inna klasyfikacja oparta na endo- lub egzogennej proveniencji bodźców wywołujących ten proces. Wyodrębniono zatem rozwojowy (ang. *developmental PCD*, dPCD) oraz środowiskowy (ang. *environmental PCD*, ePCD) typ PCD. Przebieg dPCD i ePCD jest podobny. Charakterystyczny dla obydwu procesów jest udział sygnalizacji wapniowej, generacja i akumulacja wolnych rodników, a także stymulacja aktywności VPE [9,24]. Regulacja każdego typu PCD kontrolowana jest przez czynniki transkrypcyjne. Wśród członków największej rodziny czynników transkrypcyjnych, które wspomagają inicjację śmierci komórki lub jej zatrzymanie, wyróżnia się NAC. U zwierząt jednym z najważniejszych czynników regulujących PCD są kaspazy, a u roślin są to VPE [9]. To co łączy kaspazy zwierzęce i VPE w kontekście PCD, to fakt, że obie grupy enzymów biorą udział w regulacji enzymów hydrolytycznych. W przypadku VPE tymi enzymami są hydrolazy wakuolarnie (Ryc. 2). Ze względu na zróżnicowaną lokalizację komórkową kaspaz zwierzęcych i VPE, mechanizmy regulacji PCD przez te enzymy są różne. PCD z udziałem VPE wciąż wymaga dalszych badań, ponieważ jak dotąd mechanizm ten nie jest dostatecznie poznany [9]. Programowana śmierć komórki roślinnej, w którą jest zaangażowane VPE,

zachodzi niemal we wszystkich komórkach organizmu i stanowi odpowiedź rośliny na czynniki stresowe oraz jest istotnym elementem w rozwoju organizmu roślinnego [16]. PCD za pośrednictwem VPE może następować w wyniku przetwarzania przez VPE innych enzymów hydrolytycznych i inicjacji szeregu procesów proteolitycznych [9].

Programowana śmierć komórki występuje pod różnymi postaciami. Jednym z najlepiej poznanych przykładów PCD jest tak zwana reakcja nadwrażliwości (ang. *Hypersensitive Response*; HR), która stanowi przejaw nieautolitycznego typu PCD. HR to lokalny mechanizm obronny rośliny, który uaktywnia się w warunkach stresu biotycznego. Celem reakcji nadwrażliwości jest doprowadzenie do szybkiego obumarcia komórek gospodarza zainfekowanych patogenami, by uniemożliwić zarażenie kolejnych komórek i opanowanie przez patogen całego organizmu [3,9,25]. HR klasyfikuje się jako swoisty rodzaj PCD [1]. Wykazano, że VPE jest jednym z najważniejszych czynników regulujących reakcję nadwrażliwości [3]. Pierwszymi badaniami, w których wykazano udział VPE w HR, były badania na roślinach z rodzaju tytoniu, w których użyto zarówno roślin z wyciszoną ekspresją genów VPE, jak i roślin traktowanych inhibitorami VPE i kaspazy-1. W badaniu wykorzystano rośliny zainfekowane przez wirus mozaiki tytoniowej (ang. *Tobacco Mosaic Virus*, TMV). W roślinach, w których VPE było aktywne, wykazano związek pomiędzy wzmożoną ekspresją i translacją VPE w zakażonych komórkach, a atakiem TMV. Co istotne, zaobserwowano związek między utrzymaniem ciągłości tonoplastu a aktywnością VPE [1]. Dezintegracja tonoplastu jest kluczowym etapem PCD, podczas którego następuje uwolnienie enzymów hydrolytycznych z wakuoli do cytoplazmy, co w konsekwencji skutkuje śmiercią komórki [9,16]. W roślinach, w których VPE było wyciszone



Rycina 3. Schemat przebiegu makro- i mikroautofagii w komórkach roślinnych. Początkowym etapem makroautofagii jest wytworzenie w cytoplazmie fagoforu, błonowej struktury w kształcie kielicha bądź filiżanki (ang. *cup-shaped*). Fagofor ulega wydłużeniu, otaczając fragment cytoplazmy wyznaczony do degradacji. Dwubłonowy pęcherzyk, w którego świetle znajduje się ładunek przeznaczony do degradacji jest nazywany autofagosomem. Autofagosom kierowany jest do wakuoli, gdzie jego zewnętrzna błona ulega fuzji z tonoplastem, natomiast ładunek otoczony pojedynczą błoną tworzy w świetle wakuoli ciało autofagowe. Mikroautofagia, zachodzi bez wytworzenia autofagosomu, a elementy cytoplazmy przeznaczone do autofagowej degradacji, przedostają się do światła wakuoli poprzez inwaginację tonoplastu. Otoczony pojedynczą błoną ładunek przeznaczony do degradacji tworzy ciało autofagowe. Niezależnie od sposobu powstania, ciało autofagowe ulega szybkiej degradacji na skutek działania hydrolaz wakuolarnych. Dotychczas nie opisano enzymów hydrolitycznych biorących udział w degradacji ciała autofagowego u roślin, jednak sugeruje się, że jednymi z nich mogą to być wakuolarne enzymy procesujące (VPE).

nie doszło do naruszenia ciągłości tonoplastu. Dzięki wykazaniu tej różnicy w strukturze błony wakuoli, udowodniono, że VPE bierze udział w programowanej śmierci komórki przyczyniając się od pęknięcia wakuoli [8,9,16]. Dodatkowo u roślin zaatakowanych przez TMV, u których ekspresja genów VPE była wyciszona, nie zaobserwowano również fragmentacji DNA. Fragmentacja DNA jest jedną z charakterystycznych cech PCD, co stanowi kolejny dowód zależności PCD od VPE [1,16]. Badania skupiające się na wyciszaniu genów w wyniku indukcji patogenem potwierdziły kaspazo-1-podobną aktywność VPE oraz to, jak istotną częścią odporności rośliny jest PCD. Na podstawie przeprowadzonych badań, w tym analizy ultrastruktury, wykazano, że PCD wywołana infekcją TMV następuje zaraz po pęknięciu wakuoli w wyniku dezintegracji tonoplastu. Zatem przerwanie błony wakuoli kontrolowane przez VPE jest kluczowym etapem śmierci komórki podczas reakcji nadwrażliwości wywołanej wirusem TMV [16]. Wskazanie VPE jako jednego z istotniejszych elementów uczestniczących w PCD było niewątpliwie pomocne w poznaniu mechanizmu tego procesu, jednak szczełowe poznanie roli VPE podczas PCD wciąż wymaga dalszych badań [8]. Niedobór VPE nie oznacza jednak braku reakcji obronnej. W warunkach deficytu VPE indukcja ekspresji genów kodujących białka obronne nie jest zahamowana, jednak deficyt ten sprzyja intensywniejszemu namnażaniu się wirusa w komórce [16]. PCD w reakcji nadwrażliwości jest więc niezbędna do wyeliminowania patogenów uzależnionych wzrostowo od

tkanek żywych w organizmie gospodarza, czyli tak zwanych patogenów biotroficznycych [16].

ROLA VPE W AUTOFAGII

Liczne dane literaturowe dowodzą, że HR może być ograniczana lub stymulowana przez autofagię. Choć autofagia w komórkach roślinnych nie jest wystarczająco dobrze poznana w porównaniu z komórkami drożdżowymi i zwierzęcymi, niewątpliwie stanowi ważną część ochrony roślin przed patogenami [26]. Zarówno u zwierząt jak i u roślin autofagia bierze udział w rozwoju organizmu. Wśród roślinnych procesów rozwojowych, etapy w które zaangażowana jest autofagia są zróżnicowane – od dojrzewania pyłku, przez starzenie komórek i śmierć, łącznie z PCD [26]. W normalnych warunkach autofagia zachodzi z niską intensywnością, natomiast w warunkach stresu obserwuje się nasilenie tego procesu [26]. Autofagia, określana również jako „samo-zjadanie”, odkryta została w latach 50. XX wieku [9]. Mimo negatywnego wydźwięku terminu „samo-zjadanie”, jest to zjawisko niezwykle korzystne dla komórki i całego organizmu. Autofagia to fizjologiczny proces kataboliczny zachodzący w komórkach roślinnych, zwierzęcych oraz drożdżowych [27]. Polega przede wszystkim na wewnątrzwakuolarniej degradacji fragmentów cytoplazmy, organelli lub innych elementów komórkowych [26,27]. Podczas autofagii składniki przeznaczone do degradacji trafiają za pomocą transportu pęcherzykowego do wakuoli. Produkty degradacji składników komórkowych przedostają

się do cytoplazmy, po to by komórka mogła je powtórnie wykorzystać (Ryc. 3). Dowiedziono, że autofagia poza elementami własnymi komórki, może również przyczyniać się do degradacji wirusów i bakterii [9]. Indukcja autofagii może zająć pod wpływem abiotycznych czynników stresowych, takich jak np. deficyt azotu i węgla. Mutanty, które mają wadliwe geny autofagii są szczególnie wrażliwe na takie czynniki, zatem proces ten pełni funkcję pomocniczą w przeżyciu w warunkach głodu czy deficytu substancji troficznych. Mimo niewątpliwego udziału autofagii w promowaniu przeżycia komórek podczas niekorzystnych warunków środowiska, istnieją dowody, które łączą autofagię z PCD. Autofagii przypisuje się więc dwie funkcje: utrzymanie przy życiu lub śmierć komórki [3,9].

Przez długi czas autofagia była postrzegana jako proces nieselektywny, jednakże obecnie wiadomo, że podlega kontroli i jest selektywna [26,28]. Sелеktywna autofagia polega na degradacji wyłącznie wybranych elementów komórkowych, na przykład mitochondriów, peroksysomów, czy chloroplastów. W zależności od tego w jaki sposób składniki komórkowe trafiają do miejsca ich degradacji, autofagię podzielono dodatkowo na trzy typy [9]. Najlepiej poznany typem jest makroautofagia (Ryc. 3). Początkowym etapem makroautofagii jest wytworzenie się w cytoplazmie fagoforu, błonowej struktury w kształcie kielicha bądź filiżanki (ang. *cup-shaped*) [9,26,27]. Powstały fagofor ulega wydłużeniu i otacza składniki wyznaczone do degradacji. W ten sposób powstaje autofagosom, czyli dwubłonowy pęcherzyk z zawartością przeznaczoną do autofagowej degradacji. Autofagosom transportowany jest do przedziału litycznego komórki, który u drożdży i roślin stanowi wakuola. Zewnętrzna błona autofagosomu ulega fuzji z błoną wakuoli, natomiast błona wewnętrzna autofagosomu tworzy w świetle wakuoli ciało autofagowe. Ciało autofagowe wraz z ładunkiem przeznaczonym do degradacji jest szybko trawione przez enzymy lityczne. W dalszej kolejności następuje odzysk metabolitów, które komórka może ponownie wykorzystać [9,26,27,29]. Innym rodzajem autofagii w komórkach roślinnych jest mikroautofagia (Rycina 3). W przeciwieństwie do makroautofagii, ładunek przeznaczony do rozkładu dociera do wakuoli dzięki inwaginacji tonoplastu, a nie poprzez autofagosom [9,26,27,29]. Błona wakuoli ulega wpukleniu i wakuola „wciąga” fragmenty cytoplazmy. Następnie, podobnie jak podczas makroautofagii, w wakuoli powstaje ciało autofagowe, które ulega degradacji w wyniku działania enzymów litycznych [9].

Trzecim typem autofagii jest mega-autofagia, zaliczana do autofagii nieselektywnej. Polega na zniszczeniu cytoplazmy podczas rozwojowej i środowiskowej PCD indukowanej abiotycznymi czynnikami stresowymi [30]. Nadrzędną cechą, która odróżnia mega-autofagię od dwóch poprzednich, jest to, że podczas mega-autofagii elementy komórkowe nie są transportowane do wakuoli w celu ich degradacji. W trakcie mega-autofagii wakuola powiększa się i zmienia się przepuszczalność błony wakuolarniej. W efekcie może dojść do dezintegracji tonoplastu co umożliwi wpływ wakuolarnych enzymów litycznych do cytoplazmy i degradację protoplastu [9,26]. Wakuola stanowi zatem kluczowy element podczas śmierci komórek roślinnych z wykorzystaniem autofagii. Pełni rolę nie tylko docelowej lokalizacji pe-

cherzykowych struktur autofagicznych, zaangażowanych w transport składników komórkowych przeznaczonych do degradacji, ale także docelową lokalizację VPE. Dzięki VPE możliwa jest dezintegracja błony wakuoli i uwolnienie hydrolaz do cytoplazmy.

Kluczowe molekularne składniki autofagii wykryto pierwotnie u drożdży. Do składników tych zaliczają się geny i białka Atg (ang. *AuTophagy-related genes and proteins*), bądź kompleksy kinaz o nazwie „cel rapamycyny” (ang. *Target of Rapamycin*; TOR). Po odkryciu tych elementów u drożdży, opisano je później u zwierząt i roślin. Z tego względu badania nad autofagią roślinną oparte są często na analogii do autofagii drożdżowej [9,27]. Istotnym aspektem w mechanizmie autofagii jest rozkład ciał autofagowych. W przypadku drożdży, ciała autofagowe degradowane są wskutek działania dwóch proteinaz – B (Prb1) i A (Pep4) oraz białka Atg15 (o aktywności lipolitycznej). Innym ważnym czynnikiem uczestniczącym w rozpadzie ciał autofagowych jest Atg42/Ybr139w wraz z homologiczną karboksypeptydazą Y (Prc1) [9,27]. Sugeruje się, że roślinnym odpowiednikiem proteinaz drożdżowych jest VPE. Szczególne powiązanie dostrzega się między VPE, a drożdżową proteinazą A. Proteinaza A bierze udział w regulacji proteinazy B, Prc1 i innych proteaz. VPE, znane ze swojej roli w przetwarzaniu licznych białek wakuolarnych, może spełniać w komórkach roślin podobną funkcję do proteinazy A. Na podstawie badań nad aktywnością wakuolarnych enzymów procesujących wyizolowanego z rącznika pospolitego udowodniono analogię roślinnego VPE do proteinazy A. Okazało się, że VPE wprowadzone do komórek drożdży może przetwarzać te same białka co proteinaza A [6]. Dodatkowo, jedna z izoform VPE *A. thaliana* – γ VPE, zaangażowana jest w proces dojrzewania proenzymu karboksypeptydazy CPY, będącej homologiem drożdżowej karboksypeptydazy Y. Przypuszcza się więc, że VPE zaangażowane jest w degradację ciał autofagowych u roślin (Ryc. 3), jednak rola wakuolarnych enzymów procesujących w procesie autofagii u roślin wciąż pozostaje tylko domniemana i wymaga dalszych badań [9,27].

PODSUMOWANIE

Dzięki specyficznej budowie i aktywności wakuolarnych enzymów procesujących, które zostały scharakteryzowane na podstawie analogii do kaspaz zwierzęcych, udowodniono, że VPE pełni istotną rolę w komórkach roślinnych. VPE zaangażowane są między innymi w przetwarzanie różnego rodzaju białek, na przykład białek zapasowych. Pojedynczy prekursor białkowy umożliwia wakuolarnym enzymom procesującym wytworzenie wielu białek zróżnicowanych pod względem funkcjonalności. VPE można także zaklasyfikować jako część systemu obronnego roślin, z uwagi na możliwy udział w odpowiedzi rośliny na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Istotnym mechanizmem obronnym rośliny, w którym uczestniczy VPE jest programowana śmierć komórki. Mimo negatywnego wydźwięku nazwy, zjawisko to poprzez wybiórczą degradację poszczególnych komórek, sprzyja przeżyciu całego organizmu i utrzymaniu homeostazy. PCD jest bardzo ważnym procesem rozwojowym, objawiającym się w różnej postaci, na przykład jako reakcji nadwrażliwości. HR, której celem jest szybkie wyeli-

minowanie komórek zaatakowanych przez patogen by zapobiec jego dalszemu rozprzestrzenianiu się w organizmie roślinnym, może być z kolei ograniczana bądź stymulowana przez autofagię. Autofagia to złożone zjawisko, które stanowi istotny element ochrony rośliny. Końcowe etapy autofagii związane są z wakuolą, będącą także miejscem działania VPE. Mimo szczątkowych jak do tej pory danych na temat funkcji VPE w autofagii, można sformułować hipotezę, że enzymy te mogą uczestniczyć w degradacji ciał autofagowych.

PIŚMIENNICTWO

- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858
- Bosch M, Poulter NS, Perry RM, Wilkins KA, Franklin-Tong VE (2010) Characterization of a legumain/vacuolar processing enzyme and YVADase activity in *Papaver* pollen. *Plant Mol Biol* 74: 381-393
- Teper-Bamnolker P, Danieli R, Peled-Zehavi H, Belausov E, Abu-Abied M, Avin-Wittenberg T, Sadot E, Eshel D (2021) Vacuolar processing enzyme translocates to the vacuole through the autophagy pathway to induce programmed cell death. *Autophagy* 17:3109-3123
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J* 19: 43-53
- Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119: 301-311
- Hiraiwa N, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1997) Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* 12: 819-829
- Vorster BJ, Cullis CA, Kunert KJ (2019) Plant vacuolar processing enzymes. *Front Plant Sci* 10: 479
- Yamada K, Basak AK, Goto-Yamada S, Tarnawska-Glatt K, Hara-Nishimura I (2020) Vacuolar processing enzymes in the plant life cycle. *New Phytol* 226: 21-31
- Wleklík K, Borek S (2023) Vacuolar processing enzymes in plant programmed cell death and autophagy. *Int J Mol Sci* 24: 1198
- Tang TMS, Luk LYP (2021) Asparaginyl endopeptidases: enzymology, applications and limitations. *Org Biomol Chem* 19: 5048-5062
- Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2005) A vacuolar processing enzyme, delta VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* 17: 876-887
- Hara-Nishimura I, Shimada T, Hiraiwa N, Nishimura M (1995) Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J Plant Physiol* 145: 632-640
- Gong P, Li Y, Tang Y, Wei R, Huijun Z, Wang Y, Zhang C (2018) Vacuolar processing enzyme (VvβVPE) from *Vitis vinifera*, processes seed proteins during ovule development, and accelerates seed germination in VvβVPE heterologously over-expressed *Arabidopsis*. *Plant Sci* 274: 420-431
- Hara-Nishimura I, Takeuchi Y, Nishimura M (1993) Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma-Mansoni*. *Plant Cell* 5: 1651-1659
- Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2002) Activation of *Arabidopsis* vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. *Plant Cell Physiol* 43: 143-151
- Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, Nara-Nishimura I (2015) Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Front Plant Sci* 6: 234
- Ramirez MLG, Salvesen GS (2018) A primer on caspase mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 82: 79-85
- Labudda M, Rozanska E, Prabucka B, Muszynska E, Marecka D, Kozak M, Dababat AA, Sobczak M (2020) Activity profiling of barley vacuolar processing enzymes provides new insights into the plant and cyst nematode interaction. *Mol Plant Pathol* 21: 38-52
- Plazek A (2004) Reakcje roślin na czynniki stresowe. *Zesz Probl Post Nauk Rol* 496: 73-83
- Jaworski K, Grzegorzewska W, Wieżawska B, Szmidi-Jaworska A (2010) Participation of second messengers in plant responses to abiotic stress. *Post Biol Kom* 37: 847-868
- Fanourakis D, Nikoloudakis N, Pappi P, Markakis E, Doupis G, Charova SN, Delis C, Tsaniklidis G (2020) The role of proteases in determining stomatal development and tuning pore aperture: A review. *Plants-Basel* 9: 340
- Rausher MD (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411: 857-864
- Tulik M, Myskow E (2015) Contribution of wood cells death to evolutionary success of woody plants. *Sylvan* 159: 392-402
- Sychta K, Slomka A, Kuta E (2021) Insights into plant programmed cell death induced by heavy metals - Discovering a terra Incognita. *Cells* 10: 65
- Banasiak J (2022) System odpornościowy roślin - model zygzakowy. *Post Bioch* 68: 123-128
- Borek S, Ruta-Piosik M, Paluch E, Pietrowska-Borek M (2015) Seletywne rodaje autofagii. *Post Biol Kom* 42:505-538
- Stefaniak S, Wojtyła L, Pietrowska-Borek M, Borek S (2020) Completing autophagy: Formation and degradation of the autophagic body and metabolite salvage in plants. *Int J Mol Sci* 21: 2205
- Borek S, Stefaniak S, Sliwinski J, Garnczarska M, Pietrowska-Borek M (2019) Autophagic machinery of plant peroxisomes. *Int J Mol Sci* 20: 4754
- Orzechowski A (2017) Autofagia, czyli wielkie sprzątanie. *Kosmos* 66:153-166
- Floyd BE, Pu Y, Soto-Burgos J, Bassham DC (2015) To live or to die: autophagy in plants, W: Gunawardena, A, McCabe P (red) *Plant programmed cell death*. Springer International Publishing Switzerland, str. 269-300

Molecular structure and functions of vacuolar processing enzymes in plants

Marta Przybylak, Karolina Wleklik, Alan Stafiej, Sławomir Borek ✉

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań

✉ corresponding author: borek@amu.edu.pl

Keywords: autophagy, autophagic bodies, caspases, programmed cell death, proteases

ABSTRACT

Vacuolar processing enzymes (VPEs) are plant proteases belonging to the C13 protease family. The specific activity of VPEs was characterized by comparing them to animal caspases. VPEs perform many important functions at various stages of plant ontogenesis, playing a role not only in the proper development of the plant organism but also in plant reactions to biotic and abiotic stress factors. A particularly important role of VPEs is noted in the processing of vacuolar proteins, enabling the production of their mature and active forms. VPEs are involved in programmed cell death, but despite residual evidence, we also suggest that VPEs are involved in autophagy. Based on literature data on autophagy in yeast, we formulate a hypothesis that VPEs during autophagy in plant cells are involved in the degradation of autophagic bodies - one of the final stages of autophagy.

