


MBR2 **2017** **1**

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

MBR **2**

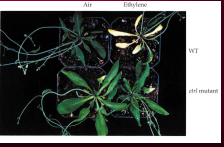
c) Senescence a rostlinné hormony

Faktory
 Vnější Vnitřní → Rostlinné hormony: Etylén (CH₂-CH₂)
 Cytokiny
 ABA, GA

Senescence

Etylén (plynný fytohormon) – stimuluje senescenci

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

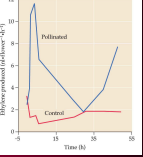


1) Interakce hormonů
 2) Rostlinná reakce rostlin ke stejnému hormonu
 3) Interakce hormonů s vnějšími i jinými vnitřními faktory (většinou rostliny)

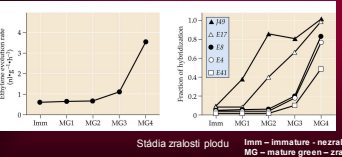
MBR **3**

[Etylén] ↑ → senescence listů
 senescence petals po opylení
 senescence plodů - zrání

Modelový objekt - rajče



Produkcce etylénu → exprese genů spojených s dozráváním plodů



Změna barvy, textury a chuti plodu

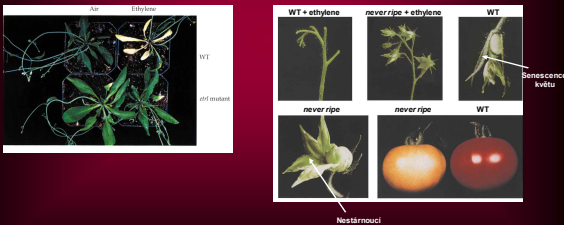
Stádia zralosti plodu: Imm - immature - nezralé, MG - mature green - zralé zelené

MBR **4**

Rostliny se změnami v receptoru etylénu ukazují změny v senescenci

Arabidopsis mutant - *etr1* - necitlivý k etylénu; *ETR1* kóduje receptor etylénu
 Mutant rajčete - *neverripe* - necitlivý k etylénu

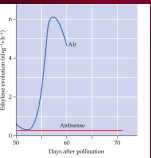
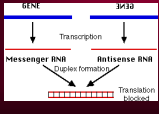
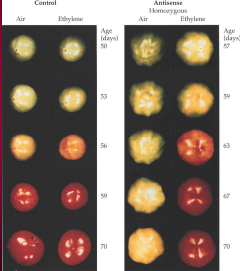
Opožděná senescence plodů i květů



MBR **5**

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 = produkuje etylén
 Antisense rostliny = neprodukuje etylén

MBR **6**

Cytokiny - potlačují senescenci

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

Cytokiny se vyskytují v zóně obklopující místo infekce patogenem ⇒ zpoždění senescence v místě kolem patogena (nestárnoucí zóna) ⇒ zelené ostrůvky



MBR 7

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

Senescence

Indukce *SAG12* => exprese *IPT1*

Redukce indukce *SAG12* a exprese *IPT1*

Biosyntéza cytokininů

Inhibice senescence

Produkcce cytokininů způsobuje zpoždění senescence → praktický dopad

MBR 8

Možná vysvětlení antisenescenční aktivity cytokininů

- 1) Pletiva s vyšší hladinou cytokininů hrají roli v metabolickém hospodářství rostliny => akumulace nutričních látek => neprobíhá senescence
- 2) Cytokiny mohou potlačovat expresi klíčových genů: *SAG*
- 3) Cytokiny aktivují transkripci chloroplastových genů. Aktivita cytokininů přitom závisí na světle a věku buněk a listů.

Duální aktivita cytokininů:

- působení na dlouhé vzdálenosti (stimulace diferenciace a metabolického hospodářství)
- působení lokální (ve stárnoucích buňkách potlačují senescenci)

MBR 9

Regreening (znovuzelenění) = 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 zpomalují senescenci

MBR 10

d) Vývojová PCD

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

Xylogeneze:

- iniciována během embryogeneze
- pokračuje během života rostliny – **diferenciac 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)

MBR 11

Vývoj TE z mezofylových buněk rostliny *Zinnia*

Kultivace *in vitro*

+ auxin
+ cytokininy

Isolated mesophyll cells → Differentiated tracheary elements

Zinnia (Ostřík)

Induce hormone

Dediferenciac

Prekursorová TE buňka

Akumulace hydrolytických enzymů
Secondary wall synthesis

Ca²⁺/CaM, cysteine proteases, β-xylosidase

Nezralé TE se sek. buněčnou stěnou (lignifikace)

Prasknutí tonoplastu

TE = mrtvá tracheida

MBR 12

In vitro proces diferenciace TE probíhá v populaci buněk synchroně

3 fáze diferenciace tracheid – 4 dny

Možnost biochem. a mol. analýzy

Expres genů zapojených v reakcích k poškození (PI – Proteolýza inhibitory) (RP – Ribozomální proteolýza) (EF – Produčovač faktory)

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

Expres TE differentiation-related genes (TED, neznámá funkce)

0 24 48 72 96 h

Stage 1 Stage 2 Stage 3

Dedifferentiation Restriction of developmental potential TE-specific development

ZeRT, ZePR, ZeP1, ZeP2

ZeRPS3a, ZeRPS3, ZeRPP0, ZeEF1β

ZeTubB1, ZeTubB3

TED2, TED3, TED4

ZCAD1

ZePAL1, ZePAL2, ZePAL3, ZC4H

ZePAL1, ZePAL2, ZePAL3, ZC4H

ZPO-C

ZEN1, ZRNaseI, ZCP4, p48h-17

MBR **13**

Po uložení sek. buněčné stěny protoplast degeneruje – autolýza: tonoplastpraská 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.

MBR **14**

Regulace PCD při vzniku tracheid

Auxiny

Cytokiny – role v indukcii 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 – cytokiny indukují tvorbu NO v *Arabidopsis*, tabáku, petrželi, atd.

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

MBR **15**

Brassinosteroidy

- aplikace uniconazolu (inhibitor syntézy brassinosteroidů) vede k blokádě diferenciaci tracheid a redukcii exprese genů exprimovaných v pozdních fázích
- při současné aplikaci uniconazolu a brassinosteroidů dochází k potlačení efektu uniconazolu

MBR **16**

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 (*)

MBR **17**

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

MBR **18**

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

MBR 19

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

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 Ca²⁺, cytosolické pH, calmodulin, protein kinázy a fosfatázy.

MBR 20

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 celulózy
Aktivita ACC syntázy

MBR 21

Buňky procházející hypoxií ukazují zvýšenou hladinu Ca²⁺ v cytozolu.

Změna koncentrace Ca²⁺ je rychlá

Role cytosolického Ca²⁺ při hypoxii

[Ca]_i – cytosolický Ca²⁺

On – zapnutí oxysličování média
Off – vypnutí oxysličování média – nastává hypoxie

Ca_e – 1 mM externí Ca²⁺
Ca_e – 10 mM externí Ca²⁺

Změny v hladině cytosolického Ca²⁺ v kultivovaných buňkách kukuřice

MBR 22

Reakce k patogenu

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

Forma rezistence k patogenům – **hypersenzitivní 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*.

MBR 23

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 zabíjení 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.

MBR 24

Genetické důkazy, že buněčná smrt při HR je naprogramovaná

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

HR vychází z endogenního genetického programu buněčné smrti

Mutace v genu pro rezistenci k patogenu → HR
Mutace v genu řídicího metabolického dráhy → HR

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)

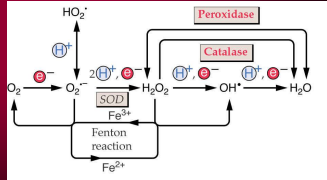
↓
 Peroxid vodíku H_2O_2 (vysoce toxický; snadno prochází membránou)

↓
 Meziprodukty (zhoubné)

↓
 Buněčná smrt

Inhibice tvorby superoxidu vede k redukci rozsahu buněčné smrti.

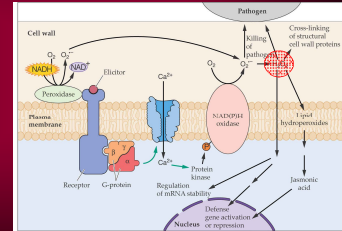
O_2^- - superoxid
 H_2O_2 - peroxid vodíku
 O_2^{\cdot} - singletový oxid
 OH^{\cdot}



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

Peroxid vodíku – indukuje transkripci genů kódujících antioxidantní proteiny

↓
 Snížení rizika buněčné smrti



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

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.

