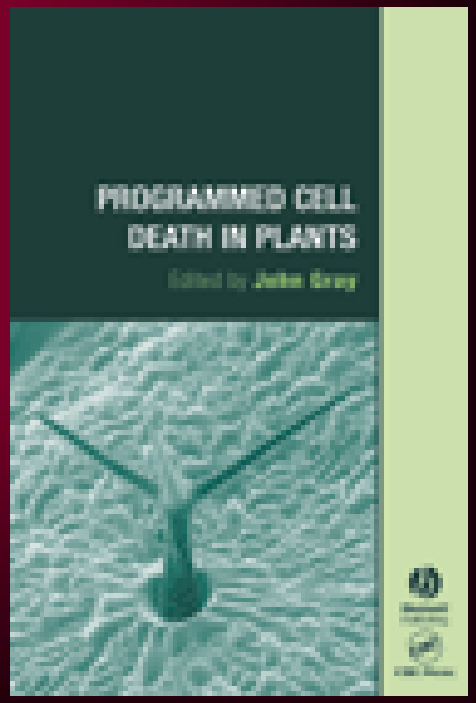
3) Senescence a programová smrt buňky (PCD)

c) Senescence a rostlinné hormony
d) Vývojová PCD
e) PCD a reakce rostlin ke stresu



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

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

c) Senescence a rostlinné hormony

Faktory

Vnější Vnitřní → Rostlinné hormony: Etylén (CH_2-CH_2)

Cytokininy

ABA, GA

Senescence

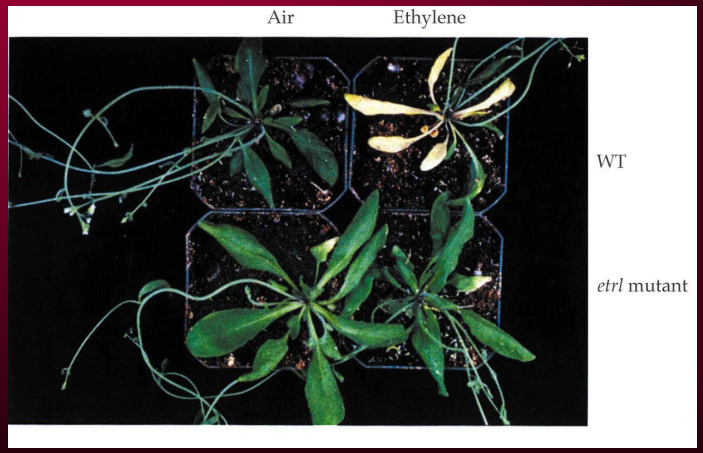
1) Interakce hormonů

2) Rozdílné reakce rostlin ke stejnému hormonu

3) Interakce hormonů s vnějšími i jinými vnitřními faktory (věk rostliny)

Etylén (plynný fytohormon) – stimuluje senescenci

- redukce růstu listů a indukce žloutnutí
- snížení exprese genů spojených s fotosyntézou
- zvýšení exprese *SAG*



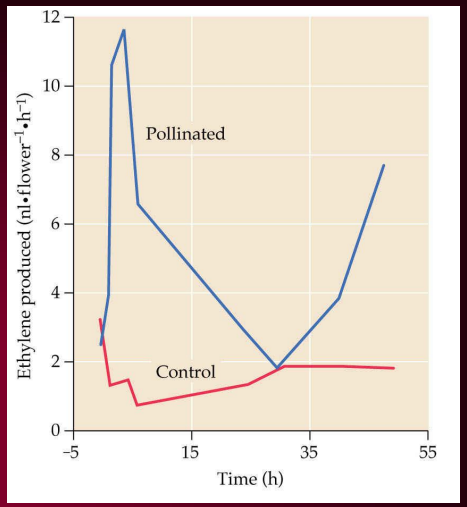
[Etylén] ↑ → senescence listů

senescence petals po opylení →

senescence plodů - zrání

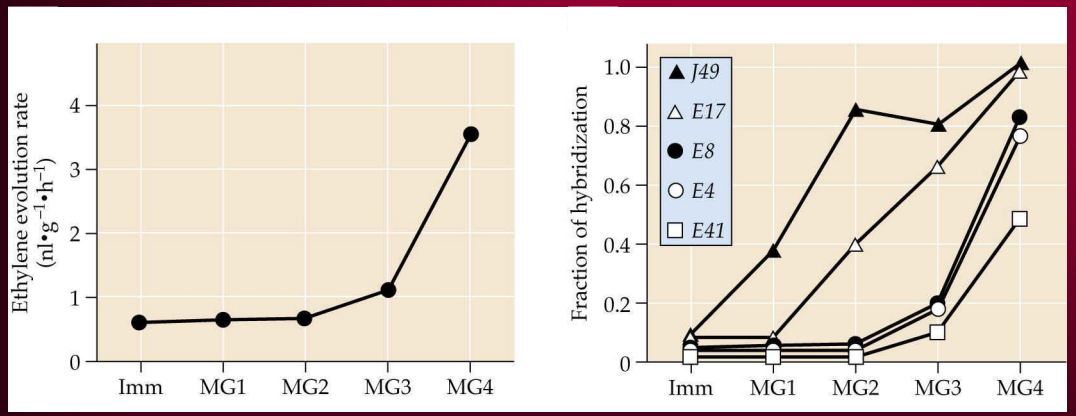
↓

Modelový objekt - rajče



Petunia

Produkce etylénu → exprese genů spojených s dozráváním plodů



↓

Změna barvy, textury a chuti plodu

Stádia zralosti plodu

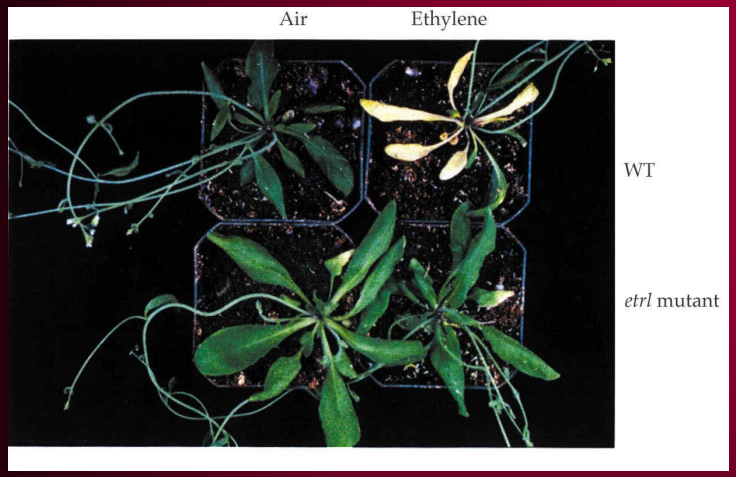
Imm – immature - nezralé
MG – mature green – zralé zelené

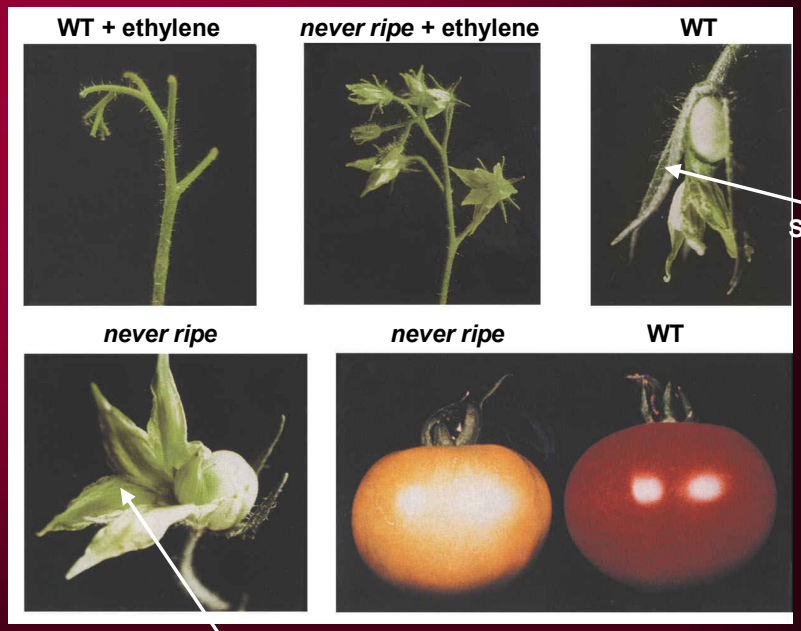
Rostliny se změnami v receptoru etylénu ukazují změny v senescenci

Arabidopsis **mutant –** ***etr1*** **– necitlivý k etylénu;** ***ETR1*** **kóduje receptor etylénu**

Mutant rajčete – ***never ripe*** **– necitlivý k etylénu**

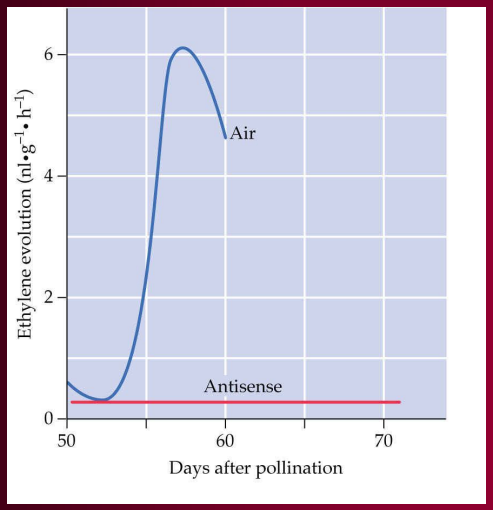
Opožděná senescence plodů i květů

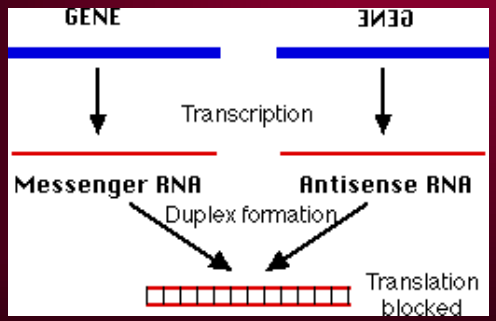


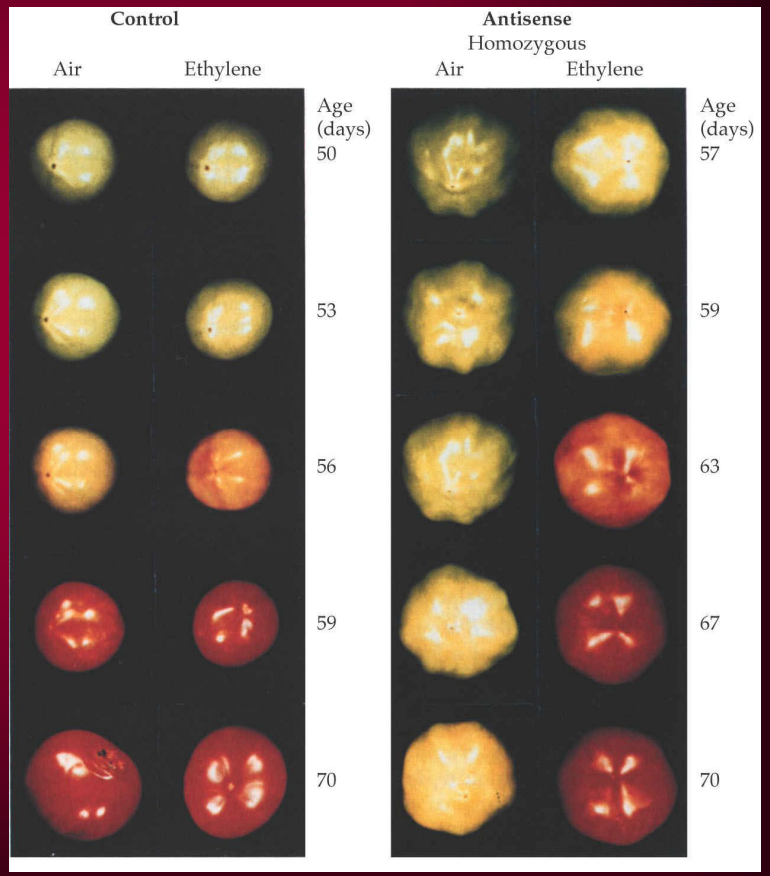


Rostliny se změnami v biosyntéze etylénu

Transgenní rostliny – rajče exprimující antisense geny zapojené v biosyntéze etylénu => tvorba enzymů blokována => produkce etylénu blokována => špatné dozrávání plodů







Normální rostliny = produkující etylén

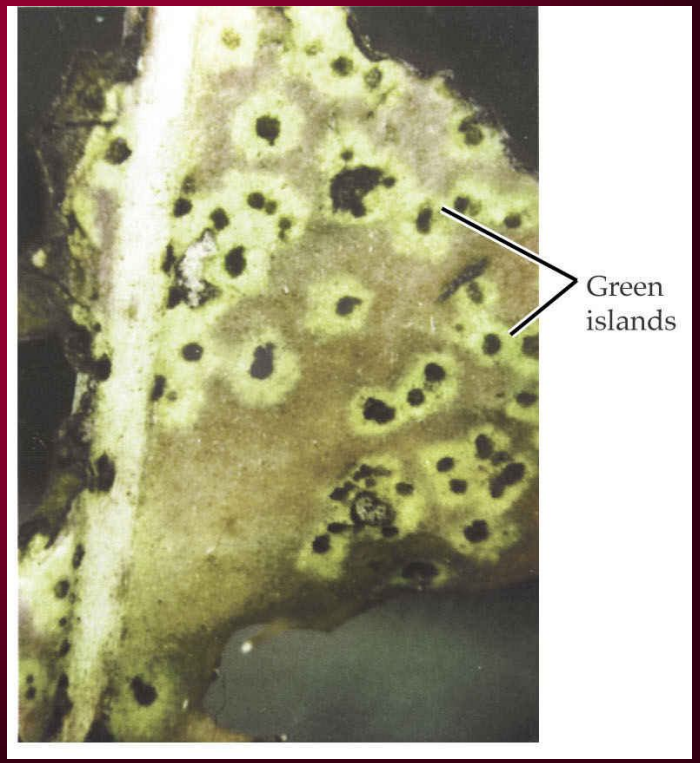
Antisense rostliny = neprodukující etylén

Cytokininy – potlačují senescenci

- koncentrace cytokininů se snižuje ve stárnoucích pletivech
- aplikace cytokininů způsobuje zpoždění senescence

Cytokininy se vyskytují v zóně obklopující místo infekce patogenem => zpoždění senescence v místě kolem patogena (nestárnoucí zóna) => zelené ostrůvky

Není známo, zda cytokinin v zelených ostrůvcích je produkován rostlinou nebo patogenem



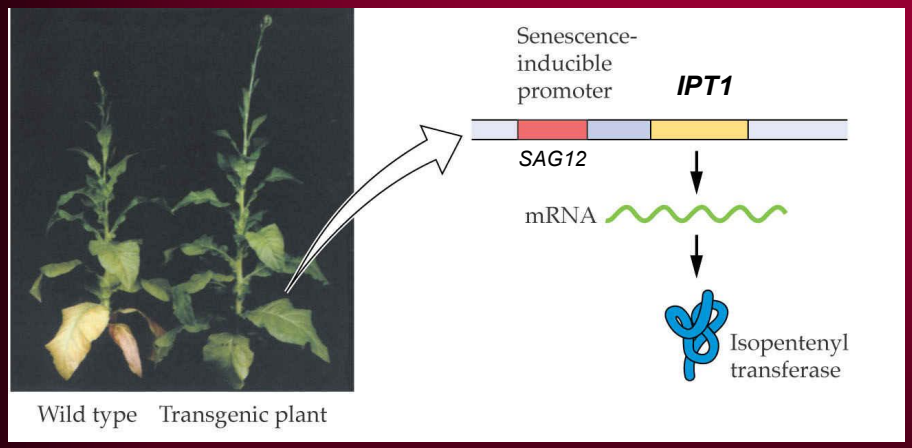
Identifikace role cytokininů v senescenci – molekulární metody

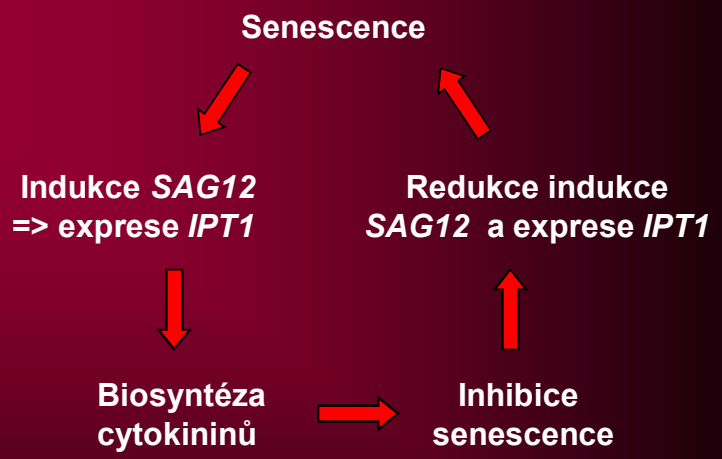
Gen *IPT* z *A. tumefaciens* – kóduje izopentenyl transferázu – katalyzuje biosyntézu cytokininů

Transgenní rostliny obsahující *IPT* – zpožděná senescence + vedlejší fenotypy

Obtížné stanovit, zda zpožděná senescence je přímým následkem zvýšené hladiny cytokininů, nebo následkem sekundárních efektů

Chytrý experiment





Produkce cytokininů způsobuje zpoždění senescence → praktický dopad

Možná vysvětlení antisenescenční aktivity cytokininů

1) Pletiva s vyšší hladinou cytokininů hrají roli v metabolitovém hospodářství rostliny => akumulace nutričních látek => neprobíhá senescence

2) Cytokininy mohou potlačovat expresi klíčových genů: *SAG*

3) Cytokininy aktivují transkripci chloroplastových genů. Aktivita cytokininů přitom závisí na světle a věku buněk a listů.

UPDATE 2008

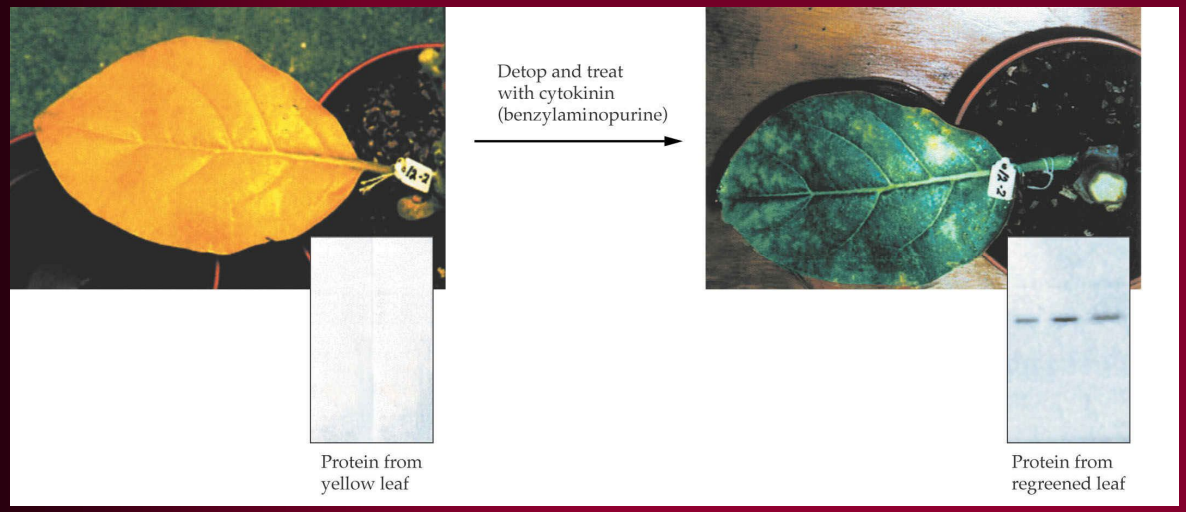
Zubo YO et al. (2008) Plant Physiology 148: 1082-1093

Duální aktivita cytokininů:

- působení na dlouhé vzdálenosti (stimulace diferenciace a metabolitového hospodářství)

- působení lokální (ve stárnoucích buňkách potlačují senescenci)

Regreening (znovuzelenání) = příklad reverzibility senescence u rostlin



- potlačení exprese *SAG*
- aktivace genů pro tvorbu plastidů
- přeměna gerontoplastů na chloroplasty

Role jiných fytohormonů v senescenci – není zcela jasná

ABA – většinou stimuluje senescenci

GA – obvykle zpomaluje senescenci

Auxiny – stimulují i zpomalují senescenci

d) Vývojová PCD (programmed cell death)

Xylogeneze (tvorba xylému) – **1. modelový příklad** vývojově regulované buněčné smrti

Xylogeneze:

- iniciována během embryogeneze
- pokračuje během života rostliny – **diferenciace tracheid** (buňky xylému – transport vody do rostliny)

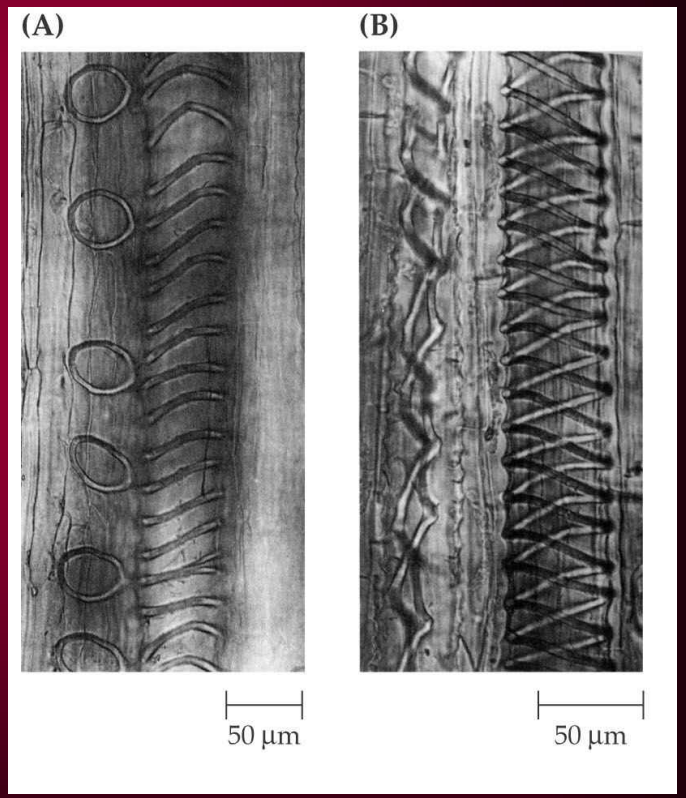
Tvorba sekundární buněčné stěny (lignifikace)

↓

Buněčná smrt a autolýza obsahu buňky

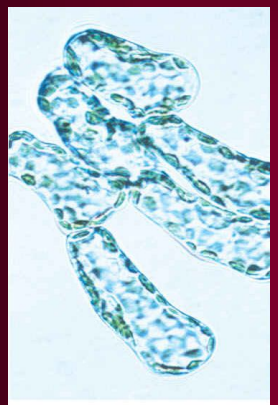
↓

Obal buňky = sek. buněčná stěna = **tracheidy (TE)**



Tracheidy (tracheary elements)

Vývoj TE z mezofylových buněk rostliny *Zinnia*



Isolated mesophyll cells

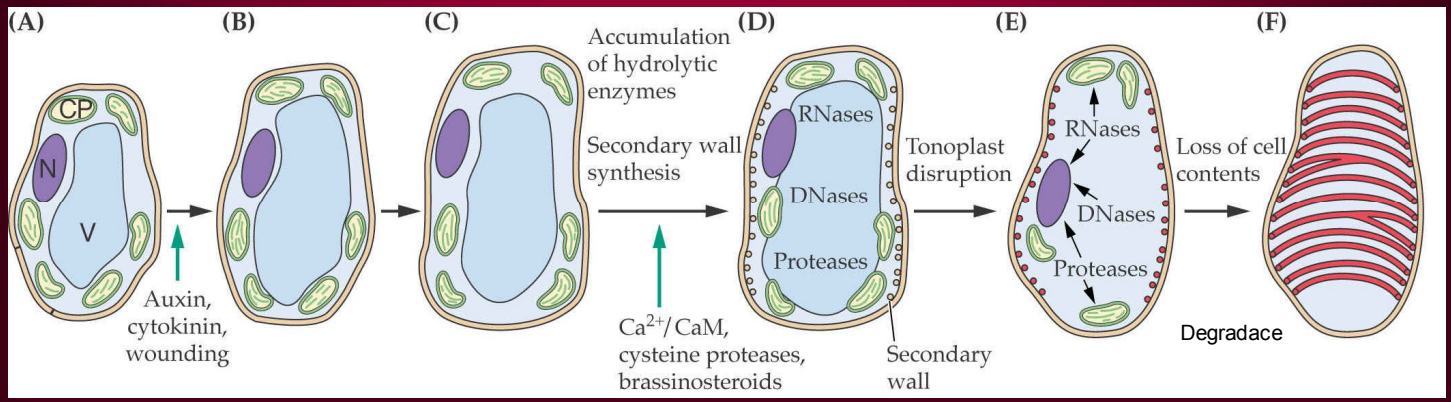
Kultivace *in vitro*

+ auxin

+ cytokininy

Differentiated tracheary elements

***Zinnia* (Ostálka)**



Indukce hormony | **Dediferenciace** | **Prekurzorová TE buňka** | **Nezralé TE se sek. buněčnou stěnou (lignifikace)** | **Prasknutí tonoplastu** | **TE = mrtvá tracheida**

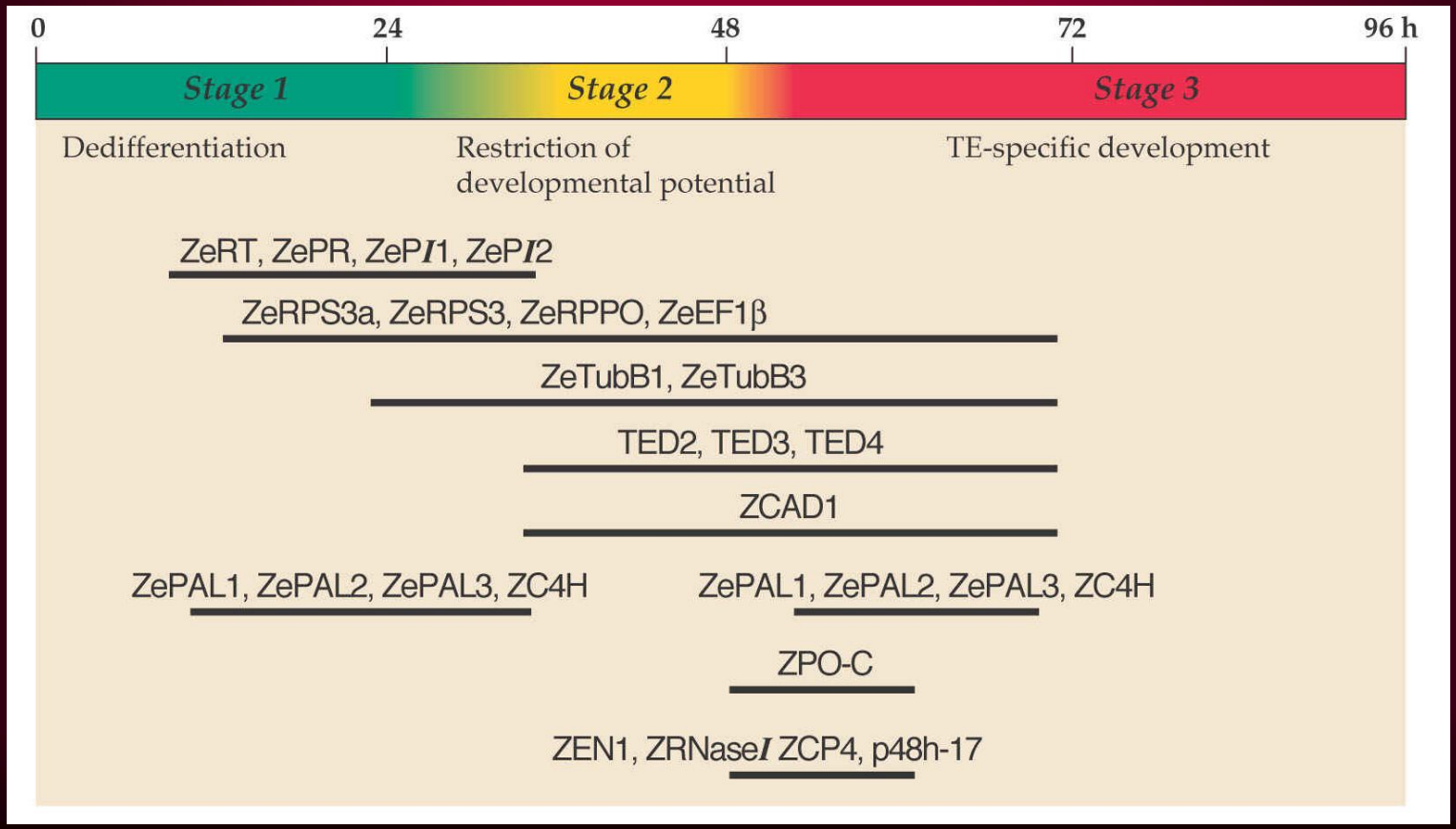
In vitro proces differenciace TE probíhá v populaci buněk synchroně

3 fáze diferenciace tracheid ~ 4 dny ← Možnost biochem. a mol. analýzy

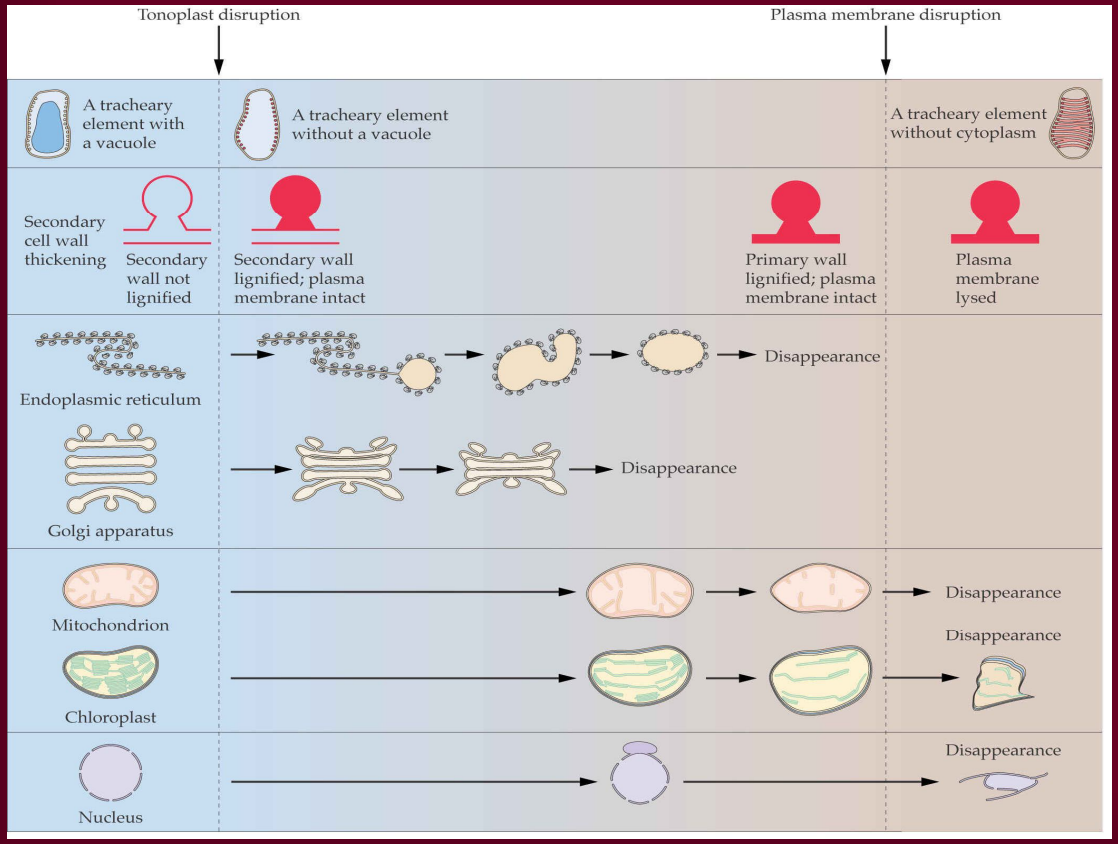
Exprese genů zapojených v reakcích k poškození (PI - Proteázové inhibitory) (RP – Ribozomální proteiny) (EF – Prodlužovací faktory)

Exprese TE diferentiation-related genes (TED, neznámá funkce)

Exprese genů účastnících se syntézy komponent cytoskeletu (TUB - tubulin). Aktivace genů kódujících proteiny buněčné stěny (arabinogalactan-like, extensin-like)



Po uložení sek. buněčné stěny protoplast degeneruje – autolýza: tonoplast praská a do cytozolu se uvolňují lytické vakuolární enzymy (cystein proteázy, nukleázy, serine proteázy). Po prasknutí tonoplastu dochází ke změnám v organizaci organel a buněčné stěny.



Update 2009

Endo S et al. (2009) Plant Cell 21: 1155-1165

Geny *TED6* a *TED7* hrají klíčovou roli v syntéze sekundární buněčné stěny.

Regulace PCD při vzniku tracheid

Auxiny

Cytokininy – role v indukci PCD u rostlin a živočichů – 2002; prvky signální dráhy nejsou známy

Nedávné výzkumy – zapojení NO (oxid dusnatý)

NO – reaktivní plyn rozpustný ve vodě a tucích; zapojen v mnoha biologických procesech:

- **– zavírání stomat**
- **– klíčení semen**
- **– vývoj kořenů**
- **– exprese obranných genů**

2002 – cytokininy indukují tvorbu NO v *Arabidopsis*, tabáku, petrželi, atd.

Cytokininy indukují tvorbu NO v xylémových buňkách => inhibice respirace => => PCD (vznik tracheid)

Ca^{2+}, calmodulin:

- odstranění Ca^{2+} z kultivačního médie vede k redukci diferenciace
- hladina Ca^{2+} se zvyšuje těsně před lignifikací
- aplikace inhibitorů Ca^{2+} kanálů vede k redukci diferenciace tracheid
- aplikace inhibitorů calmodulinu vede k inhibici diferenciace tracheid

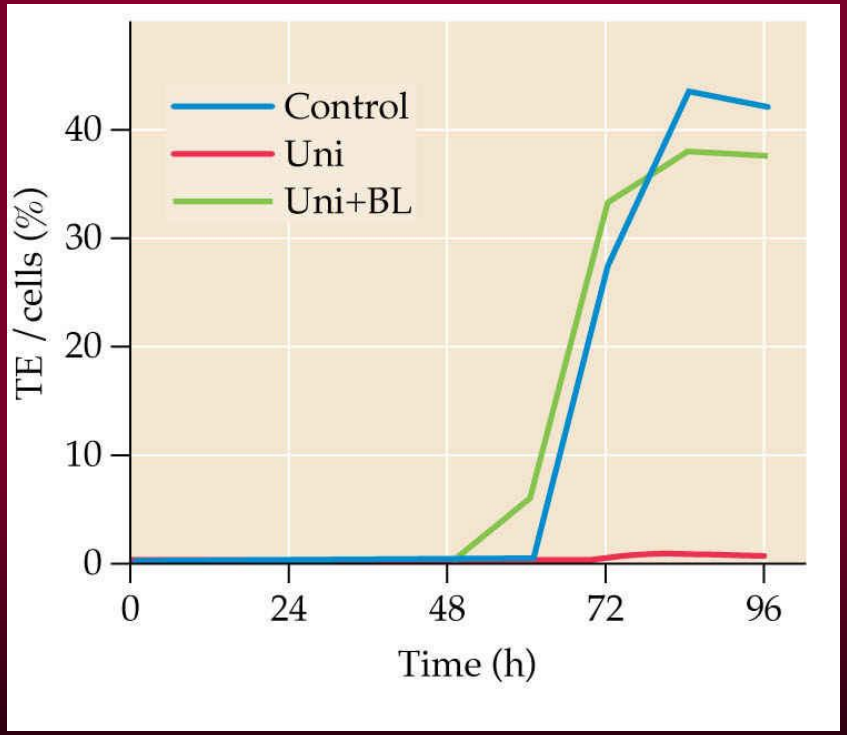
Serine proteázy:

- aplikace trypsinu a papainu vede k stimulaci PCD a diferenciaci tracheid
- stimulační efekt trypsinu je blokován snížením hladiny Ca^{2+} nebo aplikací inhibitorů Ca^{2+} kanálů
- aplikace inhibitoru trypsinu vede k blokádě PCD a diferenciace tracheid

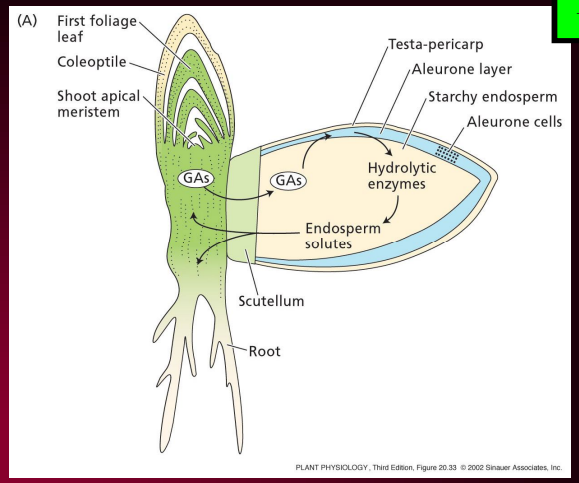
Brassinosteroidy

– aplikace uniconazolu (inhibitor syntézy brassinosteroidů) vede k blokádě diferenciace tracheid a redukci exprese genů exprimovaných v pozdních fázích

– při současné aplikaci uniconazolu a brassinosteroidů dochází k potlačení efektu uniconazolu



PCD endospermu a aleuronových buněk - - 2. modelový příklad vývojově regulované buněčné smrti

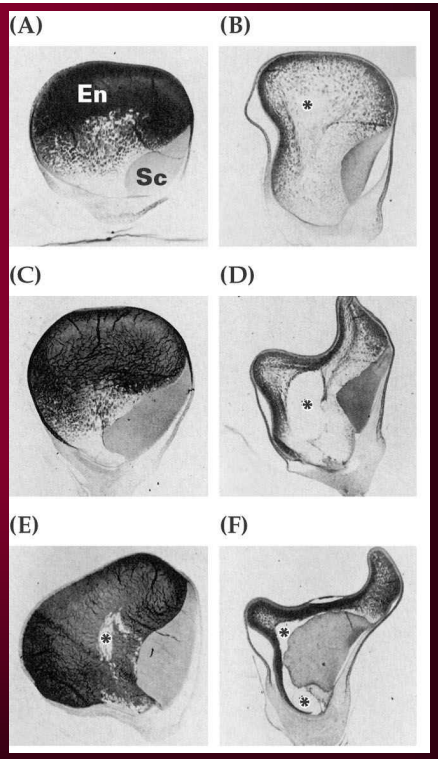


Endosperm obilnin - 2 typy buněk – 2 odlišné cesty PCD

- škrobový endosperm
- aleuronové buňky

Škrobový endosperm – mrtvé buňky, ale jejich obsah není degradován – buňka je mumifikovaná; endosperm je degradován při klíčení enzymy uvolňovanými z aleuronu

shrunken2 - mutant kukuřice, předčasná smrt škrob. endospermu a degradace buňky; během PCD je jaderná DNA rozštěpena na velké fragmenty; na rozdíl od WT, buňky *shrunken2* autolyzují a endosperm se scvrkává – vznikají dutiny (*)



Dny po opylení

28

32

40

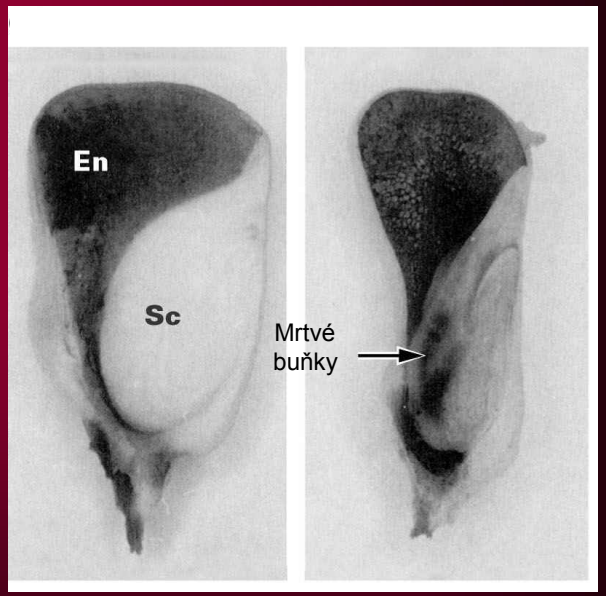
WT *shrunken2*

shrunken2 – nadprodukce etylénu

WT – aplikace etylénu => zvýšené množství buněčné smrti a deformací

AVG (inhibitor biosyntézy etylénu) – snižuje fragmentaci DNA v *shrunken2* a snižuje velikost dutiny v deformovaných zrnech

Etylén hraje důležitou roli v PCD škrobového endospermu



WT WT + etylén

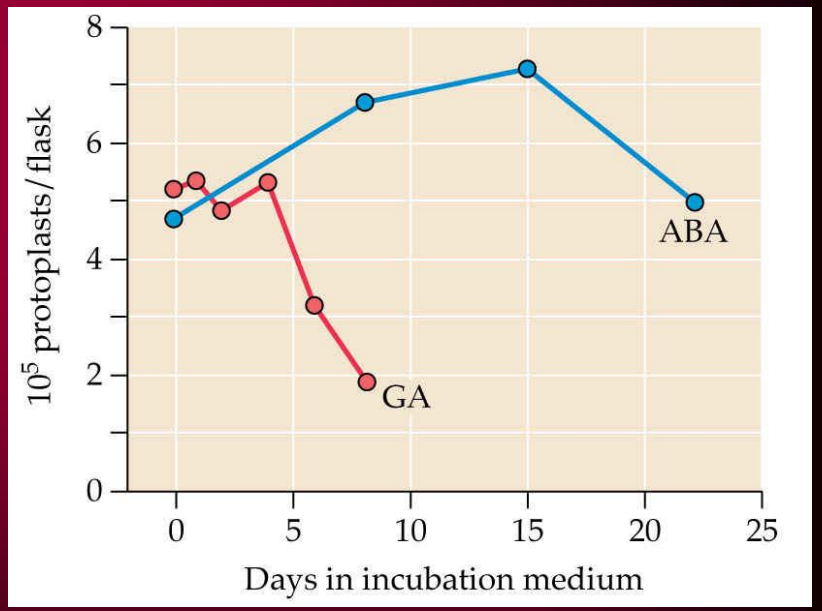
Aleuronové buňky – zůstávají živé až do klíčení a do doby, než jsou všechny rezervy z endospermu mobilizovány

Konec klíčení → změny v aleuronu:
- vakuolizace
- smrt
- rozpad protoplastu

Rostlinné hormony **ABA** a **GA** regulují PCD aleuronu:

GA – stimuluje začátek PCD – způsobuje buněčnou smrt 8 dnů po aplikaci

ABA – zpomaluje PCD – způsobuje oddálení buněčné smrti až o 6 měsíců



Protein HVA22 – indukován ABA; lokalizace v ER a Golgi aparátu aleuronových buněk; inhibuje GA-zprostředkovanou vakuolizaci/programovou smrt buněk aleuronu;

HVA22 inhibuje transport vezikul zásobujících vakuoly => zpoždění splývání vakuol => zpoždění klíčení a růstu

Aleuronové buňky obsahují PSV – protein storage vacuoles, pH 7

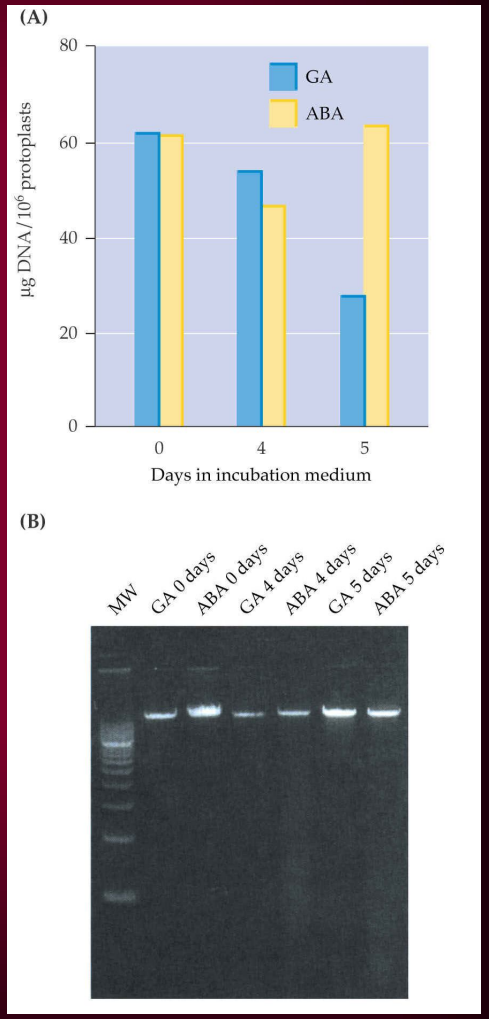
Aplikace GA → PSV pH 5.5 – vakuoly akumulují kyselé hydrolázy a nukleázy

Aplikace ABA → PSV pH 7 – vakuoly neobsahují kyselé enzymy

Role PSV není však jasná – nejsou důkazy, že tonoplast praská a hydrolázy se dostanou k obsahu buňky. Nedochází ani k apoptické degradaci DNA na 180 bp úseky.

Při PCD aleuronových buněk dochází ke štěpení DNA na velmi malé fragmenty; degradace DNA probíhá v pozdních fázích PCD až po autolyzaci celého obsahu buňky.

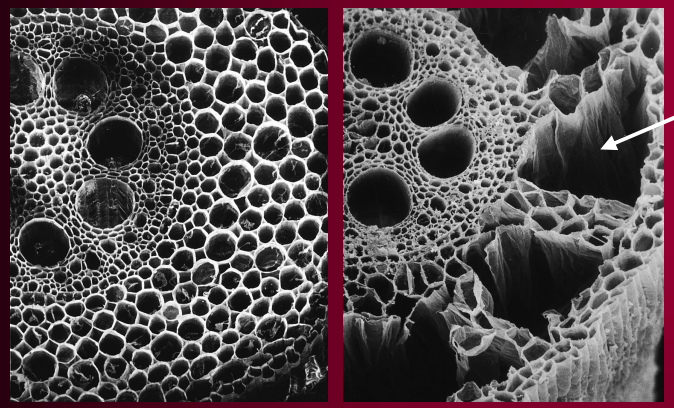
Signální dráhy vedoucí k syntéze a sekreci hydroláz v aleuronu jsou málo známy. Účastní se jich Ca^{2+}, cytozolické pH, calmodulin, protein kinázy a fosfatázy.



e) PCD a reakce rostlin ke stresu

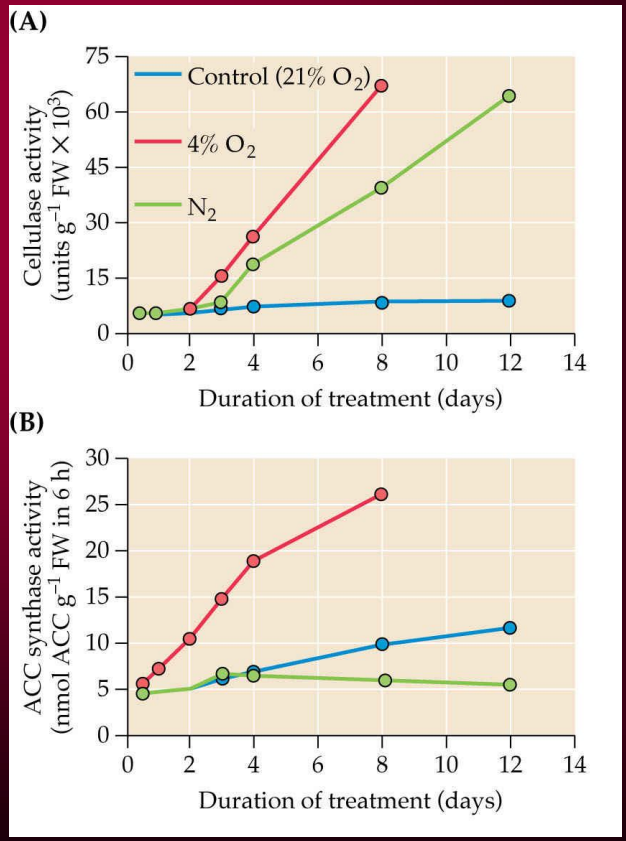
Kyslíkový deficit – hypoxie – nastává při zamokření půdy

- tvorba aerenchym – rychlý proces, spočívající v odstranění kortikálních buněk včetně buněčné stěny a vytvoření prostorů (kanálů) pro přívod kyslíku;



Hypoxie → Vysoká hladina celuláz

Aktivita ACC syntázy



Buňky procházející hypoxií ukazují zvýšenou hladinu Ca^{2+} v cytozolu.

Změna koncentrace Ca^{2+} je rychlá

Role cytozolického Ca^{2+} při hypoxii

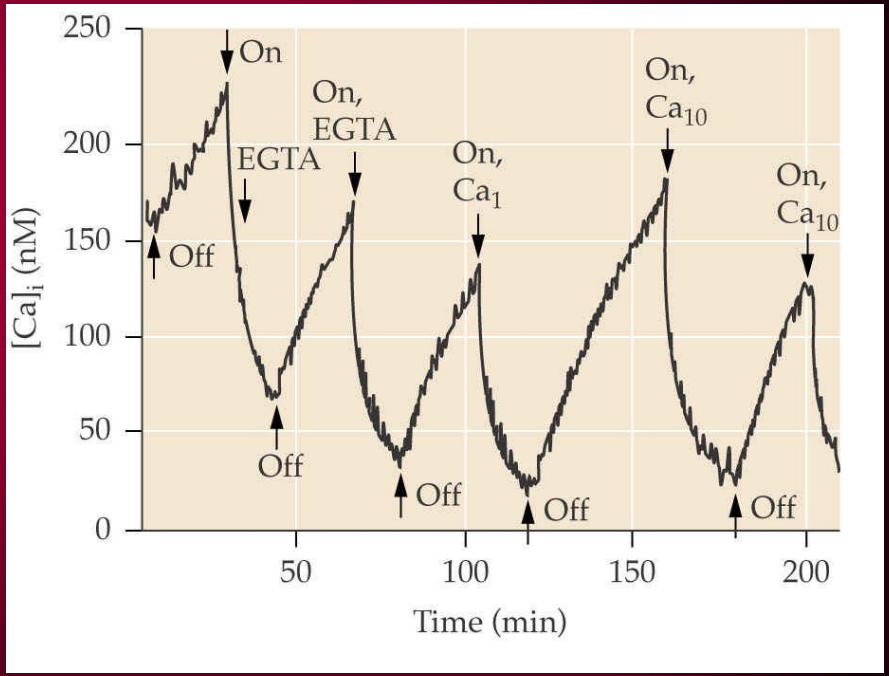
$[Ca]_i$ – cytozolický Ca^{2+}

On – zapnutí okysličování média

Off – vypnutí okysličování média – nastává hypoxie

Ca_1 – 1 mM externí Ca^{2+}

Ca_{10} – 10 mM externí Ca^{2+}



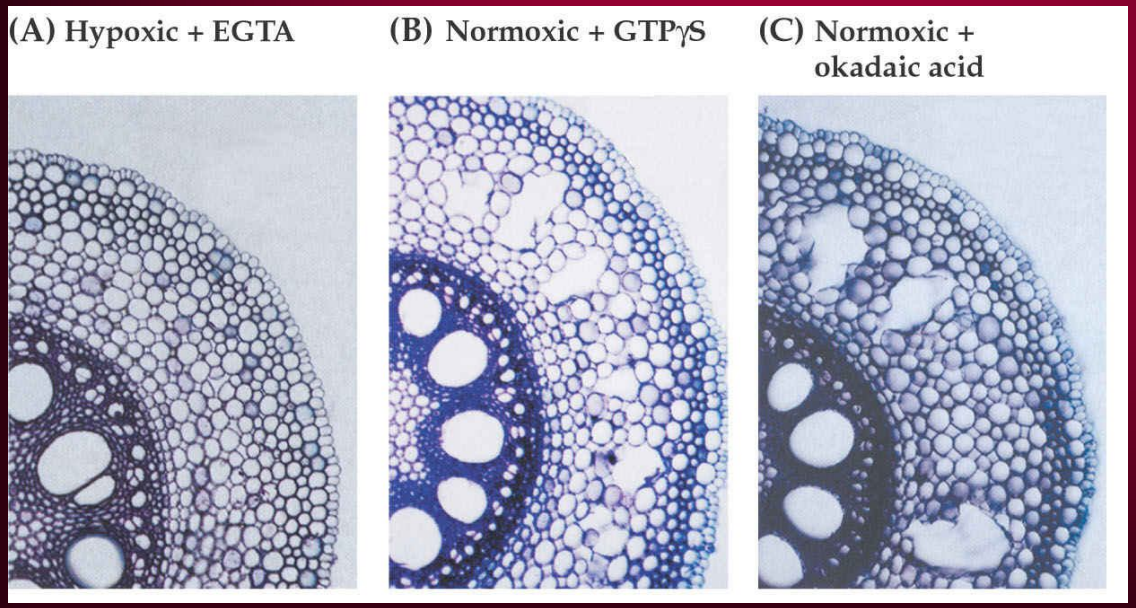
Změny v hladině cytozolického Ca^{2+} v kultivovaných buňkách kukuřice

Role G-proteinu a fosforylace ve tvorbě aerenchym

- GTPγS udržuje G-protein aktivní
- Okadaic acid inhibuje protein fosfatázy

→ Stimulace celuláz a tvorby aerenchym

- Aplikace inhibitoru protein kinázy → Blokuje tvorbu aerenchym



Ca^{2+}, calmodulin

↓

Aktivace protein kináz a fosfatáz

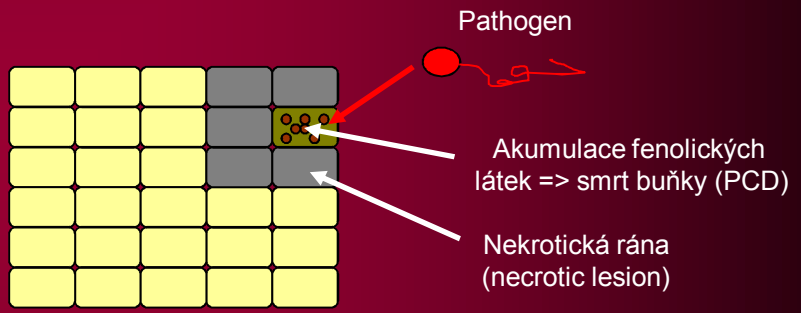
↓

Modifikace proteinů zapojených v PCD

Reakce k patogenu

Smrt hostitelské buňky je jedním ze základních znaků rezistence rostlin k patogenům

Forma rezistence k patogenům – hypersensitivní reakce (HR) = lokalizované smrti buněk



HR je znakem inkompatibilní interakce mezi rostlinou a avirulentním patogenem.

Inkompatibilní interakce je kontrolována genem rezistence *R* v rostlině. Umožňuje rostlině rozpoznat patogena a reagovat k patogenu, který nese gen avirulence *Avr*.

Při absenci jednoho z genů *R* nebo *Avr* dochází ke **kompatibilní interakci** – rostlina **není** schopna rozpoznat patogena a dochází k propuknutí nemoci.

Buněčná smrt může být příznakem nemoci během kompatibilní interakce.
Tato forma buněčné smrti není naprogramovaná a je následkem zabití hostitele patogenem (toxiny vylučovanými patogenem).

Základní otázka:

Je smrt buňky během HR sebevražda (geneticky naprogramovaná smrt) nebo vražda (smrt následkem toxicity produktů produkovaných patogenem)?

Poslední výzkumy se přiklání k hypotéze sebevraždy.

3 druhy důkazů:

1) HR je aktivní proces vyžadující transkripci a translaci

2) Elicitory mohou indukovat HR reakci u rezistentního hostitele

Elicitor – molekula (polypeptid, oligosacharid) produkovaná patogenem nebo jako výsledek interakce hostitel-patogen

Elicitor → rostlina s genem *R* → rozeznání patogena → HR

Elicitor → citlivá rostlina = bez genu *R* → nerozeznání patogena ⇏ HR

↓

Elicitor aplikovaný na citlivého hostitele – nedochází k viditelné reakci

↓

Buněčná smrt viditelná u rezistentního hostitele není výsledek přímého toxického efektu elicitoru = rozpoznání elicitoru genem rezistence v rostlině stačí ke spuštění HR a PCD.

3) Genetické důkazy, že buněčná smrt při HR je naprogramovaná

Lesion-mimic mutanti (paranoidní mutanti) – ukazují HR při absenci patogena

↓

HR vychází z endogenního genetického programu buněčné smrti

↙ ↘

Mutace v genu pro rezistenci k patogenu

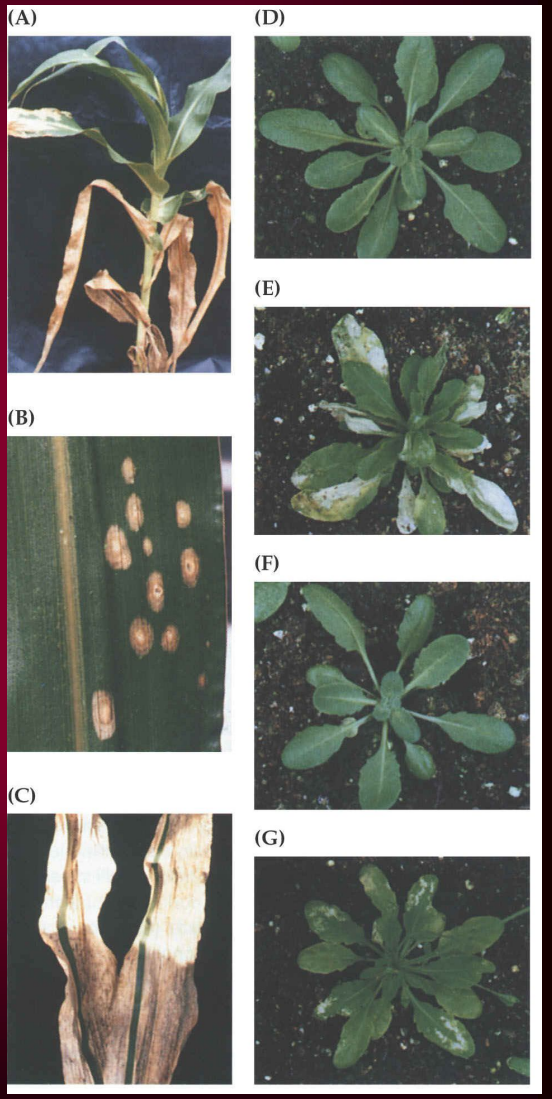
Mutace v genu řídícího metabolické dráhy

↘ ↙

HR

Mutant *vad1* (*vascular associated death*) – poranění podobné HR podél vaskulárního systému: zvýšená exprese genů spojených se syntézou a signálními drahami etylénu.

VAD1 – funguje jako spojující článek signálních drah etylénu a salicylové kyseliny



Spouštění PCD

Oxidativní výbuch (oxidative burst) – proces, kdy po inokulaci patogenem dochází k produkci reaktivního kyslíku a jeho meziproduktů

Superoxid O_2^- (nestabilní; špatně prochází membránou)

↓

Peroxid vodíku H_2O_2 (vysoce toxický; snadno prochází membránou)

↓

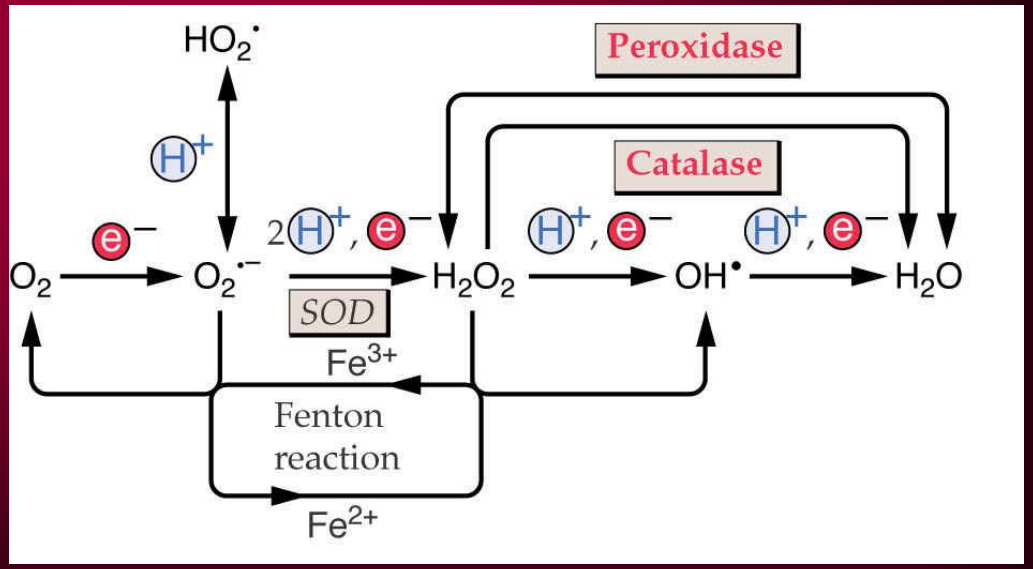
Meziprodukty (zhoubné)

↓

Buněčná smrt

Inhibice tvorby superoxidu vede k redukci rozsahu buněčné smrti.

O^{2-} - superoxid
H_2O_2 – peroxid vodíku
$^1O_2$ – singletový oxid
OH*

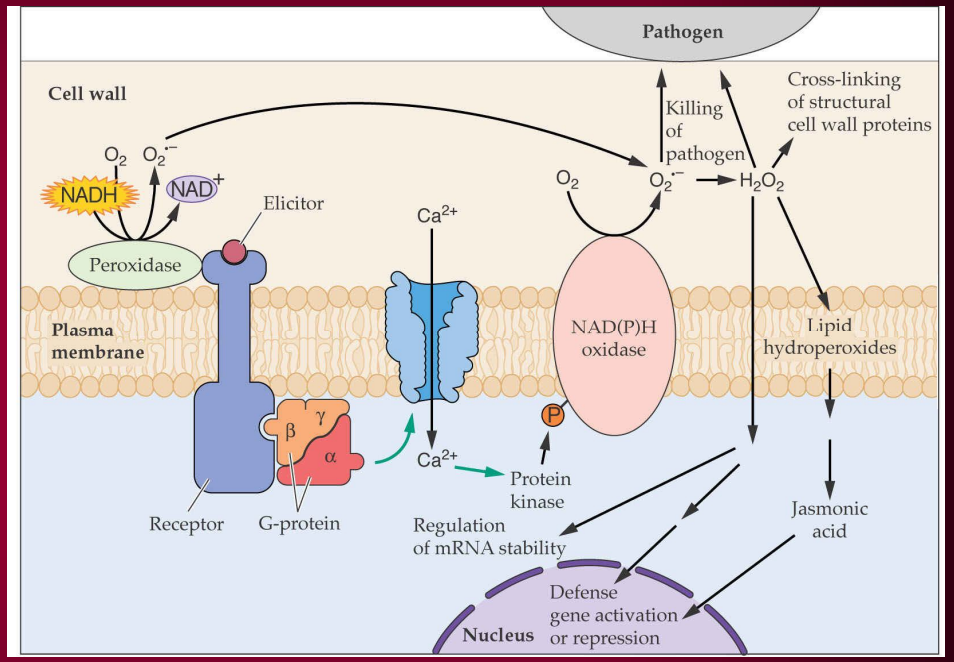


SOD = superoxid dismutáza

Meziprodukty reaktivního kyslíku mohou působit v nízké koncentraci jako signální molekuly, které spouští jiné dráhy vedoucí k PCD.

Peroxid vodíku – indukuje transkripci genů, kódujících antioxidační proteiny

Snížení rizika buněčné smrti



Současný výzkum: Může PCD u rostlin probíhat cestou apoptózy, známé u živočichů? (Vznik apoptických částic, tvorba měchýřků membrány, kondenzace chromatinu, štěpení jaderné DNA)

Signální dráhy vedoucí k PCD zprostředkované reaktivním kyslíkem a jeho meziprodukty (O_2^- - superoxid, H_2O_2 – peroxid vodíku ,$^1O_2$ – singletový oxid, $OH^{\cdot}$)

Geny zapojené v signální dráze reaktivního kyslíku

RCD – Radical-induced Cell Death

EXE1 – Executer1

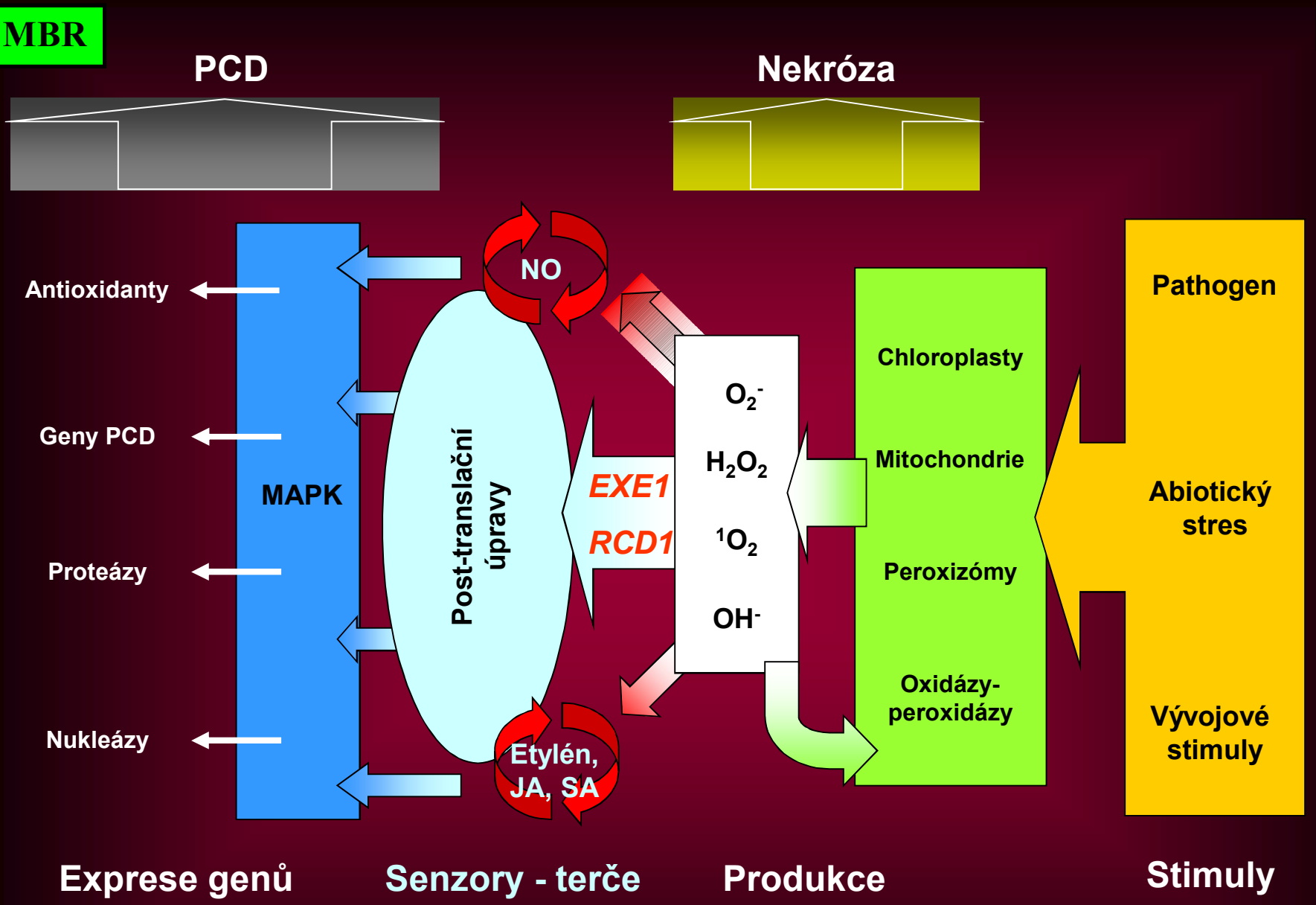
Hledání dalších elementů zapojených v síti genové regulace PCD zprostředkované reaktivním kyslíkem

UPDATE 2007

Queval G et al. (2007) Plant J 52: 640 - 657

PCD indukovaná světlem a zprostředkovaná $^1O_2$ je závislá na funkčním receptoru modrého světla CRY1. Mechanismus je odlišný od mechanismu PCD vyvolané světlem a zprostředkované O_2^- a H_2O_2 během fotosyntézy.

Fotoperioda ovlivňuje signální dráhy vedoucí k PCD a zprostředkované H_2O_2. Fotoperioda určuje zda se rostlina vystavená stresu bude aklimatizovat nebo zvolí cestu vedoucí k PCD.



MAPK – mitogen-activated protein kináza

Podle Van Breusegen and Dat (2006) Plant Physiology 141: 384 - 390