

7) Programová smrt buňky (PCD) a senescence (stárnutí)



Nejnovější review:

Yan A, Chen Z (2020) *The Botanical Review* 86: 39–75

Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů

PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

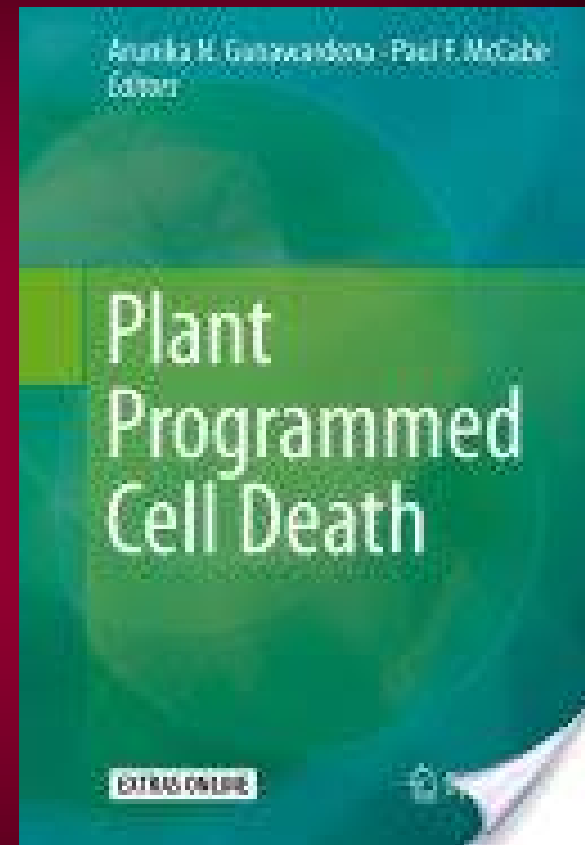
Programová smrt buňky (PCD)

- a) Typy buněčné smrti
- b) PCD v životním cyklu rostlin
- c) PCD a reakce rostlin ke stresu
- d) PCD a nestresové podmínky

Nejnovější review:

Latrasse D et al. (2016)
Journal of Exp. Botany 67: 5887-5900

Stael S et al. (2019)
Journal of Exp. Botany 70: 1991-1995



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 hypersenzitivní 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

1963 – Christian de Duve

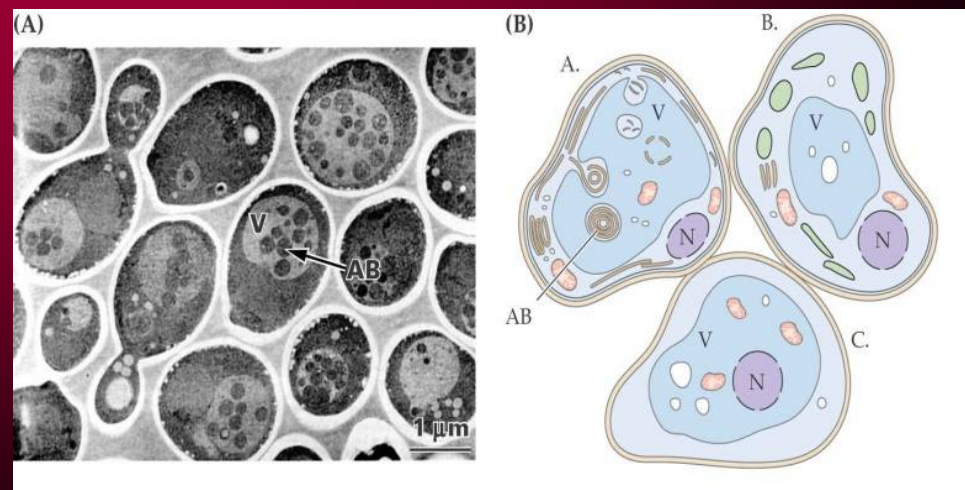
Update 2024

Yagyu M, Yoshimoto K (2024) J Exp Botany 76: 1234-1251

Nejnovější review o autofagii u rostlin

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

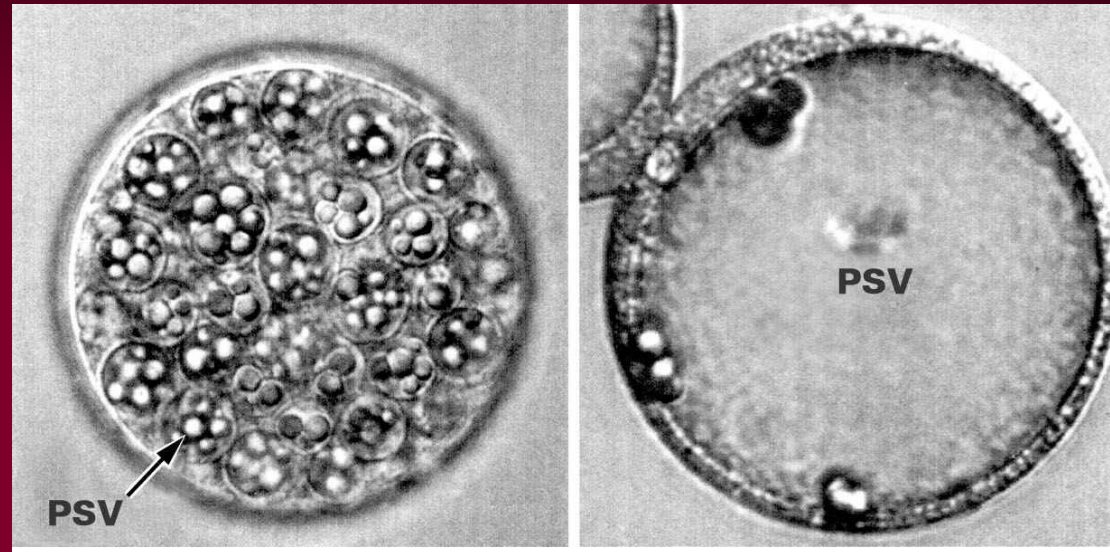
Autofagozomy jsou pohlceny centrální vakuolou (V) a rozloženy hydrolytickými enzymy.



Saccharomyces

Rostliny (svlaček)

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:

- **rostliny nemají kaspázy** Kaspáza1 = cystein proteáza; hraje roli v apoptóze a proteolyticky štěpí cytokiny na jejich aktivní formy (2005)
- **enzymy ukazující aktivitu kaspázy 1 = kaspáze-lile enzymy**
- **další typy proteáz (VPE = vacuolar processing enzyme, CEP1 = cystein endopeptidase, XCP1, XCP2 = xylem cystein proteases)**

Update 2019

Buono RA et al. (2019) J Exp Botany 70: Feb 12

Salguero-Linares J and Coll NS (2019) J Exp Botany 70: 2087-2095

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

Reaktivní kyslík
NO – oxid dusnatý } **Hlavní signály zprostředkující PCD**

Update 2018

Nakamura S et al. (2018) *Plant Physiology* 177: 1007 - 1026

4. Chlorofagie – odstranění chloroplastů poničených světlem během fotosyntézy- poničené chloroplasty se zvětší, jsou obklopeny autofagozomálními strukturami a pohlceny tonoplastem

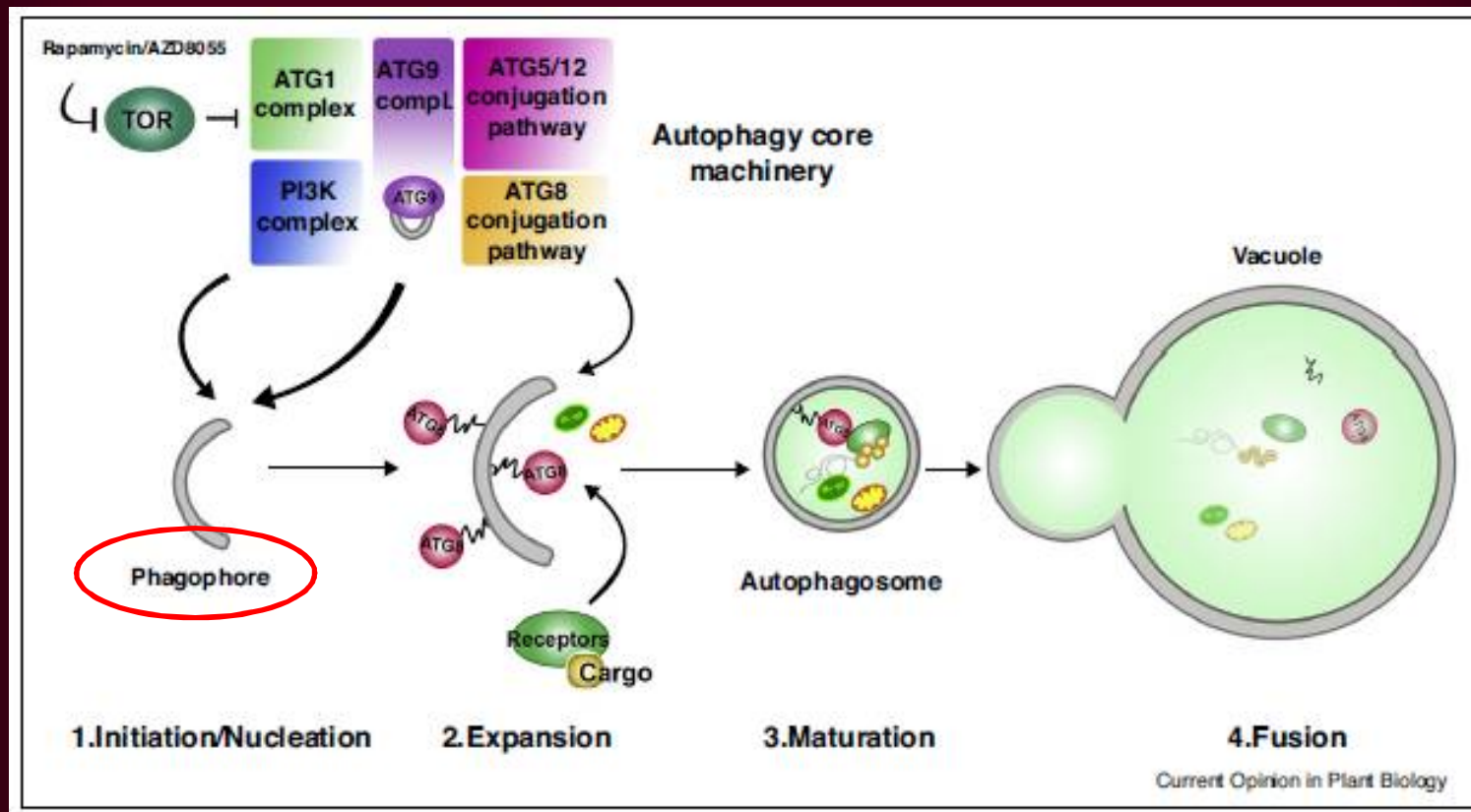
Důležitý milník ve výzkumu autofagie – izolace a identifikace **autophagy-related genů (ATG)** genetickým skríníngem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

ATG – konzervované u většiny eukaryontních organismů => izolace ATG knokautovaných mutantů => odhalení fyziologické úlohy autofagie

Update 2017

Üstün S et al. (2017) *Current Opinion in Plant Biology* 40: 122 - 130

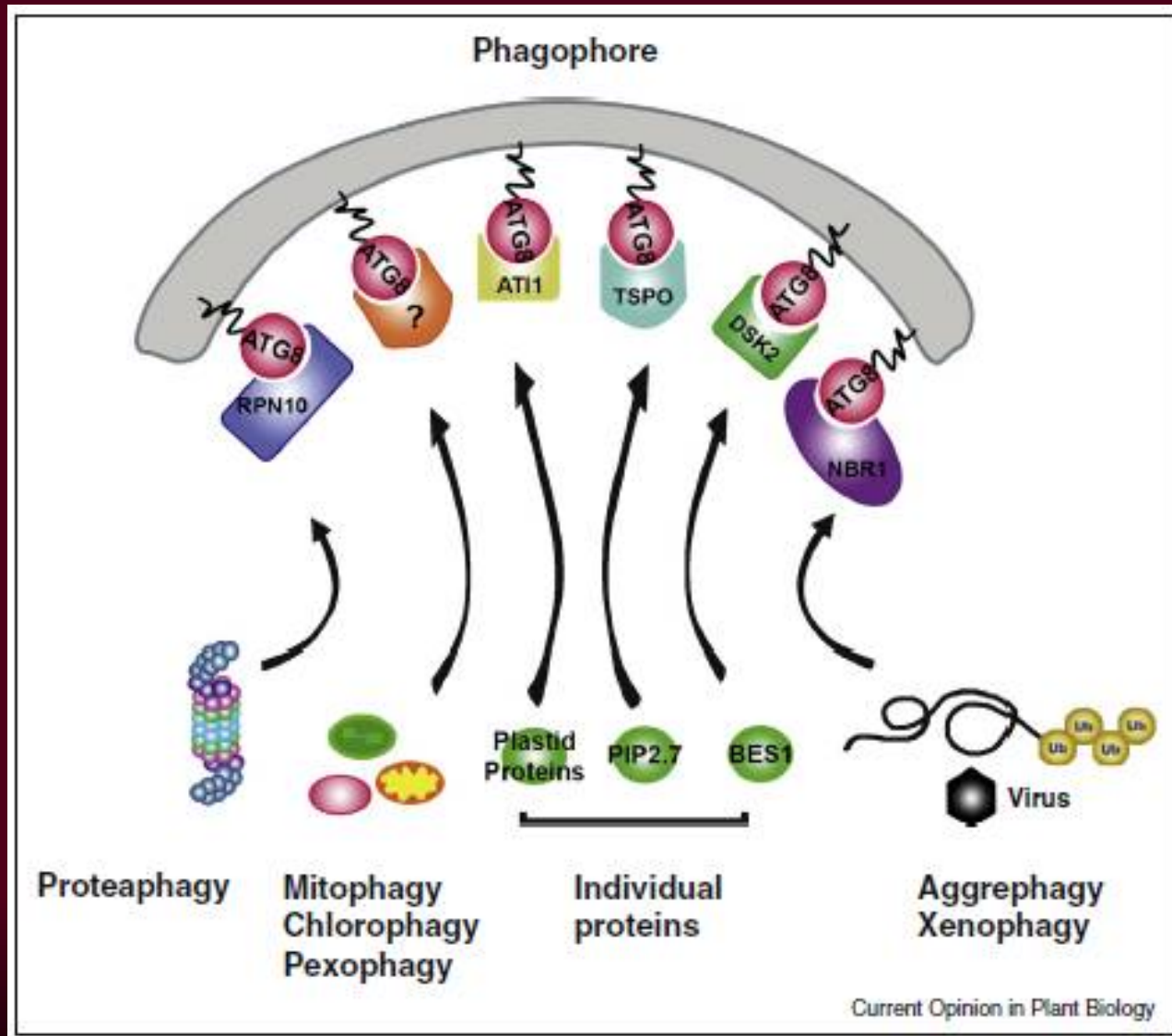
Nejnovější review o molekulárních mechanismech autofagie u rostlin



Indukce autofagie a nukleace – při nedostatku živin nebo při chemické či genetické inhibici (např. rapamycin) dochází k inhibici proteinkinázy **TOR**. Dochází k aktivaci **ATG1** (**AuTophagy** related) komplexu a tvorbě **fagoforu** z preautofagozomálních struktur na vnější straně ER. Na tvorbě fagoforu se podílí další komponenty systému (ATG9, PI3K,..). **ATG8** jsou transportovány na membránu fagoforu, kde na sebe váží receptory pro jednotlivé orgány, molekulární systémy, individuální proteiny, viry, atd. Vytvořený autofagozóm fúzuje s vakuolou, kde dochází k hydrolytické degradaci navázaných komponent.

Update 2017

Üstün S et al. (2017) Current Opinion in Plant Biology 40: 122 - 130



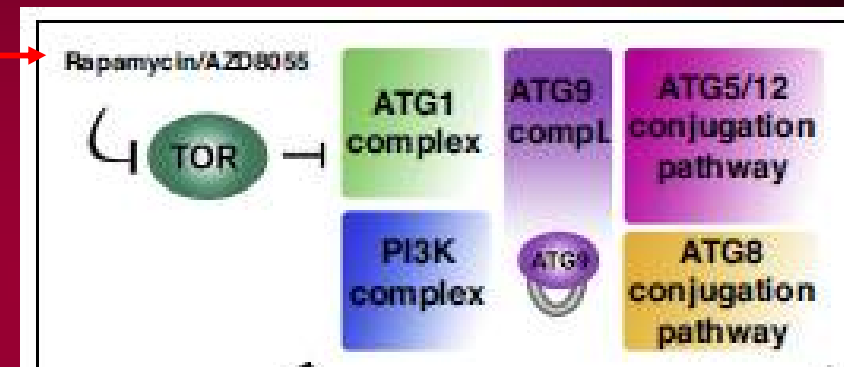
Update 2017

Soto-Burgos J and Bassham D (2017) PLOS One 12: e0182591

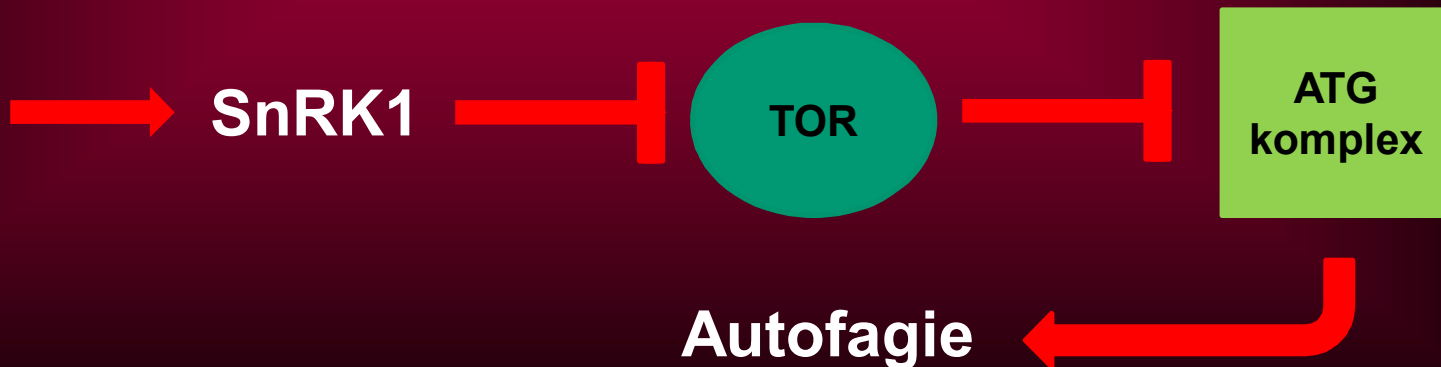
Autoři ukázali, že KIN10, katalytická podjednotka SnRK1, je aktivátor autofagie u *Arabidopsis* a že v regulaci autofagie funguje v signalizaci před TOR.

Změny v hladině energie
(nutriční či energetická
deficience)

SnRK1 u *Arabidopsis thaliana* = protein kináza, která vnímá změny v hladině energie (využitím karbohydrátů jako indikátorů energetického stavu rostliny) a spouští reakce, které pomáhají organizmu přežít.

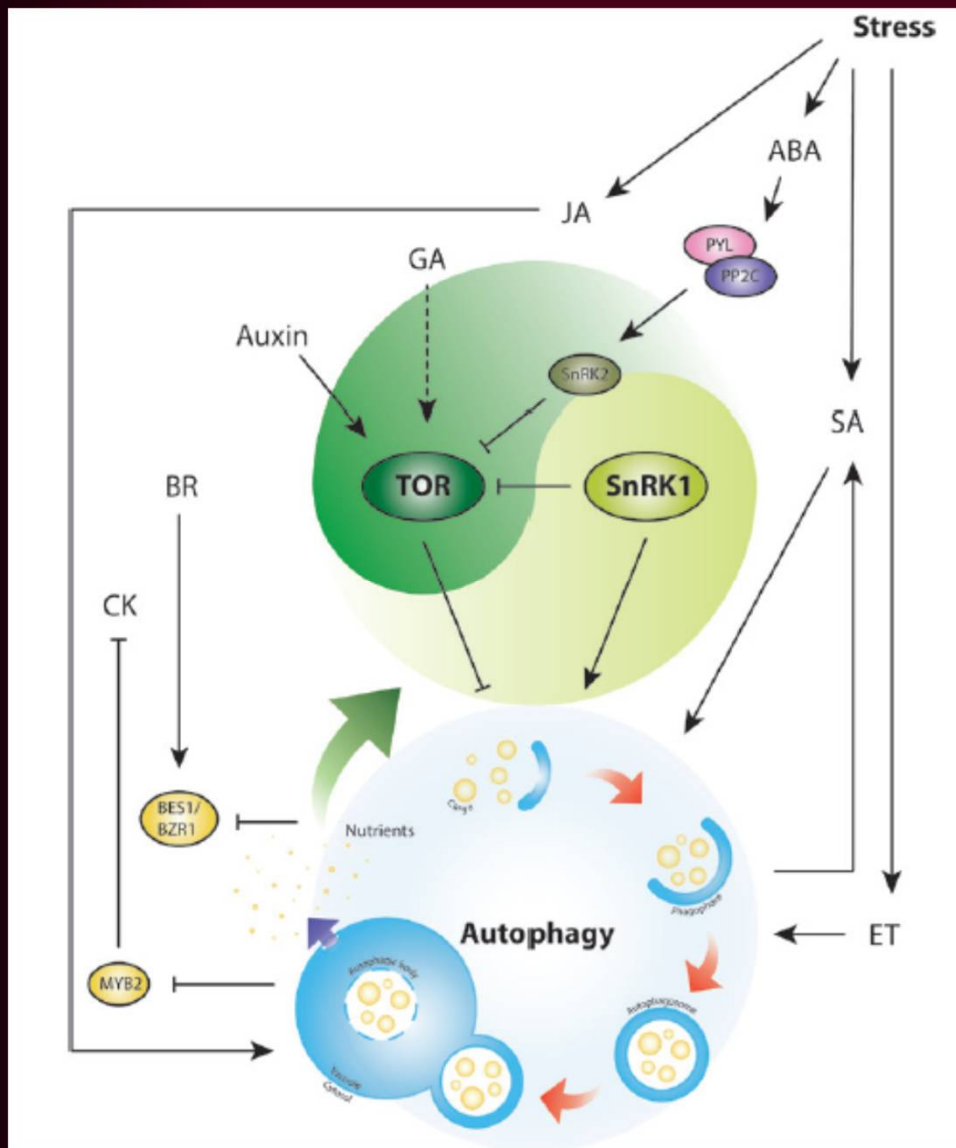


Nízká
energie



Update 2020

Liao C-Y and Bassham DC (2020) J Exp Botany 71: 1723-1733



Vztah hormonů a autofagie

TOR a SnRK1 jsou hlavní regulátory, které fungují antagonisticky v rovnováze mezi růstovými a stresovými reakcemi. Tyto dva protein kinázové komplexy propojují různé signální dráhy, včetně signalizace hormonální.

Stimulují růst (potlačují autofagii):

Auxiny

GAs

Potlačují růst (stimulují autofagii):

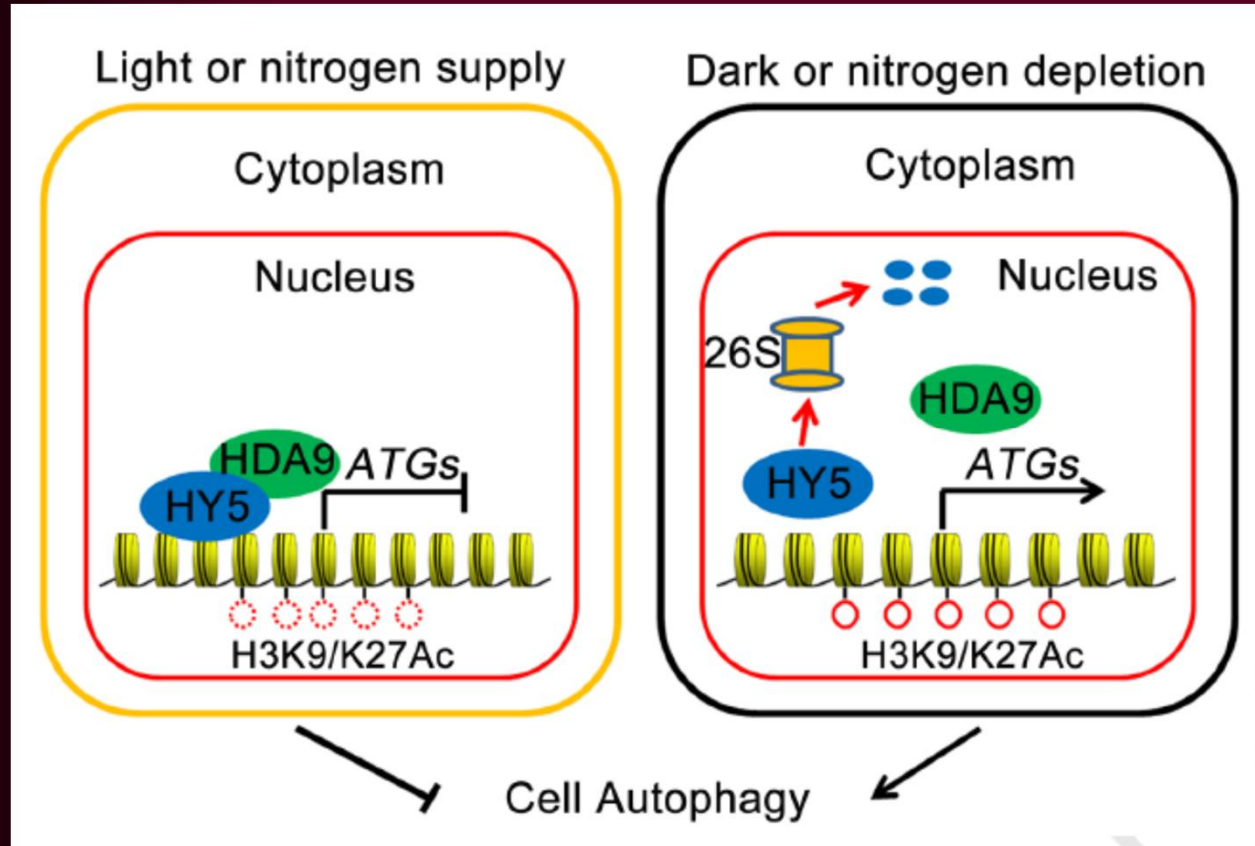
ABA

SA

JA

Etylén

Regulace autofagie světlem a dusíkem



HDA9 - Histone Deacetylase 9

H3K9/K27Ac - histon

Světlo nebo dostatek N₂: Interakce HY5 s HDA9 => aktivace HDA9 => interakce s ATGs => => deacetylace histonů => potlačení exprese ATGs => růst

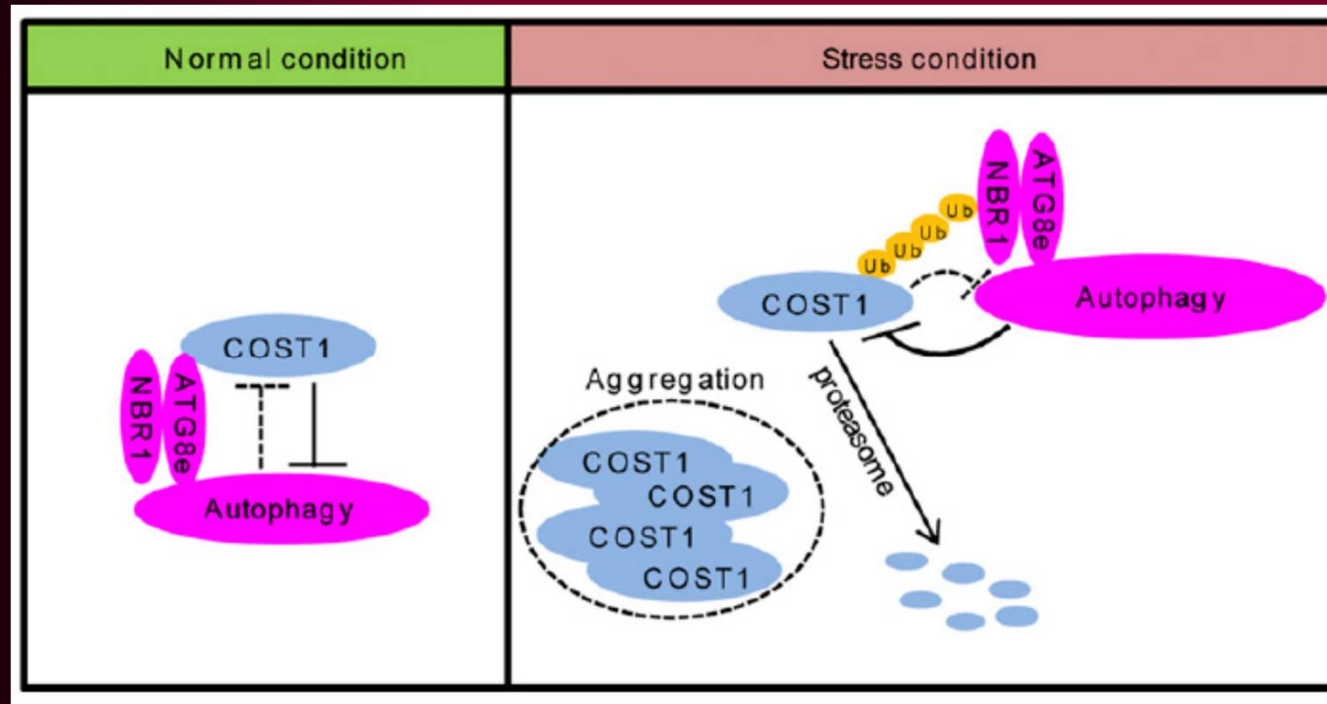
Tma nebo nedostatek N₂: Degradace HY5 => oddělení HDA9 od ATGs => zvýšení acetylace histonů => exprese ATGs => autofagie

Update 2020

Bao Y et al. (2020) PNAS 117: 7482-7493

Bao Y (2020) Plant Signaling & Behavior 15: art. no. 1779487

Nový gen COST1 - důležitý regulátor, který kontroluje rovnováhu mezi růstem a stresovými odpověďmi prostřednictvím přímé regulace autofagie



COST1 – Constitutive Stressed 1

Normální podmínky – COST1 interaguje s ATG8 => degradace ATG8 => potlačení autofagie => růst rostliny

Stresové podmínky – COST1 je degradován => uvolnění ATG8 => aktivace autofagie => potlačení růstu rostliny

Některé typy PCD jsou specifické pro rostliny.

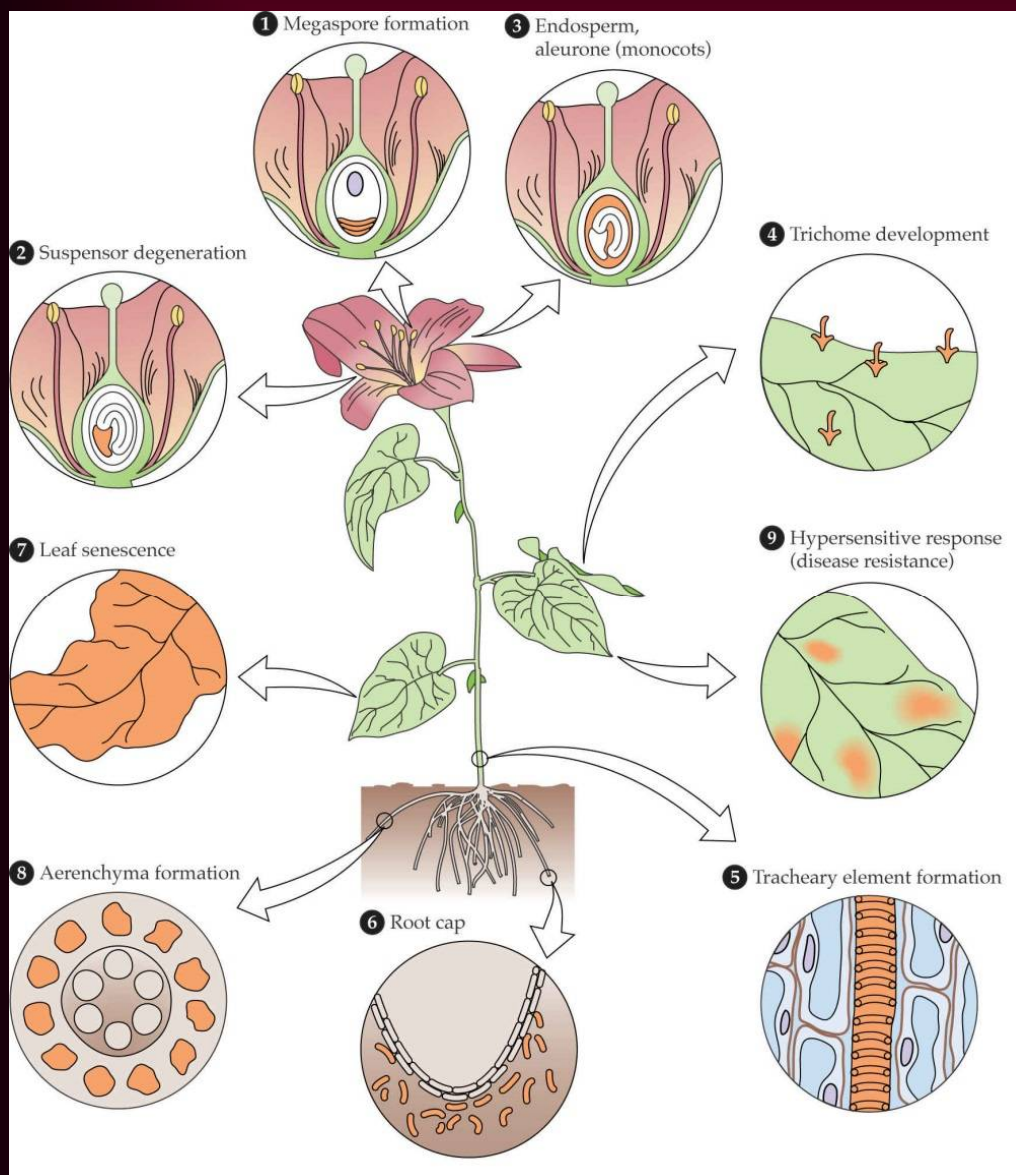
Tvorba endospermu u obilnin – škrobový endosperm obklopený aleuronovou vrstvou

- endosperm akumuluje zásobní látky
- při zrání zrna 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



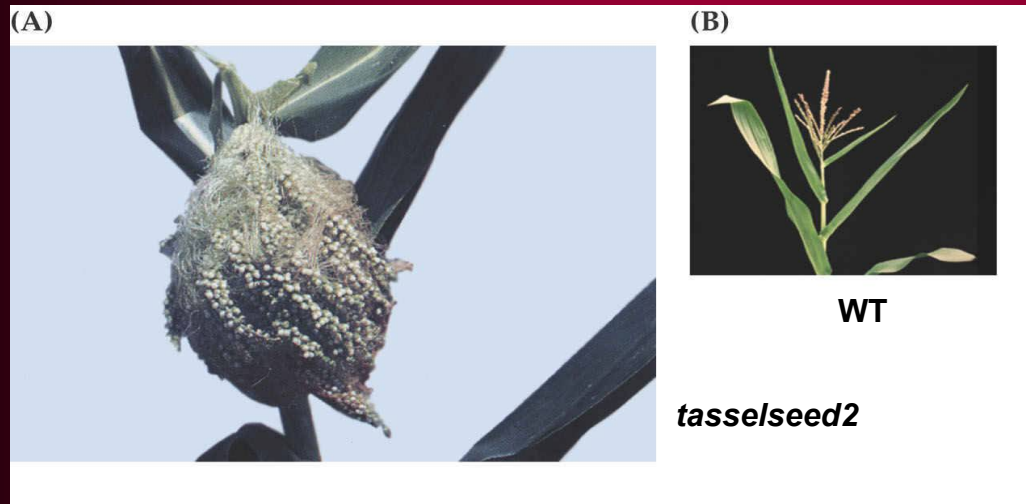
PCD vede k vývojové plasticitě

PCD v reprodukčním vývoji

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

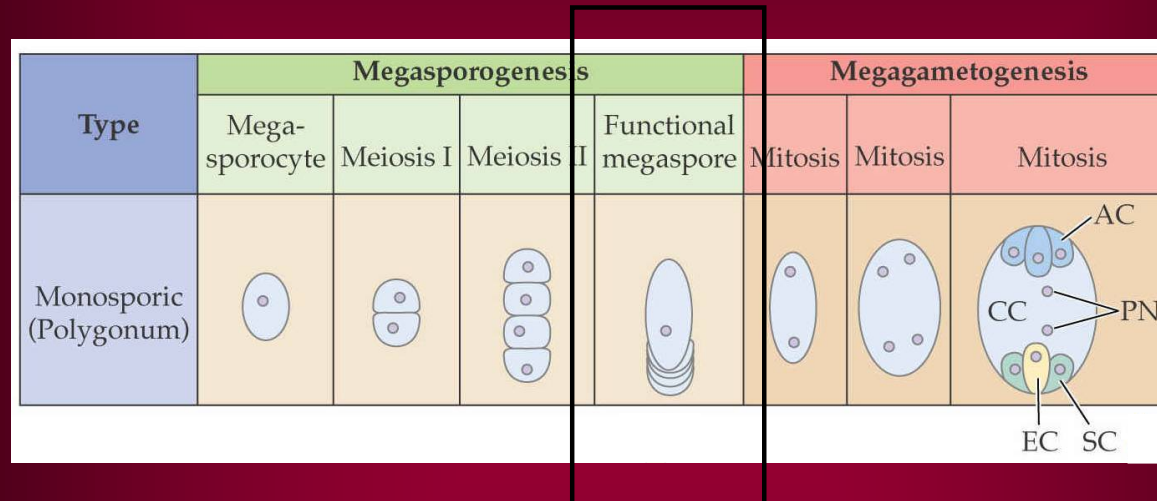
Raná stádia vývoje květu – primordia samičích (gynoecium) i samčích (prašníky) pohlavních orgánů existují v obou květech. Další vývoj květu – **primordia jednoho pohlavního orgánu zanikají = PCD**

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**

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

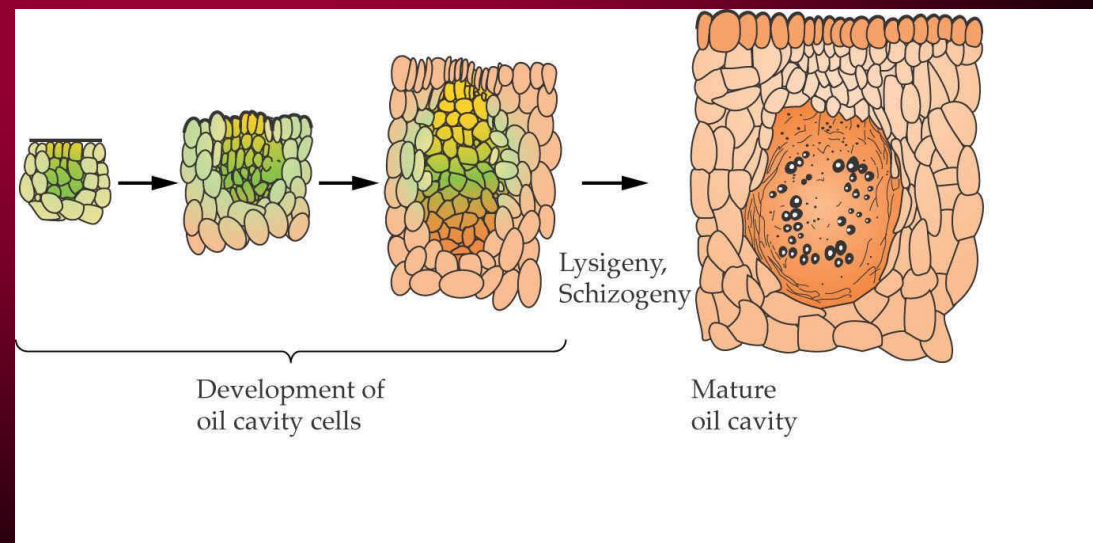


Monstera (*Monstera deliciosa*)

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



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

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

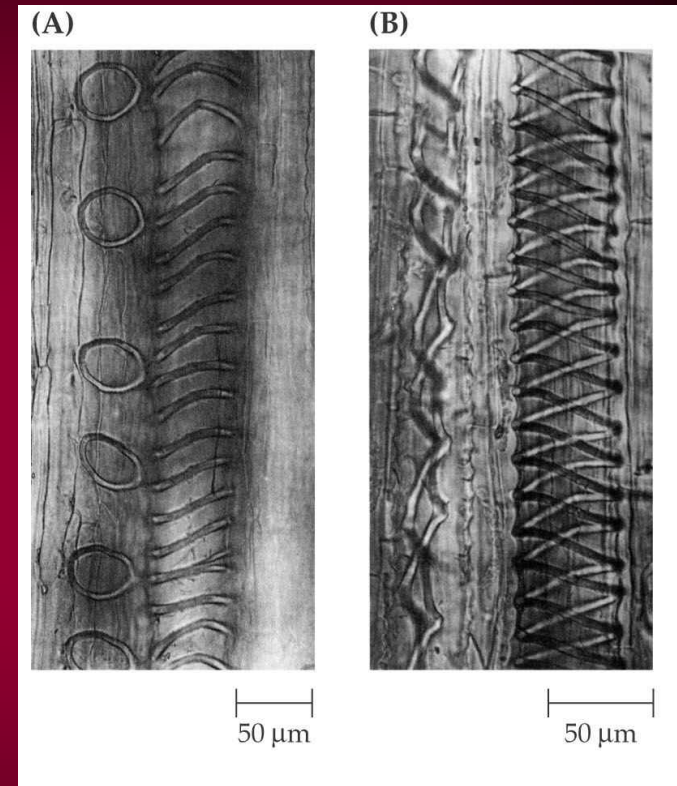
Tvorba sekundární buněčné stěny (lignifikace)



Buněčná smrt a autolýza obsahu buňky



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



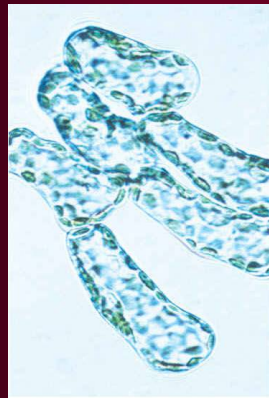
Tracheidy (tracheary elements)

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**

Vývoj TE z mezofylových buněk rostliny *Zinnia*



Zinnia (Ostálka)



Isolated mesophyll cells

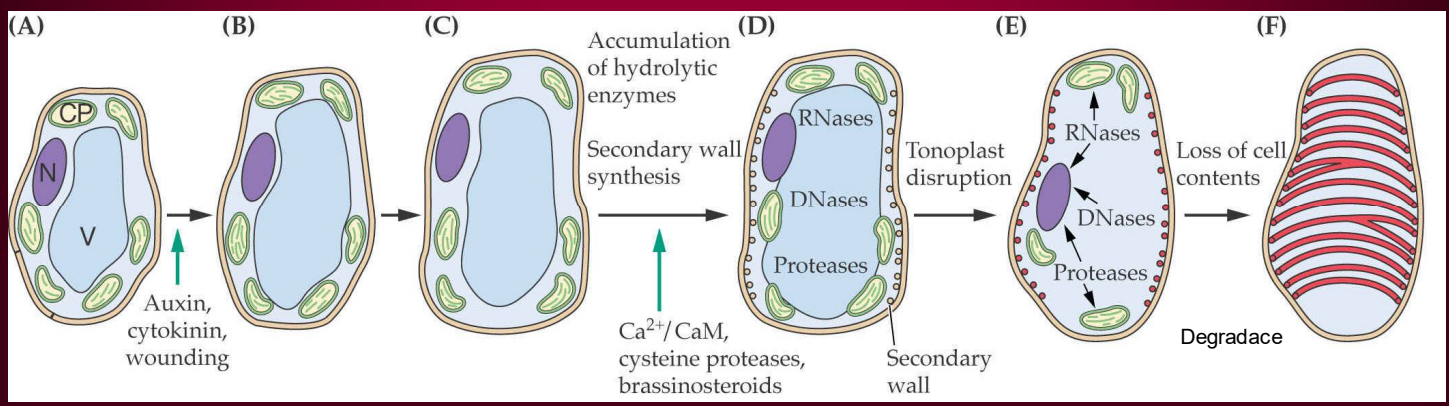
Kultivace *in vitro*



+ auxin
+ cytokininy



Differentiated tracheary elements



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

In vitro proces diferenciace TE probíhá v populaci buněk synchroně



3 fáze diferenciace tracheid ~ 4 dny

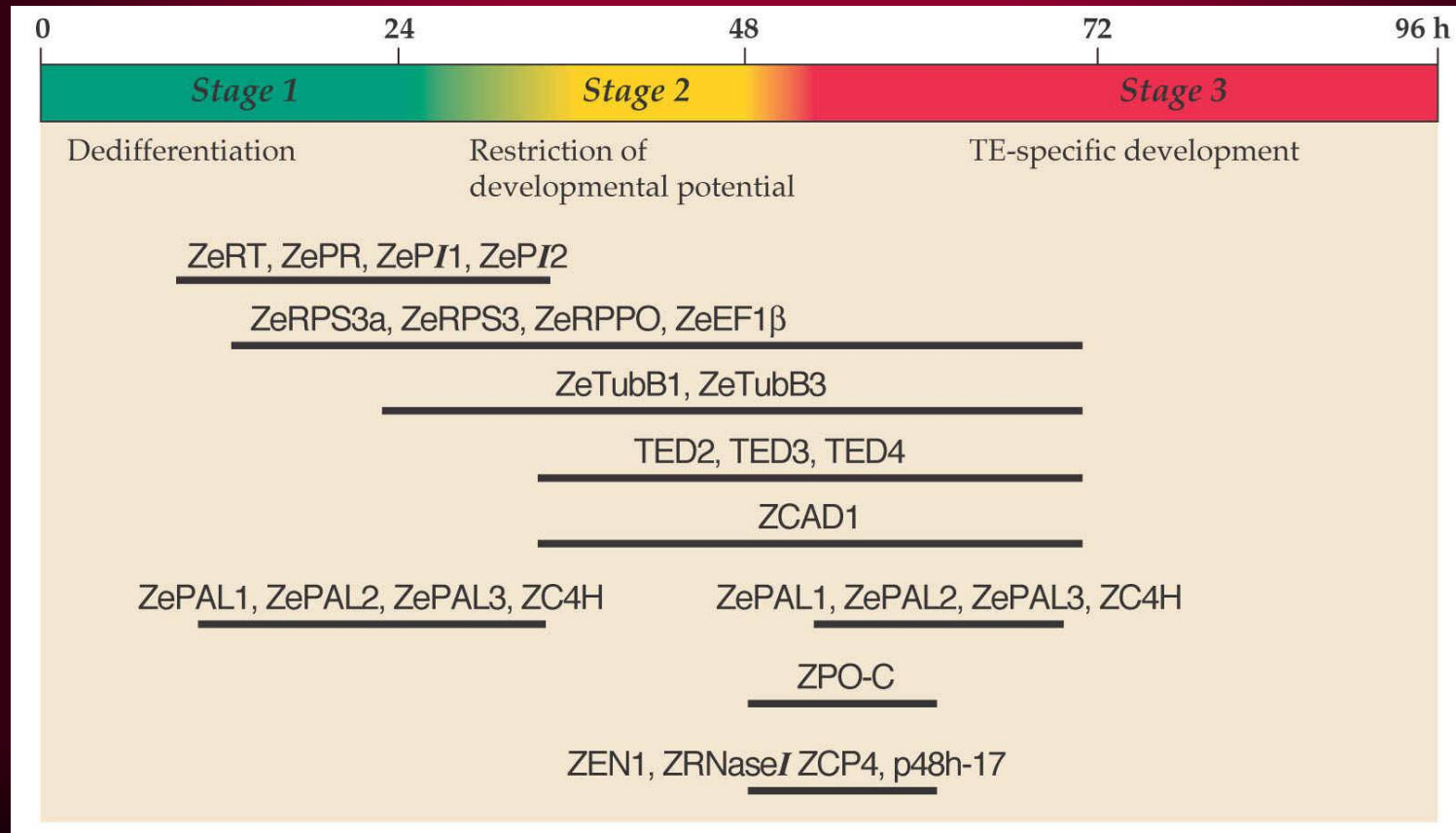


Možnost biochem. a mol. analýzy

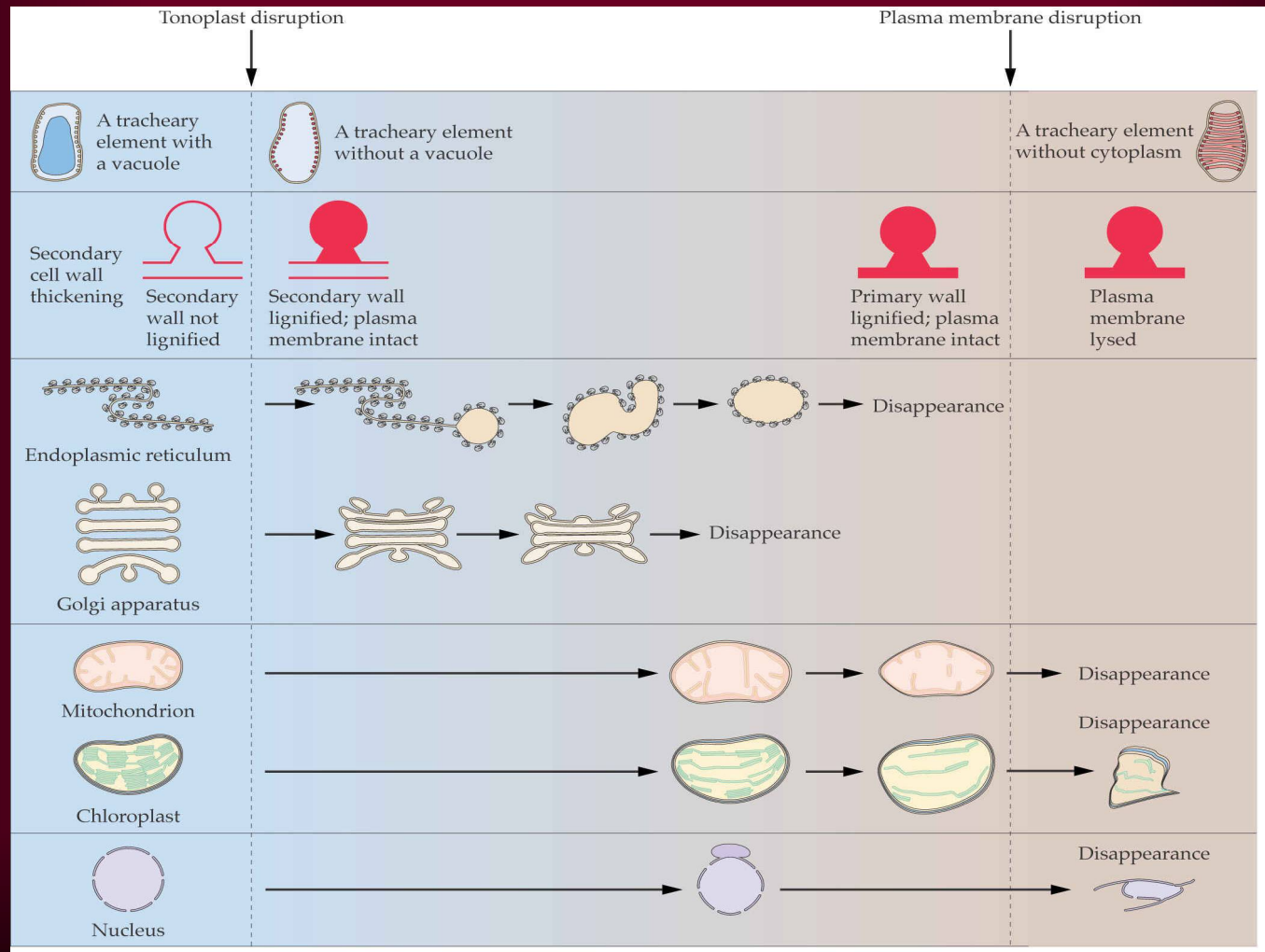
Expres genů zapojených
v reakcích k poškození
(PI - Proteázové inhibitory)
(RP – Ribozomální proteiny)
(EF – Prodlužovací faktory)

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

Expres 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.



Zapojení hormonů a NO v regulaci 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:

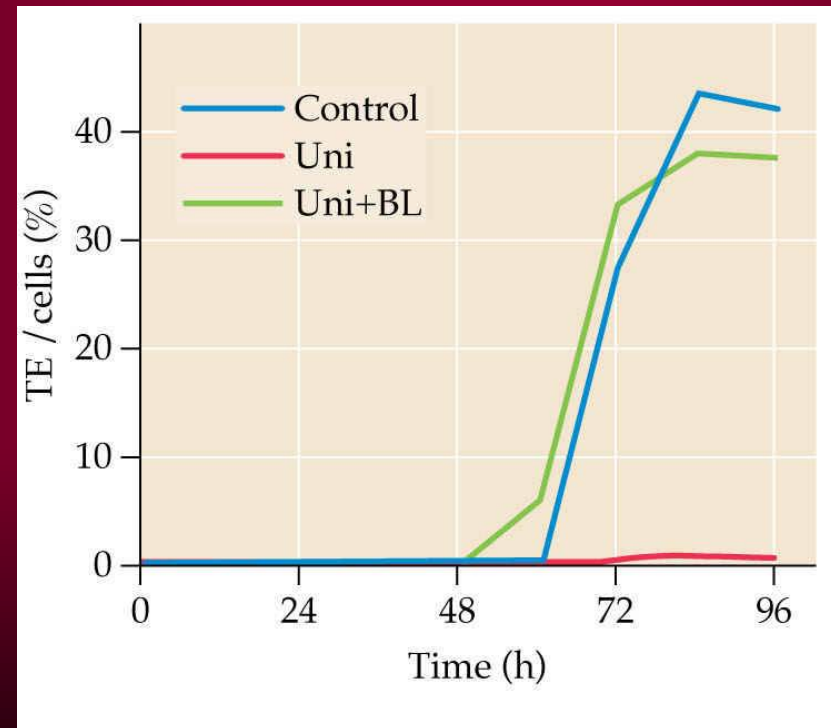
- zavírání stomat
- klíčení semen
- vývoj kořenů
- exprese obranných genů

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

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

Brassinosteroidy

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



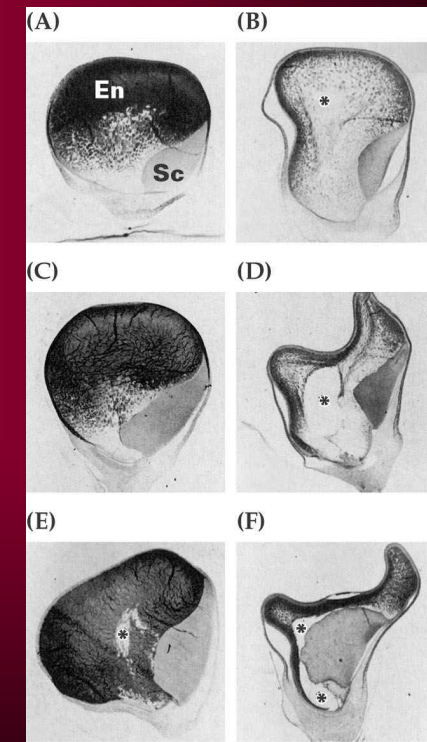
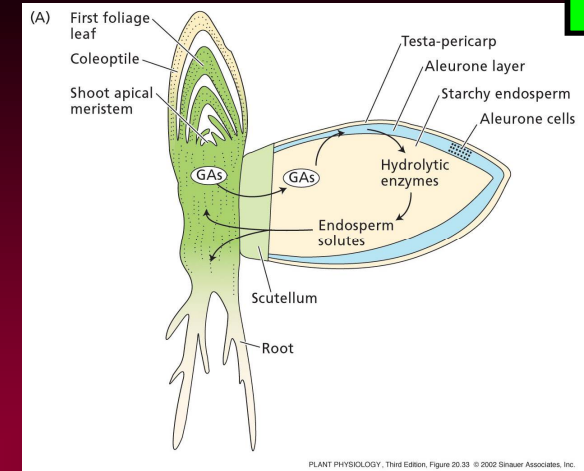
PCD endospermu a aleuronových buněk - - 2. modelový příklad vývojově regulované buněčné smrti

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



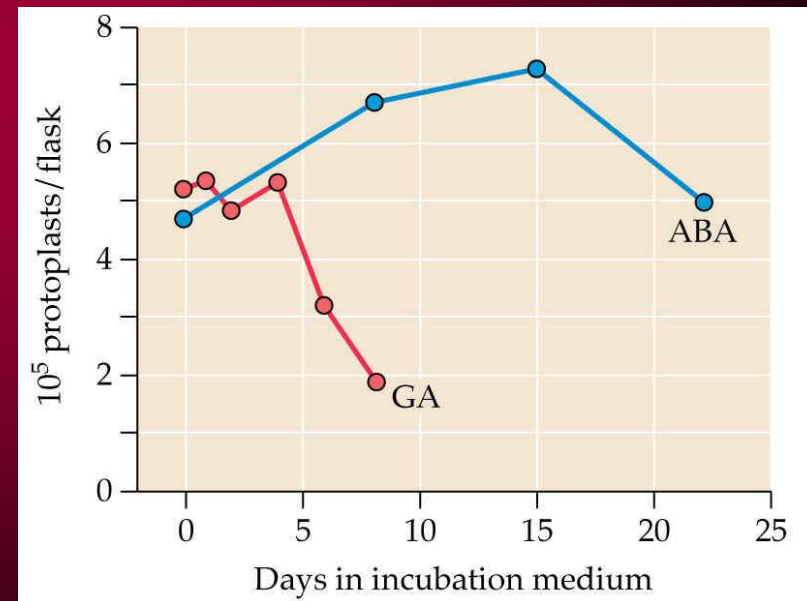
Aleuronové buňky – zůstávají živé až do klíčení a do doby, než jsou všechny rezervy z endospermu mobilizovány

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



Aleuronové buňky obsahují **PSV** – **p**rotein **s**torage **v**acuoles, pH 7

Aplikace GA



PSV pH 5.5 – vakuoly akumulují kyselé hydrolázy a nukleázy

Aplikace ABA

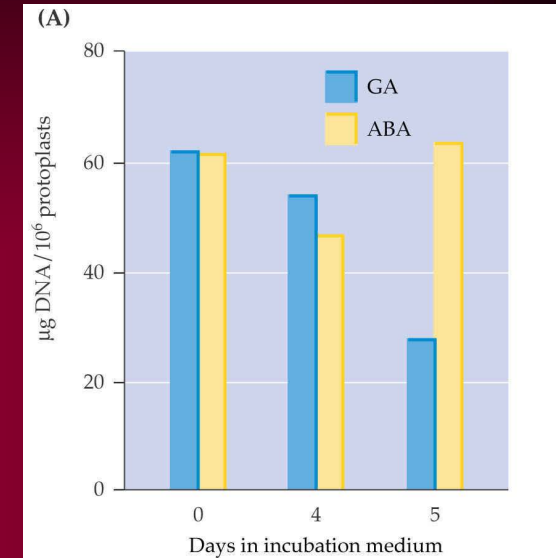


PSV pH 7 – vakuoly neobsahují kyselé enzymy

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.

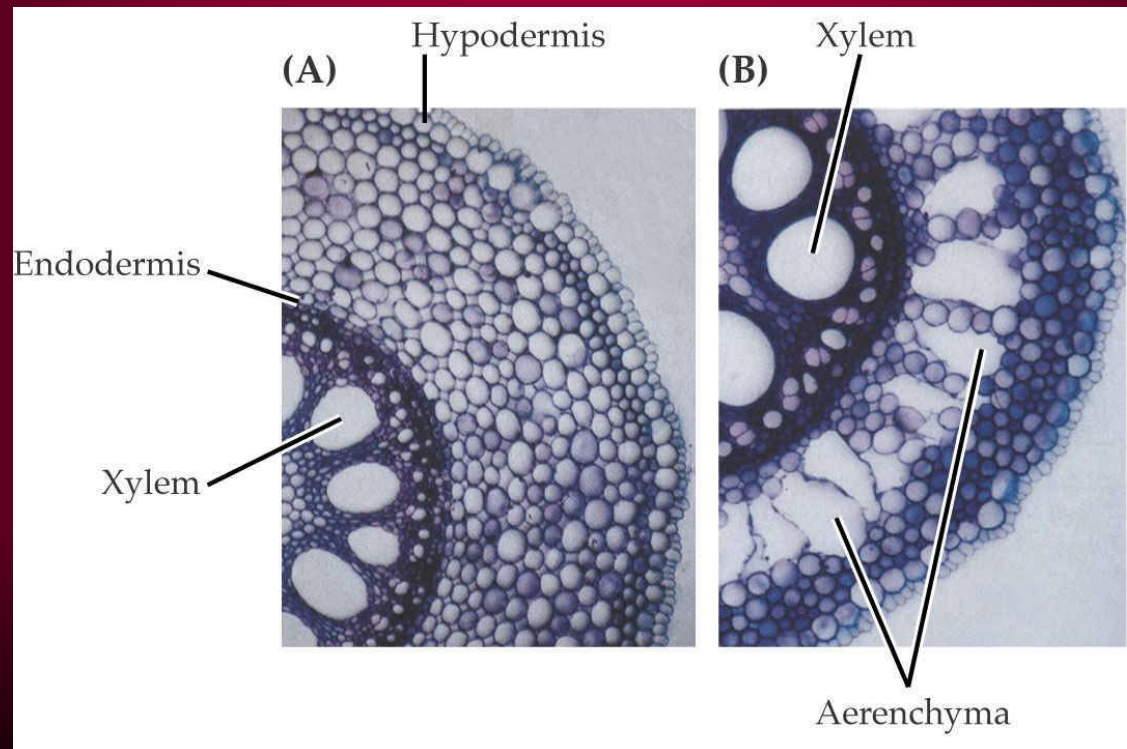
Signální dráhy vedoucí k syntéze a sekreci hydroláz v aleuronu jsou málo známy. Účastní se jich Ca^{2+} , cytozolické pH, calmodulin, protein kinázy a fosfatázy.



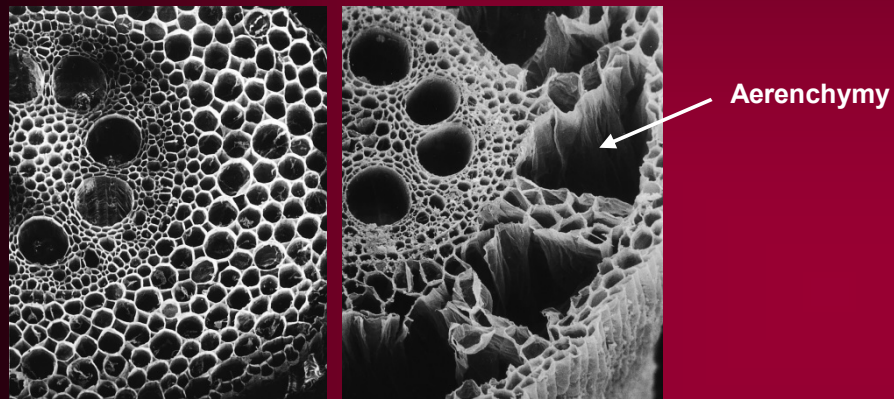
c) PCD a reakce rostlin ke stresu

Kyslíkový deficit – hypoxie – nastává při zamokření půdy

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



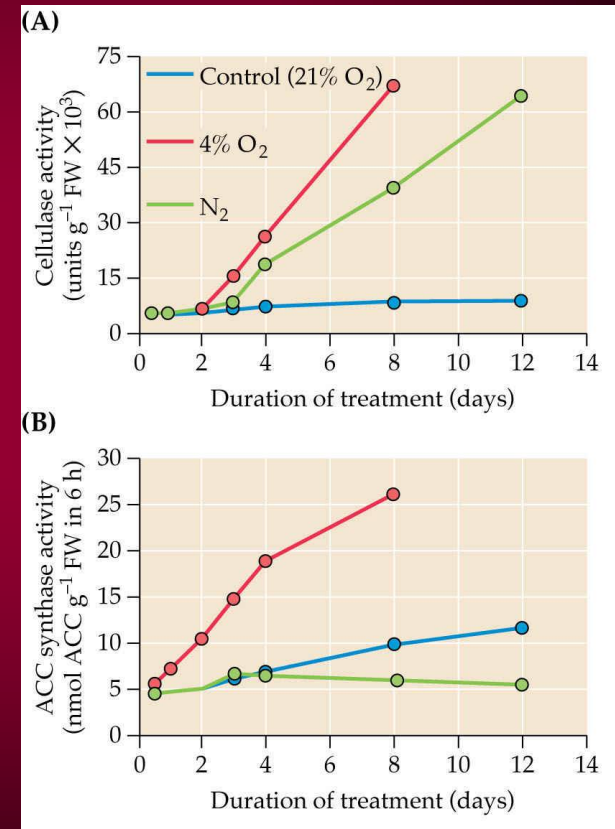
- tvorba aerenchym – rychlý proces, spočívající v odstranění kortikálních buněk včetně buněčné stěny a vytvoření prostorů (kanálů) pro přívod kyslíku;



Hypoxie → Vysoká hladina celuláz
Aktivita ACC syntázy

Update 2018

Sade N et al. (2018) JExB 69: 845 - 583



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

Změna koncentrace Ca^{2+} je rychlá

Role cytozolického Ca^{2+} při hypoxii

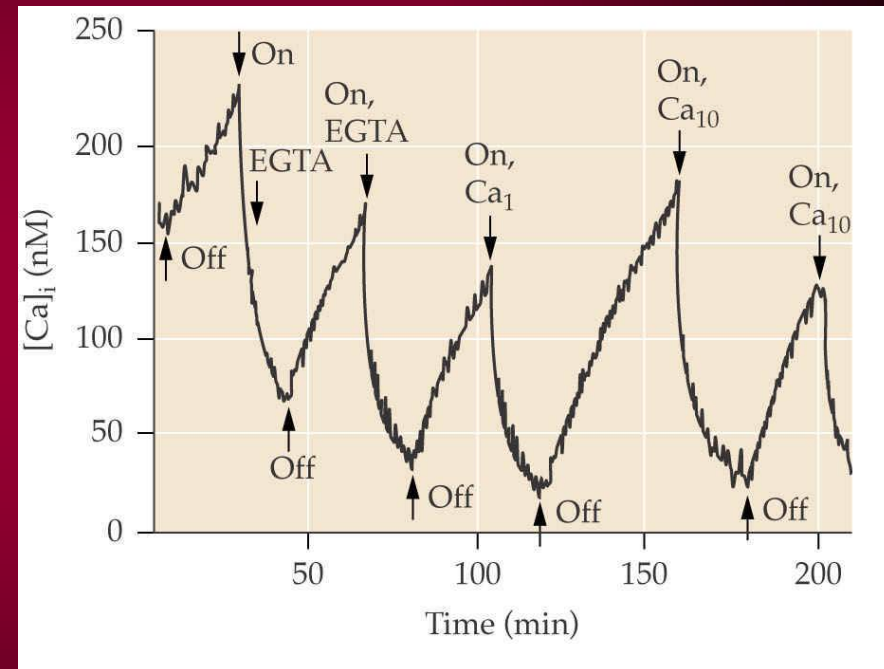
$[\text{Ca}]_i$ – cytozolický Ca^{2+}

On – zapnutí okysličování média

Off – vypnutí okysličování média – nastává hypoxie

Ca_1 – 1 mM externí Ca^{2+}

Ca_{10} – 10 mM externí Ca^{2+}



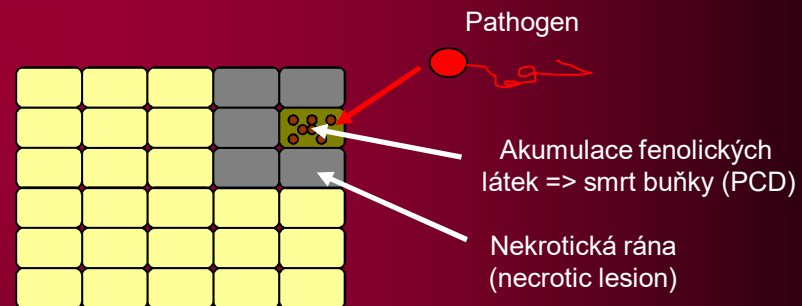
Změny v hladině cytozolického Ca^{2+} v kultivovaných buňkách kukuřice

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

Hypersensitivní reakce – hostitelská buňka a buňky okolní prochází rychlou **PCD** => chrání ostatní buňky pletiva před infekcí



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.

Charakteristické znaky hypersensitivní reakce ve srovnání s vakuolární PCD

| Characteristics | HR | Vacuolar cell death |
|--------------------------|----|---------------------|
| Cytoplasmic shrinkage | ✓ | ✓ |
| Cytoplasmic swelling | ✗ | ✗ |
| Chromatin condensation | ✓ | ✓ |
| Mitochondrial swelling | ✓ | ✗ |
| Vacuolization | ✓ | ✓ |
| Chloroplast rupture | ✓ | ✗ |
| Plasma membrane blebbing | ✗ | ✗ |
| Plasma membrane rupture | ✓ | ✗ |
| Tonoplast rupture | ✓ | ✓ |
| Nuclear fragmentation | ✗ | ✓ |
| Apoptotic bodies | ✗ | ✗ |

Update 2019

Salguero-Linares J and Coll NS (2019)
J Exp Botany 70: 2087-2095

Genetické důkazy, že buněčná smrt při HR je naprogramovaná:

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

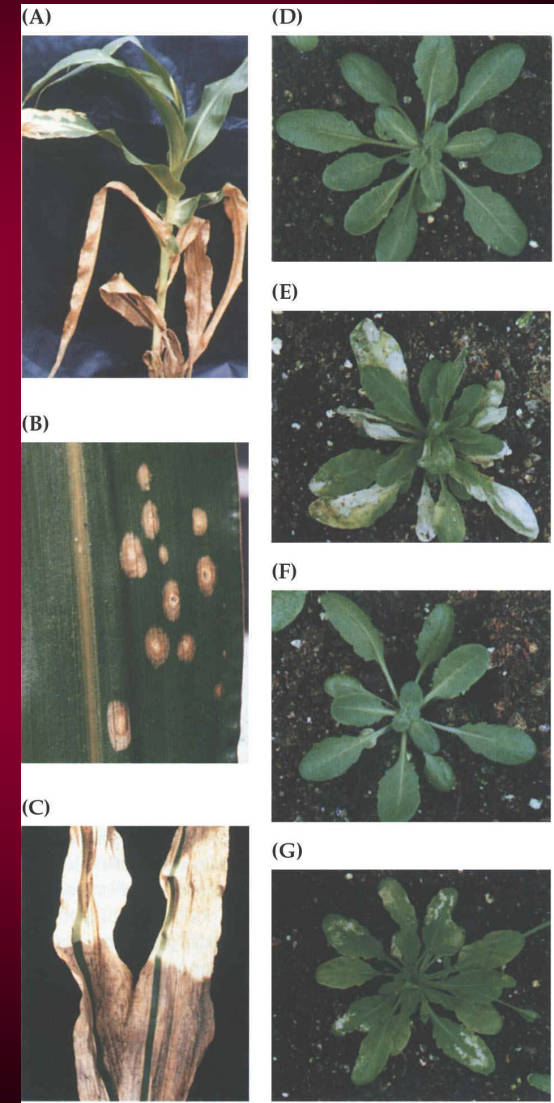


HR vychází z endogenního genetického programu buněčné smrti

Mutace v genu
pro rezistenci k patogenu

Mutace v genu
řídícího metabolické dráhy

HR



Spouštění PCD při napadení patogenem

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)



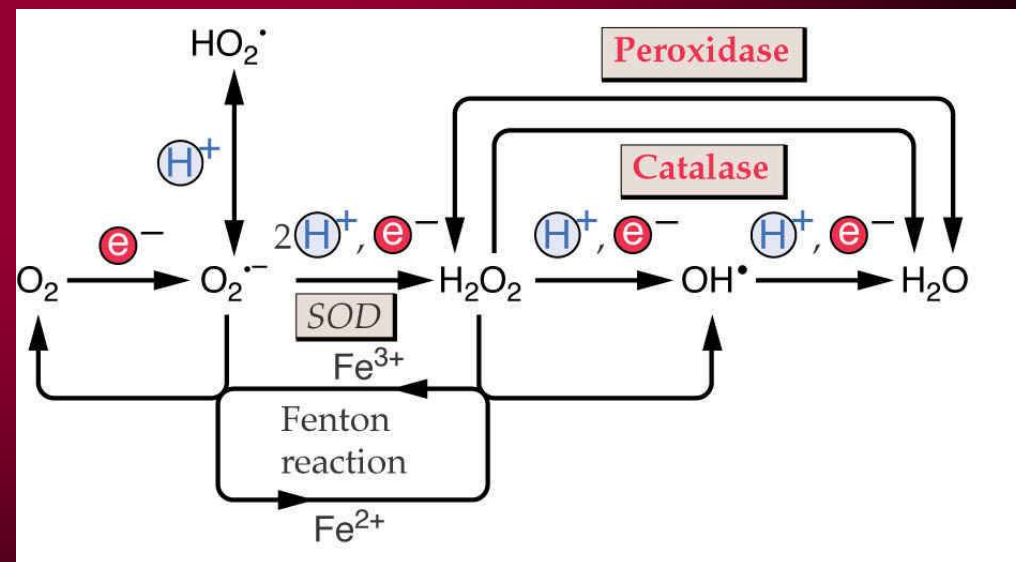
Meziprodukty (zhoubné)



Buněčná smrt

Inhibice tvorby superoxidu vede k redukci rozsahu buněčné smrti.

O_2^- - superoxid
 H_2O_2 – peroxid vodíku
 1O_2 – singletový oxid
 OH^* – hydroxylový radikál



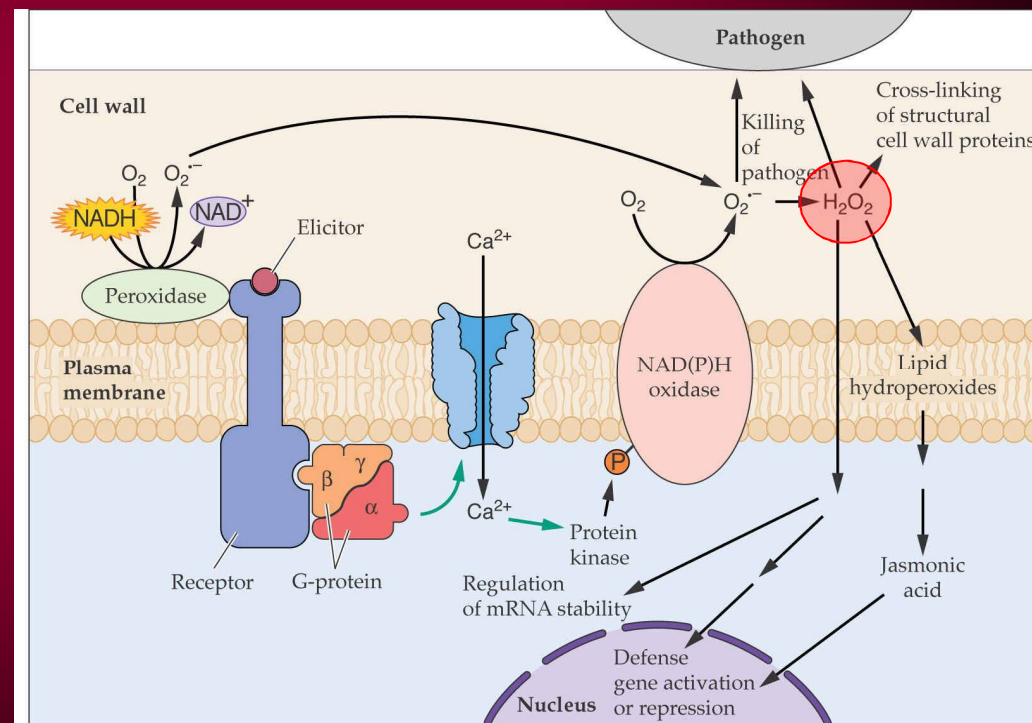
SOD = superoxid dismutáza

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



Geny zapojené v signální dráze reaktivního kyslíku:

RCD – Radical-induced Cell Death

EXE1 – Executer1



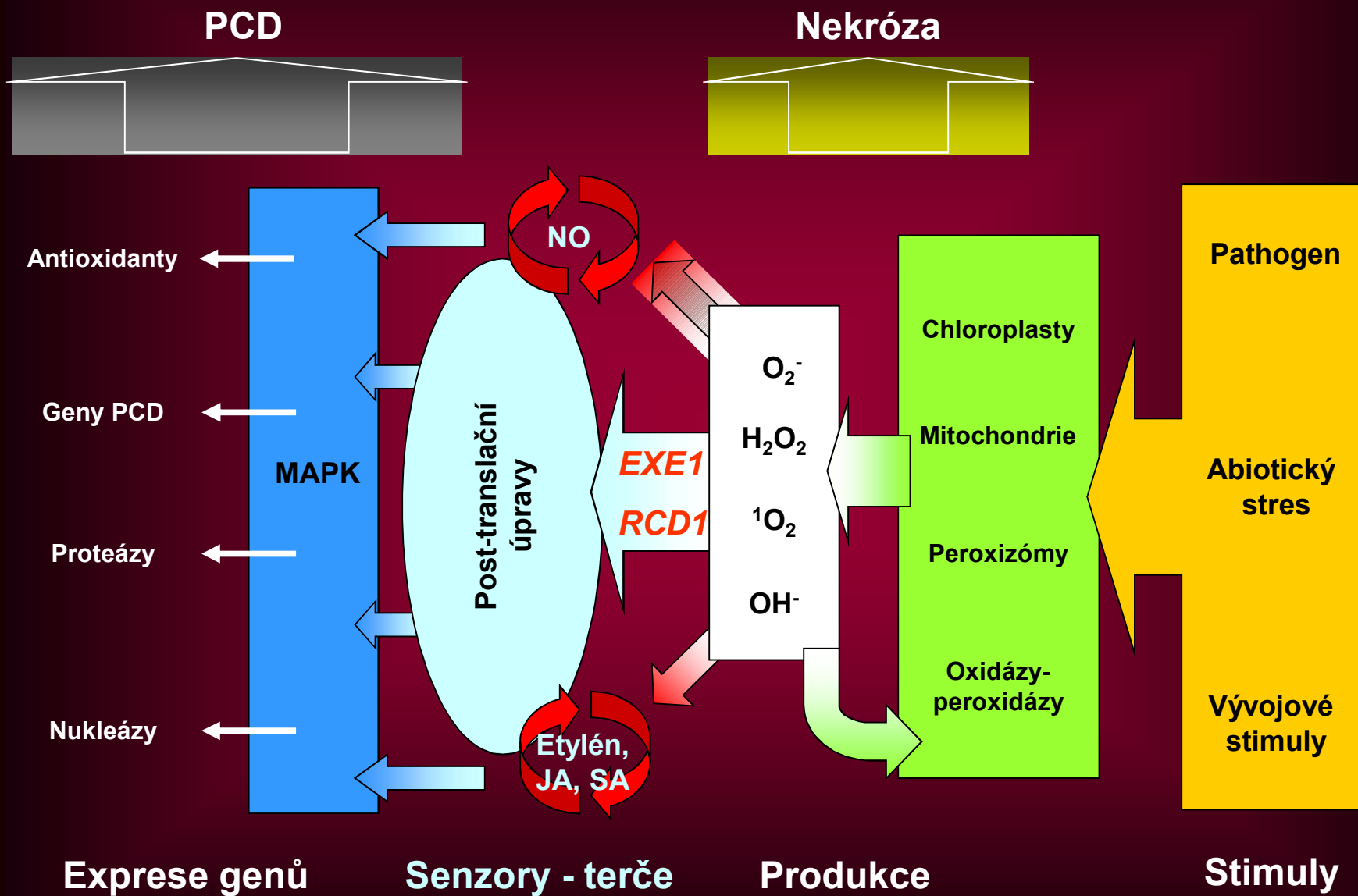
Hledání **dalších elementů** zapojených v síti genové regulace PCD zprostředkované reaktivním kyslíkem

PCD indukovaná světlem a zprostředkovaná $^1\text{O}_2$ 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.

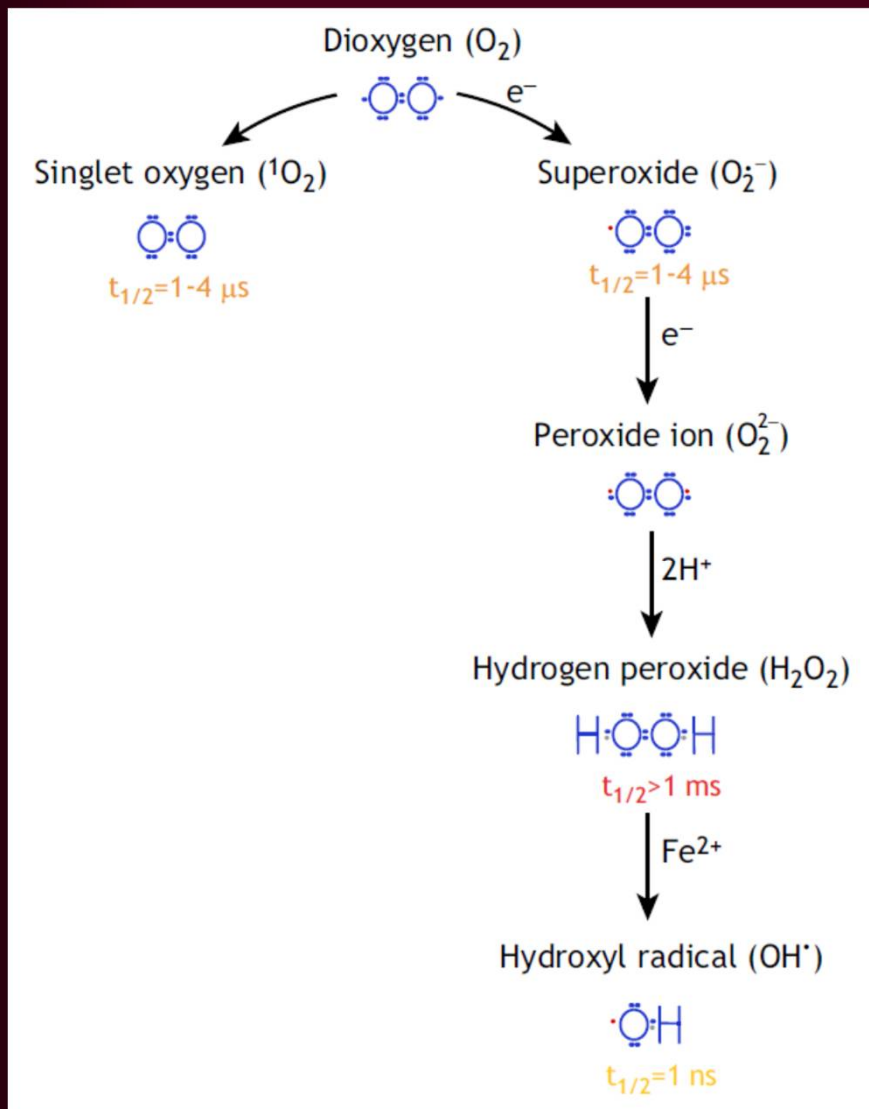
Schéma signálních drah vedoucích k PCD zprostředkované reaktivním kyslíkem.



MAPK – mitogen-activated protein kináza

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

Druhy reaktivních oxidových radikálů nalezené v rostlinách

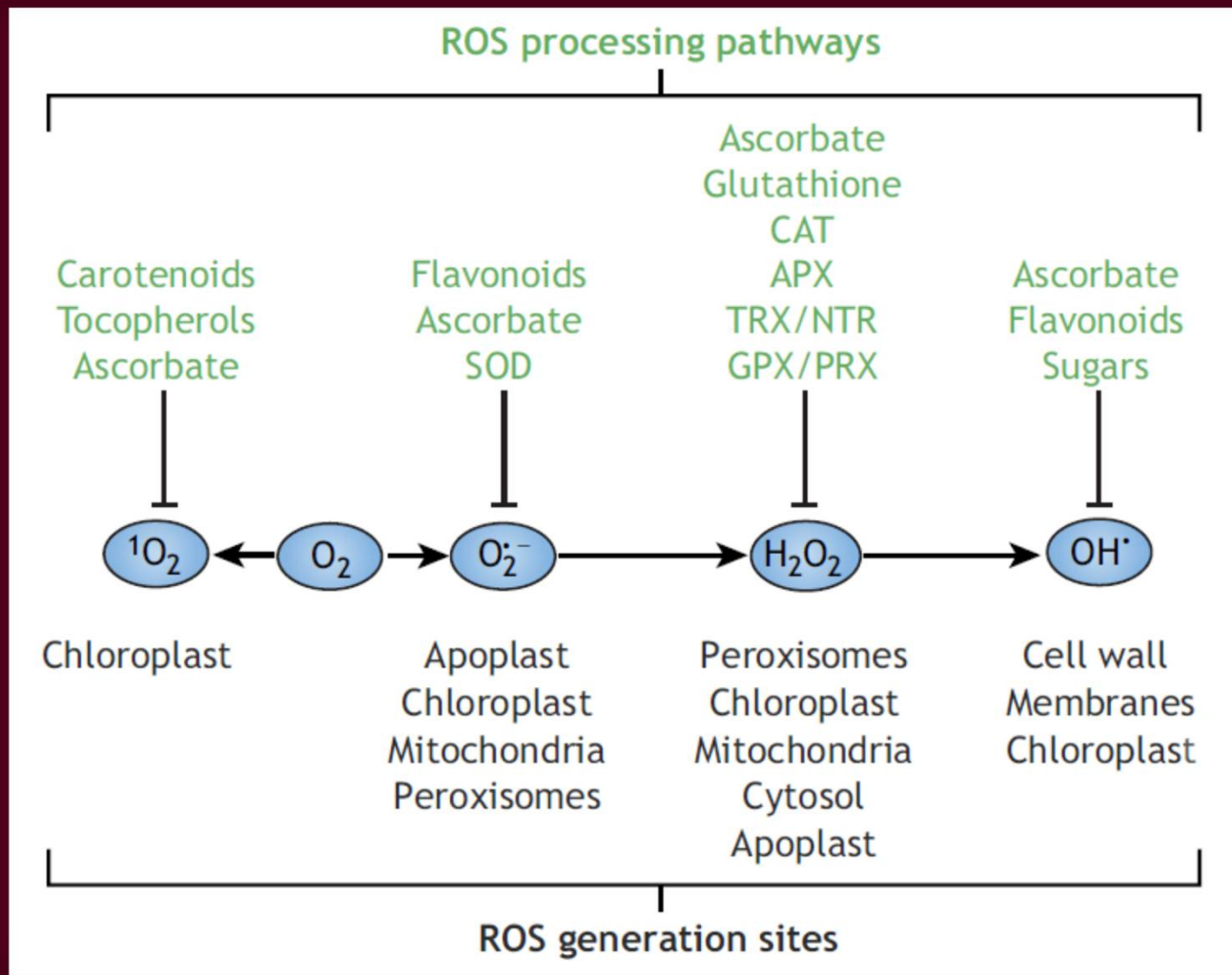


$t_{1/2}$ – half life – poločas rozpadu

Update 2018

Mhamdi A and Van Breusegem F (2018)
Development 145: 1 - 12

Místa vzniku reaktivních oxidových radikálů a dráhy ovlivňující jejich vznik



Update 2018

Mhamdi A and Van Breusegem F (2018) Development 145: 1 - 12

d) PCD a nestresové podmínky

Otevírání průduchů na světle a při nízké hladině CO_2

Stresové podmínky – uzavření průduchů
– zapojení ROS

Nestresové podmínky – redukce množství ROS prostřednictvím **pexofagie** =
degradace peroxyzómů

BL aktivuje degradaci triacylglycerolu (TAG) => β -oxidace ROS v peroxizómech => zvýšení ATP.

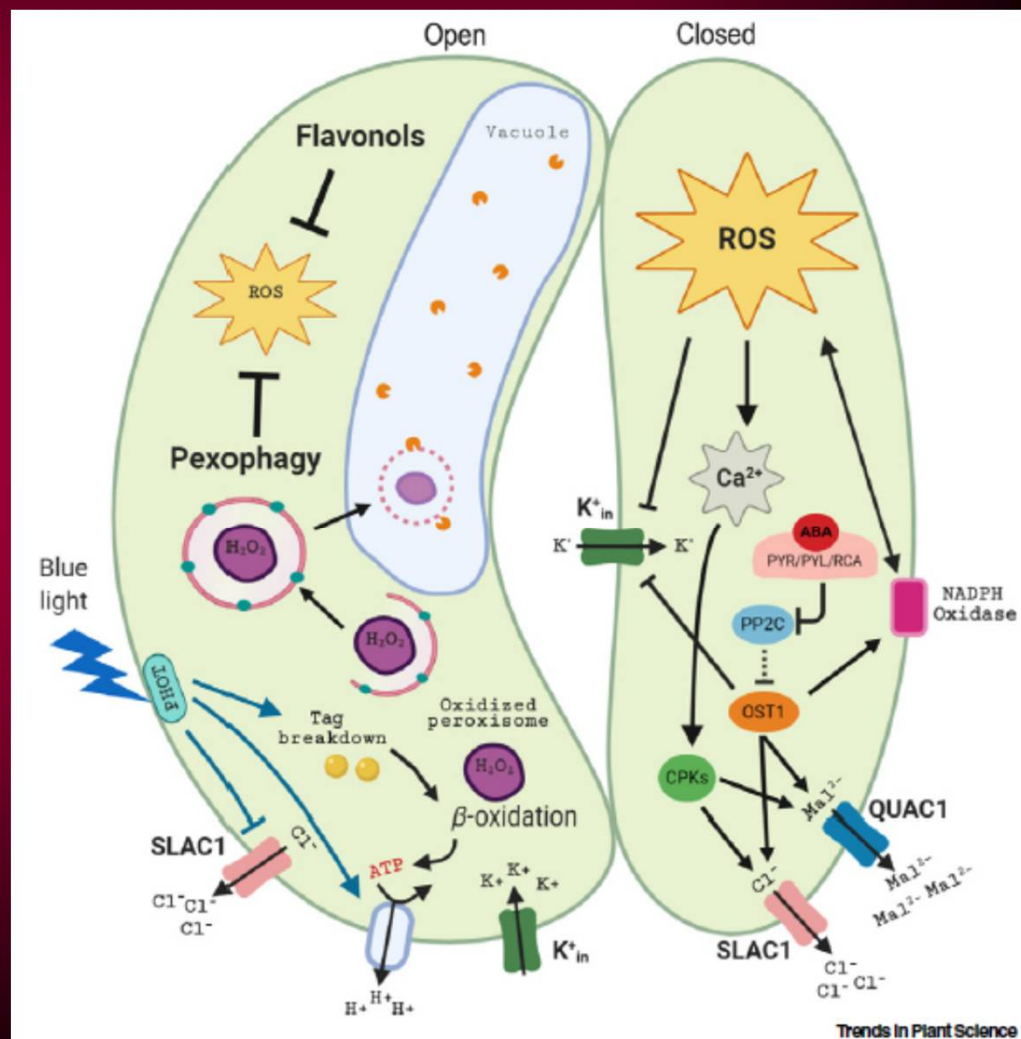
Oxidované peroxizómy jsou degradovány ve vakuolách => snížení ROS => otevírání průduchů

Peroxisómy v rostlinných buňkách produkují ROS.

Update 2019

Yamaguchi S et al. (2019) PNAS 116: 19187-19192

Medeiros DB et al. (2019) TIPS 25: 220-223



Senescence (stárnutí)

Senescence – příklad PCD regulované vnějšími faktory



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 hypersensitivní 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

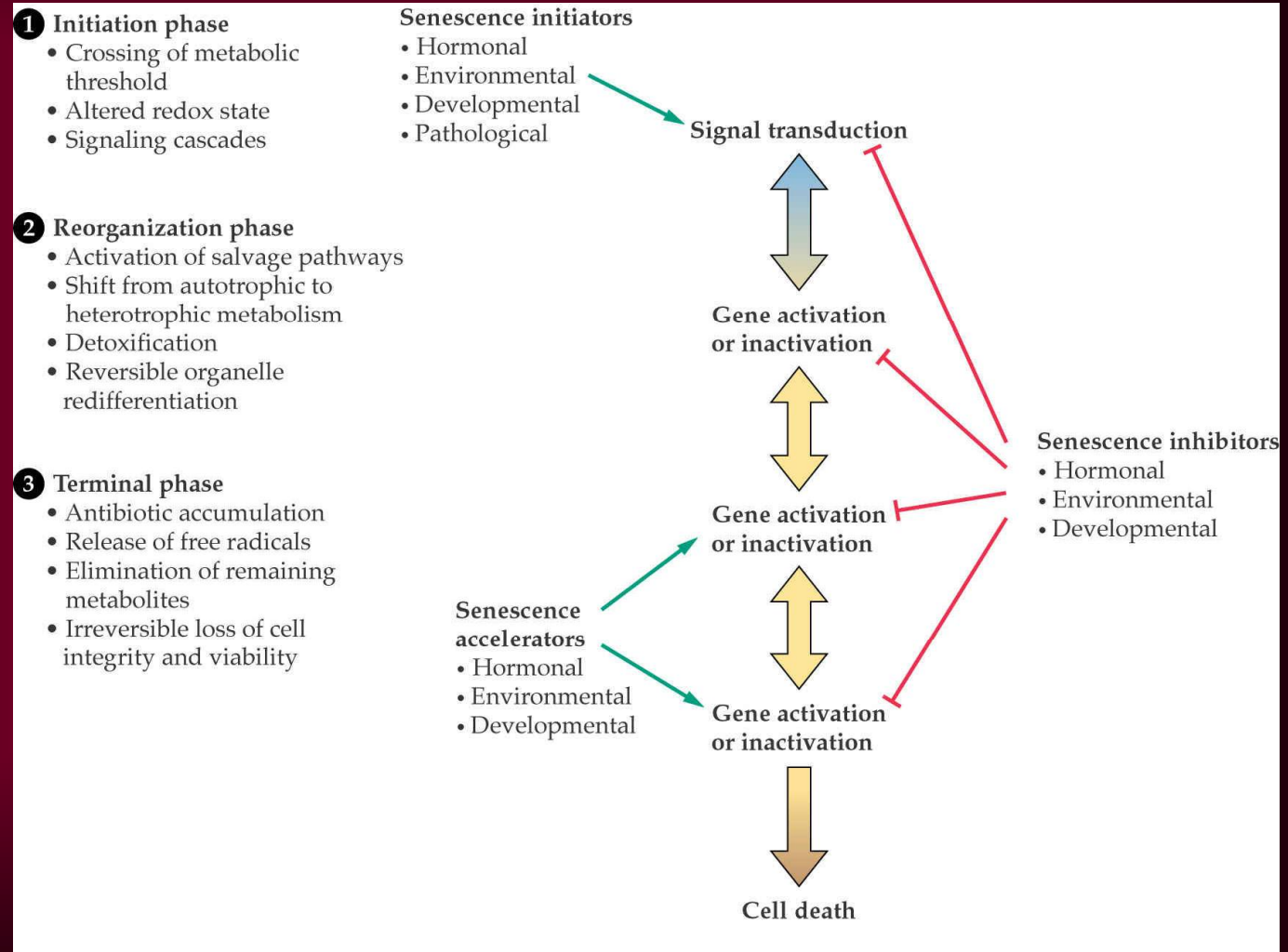
Aktivace a inaktivace genů

Reorganizační fáze

Rediferenciace buněčných struktur a remobilizace materiálu

Konečná fáze

Iniciace nevratných procesů

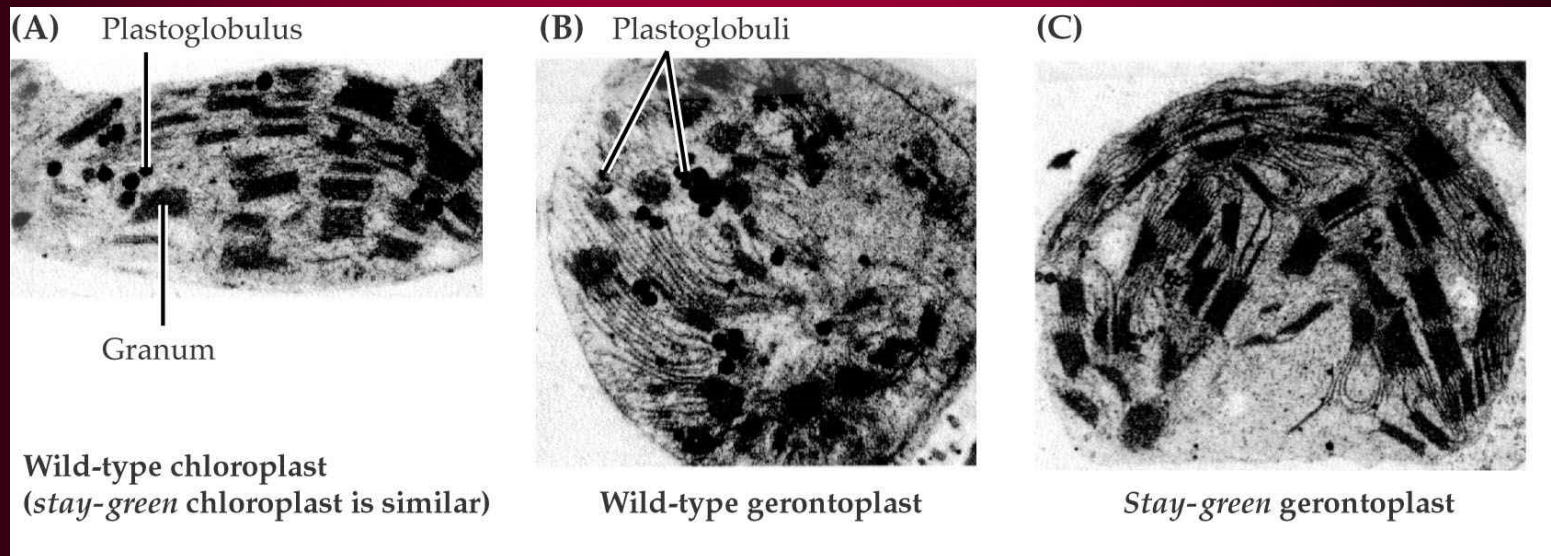


Senescence listů a plodů je charakterizována dramatickými **změnami hlavních organel**, zvláště plastidů v mezofylových buňkách a parenchymu perikarpu plodů.

Chloroplasty → Gerontoplasty

Grana se rozpadají,
přibývá plastoglobulů

Grana zůstávají zachována,
plastoglobuly se nevyskytují



WT

Stay green

Chloroplasty



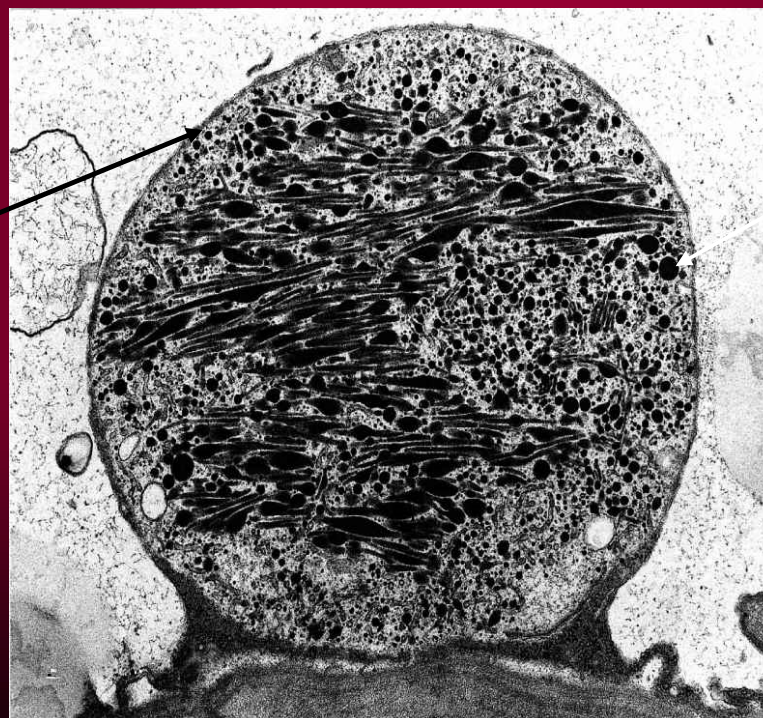
Chromoplasty



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

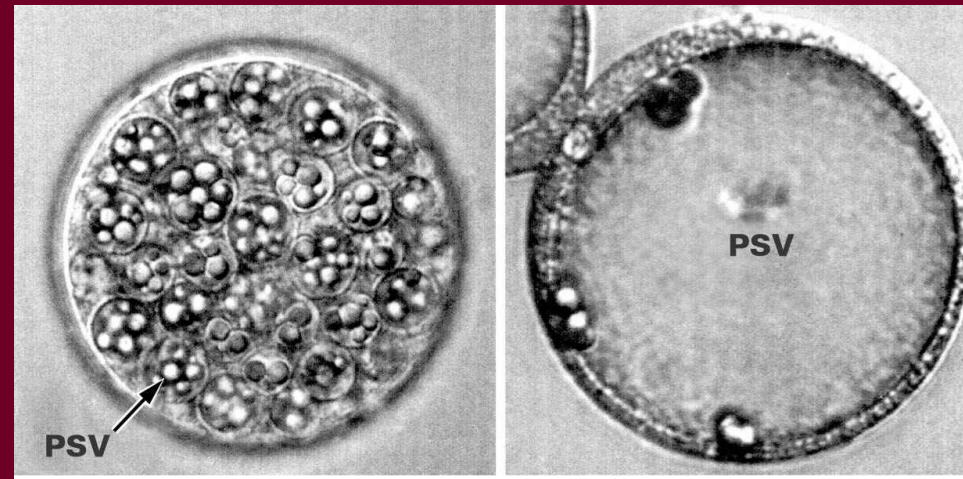
Chromoplast plodu židovské třešně – buňka má velice slabou cytoplazmu;
celá buňka je vyplněna plastidy obsahujícími karotenoidy

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, které jsou aktivovány 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

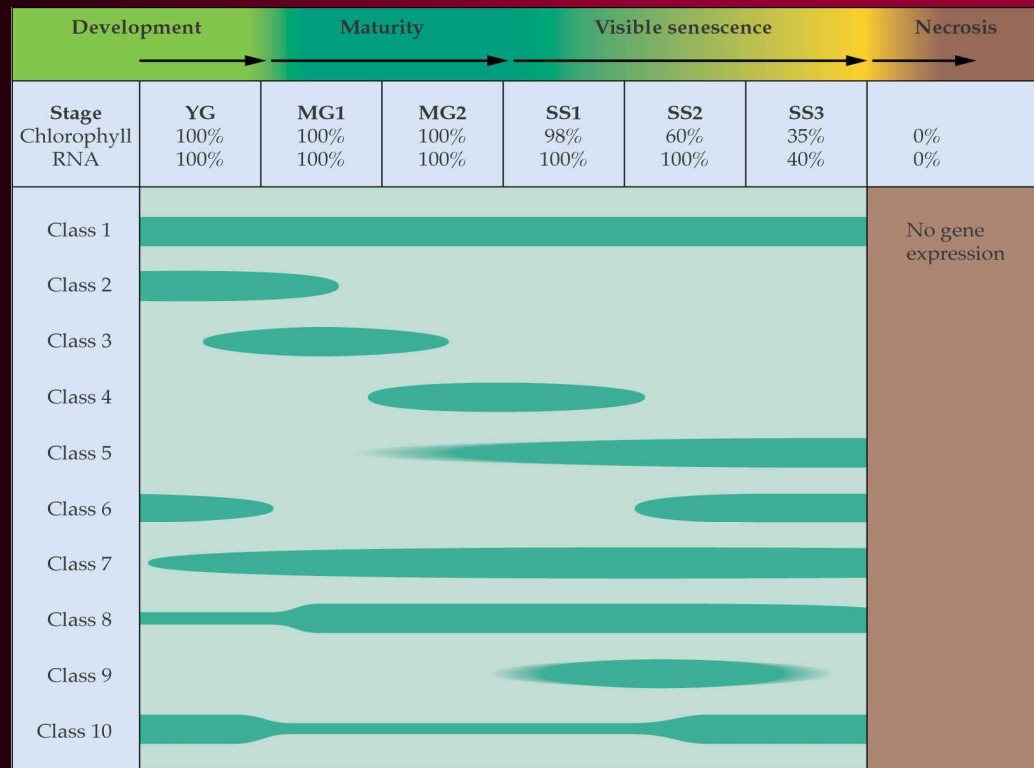
4) Geny kódující proteiny, které chrání buňku proti oxidativnímu poškození vyvolaného ionty kovů



Variabilita v expresi SAG genů

- 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 tobolky

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:

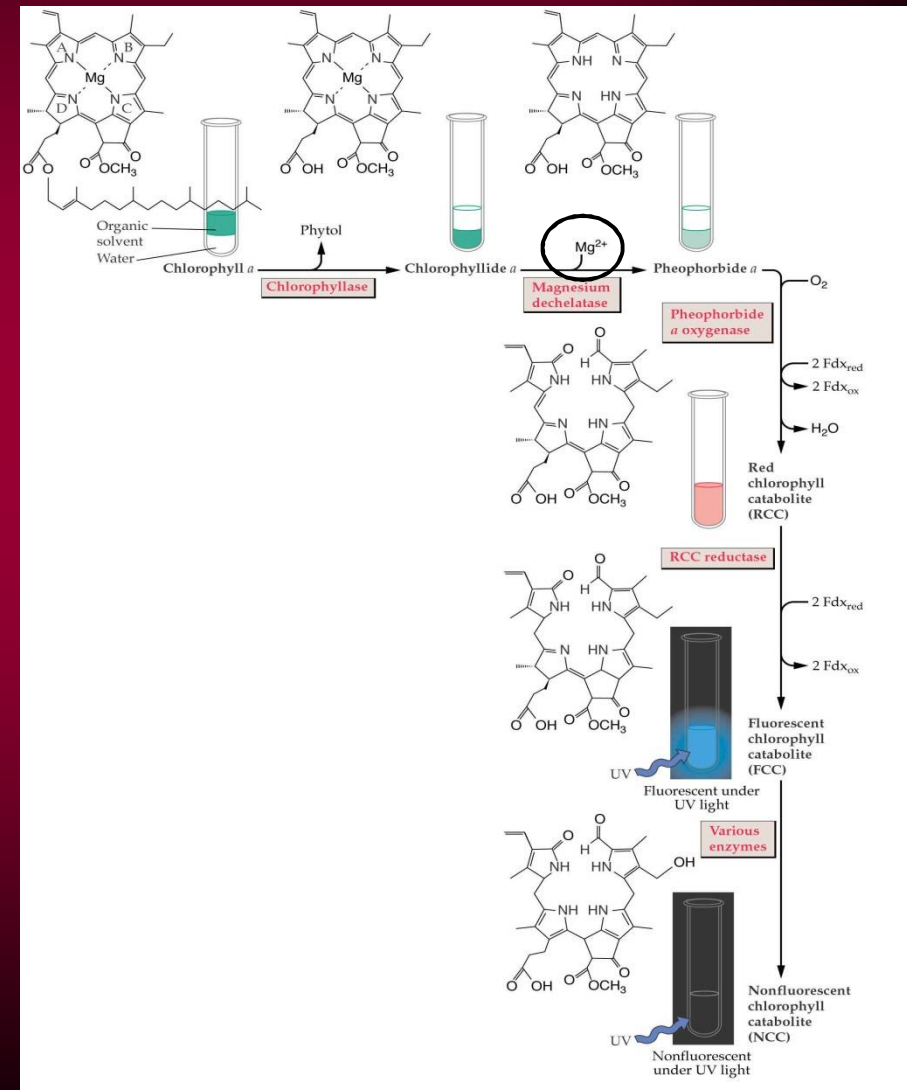
- enzymatické odstranění Mg^{2+}
- otevření kruhu a vznik bezbarvého tatrapyrolu

Update 2016

Shimoda Y et al. (2016) *Plant Cell* 28: 2147-2160

Gen *STAY-GREEN* (*SGR*) u *Arabidopsis* kóduje Mg-dechelatázu, enzym, který katalyzuje odstranění Mg^{2+} z molekuly chlorofylu.

Arabidopsis obsahuje tři *SGR* geny: *SGR1*, *SGR2* a *SGRL*.



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 anthocyanů:

- fyziologická (fotoprotektivní, antioxidantivní, zásobní)
- signální – žlutá barva přitahuje mšice, červená ne

Update 2021

Novas IP and Archetti M (2021)
New Phytologist 232: 2236 - 2237

Analýza mutantů s abnormálně zbarvenými plody či listy

↓

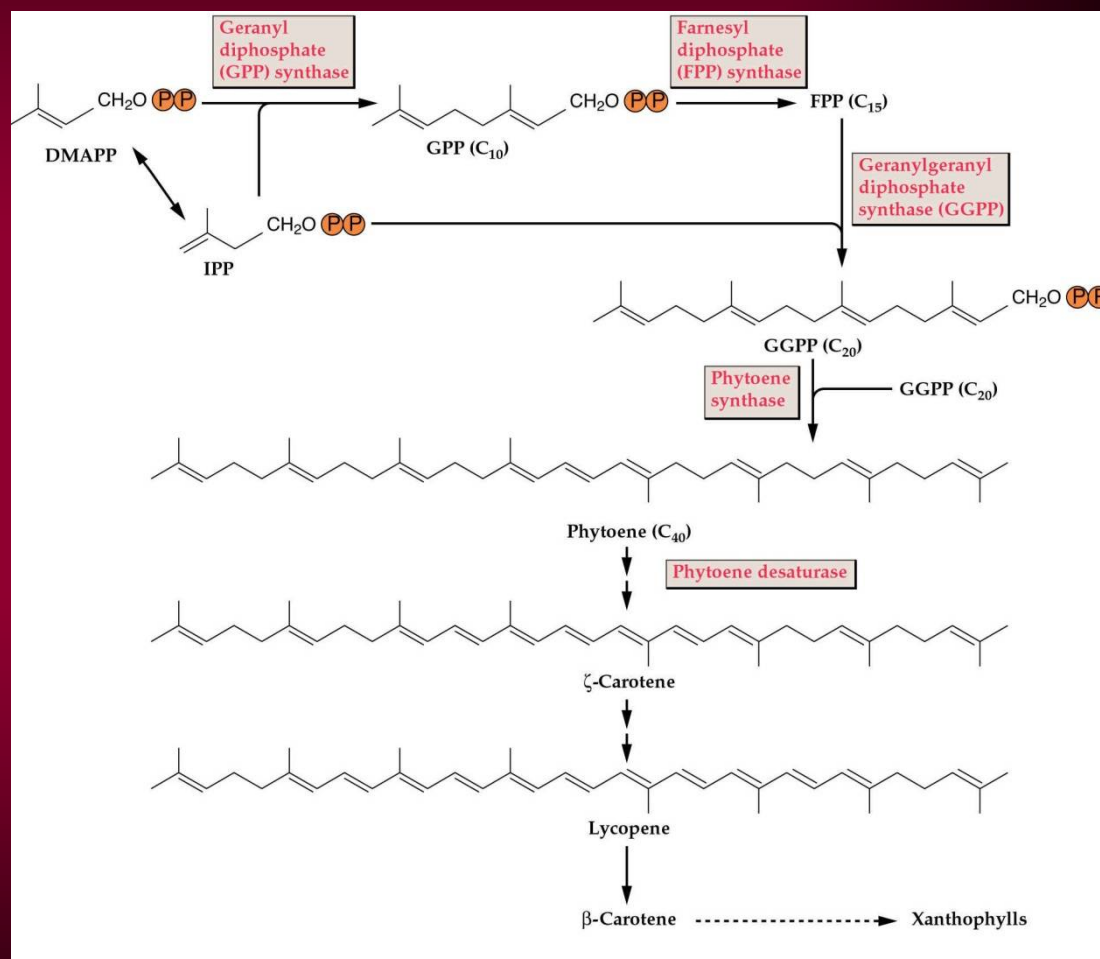
**Klonovány důležité geny
hrající roli v biosyntéze
karotenoidů**

↓

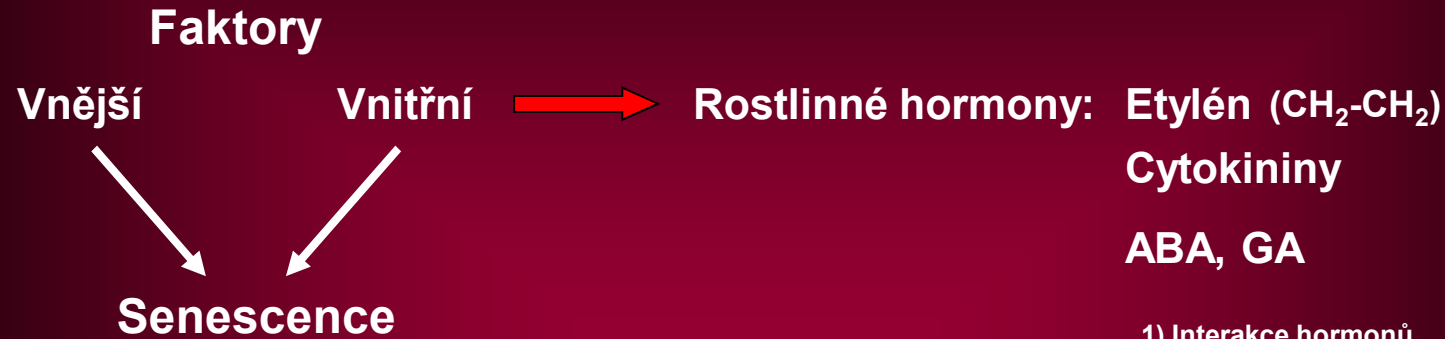
Xantofyly: zeaxantin

↓

**Receptor modrého
světla zprostředkující
otevření stomat**



Vliv rostlinných hormonů na senescenci



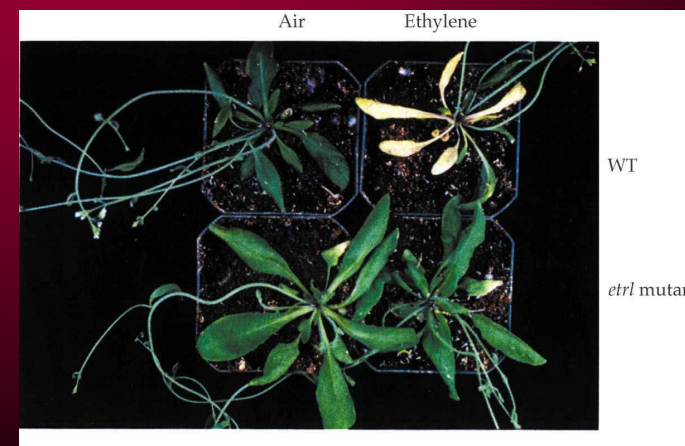
1) Interakce hormonů

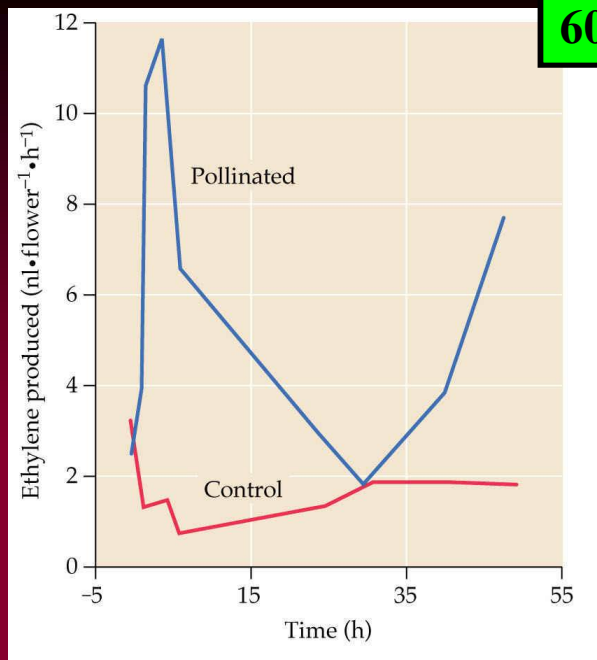
2) Rozdílné reakce rostlin ke stejnému hormonu

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

Etylén (plynný fytohormon) – stimuluje senescenci

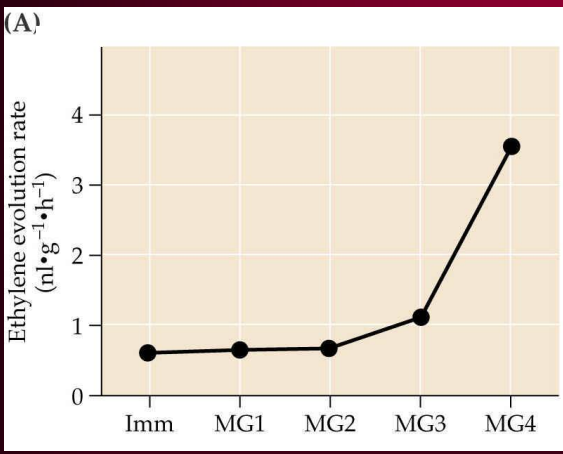
- redukce růstu listů a indukce žloutnutí
- snížení exprese genů spojených s fotosyntézou
- zvýšení exprese SAG



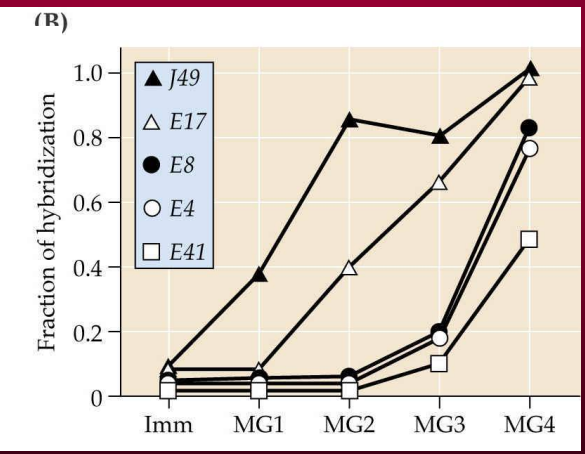


Petunia

Produkce etylénu → exprese genů spojených s dozríváním plodů



Stádia zralosti plodu



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

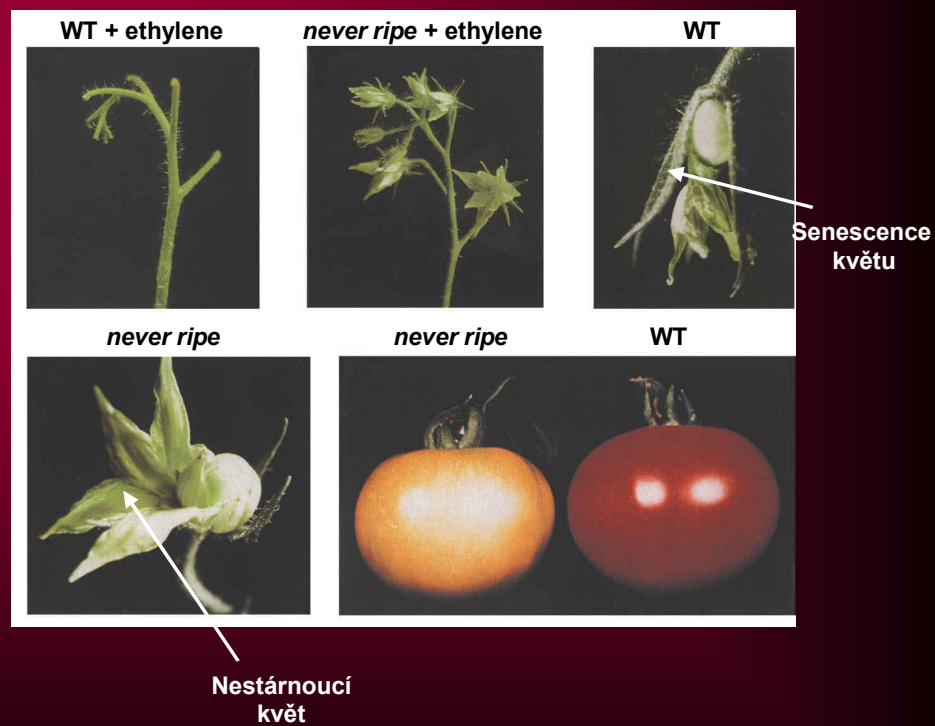
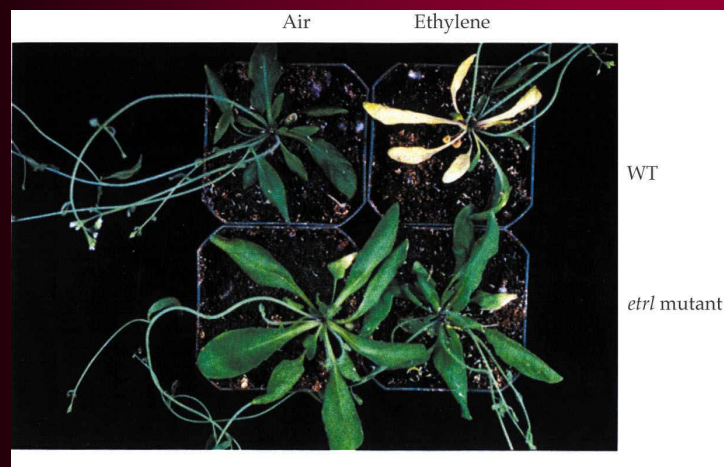
↓
 Změna barvy, textury
 a chuti plodu

Rostliny se změnami v receptoru etylénu ukazují změny v senescenci

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

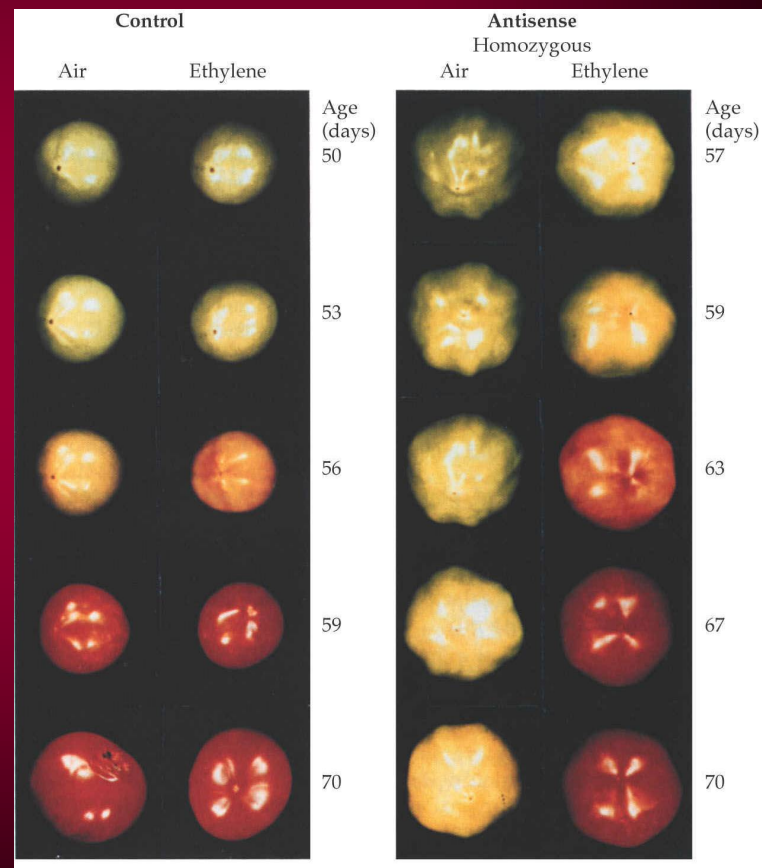
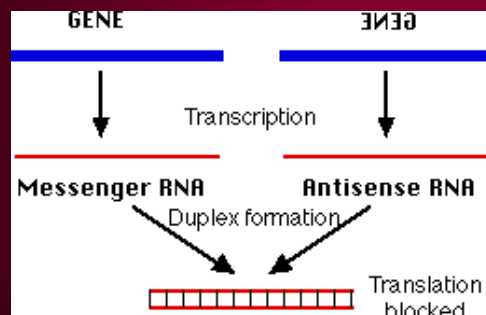
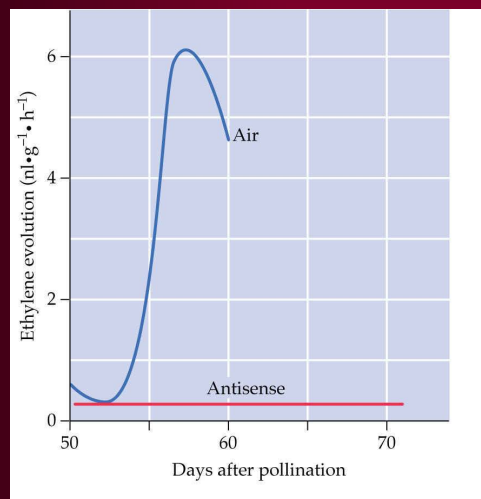
Mutant rajčete – ***never ripe*** – necitlivý k etylénu

Opožděná senescence plodů i květů



Rostliny se změnami v biosyntéze etylénu

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



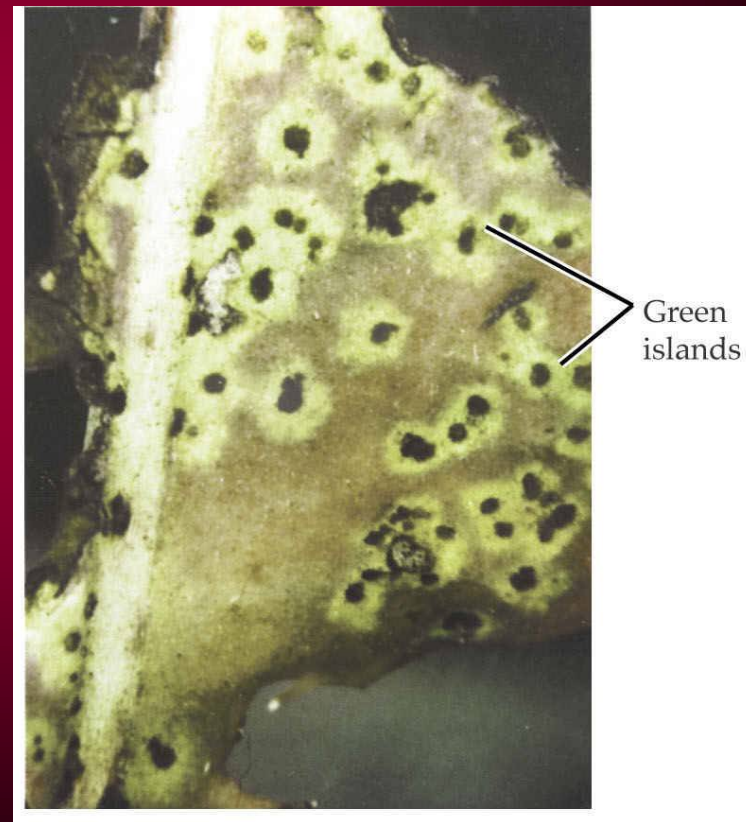
Normální rostliny =
produkcující
etylén

Antisense rostliny =
neprodukcující
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



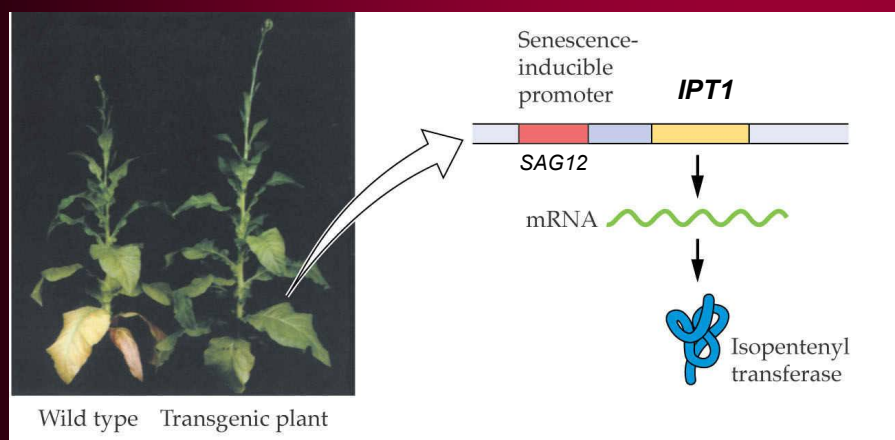
Identifikace role cytokininů v senescenci – molekulární metody

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

Produkce cytokininů způsobuje zpoždění senescence → praktický dopad

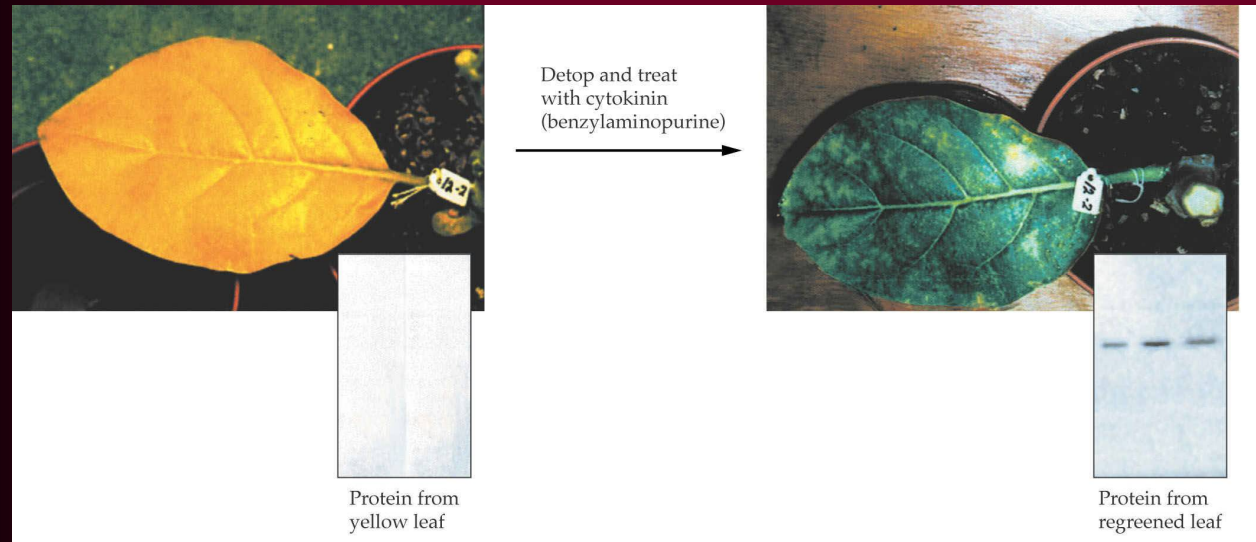
Možná vysvětlení antisenescenční aktivity cytokininů

- 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.

Duální aktivita cytokininů:

- působení na dlouhé vzdálenosti (stimulace diferenciacce 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

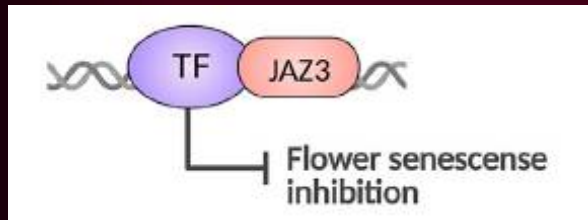
Role jiných fytohormonů v senescenci – není zcela jasná

ABA – většinou stimuluje senescenci

GA – obvykle zpomaluje senescenci

Auxiny – stimulují i zpomalují senescenci; SAUR49 stimuluje listovou senescenci

Kyselina jasmonová (JA) – stimuluje senescenci

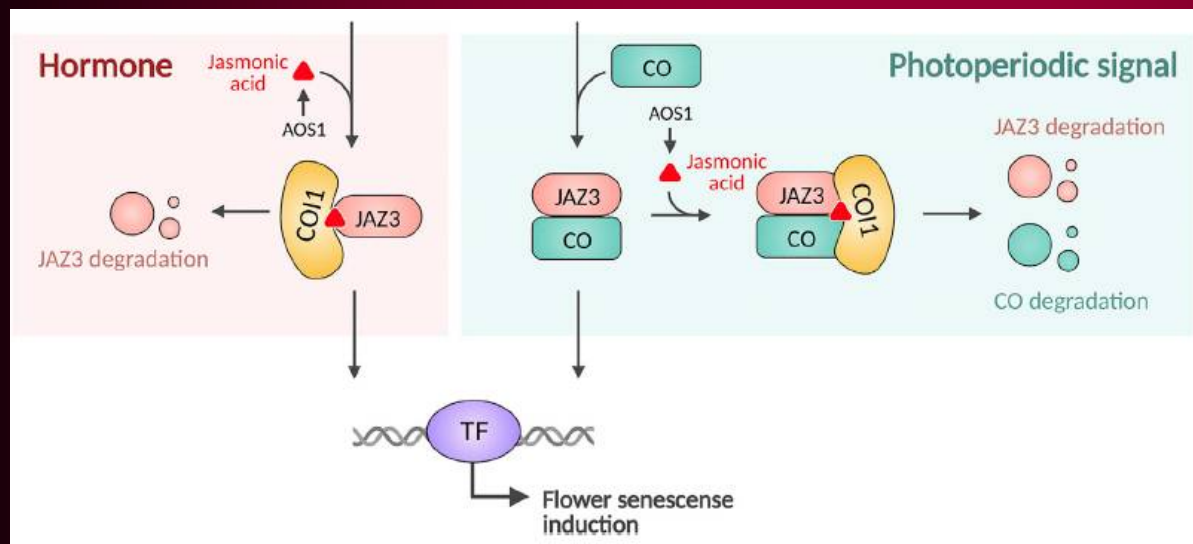


JAZ3 (JAsmonate **ZIM** domain**3**) – inhibitor JA signalizace - blokuje transkripci genů spojených se senescencí

Akumulace JA => degradace JAZ3 => odblokování JA signalizace => uvolnění TFs => aktivace senescenčních genů

CO (CONSTANS) – zprostředkovává fotoperiodicky indukované kvetení

CO je schopen vázat JAZ3. Přítomnost JA => ubiquitinace komplexu CO/JAZ3 => odblokování signální dráhy JA => uvolnění TFs a indukce genů spojených se senescencí.



Update 2022

Serrano-Bueno G et al. (2022)
Molecular Plant 15: 1710-1724

Oxid dusnatý (NO) a senescence

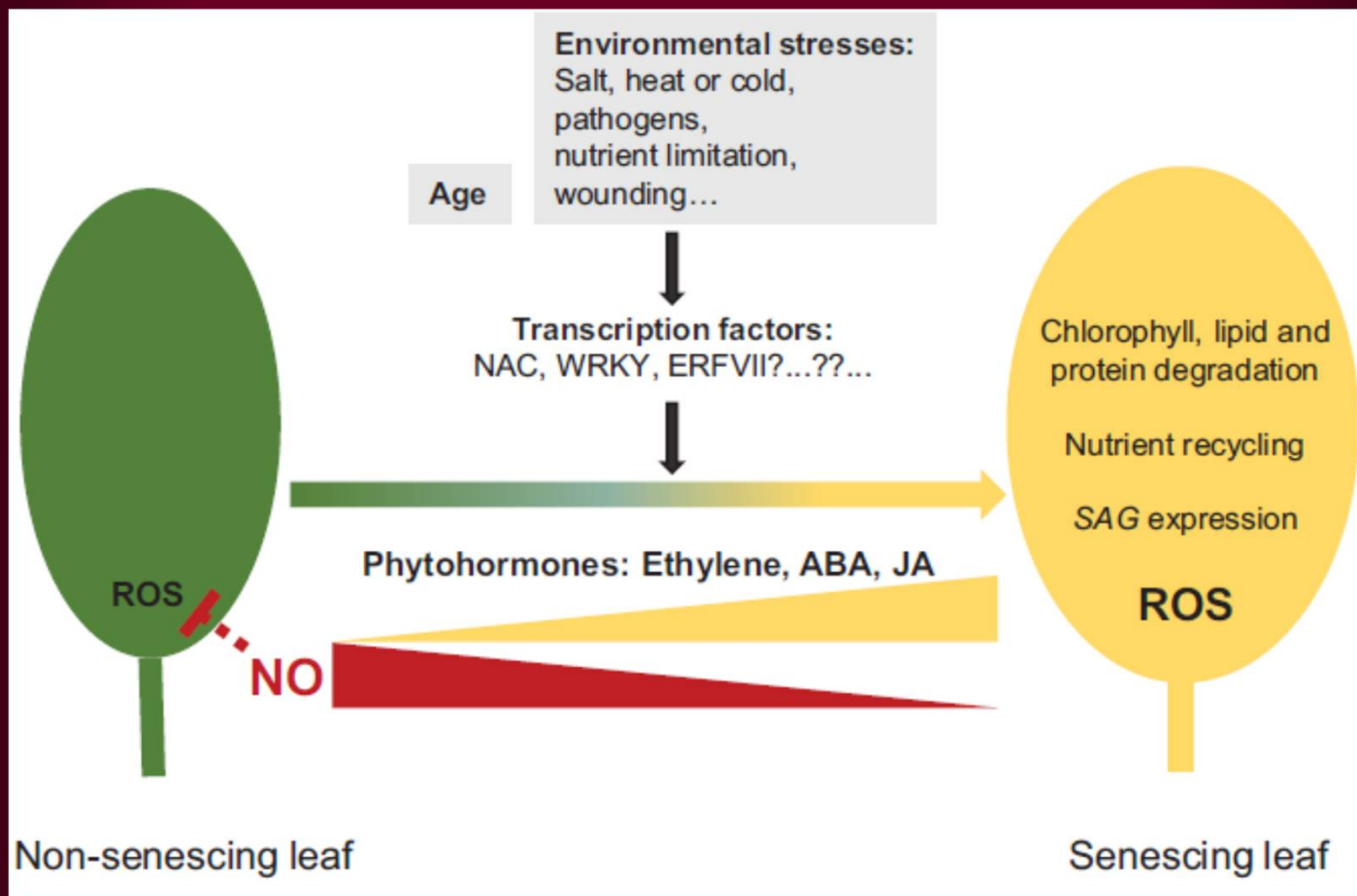
NO potlačuje listovou senescenci

Update 2022

Hussain A et al. (2022)

Frontiers in Plant Science 13: 851631

Nejnovější review of úloze NO v senescenci



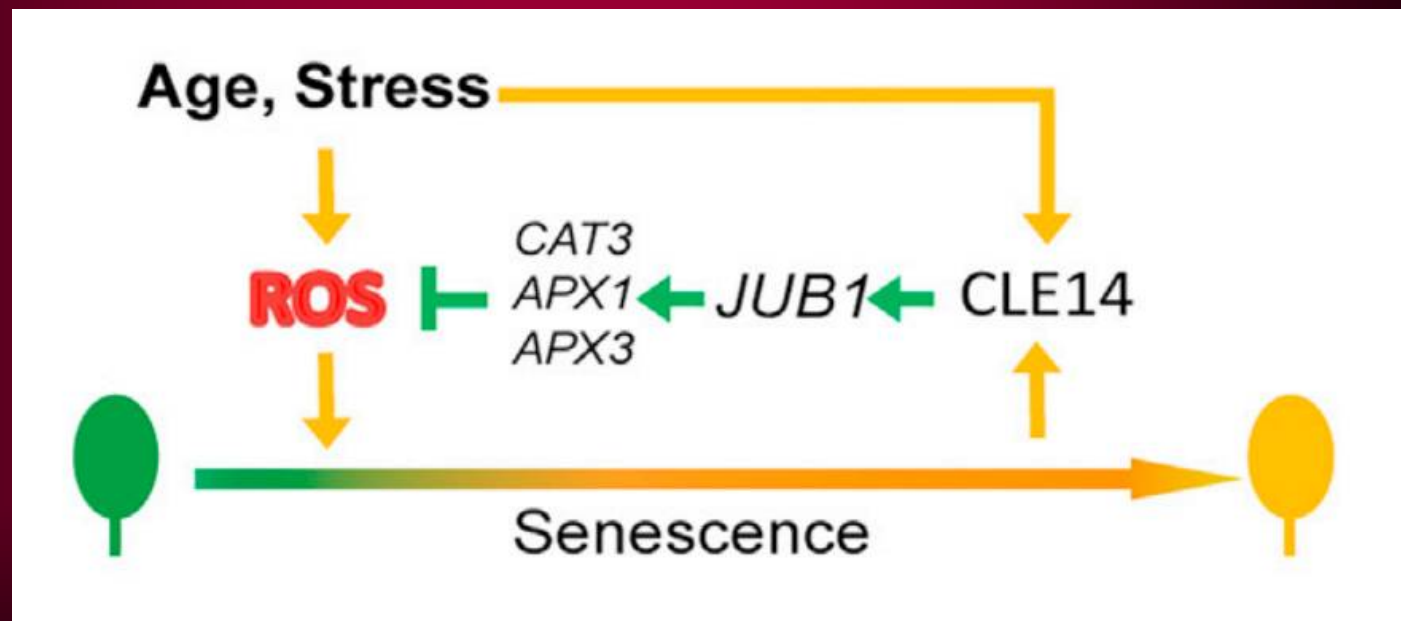
Update 2019

Bruand C and Meilhoc E (2019) J Exp Botany 70: 4419 - 4427

Zapojení malých signálních peptidů CLE14 v regulaci senescence

CLE14 (CLAVATA3/ESR-RELATED 14) – potlačuje produkci ROS prostřednictvím JUB1 (JUNGBRUNNEN1) => zpomalení senescence

JUB1 – transkripční faktor typu NAC, jehož exprese je indukována H_2O_2 . Overexprese *JUB1* zpožďuje senescenci a zvyšuje toleranci ke stresu tím, že redukuje obsah endogenního H_2O_2 . JUB1 byl dříve identifikován jako negativní regulátor senescence.



Update 2022

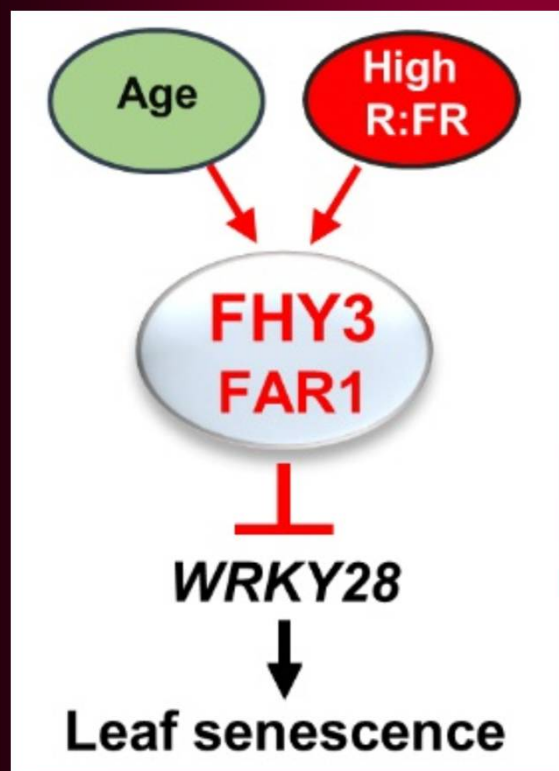
Zhang Z et al. (2022) Molecular Plant 15: 179-188

Senescence a světlo

Senescence je regulována světlem – délka dne, kvalita světla

Indukce senescence: nízký R:FR, FR světlo, tma

Potlačení senescence: vysoký R:FR, R světlo

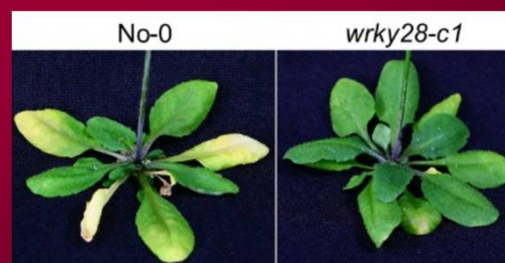


Update 2020

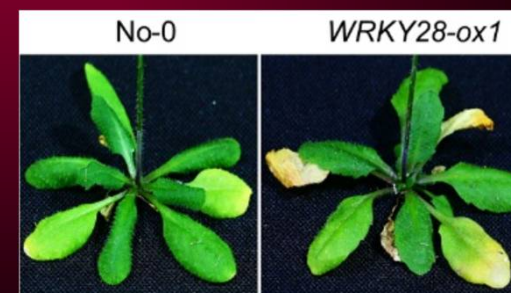
Tian T et al. (2020) Plant Cell, March 9

FHY3, FAR1 – transkripční faktory, na světle stimulují expresi proteinů FHY1 a FHL – vazba na phyA – regulace transportu phyA do jádra

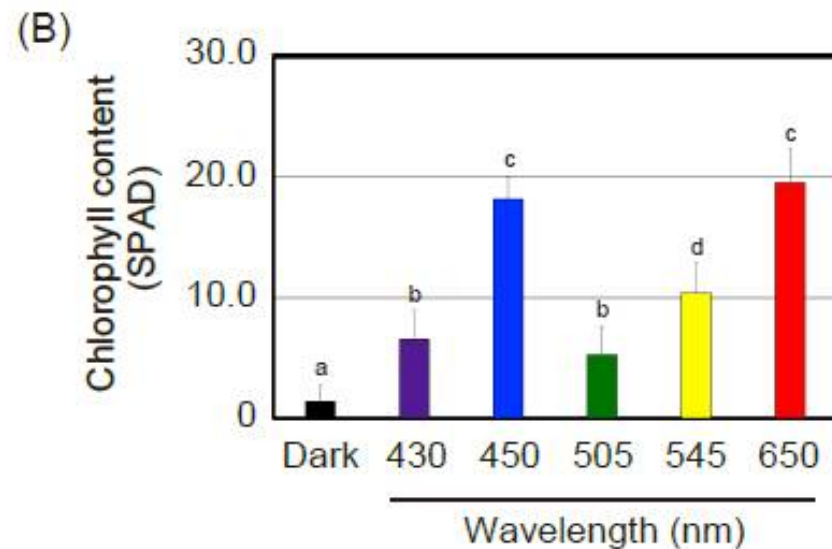
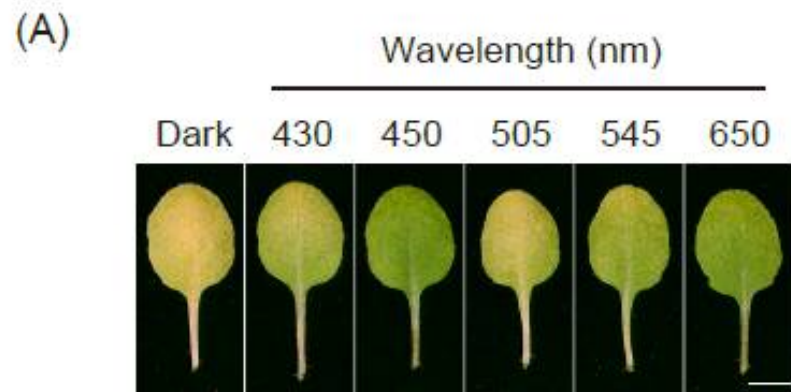
WRKY – transkripční faktor; vysoce exprimované ve stárnoucích listech



Mutanti *wrky* ukazují potlačenou senescenci

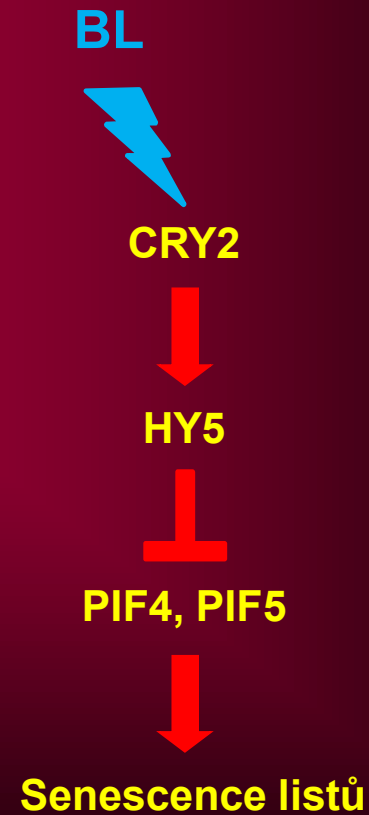


Transgenní rostliny over-exprimující WRKY ukazují dřívější senescenci



Modré světlo prostřednictvím fotoreceptoru CRY2 potlačuje stárnutí listů *Arabidopsis*.

Transkripční analýza částečně odhalila molekulární mechanismus – inaktivace transkripčních faktorů PIF4 a PIF5



Update 2023

Kozuka T et al. (2023) Plant Physiology 191: 2506-2518