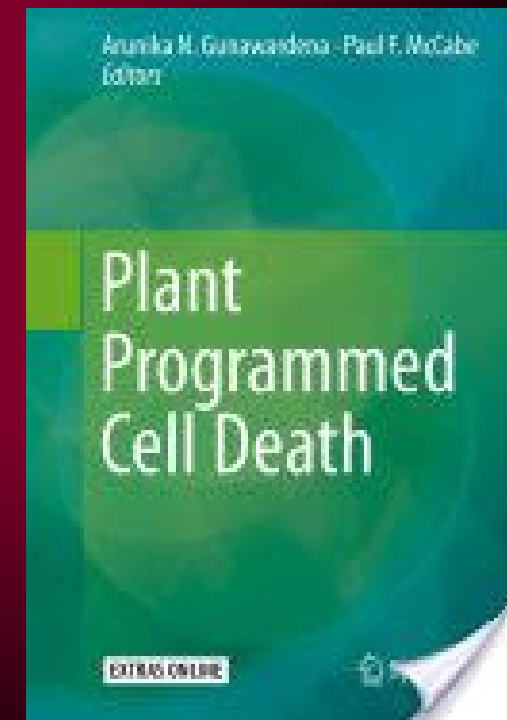


2017

## 7) Senescence a programová smrt buňky (PCD)

- a) Typy buněčné smrti
- b) PCD v životním cyklu rostlin
- c) Senescence a rostlinné hormony
- d) Vývojová PCD
- e) PCD a reakce rostlin ke stresu

Gunawardena, AN, McCabe, PF (2015)  
Plant Programmed Cell Death. Springer



**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

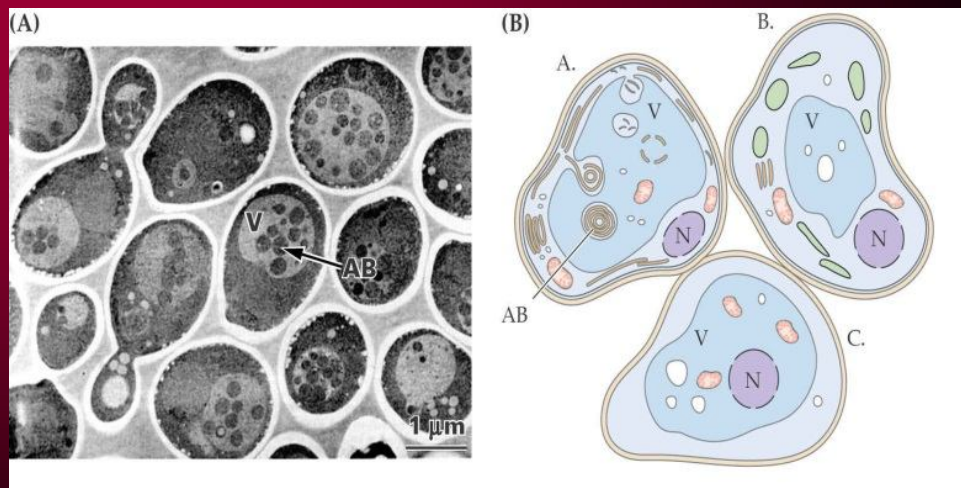
PCD u rostlin je odlišná od PCD u živočichů.

Živočichové – apoptická buňka je absorbována fagocytózou  
 Rostliny – rostlinná buňka neprovádí fagocytózu (buň. stěna; absence fagocytů)

**Autofagie** = proces, kterým se rostliny zbavují části cytoplazmy

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

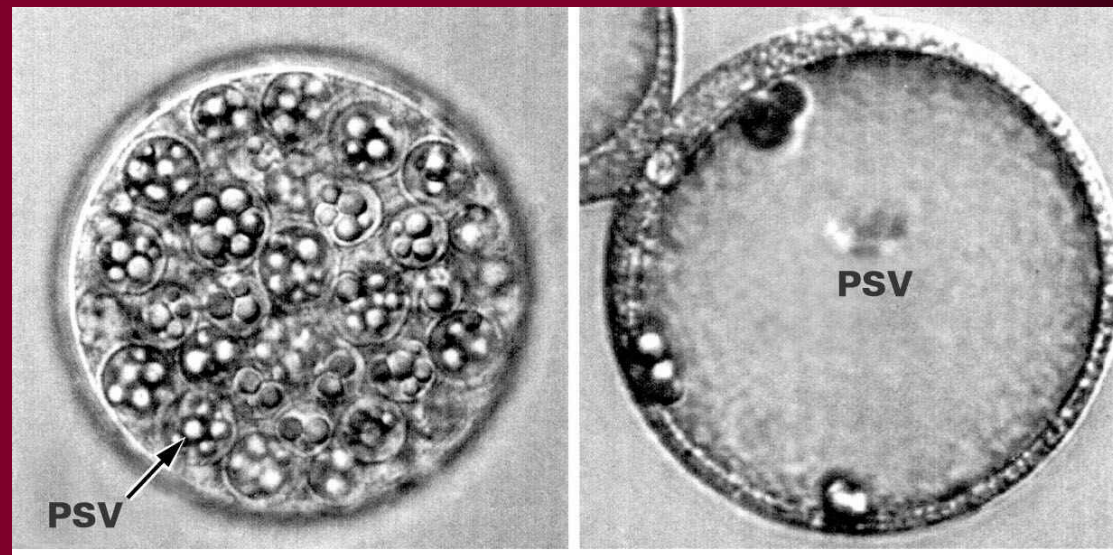
Autofagozomy jsou pohlceny centrální vakuolou (V) a rozloženy hydrolytickými enzymy.



*Saccharomyces*

Rostliny (svlačec)

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.

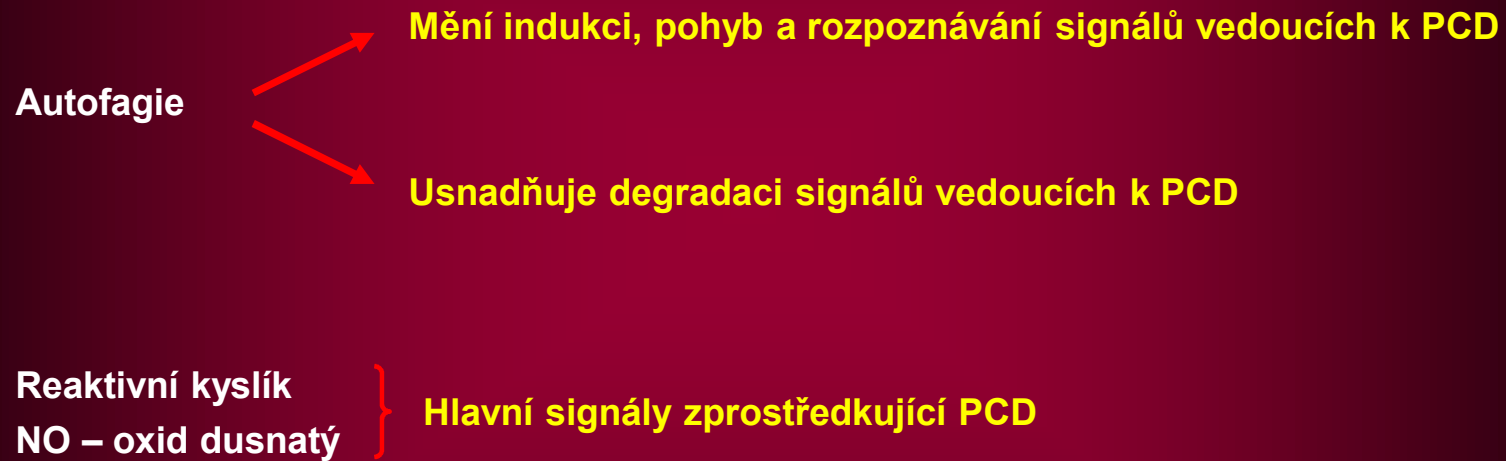


Vakuolární enzymy:

- **enzymy ukazující aktivitu kaspázy 1**

Kaspáza1 = cystein proteáza; hraje roli v apoptóze a proteolyticky štěpí cytokiny na jejich aktivní formy

**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.**



## PCD specifická pro rostliny

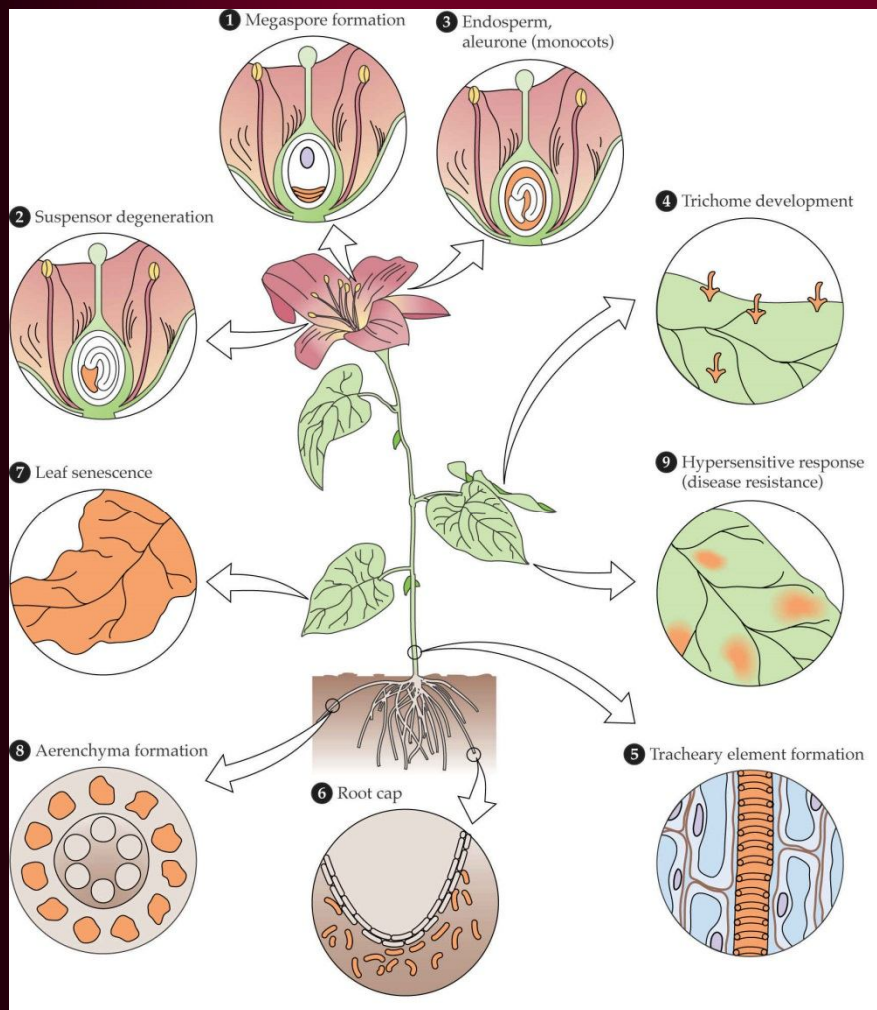
Tvorba endospermu u obilnin – škrobový endosperm obklopený aleuronovou vrstvou;

- 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



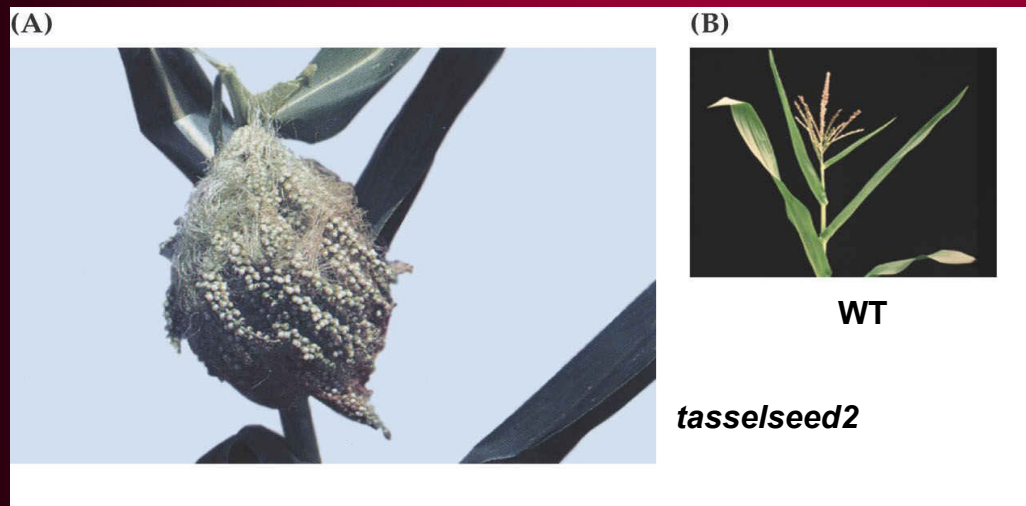
PCD vede k vývojové plasticitě

## 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**

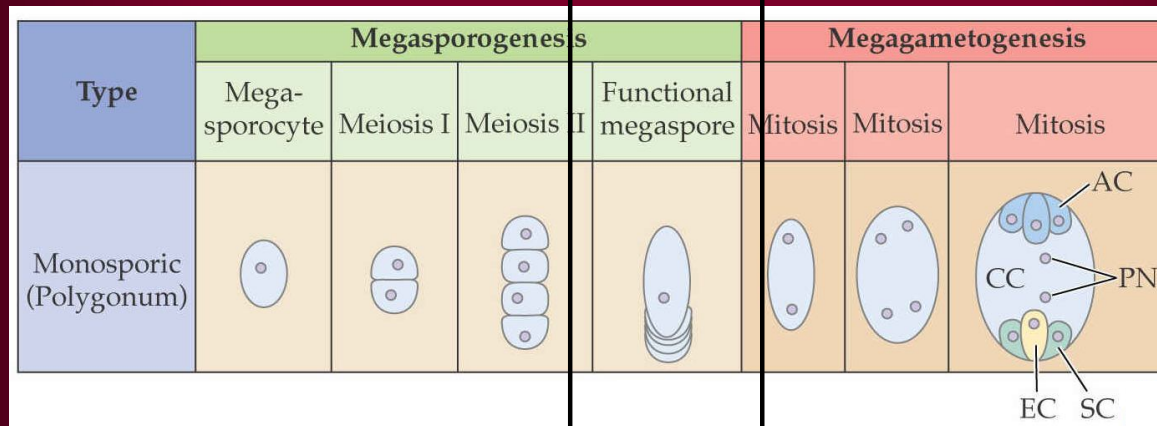
Mutant *tasselseed2* – v latě (tassel) se vyvíjí gynoecium



Gen *TASSELSEED2*  
kontroluje PCD gynoecia  
v latě



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**

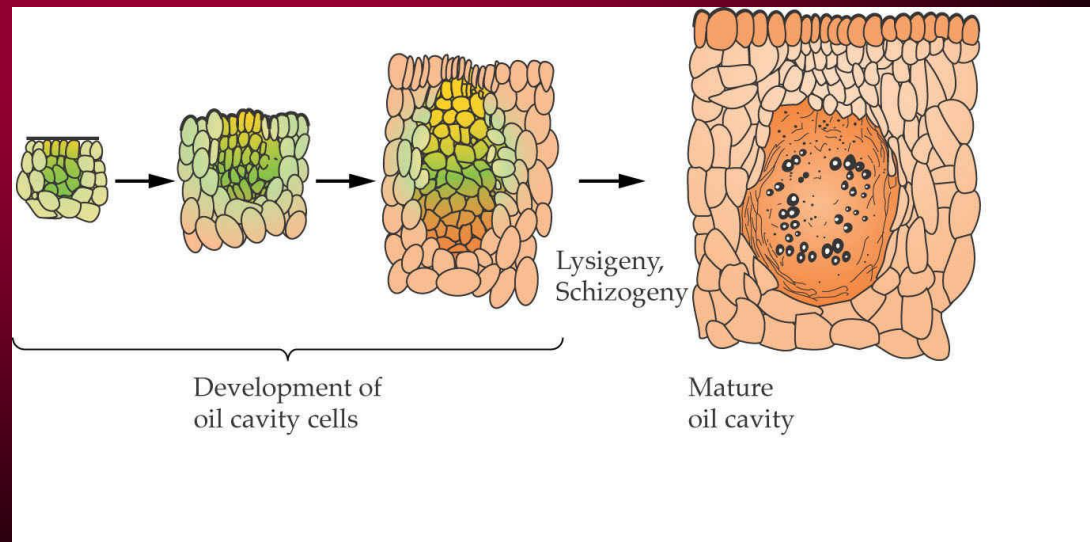


Monstera (*Monstera deliciosa*)

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

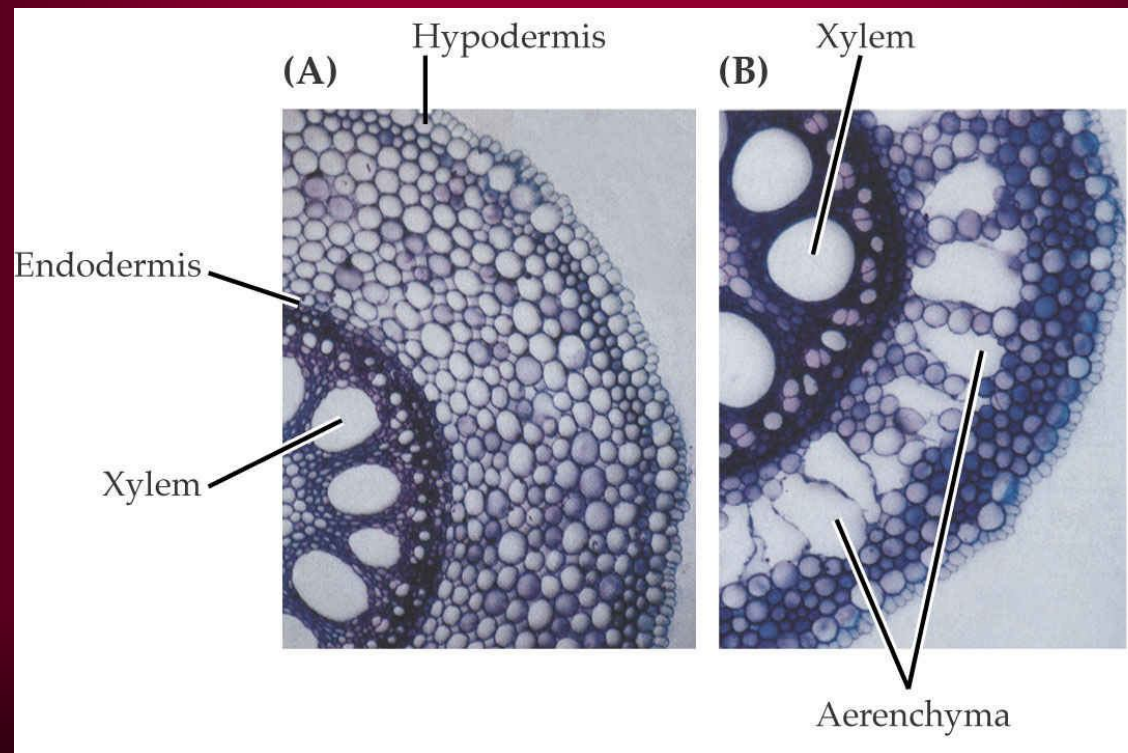


Tvorba žláz na povrchu plodů - buňky na povrchu plodů umírají = **PCD**; mrtvé buňky se plní silicemi a oleji = **lysigenie (schizogenie)**; vznikají žlázy

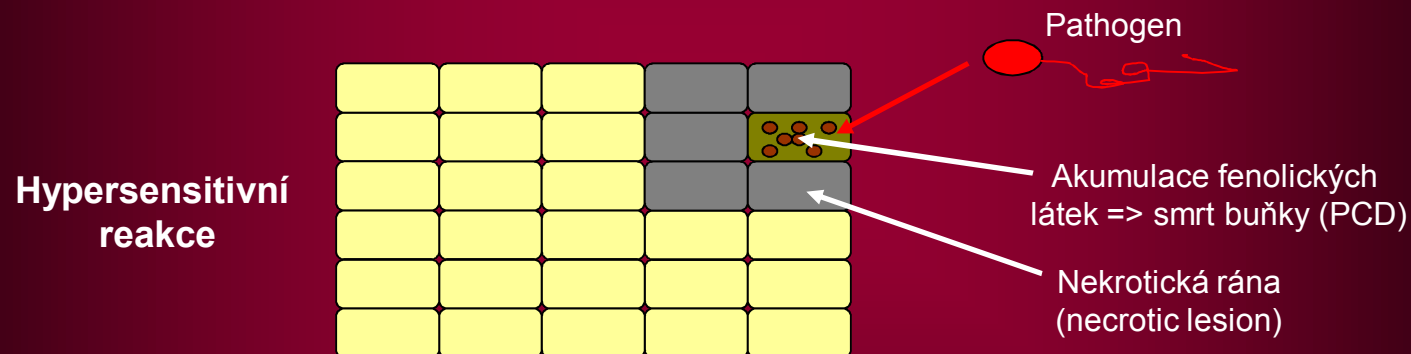


## PCD jako součást reakcí rostlin ke stresům

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



## Senescence (stárnutí) – příklad PCD regulované vnějšími faktory

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

Odrážejí 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

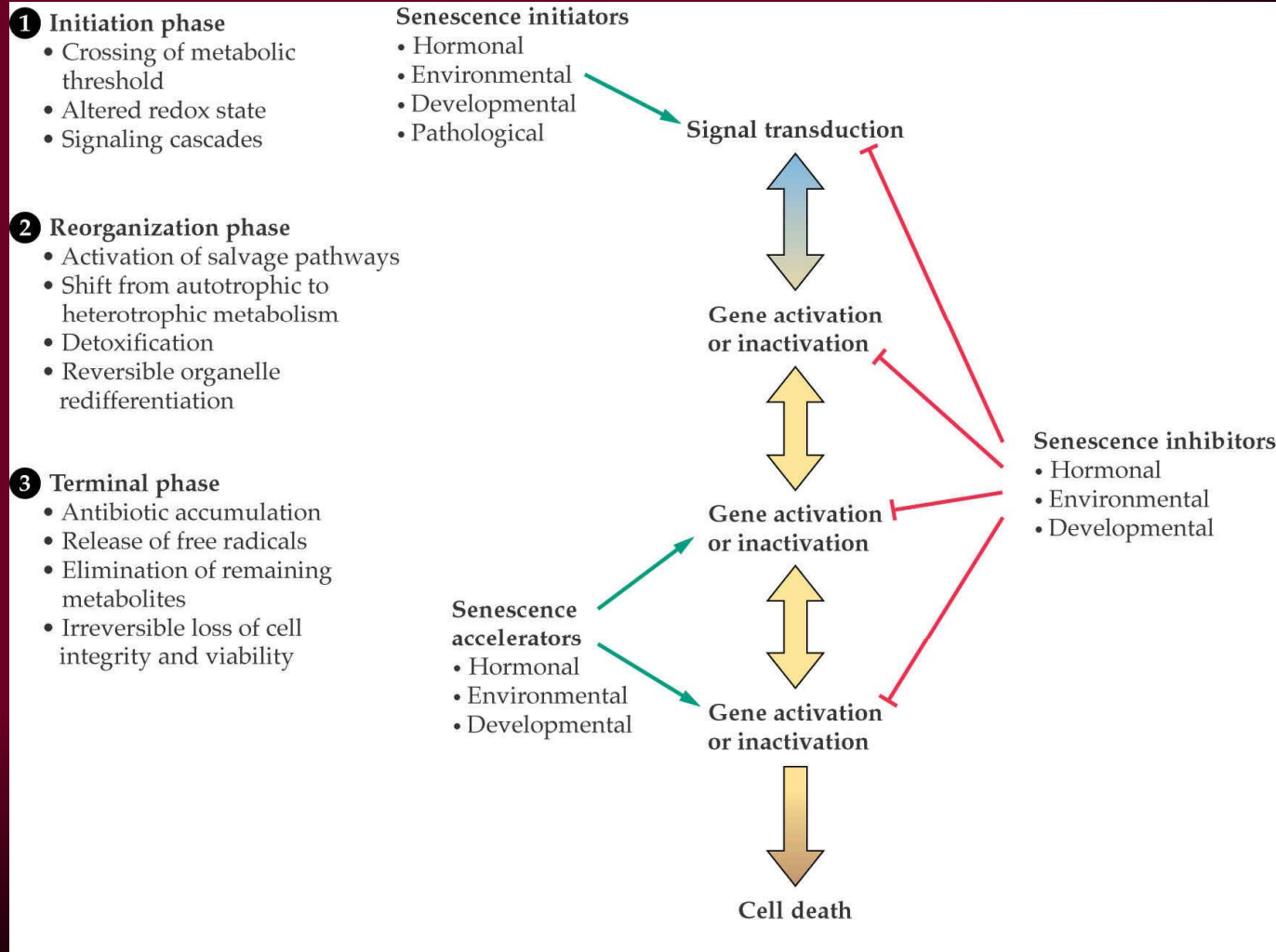
Aktivace a inaktivace genů

## Reorganizační fáze

Rediferenciace buněčných struktur a remobilizace materiálu

## Konečná fáze

Iniciace nevratných procesů

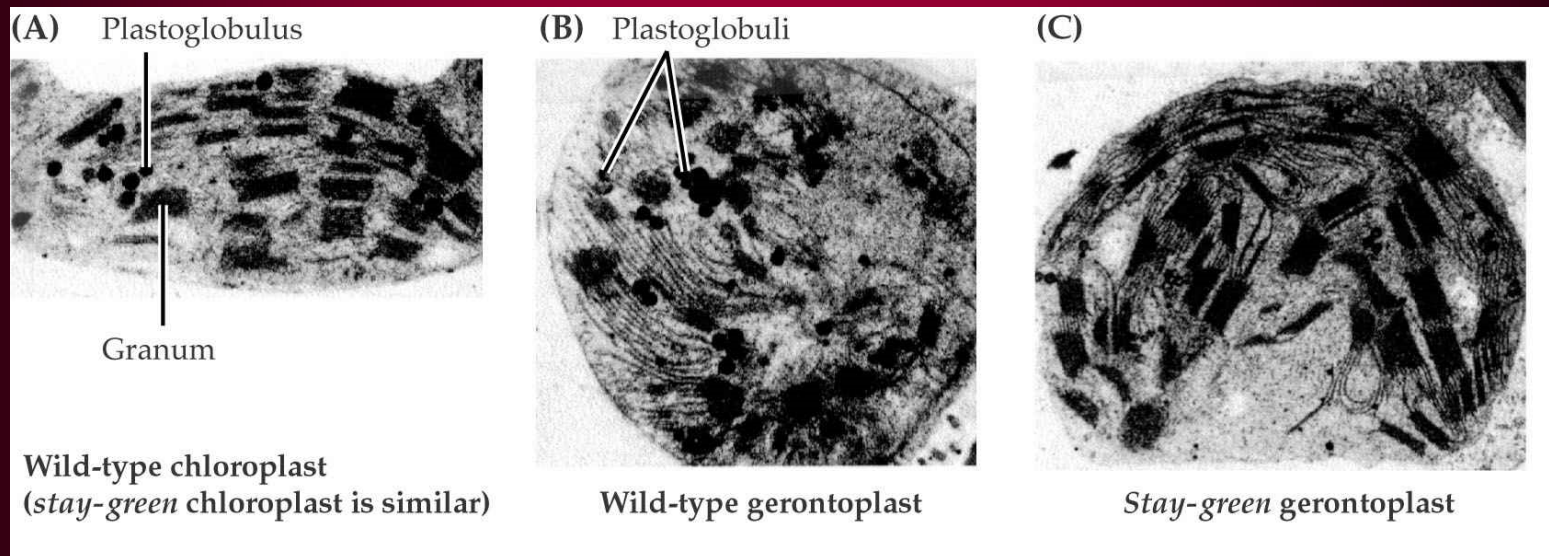


Senescence listů a plodů je charakterizována dramatickými **změnami hlavních organel**, zvláště plastidů v mezofylových buňkách a parenchymu perikarpu plodů.

Chloroplasty → Gerontoplasty

Grana se rozpadají,  
přibývá plastoglobulů

Grana zůstávají zachována,  
plastoglobuly se nevyskytují



WT

*Stay green*

Chloroplasty



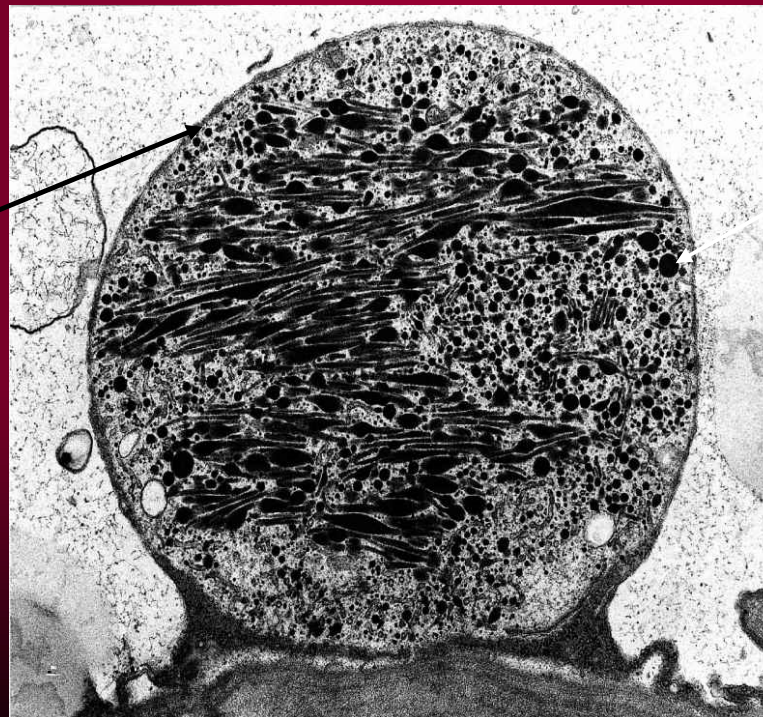
Chromoplasty



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

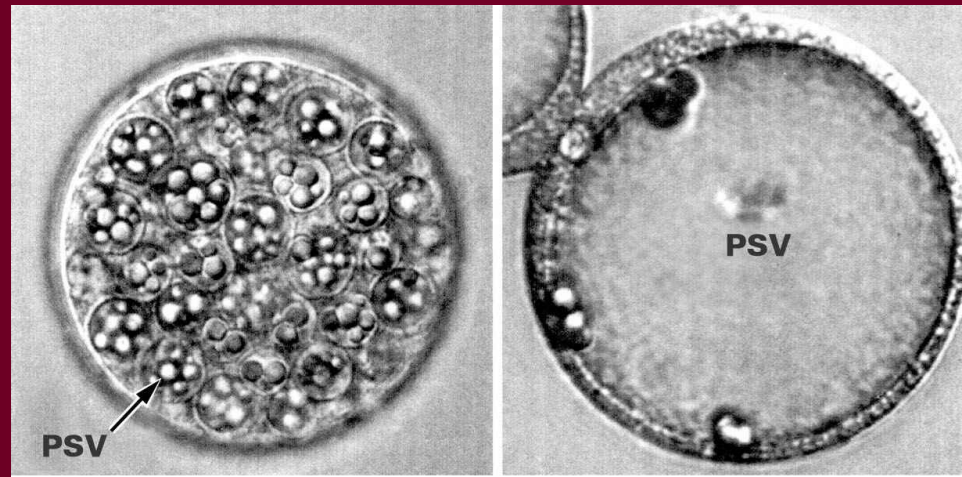
Chromoplast plodu židovské třešně – buňka má velice slabou cytoplazmu; celá buňka je vyplněna plastidy obsahujícími karotenoidy

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

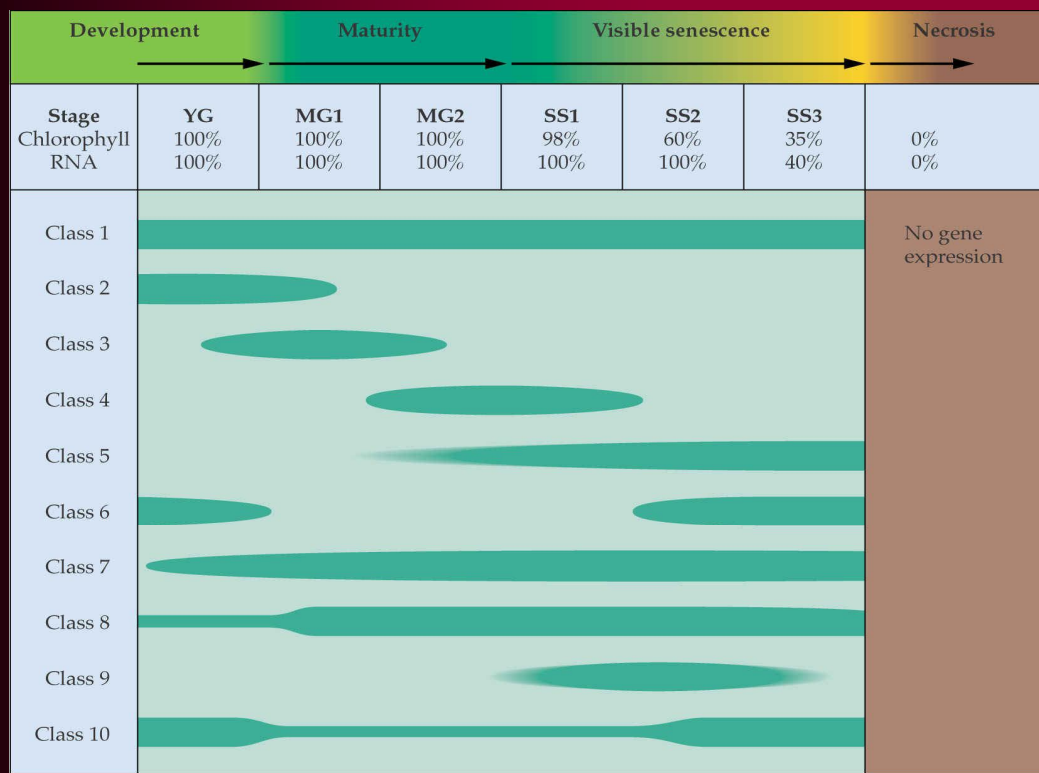
### 4) Geny kódující proteiny, které chrání buňku proti oxidativnímu poškození vyvolaného ionty kovů



## 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.

Mutant rajčete v genu **GREENFLESH** –  
exprimován v listech a plodech  
(přítomnost chlorofylu ve zrajících plodech)



Foto: Natalie Bumgarner,  
The Ohio State University.

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*

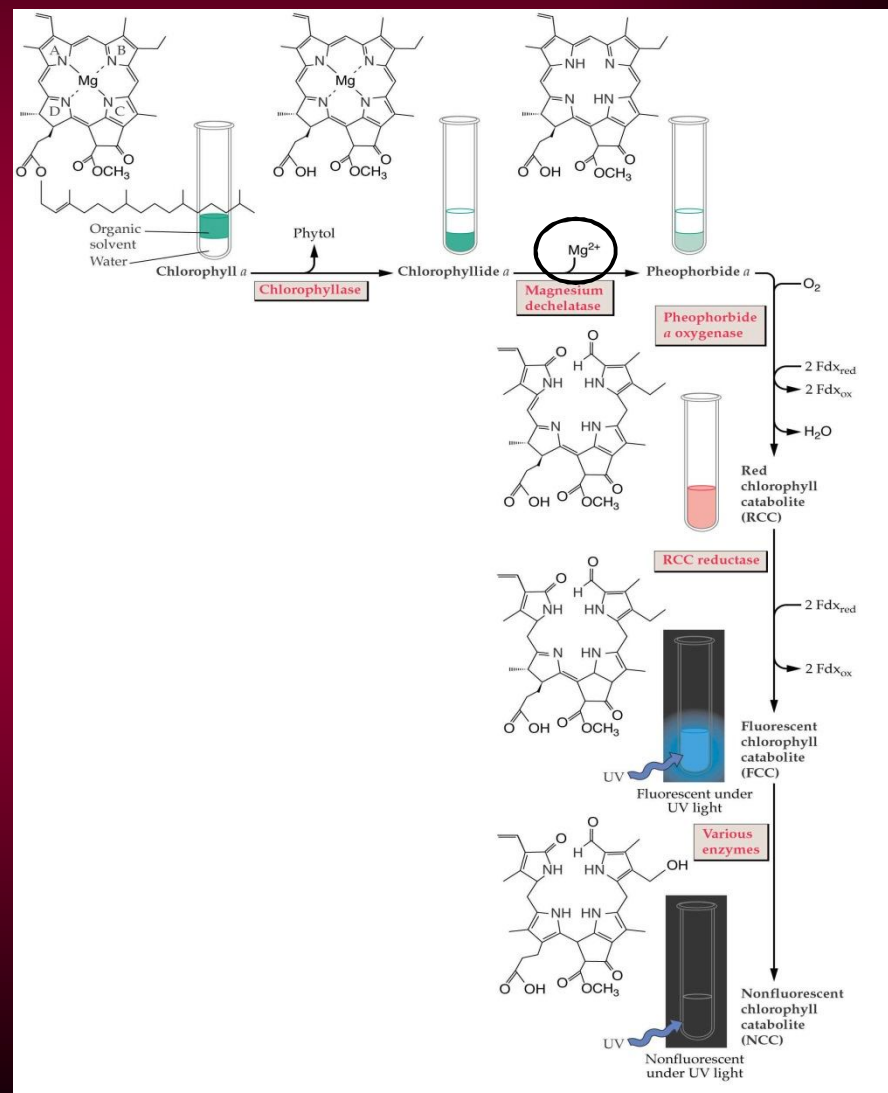
*Stay-green* variety jsou významné v ekonomicky chudých zemích

# Analýza stay-green mutanta *sid* (u trav) 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 tatrapyrolu



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



**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

