

3) Senescence a programová smrt buňky (PCD)

- a) Typy buněčné smrti
- b) PCD v životním cyklu rostlin

Gray J (2003) Programmed Cell Death in Plants. University of Toledo, Dept. of Biological Sciences

<http://www.blackwellpublishing.com/book.asp?ref=1841274208>

UPDATE 2008

Reape TJ et al. (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes
Journal of Experimental Botany 59: 435-444



Programová smrt - Programmed Cell Death (PCD) - je nezbytná část růstu a vývoje eukaryotických organismů a jejich reakcí ke stresům

Organismus sám kontroluje iniciaci a proces smrti => „programová smrt“

Příklady PCD u rostlin:

- buněčná smrt spojená s hypersensitivní reakcí**
- senescence**

a) Typy buněčné smrti

PCD u rostlin je odlišná od PCD u živočichů.

Živočichové – apoptická buňka je absorbována fagocytózou

Rostliny – rostlinná buňka neprovádí fagocytózu (buň. stěna;
absence fagocytů)

Autofagie = proces, kterým se rostliny zbavují části cytoplazmy

„Pro-life“ funkce

- remobilizace nutričních látek v době nedostatku cukru a dusíku
- degradace oxidovaných proteinů během oxidačního stresu
- využití proteinových agregátů
- odstranění poškozených proteinů a organel během normálních růstových podmínek

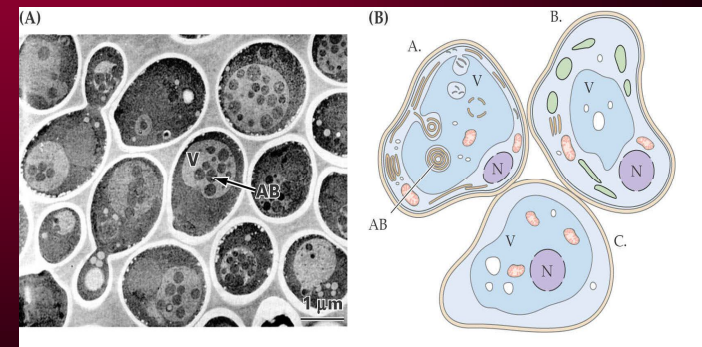
UPDATE 2010

Van Doorn et al. (2010) TIPS 15: 361-362

Úvaha o úloze autofagie v PCD

1. Autofagozomy (AB) = vezikuly, které pohlcují část cytozolu

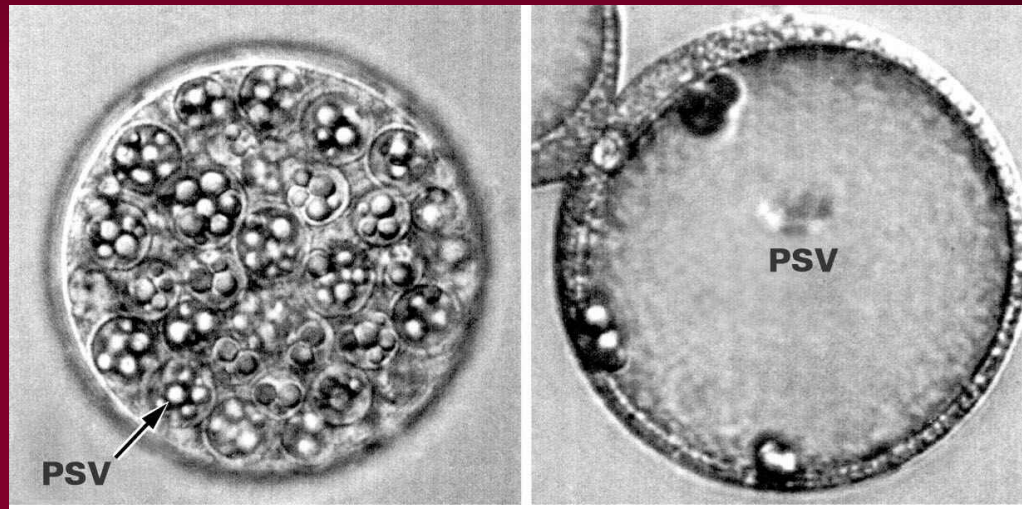
Autofagozomy jsou pohlceny centrální vakuolou (V) a rozloženy hydrolytickými enzymy.



Saccharomyces

Rostliny (silačec)

2. Autofagie v aleuronové vrstvě semen obilnin - malé vakuoly shromažďující proteiny (PSV) fúzí v centrální vakuolu. Jak jsou buněčné organely ve vakuole zlikvidovány není známo.



Vakuolární enzymy:

- **enzymy ukazující aktivitu kaspázy 1**

Kaspáza1 = cystein proteáza; enzym konvertující IL-1 β (interferon); kaspáza 1 hraje roli v apoptóze a proteolyticky štěpí cytokiny na jejich aktivní formy

- **VPE = vacuolar processing enzyme (asparaginyl endopeptidáza) - proteáza s kaspázovou aktivitou**

3. Autofagie při diferenciaci tracheid – tracheidy po diferenciaci umírají. Vakuola praská, z ní se vylíjí hydrolázy (proteázy, nukleázy, fosfatázy) a ty degradují organely a další obsah buňky.

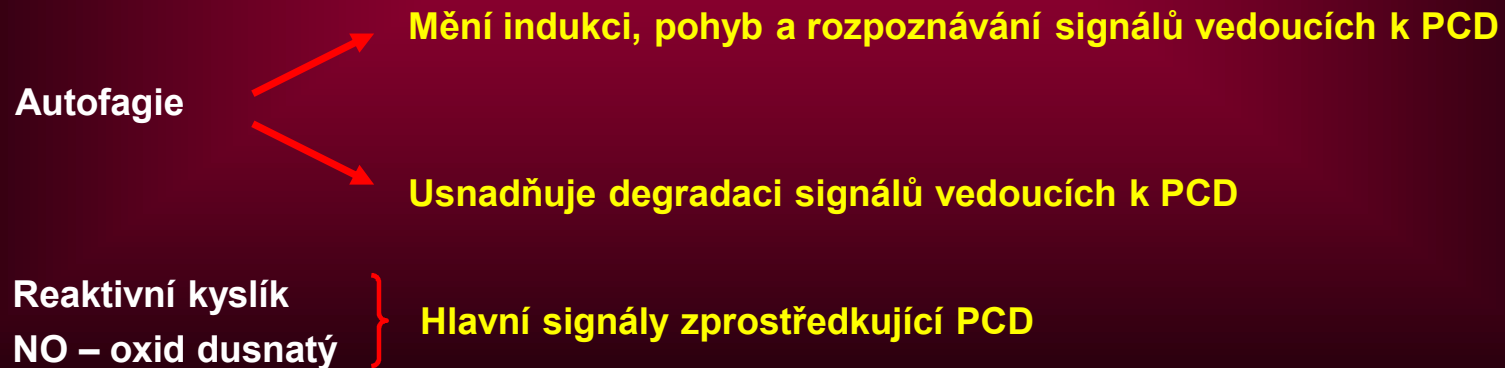
„Pro-death“ funkce

Živočichové: Utlumení genů **ATG (AUTOPHAGY)** → Snížení rychlosti PCD

Exprese genů **ATG (AUTOPHAGY)** → Zvýšení rychlosti PCD

Rostliny? Je PCD u rostlin zprostředkována aktivací genů **ATG (AUTOPHAGY)**? **NEVÍME**

Utlumení genů **ATG3, ATG6 a ATG7** → Rychlá smrt rostliny při bakteriální a virové infekci = „**pro-life**“ funkce“



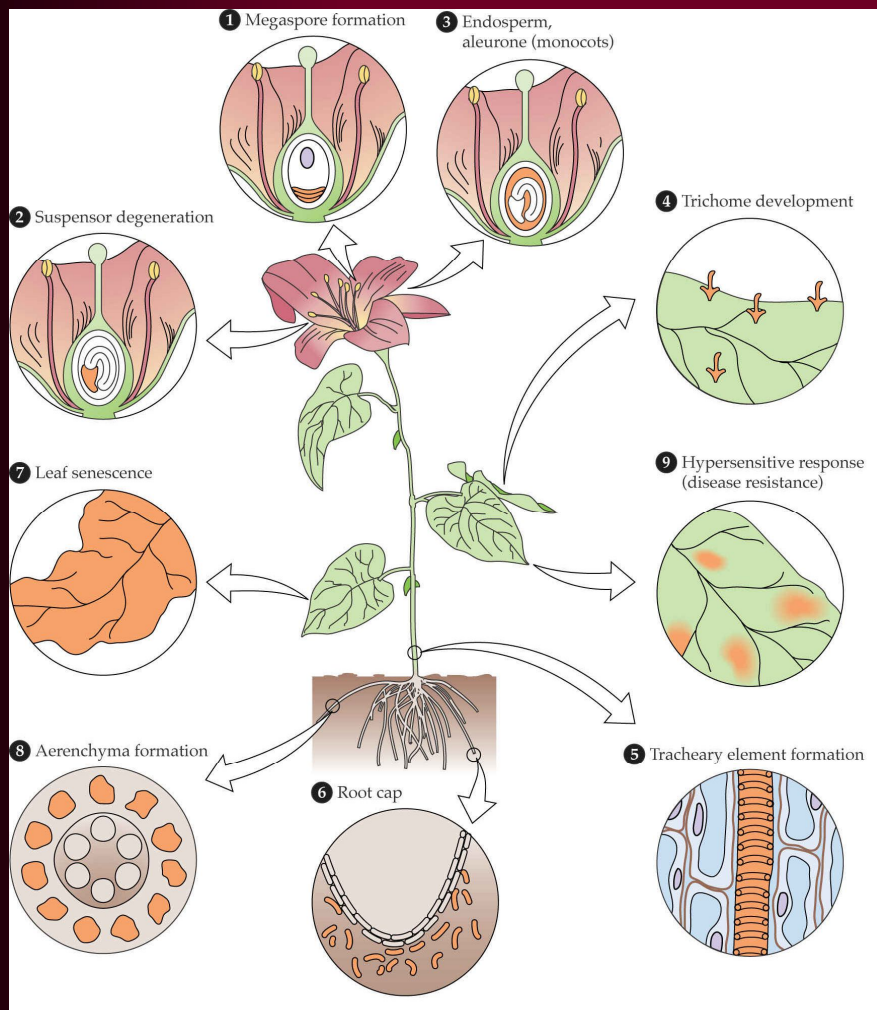
PCD specifická pro rostliny

Tvorba endospermu u obilnin – škrobový endosperm obklopený aleuronovou vrstvou; endosperm akumuluje zásobní látky; při zrání endosperm umírá; mrtvé endospermové buňky se nerozpadají – jsou mumifikovány; aleuron zůstává živý; při klíčení jsou mumifikované buňky rozkládány enzymy aleuronu.

PCD = procesy vedoucí k PCD + procesy vlastního aktu smrti

Rostliny: procesy vedoucí k PCD jsou **vratné**

b) PCD v životním cyklu rostlin



Všechny fáze životního cyklu rostliny jsou ovlivněny PCD

+

Procesy PCD probíhají při reakcích k patogenům a stresům



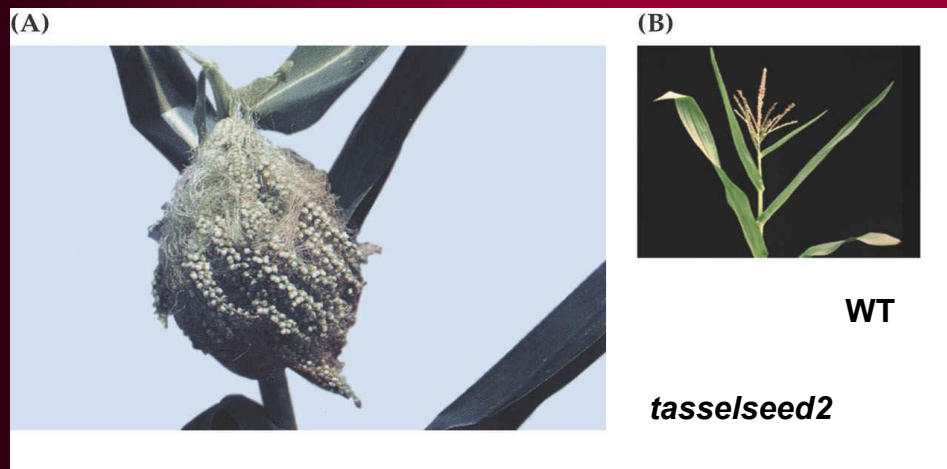
PCD vede k vývojové plasticitě

PCD v reprodukčním vývoji

Vývoj květu je radikálně ovlivněn PCD – rostliny s jednopohlavními květy (kukuřice)

Raná stádia vývoje květu – primordia samičích (gynoecium) i samčích (prašníky) pohlavních orgánů existují v obou květech. Další vývoj květu – **primordia jednoho pohlavního orgánu zanikají = PCD**

Mutant *tasselseed2* – v latě (tassel) se vyvíjí gynoecium



Gen *TASSELSEED2*
kontroluje PCD gynoecia
v latě

- *TASSELSEED2* exprimován v buňkách gynoecia těsně před PCD
- *TASSELSEED2* kóduje hydroxysteroid dehydrogenázu

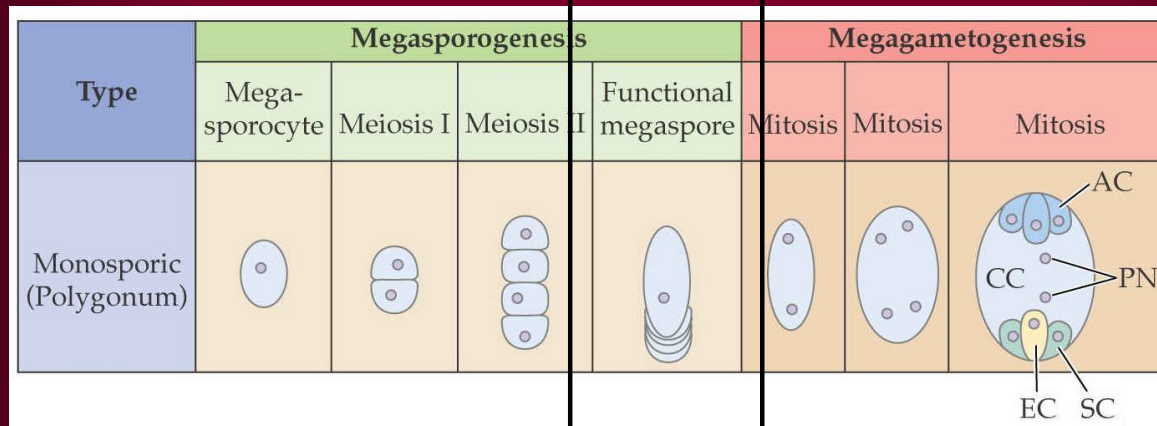
Steroidy – signál v PCD (?)

UPDATE 2009

Acosta IF et al. (2009) Science 232: 262-265

TS1 gen kóduje enzym lipoxygenázu, která je zapojena v syntéze jasmonové kyseliny (JA) => JA ovlivňuje vývoj samčích pohlavních orgánů

Vývoj samičího gametofytu (megaspory) – z nezralého vajíčka se vyvíjí embryonální zárodečný vak. Během vývoje **3 ze 4 buněk umírají = PCD**



Mikrosporogeneze (vývoj pylu) – tapetální buňky umírají, cytoplazmatický obsah (proteiny, lipidy) se ukládají na povrch pylového zrna; **smrt tapeta = PCD**

Vývoj embrya – zygota se dělí na 2 buňky, jedna dává vznik embryu, druhá suspenzoru; **suspensor po vytvoření embrya zaniká = PCD**

PCD ve vegetativním vývoji

Růst embrya – před klíčením brání růstu embrya buňky endospermu, po smrti buněk endospermu embryo může růst; **smrt buněk endospermu = PCD**

Diferenciace tracheid xylému – živé tracheální elementy nemají vodivou funkci; cytoplazma tracheálních elementů umírá a je odstraněna; mrtvé buňky se stávají vodivými tracheidy; **smrt tracheálních elementů = PCD**

Tvorba orgánů – smrt buněk v určitých částech listů dává vznik typickému tvaru listů *Monstery* (Swiss cheese plant); **smrt listových buněk = PCD**

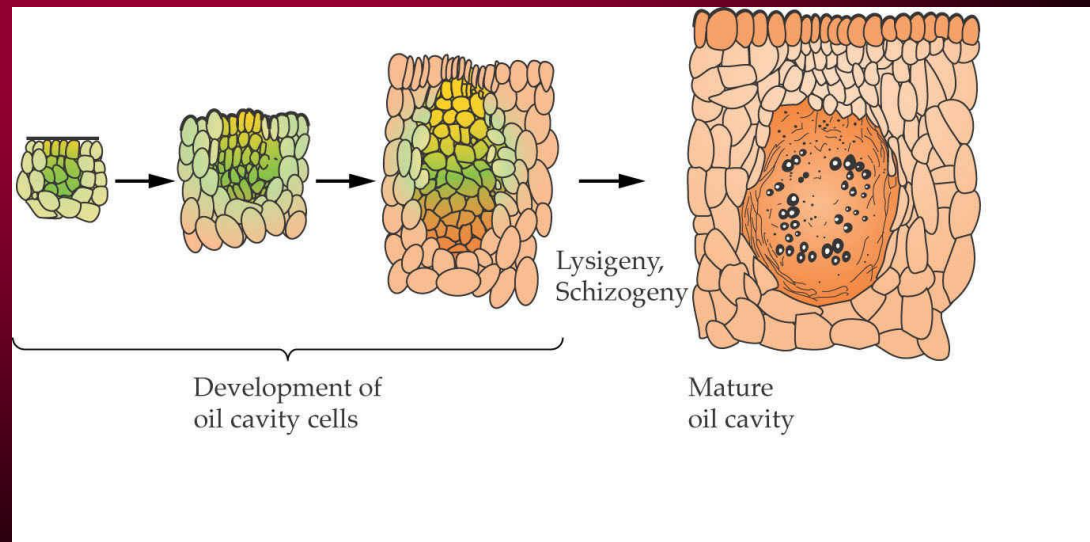


Monstera (*Monstera deliciosa*)

Tvorba trichomů, trnů, atd. – zelené stonky kaktusu jsou nahrazeny listy, tyto listy jsou redukovány na trny; **redukce listů = PCD**

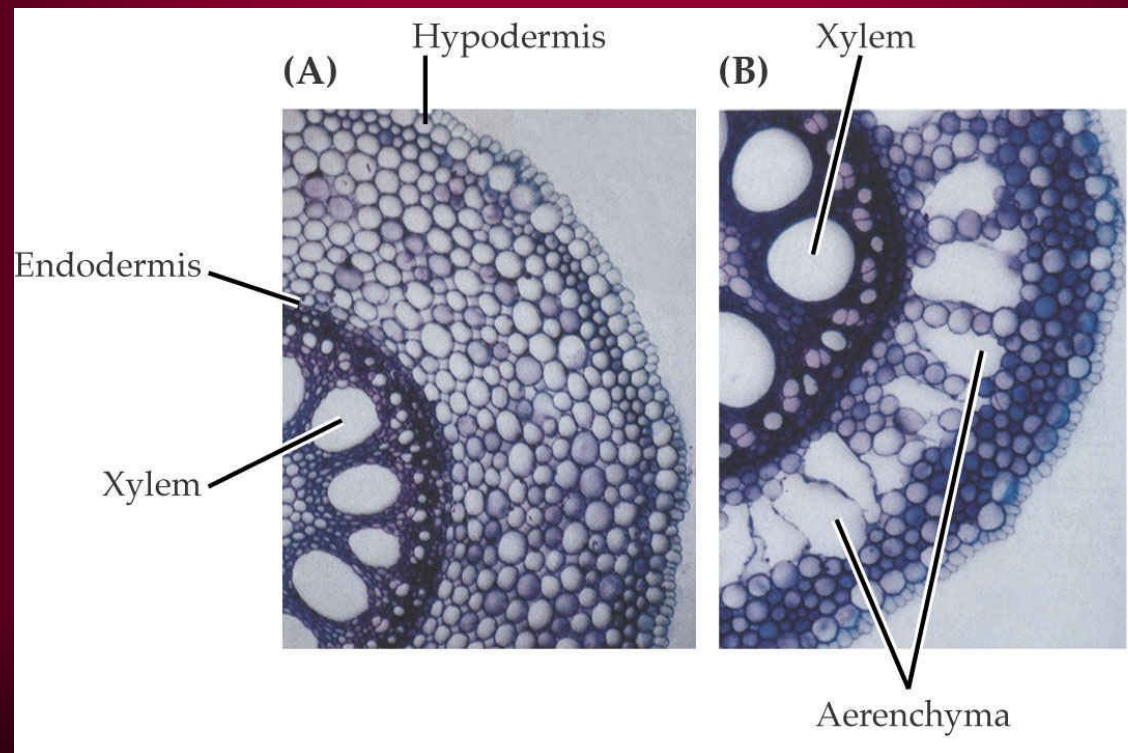


Tvorba žláz na povrchu plodů - buňky na povrchu plodů umírají = **PCD**; mrtvé buňky se plní silicemi a oleji = **lysigenie (schizogenie)**; vznikají žlázy

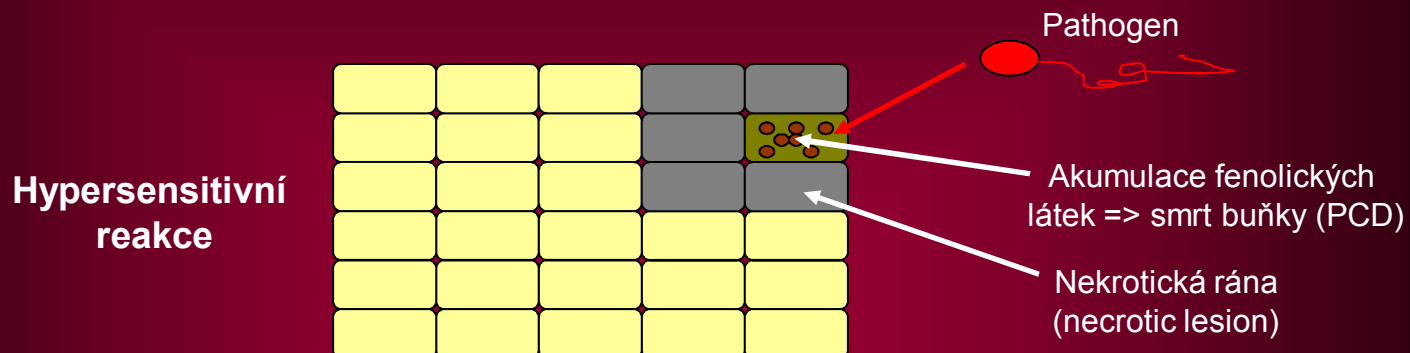


PCD jako součást reakcí rostlin ke stresům

Tvorba aerenchymu – rostliny vystaveny nedostatku buněčného kyslíku (**hypoxie**)
=> buněčná stěna a protoplast kořenových buněk umírají = **PCD**; vytváří se kanály
pro transport vzduchu ze stonku.



Hypersensitivní reakce – reakce rostliny k patogenní infekci; hostitelská buňka a buňky okolní prochází rychlou **PCD** => chrání ostatní buňky pletiva před infekcí



Hexokinázy – katalyzují fosforylaci cukru - 1. krok v metabolismu hexóz

– receptory hladiny glukózy - signál do jádra



Kontrolní rostlina

Hxk1-silenced plant

Gene silencing genu *HXK1* →

Hexokinázy spojené s mitochondriemi kriticky regulují proces PCD

Metabolismus glukózy je spojen s PCD

Senescence (stárnutí) – příklad PCD
regulované vnějšími faktory

UPDATE 2007

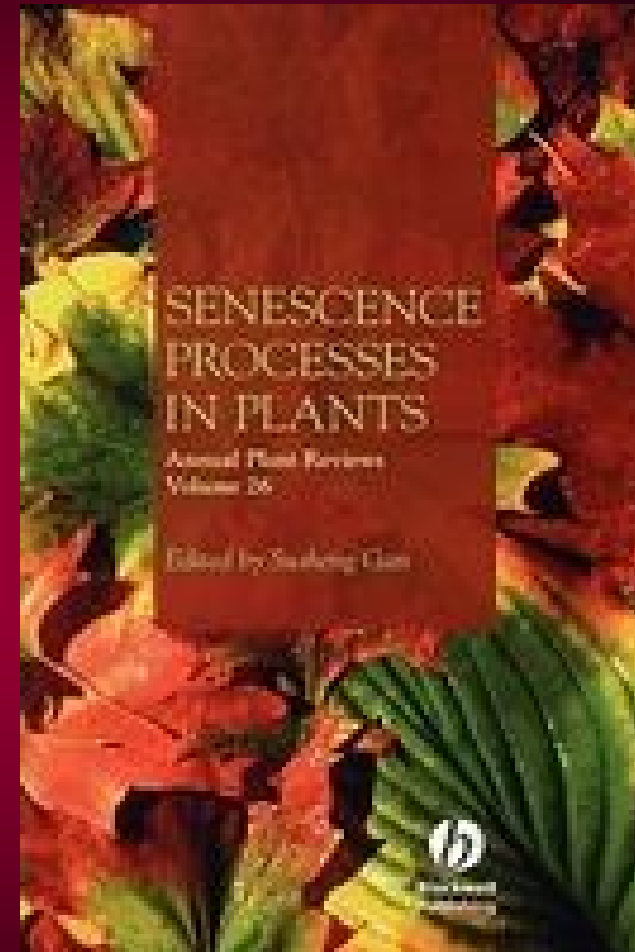
Gan S (2007) *Senescence Processes in Plants*. Blackwell Publishing.

<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470988855>

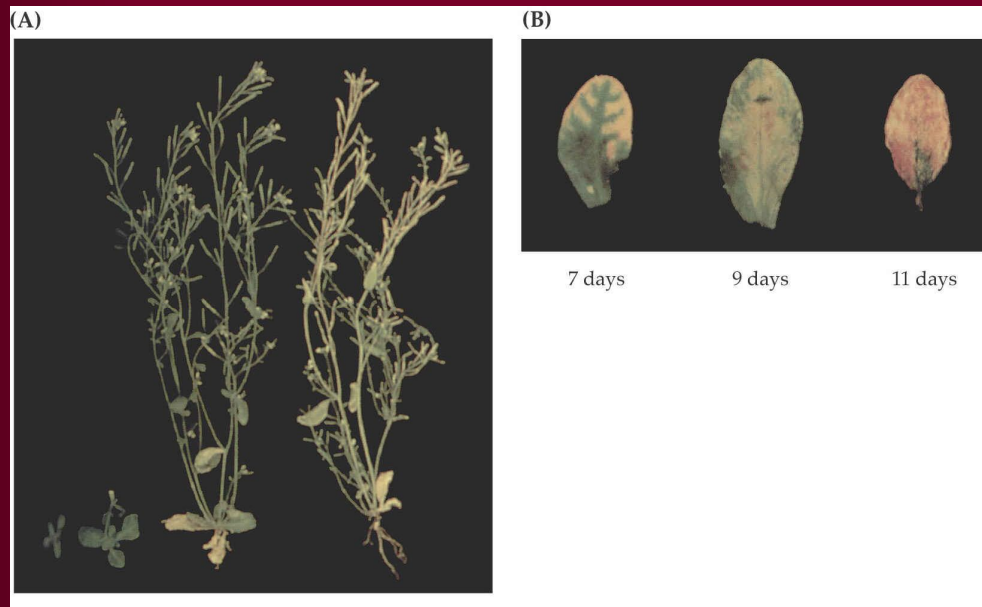
UPDATE 2007

Lim PO et al. (2007) *Annu Rev Plant Biol* 58: 115 – 136

Vyčerpávající review zabývající se senescencí listů



Senescence a smrt jsou závěrečnou fází vývoje všech orgánů.



Senescence - přirozený, na energii závislý, proces kontrolován vlastním genetickým programem rostliny. Senescence je však dramaticky regulována vnějšími faktory (délka dne, teplota)

Rychlá senescence - senescence květních orgánů – během jednoho dne: otevření květů 5.00 hod, odpoledne uzavírání, změna barvy a tvaru, stárnutí a umírání.



Povíjnice (*Ipomoea tricolor*)

Pomalá senescence - listy (jehlice) borovice *Pinus longaeva* se vyměňují po 45 letech

Mechanismus integrace senescenčních programů do vývoje a života orgánů či celé rostliny není znám.

Hypotéza „die now“ – signál „die now“ je neustále přítomen – buňky, pletiva, orgány na něj reagují až v okamžiku, kdy k tomu dá příkaz jejich individuální program.

Signál „die now“ jistých buněk může indukovat senescenci v jiných buňkách

Fenotypy genetických variant, hybridů či mutantů:

- „stay green“
- nekrotický
- nemocný

Mutace v genech, které regulují časování nebo lokalizaci normální senescence či PCD



Analýza mutantů: odhalení procesů kontrolující senescenci či buněčnou smrt

cad1 – ***constitutively activated cell death 1***; fenotyp, který je podobný poranění zřetelnému při hypersenzitivní reakci; 32x zvýšená hladina kyseliny salicylové; kóduje protein zapojený v imunitních reakcích živočichů



WT

Stay-green

Senescence je vysoce regulovaný proces – tři základní fáze

Iniciační fáze

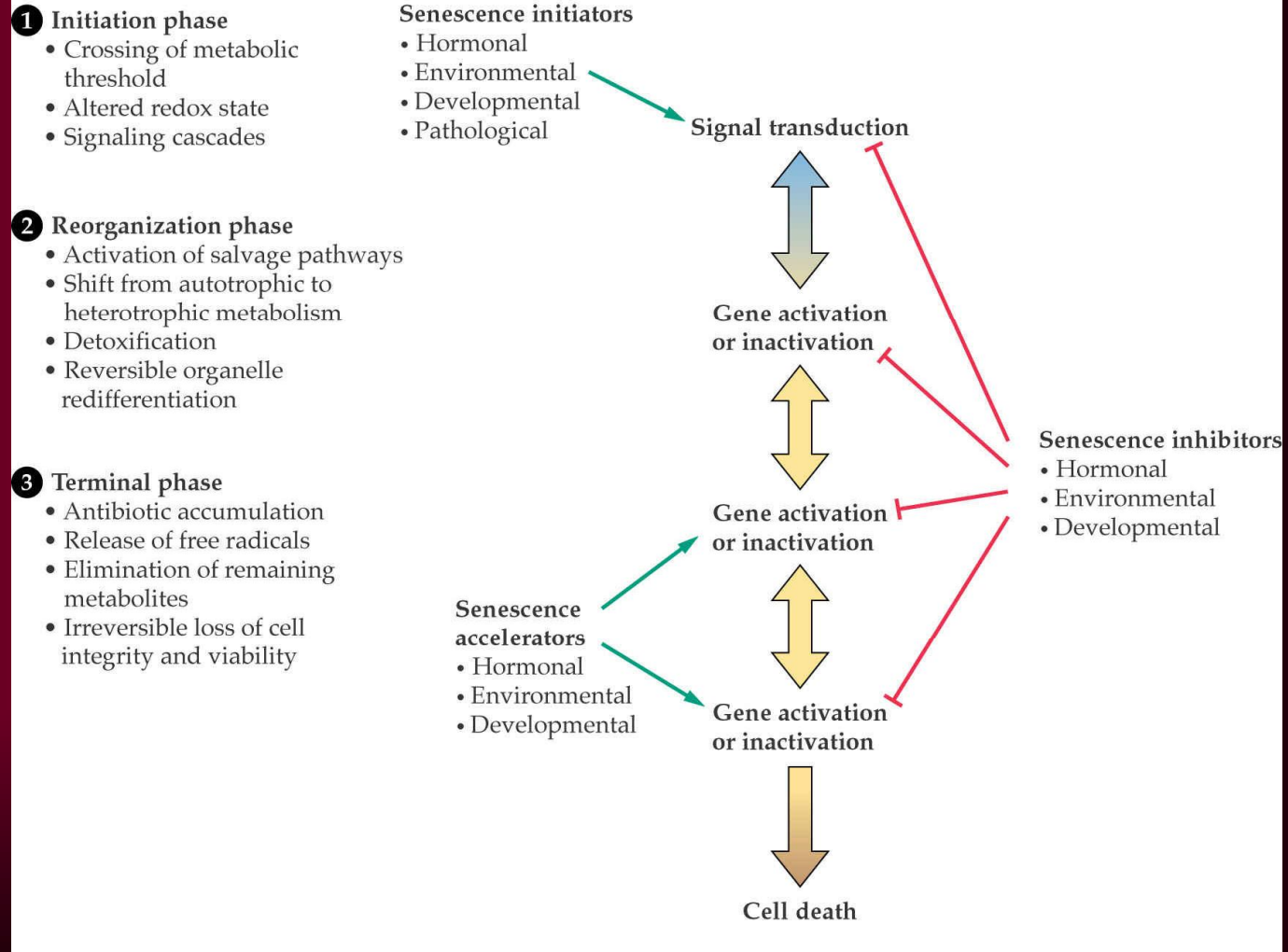
Aktivace a inaktivace genů

Reorganizační fáze

Rediferenciace buněčných struktur a remobilizace materiálu

Konečná fáze

Iniciace nevratných procesů

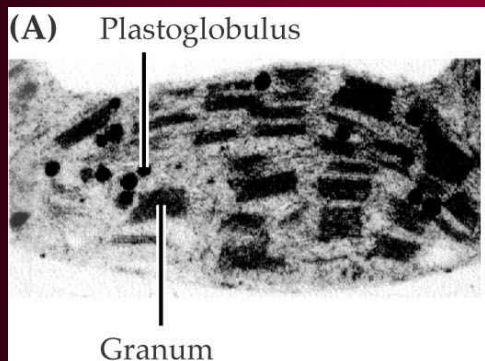


Senescence listů a plodů je charakterizována dramatickými **změnami hlavních organel**, zvláště plastidů mezofylových buněk a parenchymu perikarpu plodů.

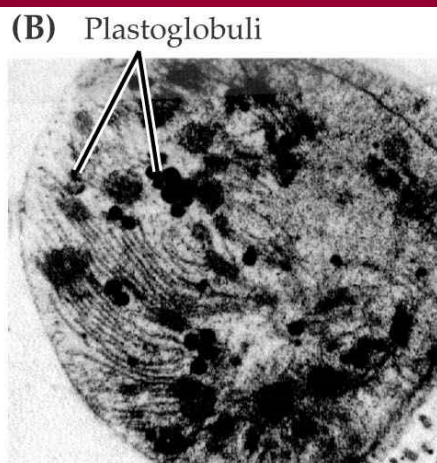
Chloroplasty → Gerontoplasty

Grana se rozpadají,
přibývá plastoglobulů

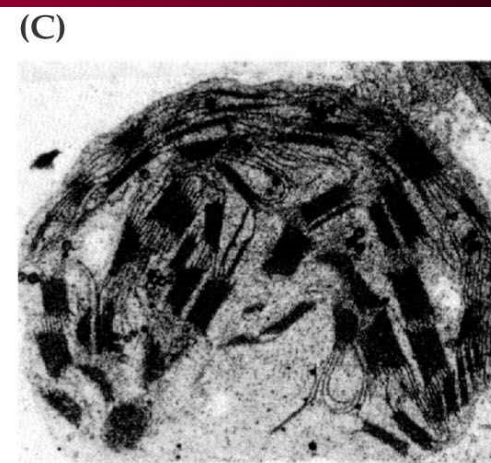
Grana zůstávají zachována,
plastoglobuly se nevyskytují



Wild-type chloroplast
(*stay-green* chloroplast is similar)



Wild-type gerontoplast



Stay-green gerontoplast

WT

Stay green

Chloroplasty

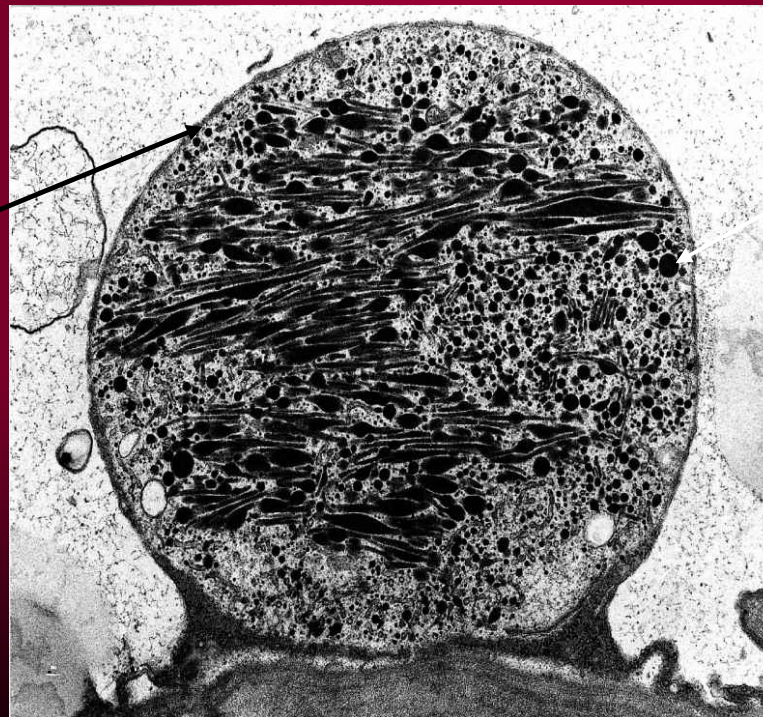


Chromoplasty

Foto: <http://botanika.wendys.cz>

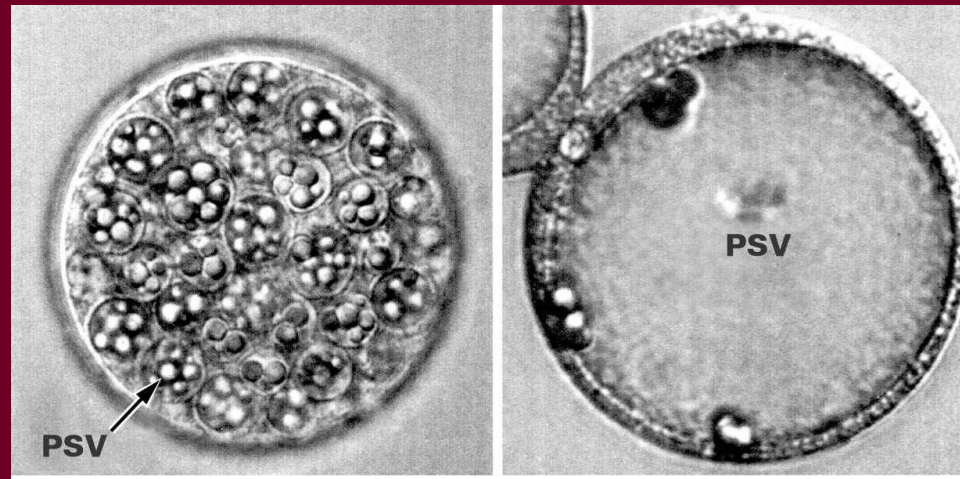
Chromoplast plodu židovské třešně – buňka má velice slabou cytoplazmu;
celá buňka je vyplněna plastidy obsahujícími karotenoidy

Cytoplazma



Karotenoidy

Dělohy a endosperm jsou zásobárnou proteinů – během senescence se malé vakuoly mění ze zásobních organel na velkou centrální vakuolu



Dělohy a endosperm jsou také zásobárnou lipidů. Lipidy jsou shromažďovány v organelách - **oleosomech**

Během senescence dochází k tvorbě glyoxyzómů – hrají roli v glukoneogenezi = tvorba cukrů z lipidů

Tyto změny v buněčné kompartmentaci dokazují vysokou organizovanost procesu senescence

Aktivace specifických genů kontrolujících předem dané buněčné události



Rozpad organel: **První:** chloroplasty (tylakoidní proteiny, stromatální enzymy)
Poslední: jádra

Senescence-down-regulated genes (SDGs) – geny, které jsou tlumeny během senescence (proteiny zapojené ve fotosyntéze)

Senescence-associated genes (SAGs) – geny, která jsou aktivována během senescence (hydrolytické enzymy – proteázy, ribonukleázy, lipázy, chloroplast degrad. enzymy...)

Klasifikace SAG podle funkční aktivity proteinů, které kódují:

1) Geny kódující proteolytické enzymy – tři druhy cystein proteáz:

- a) enzymy indukující klíčení u obilovin
- b) enzymy podobné papainu = enzym z papaje
- c) enzymy upravující proteiny

2) Geny kódující komponenty proteolytického systému (aspartic proteázy, ubiquitin)

3) Geny kódující proteiny hrající roli v obraně rostlin proti patogenům – antifungální proteiny, chitinázy, pathogenesis-related proteiny

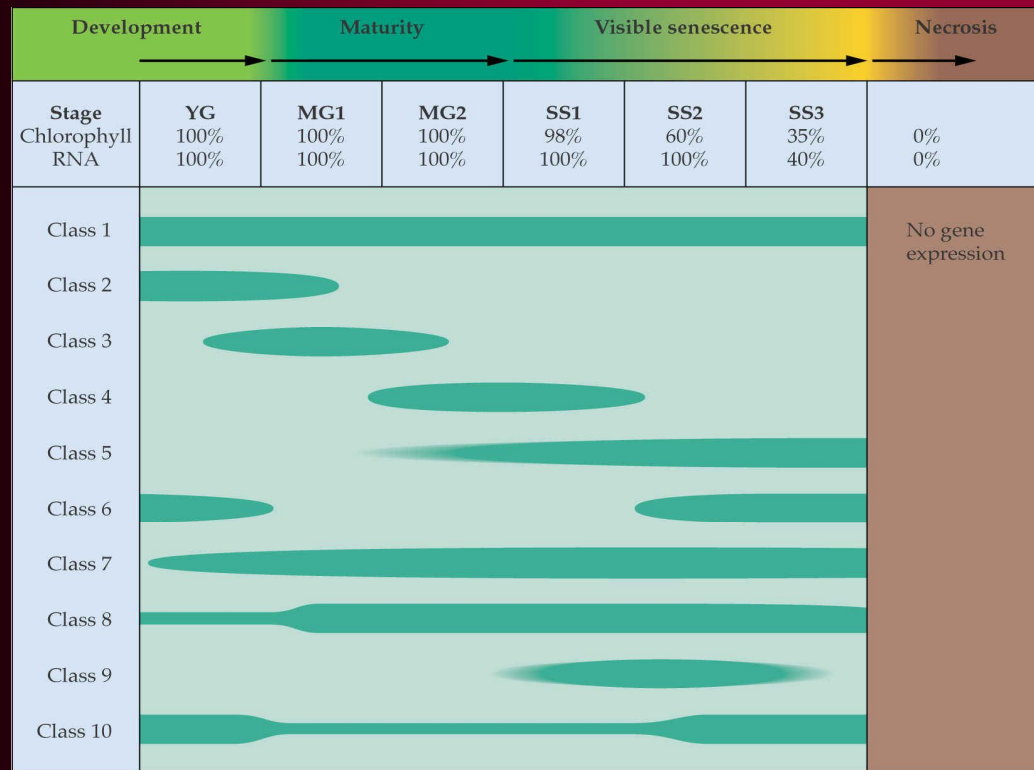
4) Geny kódující proteiny, které chrání buňku proti oxidativnímu poškození vyvolaného ionty kovů



Variabilita v expresi SAG – geny exprimované:

- v různých stádiích senescence
- jen ve stárnoucích nebo naopak jen v nestárnoucích orgánech
- pouze ve specifických orgánech
- vlivem stresů, hormonů (ABA, etylén), nedostatkem karbohydrátů

Stádia listové senescence u *Brassica napus*



YG – plně rozvinuté listy

MG1 – listy z kvetoucích rostlin

MG2 – listy z rostlin vytvářejících tobolek

SS1 – listy s 98% chlorofylu

SS2 – listy s 60% chlorofylu

SS3 – listy s 35% chlorofylu

Mutanti v genech zapojených v senescenci

- geny regulující iniciaci celého senescenčního programu = geny fungující na počátku senescenčních signálních drah
- geny kódující individuální enzymy metabolických drah = geny fungující hlouběji (později) v signální dráze

Gregor Mendel – studium senescence u hrachu – gen **I** (dříve **B**)

- reguluje stupeň zelenosti děloh

Mutant v genu **I** má deficit v enzymu (PaO), který degraduje chlorofyl. Ukazuje zpožděnou senescenci.

Protein **I** u hrachu = protein **SGR** (Stay Green Rice) u rýže; exprese SGR je indukována ABA a inhibována cytokininy stejně jako enzym PaO

sgr mutant u hrachu – funkčnost listů klesá, i když hladina Chl „a“ a Chl „b“ je vysoká v pozdní fázi senescence
=> **SGR je primárně zapojen v degradaci chlorofylu.**

Mutant rajčete v genu **GREENFLESH** – exprimován v listech a plodech

Mutanti „*stay-green*“ – blokáda
v časování aktivity enzymů, které
degradují chlorofyl



Rostliny jsou dlouho zelené

„*Stay-green*“ obilniny – ekonomický
význam



1985 rekordní výnos kukuřice v Illinois
(24 tisíc kg/ha) – *stay-green* varieta



WT

Stay-green

Stay-green variety jsou významné v ekonomicky chudých zemích

Analýza stay-green mutanta *sid* vedla k identifikaci biochemické dráhy kontrolující degradaci chlorofylu

Degradace chlorofylu je složitý proces zahrnující komplexní enzymatickou dráhu a probíhající v několika subcelulárních částech.

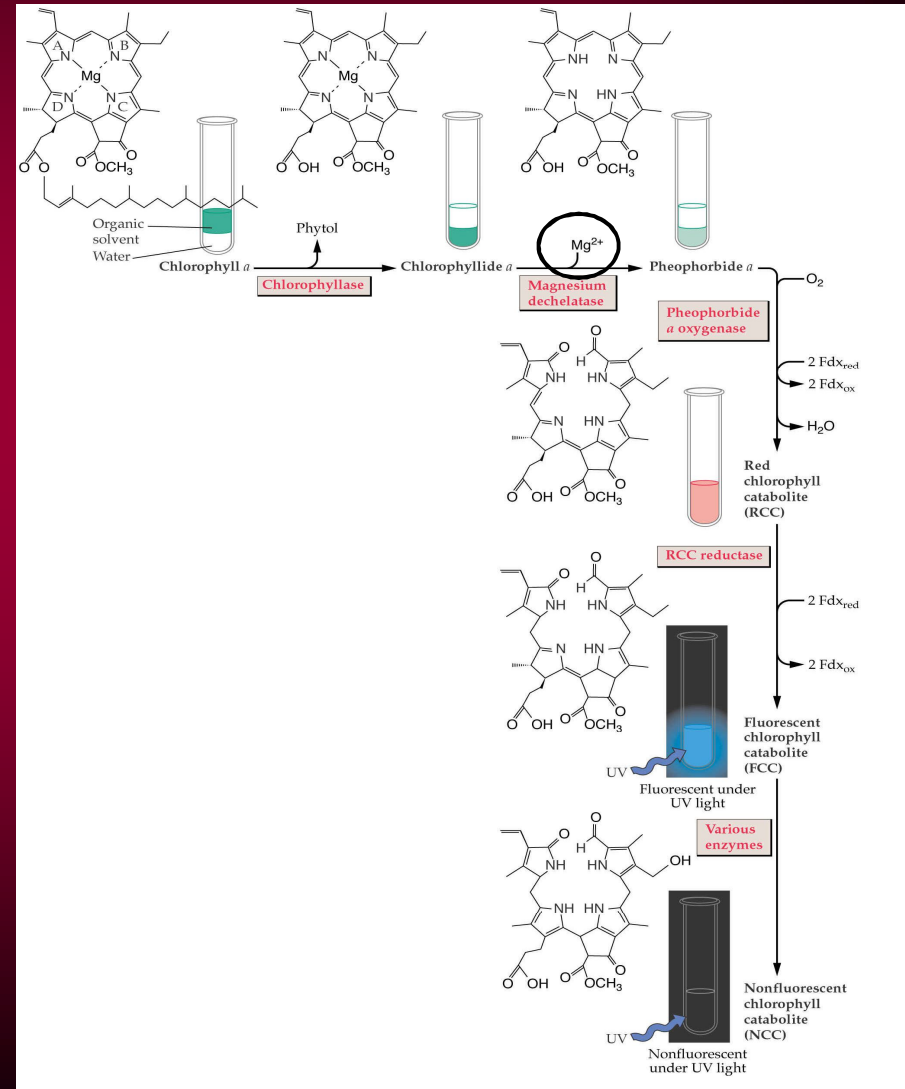
Kritické body:

- enzymatické odstranění Mg^{2+}
- otevření kruhu a vznik bezbarvého tatrpyrolu

UPDATE 2008

Ougham H et al. (2008) *Plant Biology* 10: 4-14

Review o faktorech, které kontrolují katabolismus chlorofylu a jeho význam v senescenci listů.



Ztráta chlorofylu je spojena se snižováním obsahu nebo naopak akumulací karotenoidů, v závislosti na druhu rostliny.

Degradace chlorofylu



Odhalování vrstvy karotenoidů (žluto-oranžové barvivo)



Barevné kombinace podzimních listů



UPDATE 2008

Ougham H et al. (2008) *New Phytologist* 179: 9-13

Otázka: Proč dochází k zabarvování listů nejen v zimě, ale i v létě.

Konference: „Origin and evolution of autumn colours“, Oxford, březen 2008. Téma – význam zabarvování listů pro rostlinu

Funkce anthocyaninů: - fyziologická (fotoprotektivní, antioxidantní, zásobní)
- signální – žlutá barva přitahuje mšice, červená ne

Analýza mutantů s abnormálně zbarvenými plody či listy



Klonovány důležité geny hrající roli v biosyntéze karotenoidů



Xantofyly: zeaxantin



Receptor modrého světla zprostředkující otevření stomat

