

Programmed Cell
Death (PCD) in
Plants

MORTE CELLULARE

Concetto di **morte cellulare programmata** (PCD) introdotto agli inizi del 900 per spiegare la risposta delle cellule vegetali all'infezione fungina
Negli anni "70" Kerry, Wyllie and Currie hanno coniato il termine **apoptosi** per descrivere la PCD negli animali, compreso l'uomo.

La **morte cellulare** non corrisponde temporalmente con la **morte dell'individuo**

Con "**morte cellulare**" non si intende **la mancanza nella cellula di segni vitali caratteristici** (ad es. la respirazione), ma ci si riferisce al momento in cui **l'organizzazione funzionale della cellula viene irreversibilmente compromessa**

Il fenomeno può verificarsi in modo **rapido**, quando lo stimolo che lo determina ha notevole intensità, o essere il risultato di un **lento** processo involutivo

MORTE CELLULARE

Vi sono tre sistemi essenziali per il mantenimento dell'organizzazione funzionale della cellula

- 1. membrane cellulari**
- 2. metabolismo energetico**
- 3. sintesi proteica**

Questi 3 sistemi rappresentano le principali, anche se non le uniche, vie comuni attraverso cui i fattori ambientali biotici (ad es. patogeni) e abiotici (ad es. stress chimico-fisico) provocano il danno e la morte cellulare

ESISTONO DUE MODALITÀ DI MORTE CELLULARE, DISTINTE E BEN RICONOSCIBILI

NECROSI

È la **morte cellulare accidentale**, passiva che si verifica in risposta ad un'ampia varietà di **stress** (ipossia, ipertermia,, traumi cellulari, radiazioni, sostanze tossiche ecc.).

PCD

È un processo biologico che procede in modo **ordinato** e **regolato**, richiede **consumo di energia** (ATP) e generalmente porta ad un **vantaggio** durante il ciclo vitale dell'organismo (è stata infatti definita da alcuni ***MORTE ALTRUISTA***).

La **necrosi** è una morte passiva, conseguente a traumi di varia natura. Negli animali la necrosi comporta in primo luogo ingresso di ioni sodio con aumento del volume cellulare, rottura della membrana plasmatica e delle endomembrane con il conseguente rilascio di enzimi idrolitici ed altro materiale citosolico, provocando un processo infiammatorio nel tessuto circostante. Nelle piante i due eventi di morte non sono così ben distinti e sembra esserci maggiore sovrapposizione tra le caratteristiche fenotipiche e molecolari della necrosi e PCD. La necrosi è una morte accidentale causata da fattori estrinseci, come accumulo di specifiche molecole fitotossiche in seguito ad un evento traumatico di stress biotico o abiotico. È caratterizzata da una progressiva perdita di integrità della membrana che si traduce nel rigonfiamento del citoplasma e rilascio dei componenti cellulari.

Negli animali le specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) sono **ben noti attivatori di PCD**. **Anche nelle piante cambiamenti ambientali e di sviluppo stimolano la produzione di ROS**. Il livello di ROS può essere aumentato da vari centri di produzione e portare le cellule ad una morte per necrosi. Aumenti transitori possono portare ad una cascata di eventi che interagiscono con fitormoni, acido salicilico, ossido nitrico, giasmonati ed etilene, amplificando o diminuendo la risposta o possono canalizzare la cascata di eventi attraverso sensori più specifici verso un'espressione genica ROS-dipendente correlata a PCD.

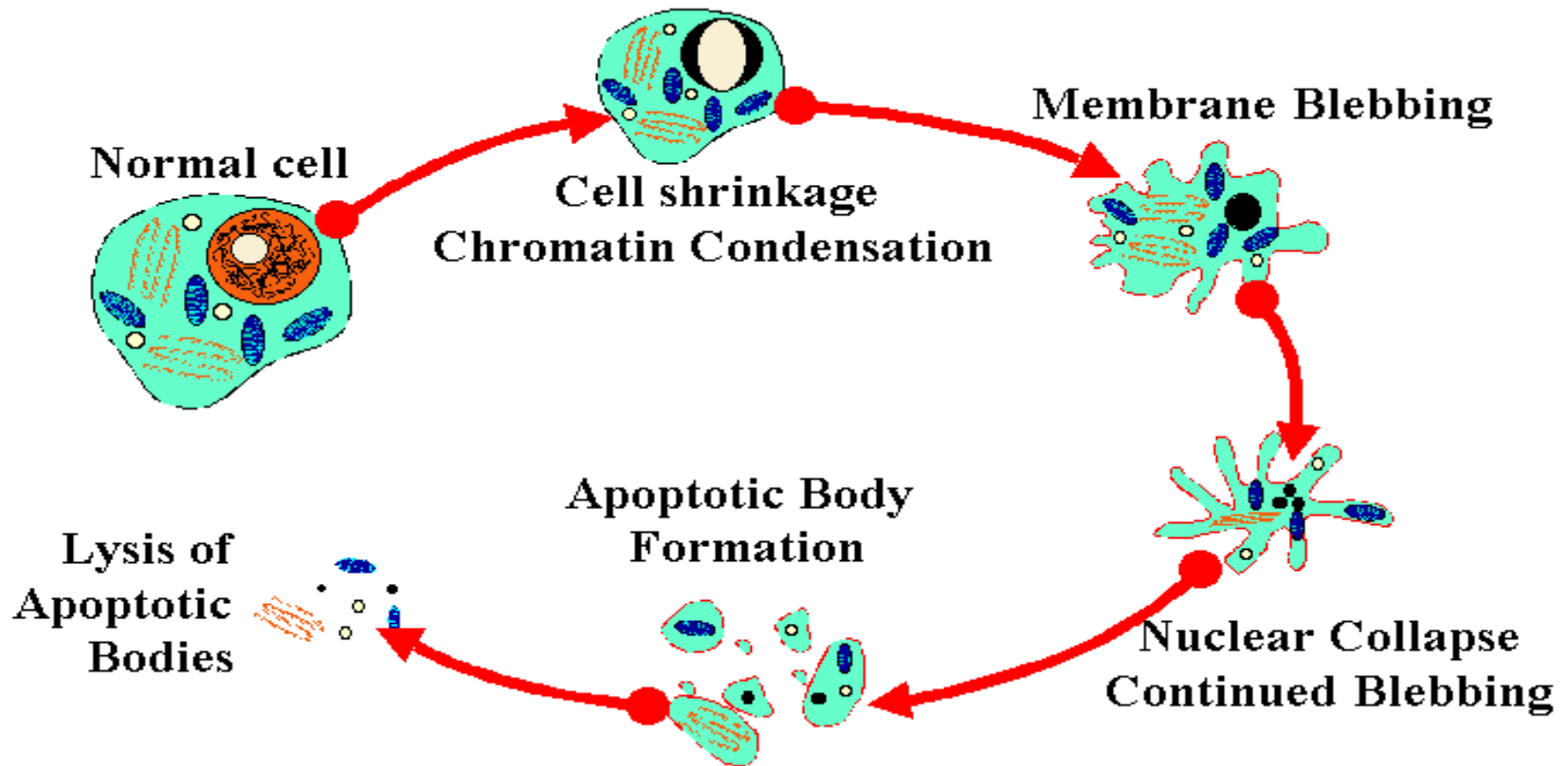
Oltre la cascata di fosforilazione guidata dalle **MAP-chinasi**, **altre modifiche post-traduzionali** regolatorie, come l'ossidazione delle proteine e la nitrosilazione potrebbero essere coinvolte in percorsi di PCD, ROS-dipendenti. **L'apoptosi** presenta significative differenze morfologiche rispetto alla necrosi, per esempio comporta diminuzione di volume della cellula con **efflusso di ioni cloro e potassio**, **attivazione di enzimi che determinano gli eventi di morte** in modo controllato, inoltre **è un evento rapido** (poche decine di minuti) che impedisce una risposta infiammatoria dannosa. Si tratta di un processo essenziale per un corretto sviluppo embrionale, per una corretta organogenesi e per mantenere l'omeostasi cellulare che, se alterata, può essere la prima causa dello sviluppo di patologie.

APOPTOSI E PCD

Negli animali, morte cellulare programmata ed apoptosi sono spesso usati come sinonimi, ma i termini non sono identici. Infatti la PCD è un processo definito geneticamente durante lo sviluppo degli organismi multicellulari, l'apoptosi è la sua manifestazione. Essa è contraddistinta da una serie di eventi morfologici facilmente distinguibili: **riduzioni delle dimensioni della cellula, condensazione della cromatina, frammentazione del DNA, formazione di evaginazioni della membrana plasmatica e della membrana nucleare, formazione di corpi apoptotici che vengono rapidamente fagocitati e digeriti dai macrofagi.** La cellula scompare senza lasciare traccia, cioè senza dar luogo a fenomeni infiammatori o necrotici.

PCD e APOPTOSI

Nelle cellule animali è invalso l'uso di denominare con il termine **apoptosi** (dal gr. $\alpha\pi\omega\pi\tau\omicron\sigma\iota\varsigma$ = caduta) il processo di PCD



PCD e APOPTOSI

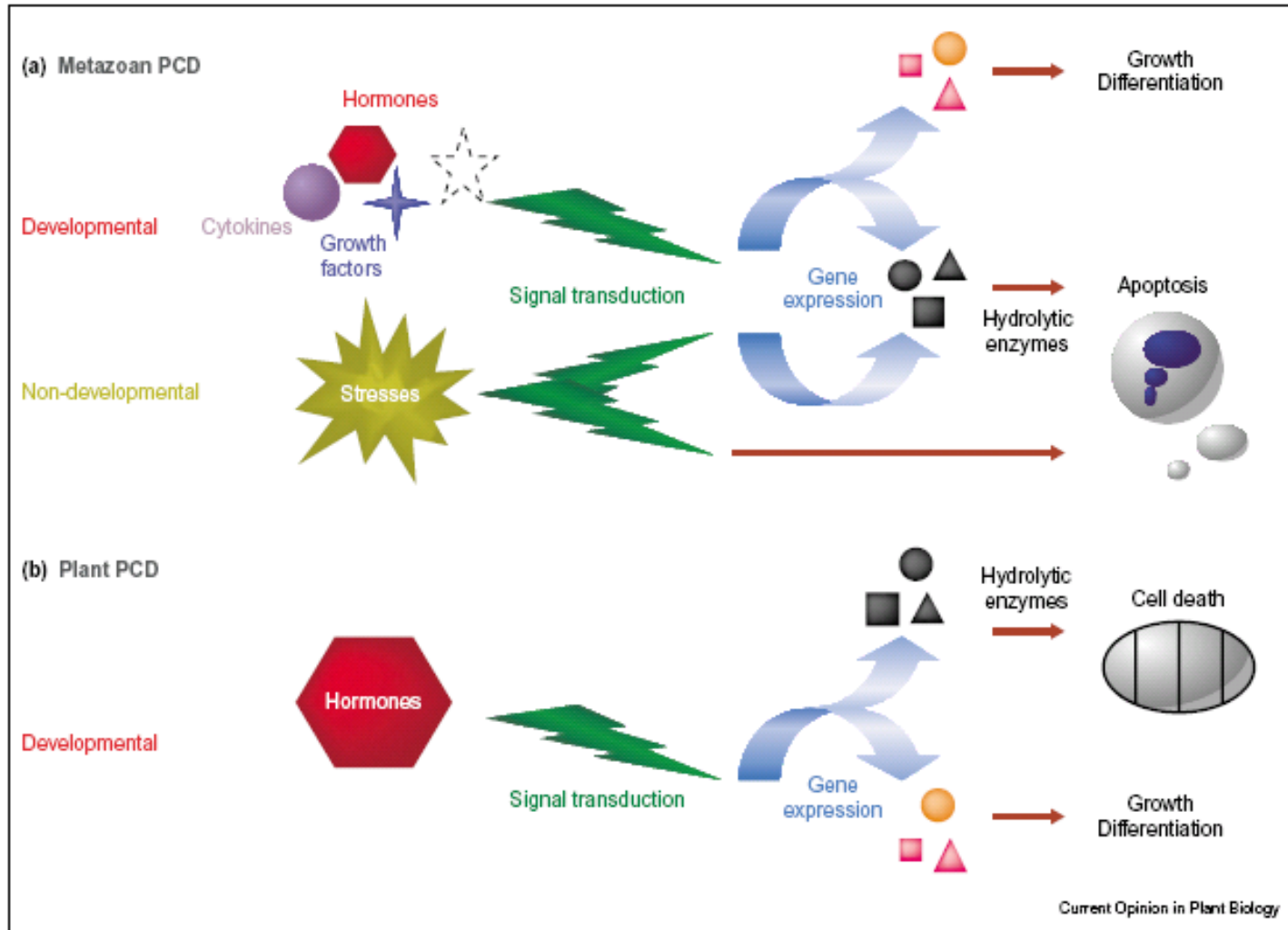
Nel mondo vegetale la PCD è parte essenziale del processo di sviluppo e dei meccanismi di difesa da patogeni (nelle piante manca il sistema immunitario)

La PCD nelle piante:

- non segue la sequenza di eventi che caratterizzano l'apoptosi negli animali
- può essere reversibile prima di raggiungere “il punto di non ritorno”
- Nelle piante la PCD prevede il coinvolgimento del vacuolo: la rottura del tonoplasto ed il rilascio nel citoplasma degli enzimi idrolitici coincide con l'inizio dell'autolisi (autofagia)

- PCD nello sviluppo è regolata da ormoni o da altre molecole endogene bioattive
- PCD, differenziamento e sviluppo sono processi spesso regolati dalle stesse molecole segnale che portano a risultati diversi a seconda della trasduzione nel bersaglio (ad esempio l'auxina promuove la formazione di radici laterali, induce morte nella formazione dei vasi legnosi, previene l'abscissione fogliare)
- PCD è accompagnata dall'attivazione di enzimi idrolitici che portano al caratteristico aspetto citologico delle cellule che vanno incontro a morte programmata

PCD nelle piante e negli animali

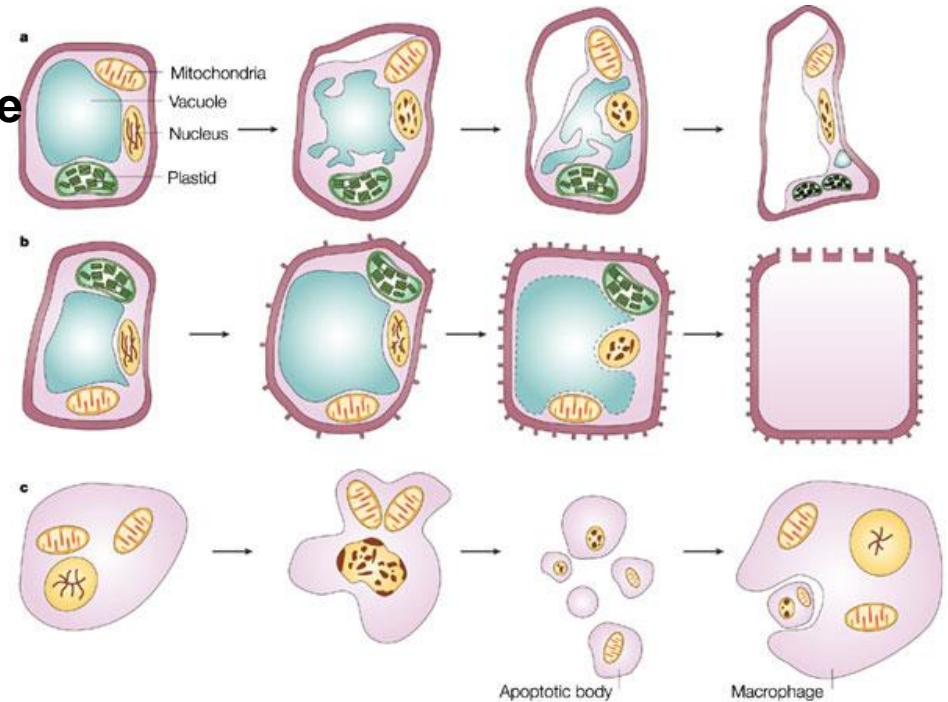


A schematic diagram illustrating metazoan and plant PCD mechanisms. (a) In metazoan developmental PCD, hormone, cytokine, and growth factor signals are transduced to invoke gene expression that results in the activation of apoptotic machinery. These signals can induce growth and differentiation under other conditions. By contrast, oxidative stresses

or ionized radiation cause non-developmental apoptosis through either signal transduction and gene expression or signal transduction alone. (b) Plant cells undergo developmental PCD in response to hormone-regulated signaling and gene expression. Interestingly, these signals can also regulate growth and differentiation in certain specific cases.

PCD nelle piante e negli animali

A) Esempio Risposta ipersensibile ai patogeni



B) Esempio xilogenesi

C) Apoptosi

A) «Apoptosis like» **Si osserva la condensazione della cromatina, rilascio del citocromo C dai mitocondri e produzione di ROS, frammentazione del DNA prima della rottura del vacuolo, attivazione di proteasi simili alle caspasi, collasso della membrana cellulare e distacco dalla parete**

B) PCD mediata dai vacuoli **Le cellule utilizzano gli enzimi litici per digerire il materiale cellulare Si osserva ingrandimento del vacuolo, rottura del tonoplasto e collasso del vacuolo, rilascio di enzimi idrolitici nel citosol e acidificazione, rapida degradazione degli organelli, autolisi. PCD indipendente dalle caspasi, attivazione VPE**

C) Condensazione e frammentazione della cromatina, rigonfiamento della membrana seguita dalla formazione dei corpi apoptotici che vengono fagocitati dai macrofagi

**MORTE CELLULARE NEI
PROCESSI
DI SVILUPPO VEGETATIVI E
RIPRODUTTIVI DELLE PIANTE**

Nelle piante, la morte cellulare garantisce la versatilità dello sviluppo e la plasticità biochimica.

Quasi tutte le fasi del ciclo vitale di una pianta, dalla germinazione allo sviluppo vegetativo e a quello riproduttivo, prevedono fenomeni di PCD.

La cessazione dell'attività meristemica, la senescenza e l'abscissione delle foglie sono esempi di decisioni vita-morte presenti nella vita delle piante. Queste decisioni possono colpire sistemi di organi specifici o, quando agiscono in concerto, condurre alla morte della pianta intera. Benché i processi sopra riportati siano determinati geneticamente, le vie metaboliche coinvolte subiscono anche l'influenza dell'ambiente.

Nelle piante con fiori imperfetti, cioè mancanti di stami (pistilliferi) o di carpelli (staminiferi), i primordi di stami e carpelli, vengono poi eliminati per PCD.

Alcune molecole che possono innescare la PCD nelle piante comprendono le **specie reattive dell'ossigeno (ROS)**, le **gibberelline (GA)** e l'**etilene**; al contrario l'**acido abscissico (ABA)** e le **citochinine** tendono a sopprimerla.

Tutti gli eventi di PCD nelle piante condividono il coinvolgimento del vacuolo e un efflusso di ioni calcio. La rottura del tonoplasto ed il conseguente collasso del vacuolo calcio-dipendente determinano il rilascio degli enzimi presenti al suo interno e portano alla degradazione di tutto il contenuto cellulare con l'inizio dell'autolisi. Tale strategia, adottata dalle piante per eliminare il citoplasma o intere cellule, è definita **autofagia**.

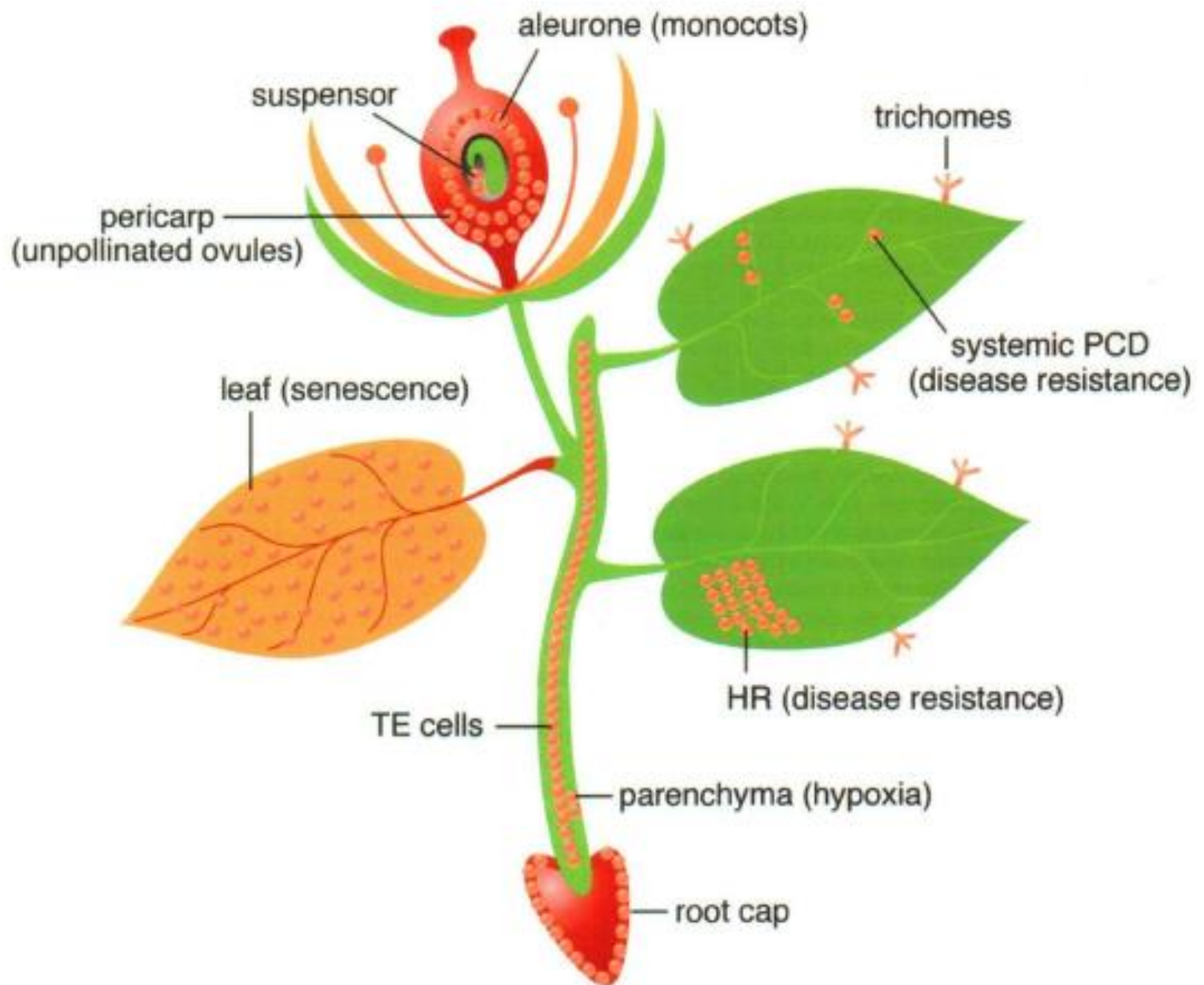


Figure 1. Sites of PCD in a Vascular Plant.

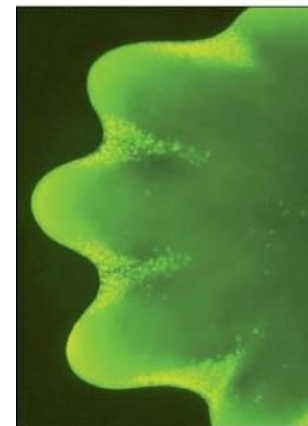
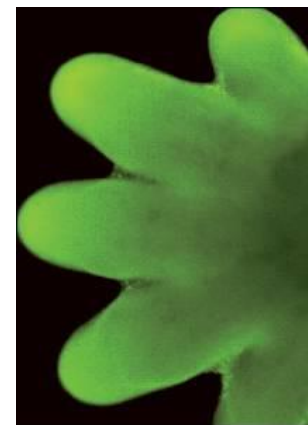
The orange spheres represent internal dead cells, and the branched structures on the leaves represent trichomes.

Formazione di incisioni e perforazioni nella foglia di *Monstera deliciosa*



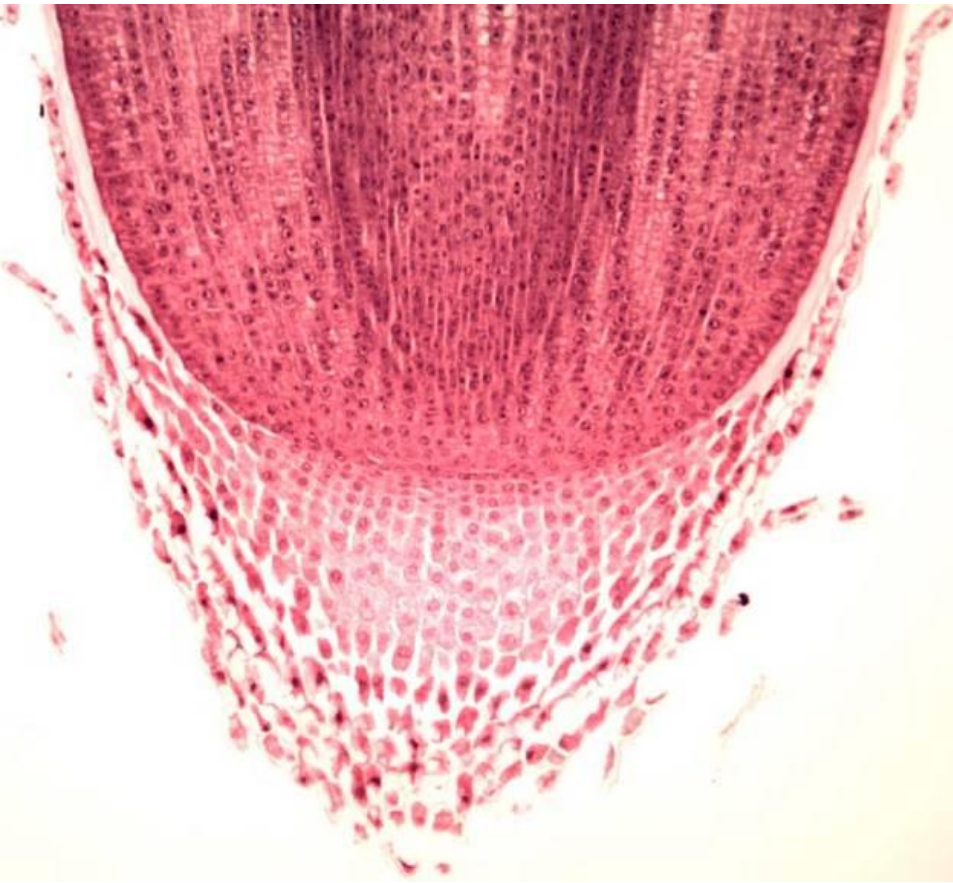
Monstera deliciosa

Notare l'analogia con le prime fasi dello sviluppo delle dita negli animali tetrapodi

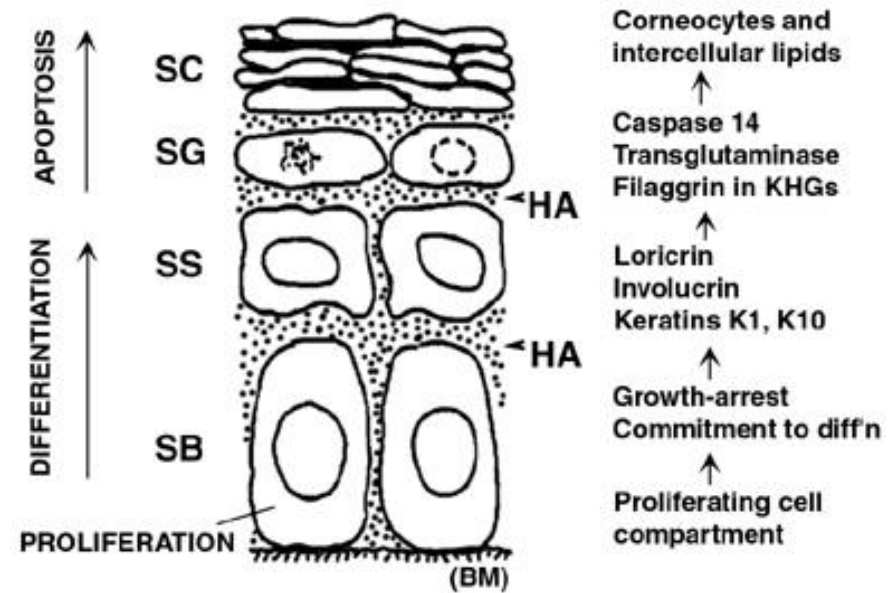


Bufo bufo

Sfaldamento delle cellule del cappuccio radicale



Notare l'analogia con la continua desquamazione di cellule epiteliali che si riscontra negli animali



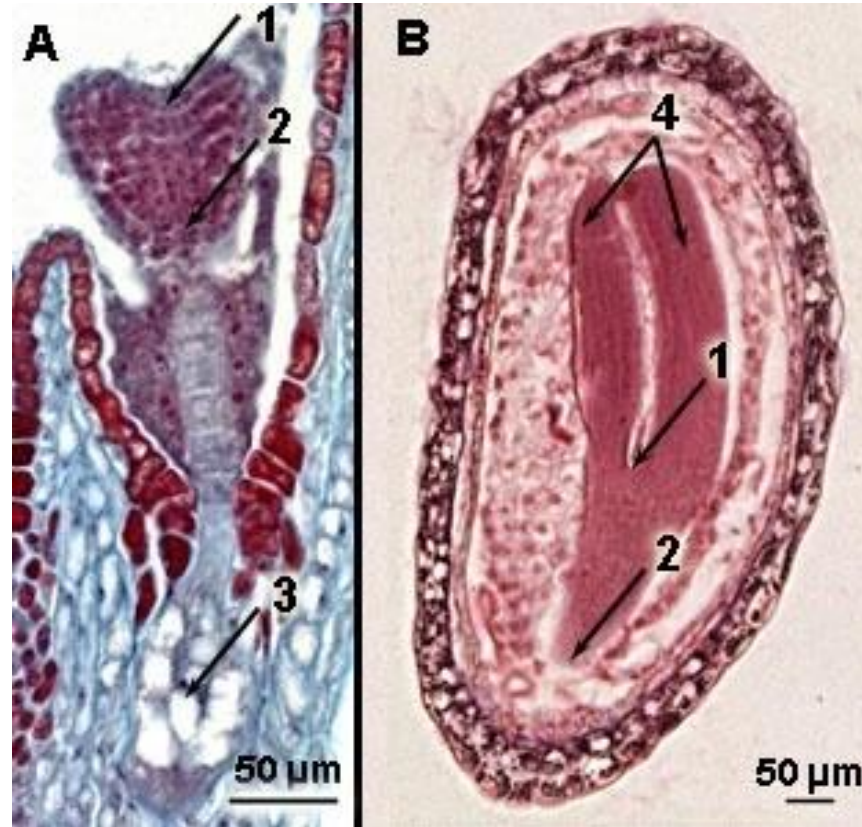
Formazione del parenchima aerifero



Figura 8.5

Parenchima aerifero nel picciolo di ninfea (*Nymphaea*).

Degenerazione del sospensore nel corso dell'embriogenesi delle spermatofite



1 = top or apical shoot meristem; **2** = top or apical root meristem; **3** = suspensor;
4 = cotyledons

Morte e disfacimento delle cellule contenenti i granuli di aleurone



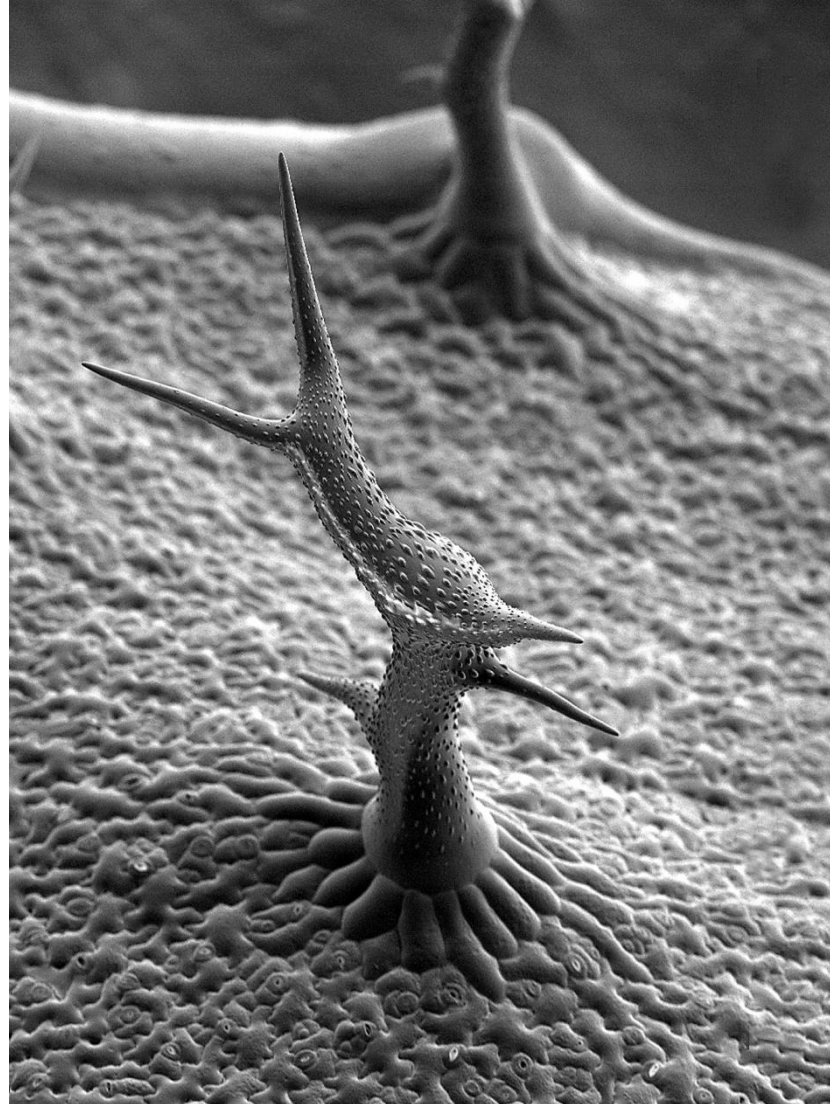
Degenerazione degli stami nei fiori pistilliferi e dei carpelli nei fiori staminiferi



Sinistra: fiore pistillifero

Destra: fiore staminifero (con stami fusi)

Morte delle cellule costituenti i tricomi non ghiandolari per cutinizzazione o silicizzazione delle pareti



Differenziamento degli elementi tracheali

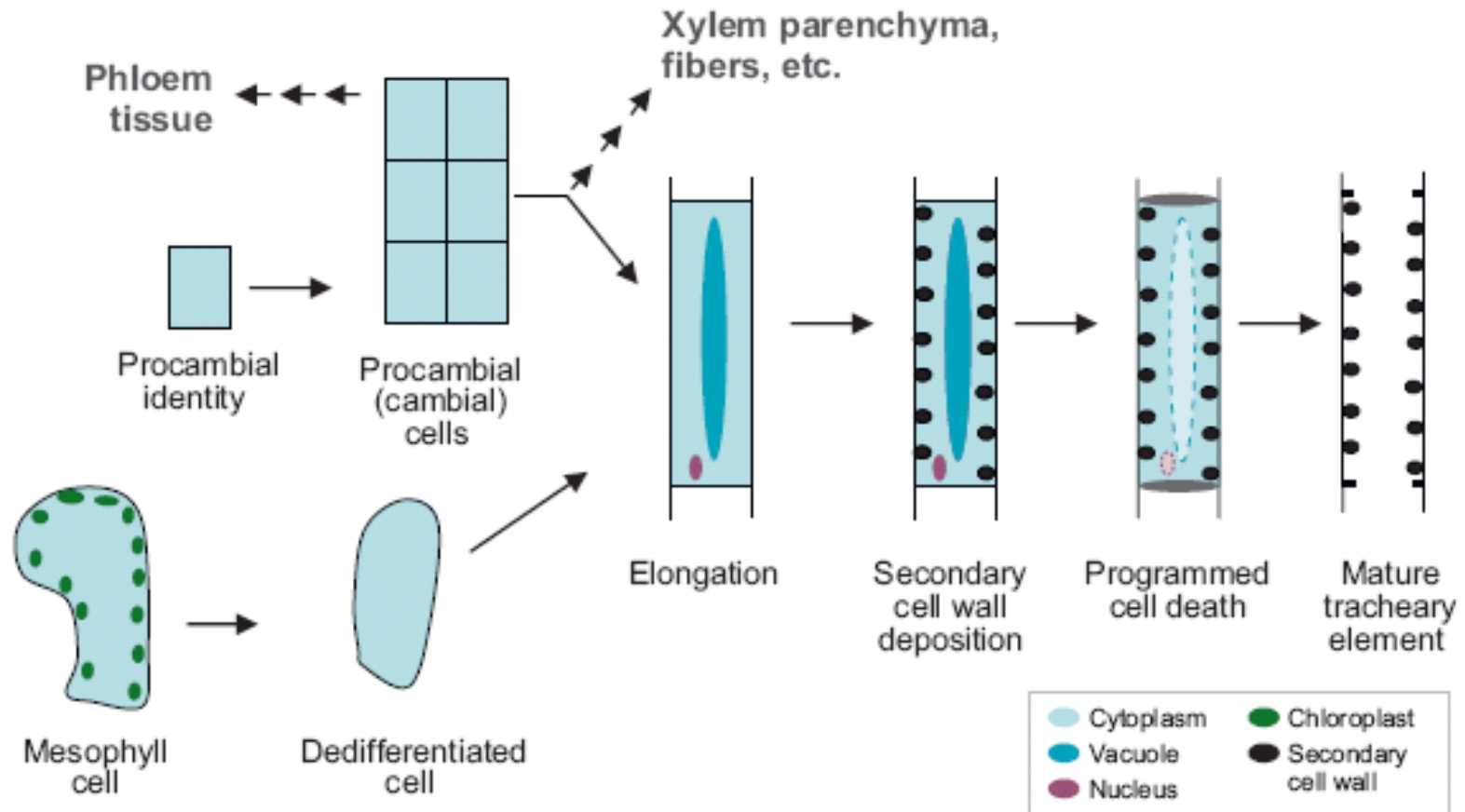


Figure 1

Tracheary element (TE) differentiation. The first sign of primary vascular development is the identification of procambial cells. These cells then divide and differentiate to become both the xylem and phloem. In secondary growth the equivalent cambial cells continue to divide and differentiate over many years. During xylem development procambial/cambial cells form various cell types in addition to TEs. In *Zinnia* mesophyll cell culture or following wounding, differentiated cells can transdifferentiate to form TEs.

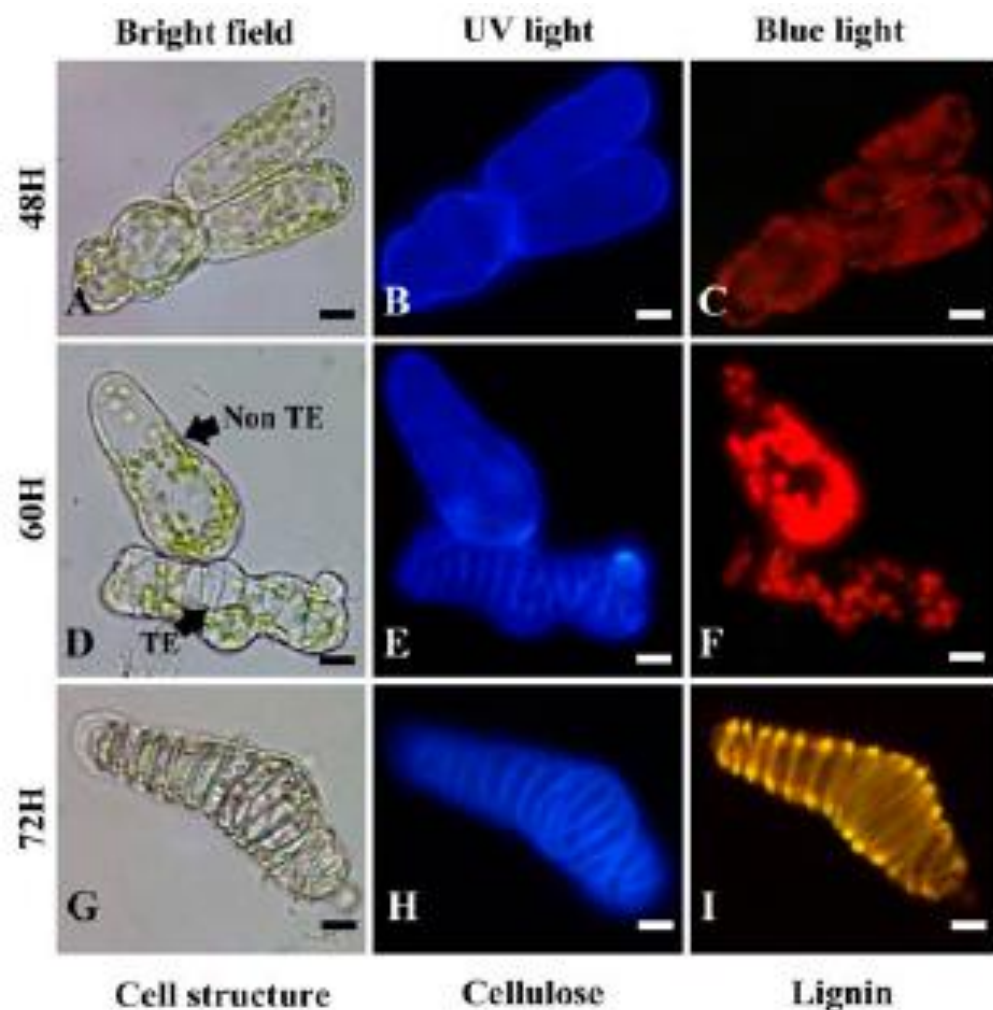


Figure 1. SCWs of differentiating zinnia TE cell cultures stained with calcofluor and auramine-O to simultaneously detect cellulose and lignin, respectively. Cells were visualized at 48 (A–C), 60 (D–F), and 72 h (G–I) under bright-field conditions (A, D, and G), UV light (B, E, and H), and blue light (C, F, and I). Under UV light, cellulosic primary walls are dark blue (B, E, and H), whereas secondary wall thickenings of TEs appear as light blue (E and H). Under blue light, lignified wall thickenings are yellow (I). These three time points subsequently defined the three stages used to construct the LXL library. Magnification bars = 8 μ m.

PCD NEI ELEMENTI CONDUTTORI

Lo studio del processo differenziativo degli elementi conduttori è stato condotto *in vitro a partire* da cellule in coltura ottenute dal mesofillo fogliare di *Zinnia elegans* (Asteraceae)

Il differenziamento *in vitro* di cellule parenchimatiche in elementi conduttori è indotto da una combinazione di **auxine e citochinine**. Il processo può essere diviso in tre stadi:

- **Lo stadio I** consiste in una fase di dedifferenziamento durante il quale le cellule mesofillari perdono la capacità fotosintetica. Questo processo di dedifferenziamento non è accompagnato da divisione cellulare. I geni che si esprimono durante questa fase comprendono elementi caratteristici della risposta delle piante alla ferita, quali **ZEP1 e ZEP2** che codificano per fattori di allungamento. È interessante notare come, sia nelle prime fasi che in quelle terminali del differenziamento, sono **espressi alcuni geni del metabolismo del fenilpropanoidi**.

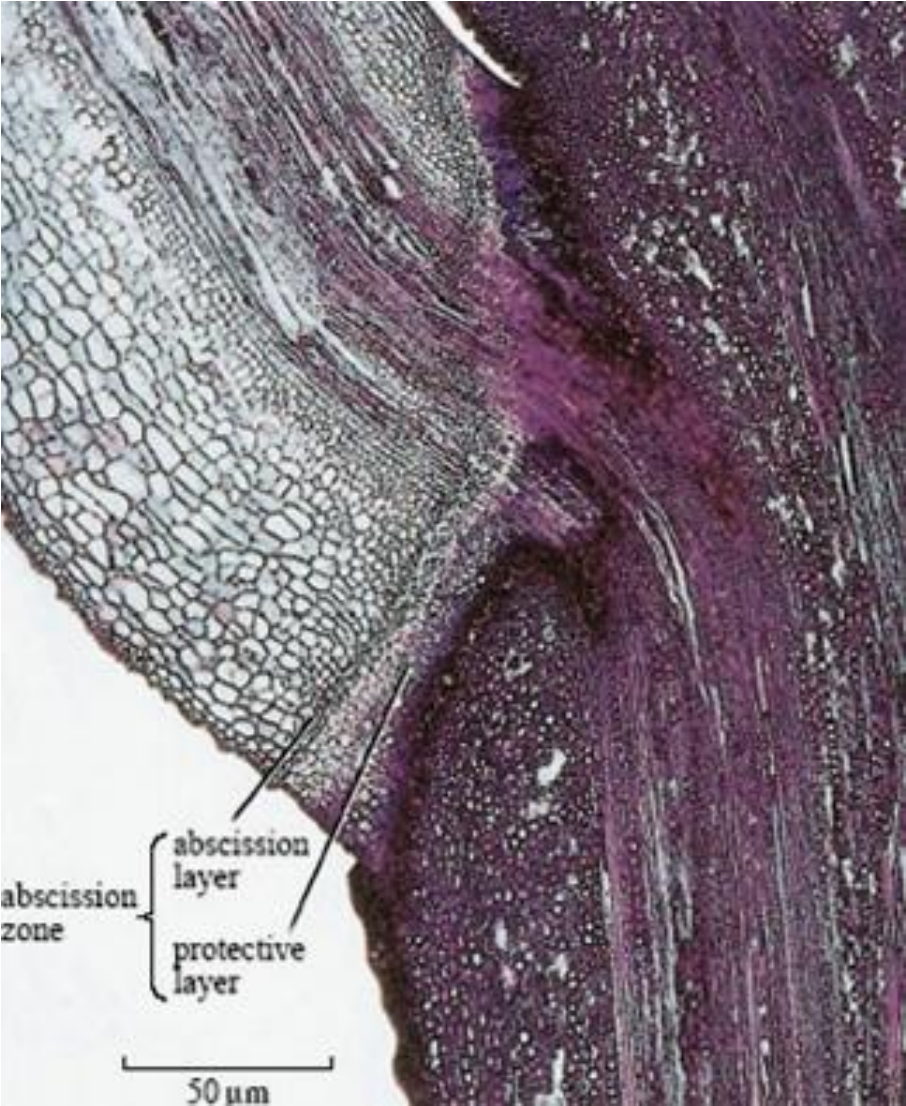
- **L'inizio dello stadio II**, durante il quale le cellule in coltura sono indirizzate alla formazione degli elementi conduttori, è caratterizzato dalla comparsa di **trascritti (ZCAD1), che codificano per la cinnamil-alcol deidrogenasi e di trascritti (TED) correlati al differenziamento degli elementi conduttori**.

Trascritti TED2 nella pianta sono ristretti alle cellule procambiali, suggerendo che lo stadio II in vitro corrisponde in vivo al processo di differenziazione degli elementi conduttori dalle iniziali procambiali.

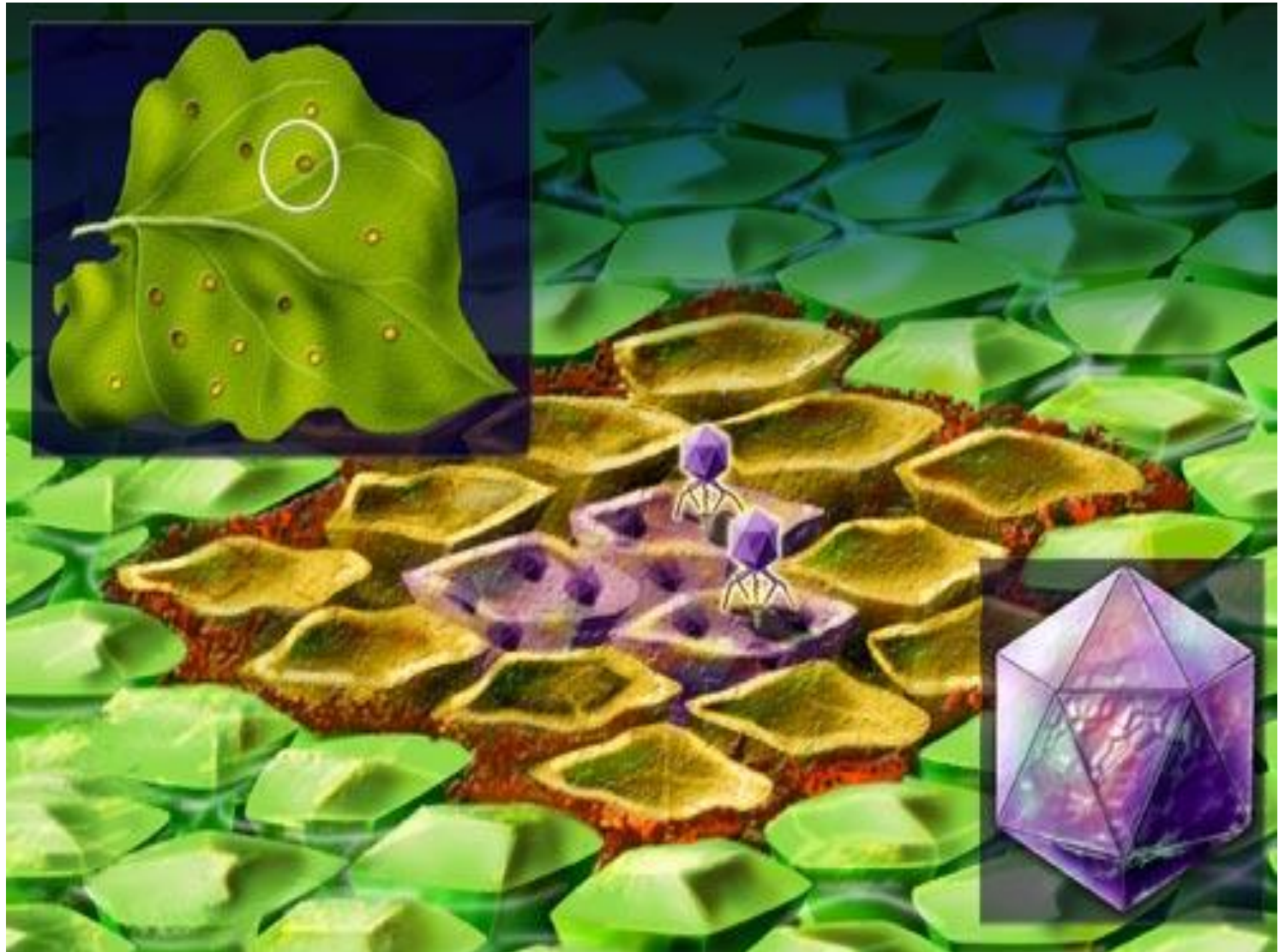
- **La transizione allo stadio III** sembra essere il **momento irreversibile nel differenziamento degli elementi xilematici**. Tra i **geni** che sembrano essere coinvolti in questo processo ce ne sono alcuni **responsabili della sintesi di componenti del citoscheletro, come la tubulina**, che sono espressi già nello stadio I. Analisi immunocitochimiche hanno dimostrato che nelle pareti degli elementi conduttori differenziati si accumulano proteine di parete del tipo delle estensine, glicoproteine ed arabinogalattani. Si verifica inoltre la deposizione della parete secondaria e l'autolisi cellulare. Microtubuli determinano la posizione e l'orientamento della parete secondaria, probabilmente guidando i complessi cellulosa-sintasi sulla membrana plasmatica.

Gli elementi conduttori raggiungono la maturità dopo la perdita dei contenuti cellulari, incluso il nucleo, e la parziale digestione della parete primaria. Questi eventi sono visibili alcune ore dopo l'ispessimento della parete secondaria e solo dopo la rottura della membrana del vacuolo, il tonoplasto.

Formazione dello strato di abscissione in foglie rami e frutti



PCD IN RISPOSTA AI PATOGENI RISPOSTA IPERSENSIBILE



Attacco virale

RISPOSTA IPERSENSIBILE

Le piante sono costantemente minacciate da **microrganismi patogeni** (funghi, batteri e virus), poiché non hanno un sistema immunitario hanno sviluppato una strategia per difendersi definita **risposta ipersensibile** (HR) che porta ad una rapida e localizzata morte cellulare nel sito di infezione e la formazione di una lesione delimitata da cellule vitali, così evitando che i patogeni possano diffondere nei tessuti. Se non si attiva la HR si sviluppa la malattia.

Le cellule morte costituiscono una **barriera** che si oppone all'espansione del patogeno. Molte delle cellule che muoiono durante HR sono vicine agli elementi vascolari, essendo queste cellule più suscettibili ai segnali di morte.

RISPOSTA IPERSENSIBILE

La risposta ipersensibile è un processo attivo nel quale l'accumulo **di radicali liberi e ossido nitrico** (O₂, H₂O₂ e NO) (come avviene nei macrofagi durante la risposta immunitaria negli animali) portano ad un aumento del calcio citosolico ed innescano un processo di morte, mediato da **proteasi caspasi-simili**.

I ROS hanno un ruolo importante nell'avvio della HR ed il programma con cui si realizza ha alcune analogie con l'apoptosi delle cellule animali. Induzione di HR è spesso associata con alti livelli di acido salicilico e l'induzione di **resistenza sistemica acquisita** in tessuti distanti dal sito di attacco.

L'attivazione del **burst ossidativo** rappresenta una componente fondamentale di un sistema di segnali altamente amplificato e integrato che coinvolge anche **acido salicilico** e **perturbazioni dei livelli di Ca²⁺ citosolico**, per attivare l'espressione di meccanismi di resistenza e per mediare una rete sistemica di segnali responsabile dell'induzione dell'immunizzazione della pianta.

H₂O₂ è anche necessaria per l'induzione della PCD, ma da sola essa non è sufficiente per una risposta efficace.

Cellule che muoiono durante HR in *Arabidopsis* formano dei corpi apoptotici.

Induzione di HR è spesso associata con **alti livelli di acido salicilico** e l'induzione di resistenza sistemica acquisita in tessuti distanti dal sito di attacco.

Le difese contro i patogeni possono esprimersi anche in altro modo, ad esempio sintetizzando callosio, lignina o composti fenolici per creare una barriera alla diffusione del patogeno o in altri casi producendo enzimi idrolitici, glucanasi e chitinasi, che vanno ad attaccare la parete fungina

RISPOSTA IPERSENSIBILE

L'**ossido nitrico** prodotto contemporaneamente al burst ossidativo coopera con le specie reattive dell'ossigeno (radicali liberi) nell'induzione della morte cellulare ipersensibile con meccanismi ancora non ben chiariti.

L'**ossido nitrico** è inoltre coinvolto nella **modulazione di alcune vie metaboliche in maniera indipendente dalle specie reattive dell'ossigeno**, quali le vie responsabili della **sintesi dei composti fenilpropanoidi**, i cui derivati possono avere funzioni antibiotiche, strutturali (lignina) e di attivazione della resistenza sistemica acquisita (acido salicilico).

RISPOSTA IPERSENSIBILE



Piante di *Arabidopsis thaliana* infettate da *peronospora*. La pianta a sinistra è un genotipo selvatico nella quale la risposta ipersensibile blocca l'espansione del patogeno. La pianta a destra è un mutante con PCD difettiva nella quale il patogeno può progredire nei tessuti della foglia

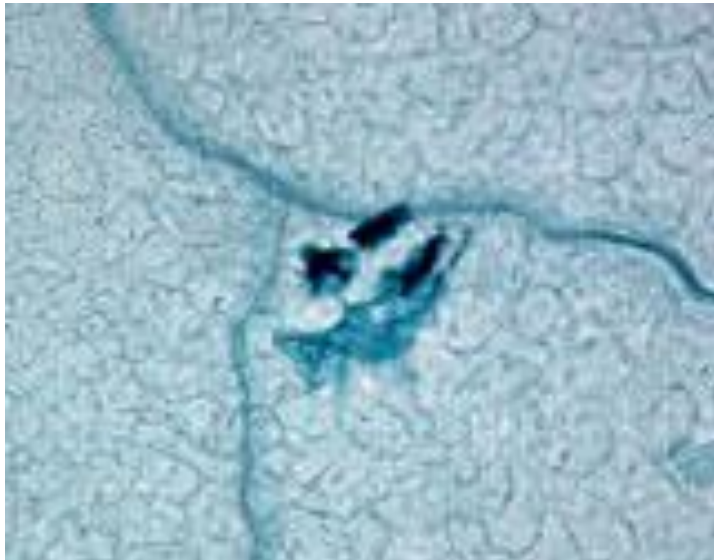


Immagine microscopica di "risposta ipersensibile" di una giovane foglia di *Arabidopsis*. La risposta ipersensibile è un tipo di PCD in cui vengono sacrificate poche cellule vegetali per prevenire la diffusione di patogeni. **La macchia blu scuro rappresenta le cellule morte e la localizzazione in cui il patogeno ha tentato di invadere il tessuto vegetale**

Lo sviluppo dell'immunità innata negli organismi multicellulari ha richiesto l'evoluzione di recettori di superficie delle cellule in grado di riconoscere/legare molecole la cui struttura chimica è generalmente conservata all'interno di varie classi di organismi estranei, ma è assente nelle molecole "self". Queste molecole estranee (non self) sono denominate Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP), e la loro presenza è rilevata dai membri di una grande famiglia di recettori per il riconoscimento (PRR). Le PRR attivano uno o più percorsi di segnalazione, spesso con l'aiuto di co-recettori, per indurre risposte di difesa a valle. Esempi di PAMP: lipopolisaccaridi batterici, flagelline, DNA, lipoproteine, peptidoglicani e chitina fungina, RNA a doppio filamento virali

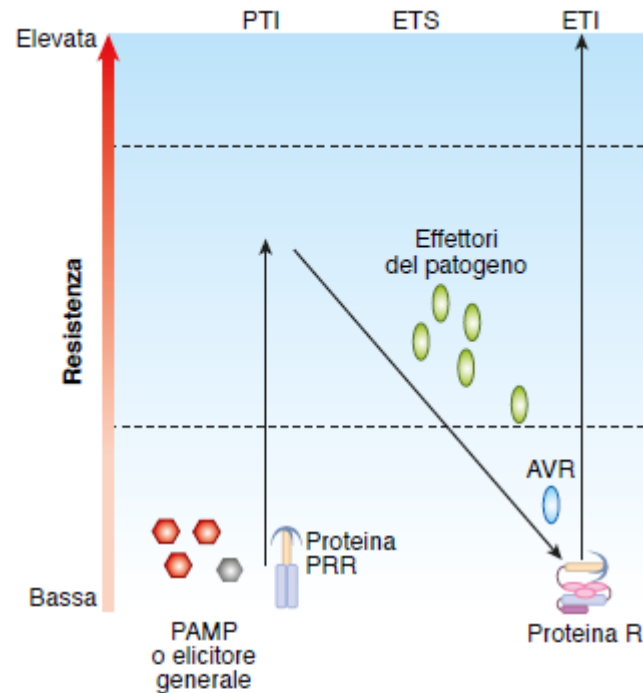


Figura 11.9 Il diagramma indica lo sviluppo di resistenza o suscettibilità ad una malattia. Le piante riconoscono un PAMP (esagono grigio) tramite recettori proteici PRR con attivazione di risposta immunitaria (PTI). Alcuni patogeni producono effettori (ellissi verdi) che sopprimono la risposta immunitaria ed inducono la suscettibilità alla malattia (ETS), di conseguenza i microrganismi invadono le cellule che riconoscono le proteine R ed attivano l'immunità attivata da un effettore AVR (fattore di virulenza) (ETI). PTI, immunità attivata da PAMP (esagoni rossi); ETS, suscettibilità attivata da un effettore; ETI, immunità attivata da un effettore.

Alcuni microrganismi, attraverso la produzione di effettori, interferiscono con la risposta immunitaria attivata da PAMP (PTI) sopprimendola. In questo caso i patogeni invadono le cellule vegetali che a loro volta riconoscono gli effettori AVR grazie alle proteine di resistenza R ed attivano la risposta difensiva “immunità attivata dall’effettore” (ETI), che è la seconda linea di difesa.

PTI ed ETI possono proteggere le piante dall’attacco di circa il 99% di fitopatogeni.

Il trasferimento di varie molecole endogene o parti di molecole nell'ambiente extracellulare, come risultato di un danno cellulare è percepito come un segnale di pericolo, e porta all'induzione di risposte immunitarie innate. Questi induttori endogeni delocalizzati sono chiamati DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns). DAMP sono rilasciate anche in seguito a danni meccanici alle cellule o stress ambientali come la siccità e la salinità. Queste difese aiutino a proteggere il tessuto danneggiato, che è vulnerabile alle infezioni a causa dell'interruzione delle barriere fisiche che altrimenti impedirebbero l'ingresso microbico. A differenza degli animali, finora nelle piante sono state identificate molte meno DAMP. La classe più grande e probabilmente la più caratteristica è quella dei segnali di difesa polipeptidici che sono prodotti dalla pianta in risposta a danni fisici e che inducono geni di difesa, sia localmente che al livello sistemico.

Da piantine di pomodoro è stata isolata la “sistemina” un termine usato per descrivere un polipeptide di 18 aminoacidi rilasciato da ferite di foglie causate da insetti o altri danni meccanici. L’attivazione della via di segnalazione sistemica sistemina-mediata comporta il legame sistemina al suo recettore sulla membrana plasmatica, la biosintesi ed il trasporto di molecole di segnalazione a lunga distanza, tra cui l’acido jasmonico, il mRNA prosistemina, composti organici volatili ed eventualmente la sistemina stessa. I segnali volatili si diffondono attraverso l’aria e sono rapidamente percepiti dai tessuti intatti come un segnale per la difesa.

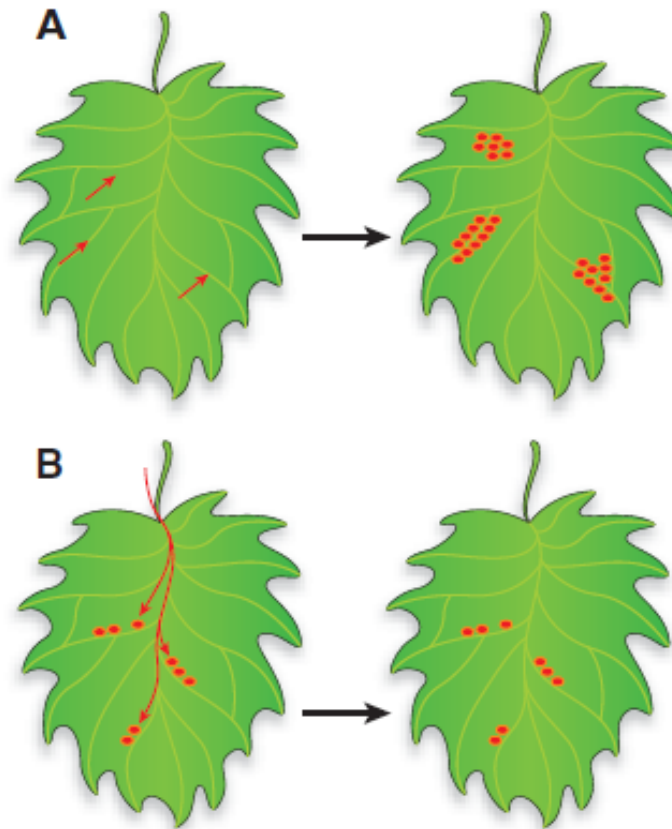
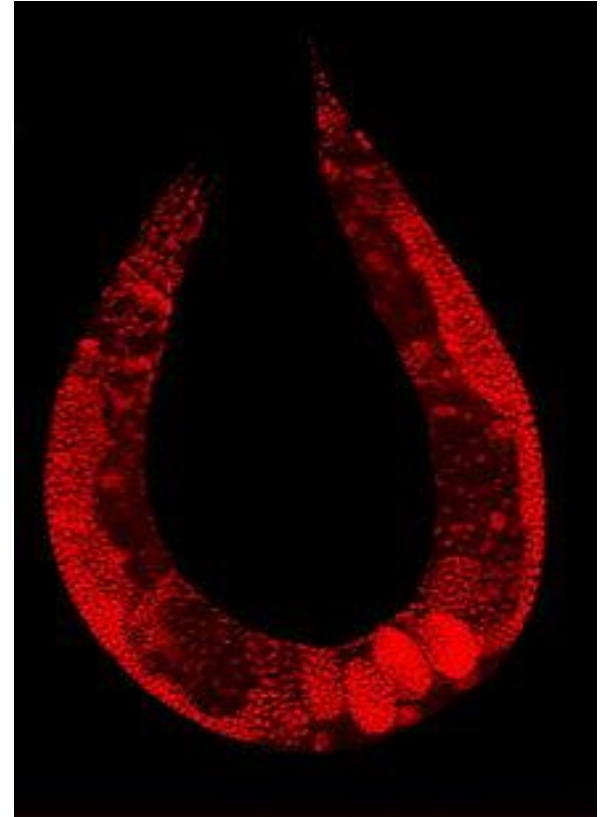


Figura 11.6

A. Risposta ipersensibile (HR). In seguito all'attacco di patogeni (freccie rosse) alcune cellule vanno incontro a PCD (pallini rossi). **B. Resistenza sistemica acquisita (RSA).** Cellule lontane dal sito di infezione acquisiscono la resistenza (pallini rossi) in risposta a segnali molecolari provenienti dagli organi precedentemente infettati.

GENI COINVOLTI NELLA PCD

Un contributo importante per la comprensione della PCD negli animali è stato dato da studi condotti nel 2002 su *Caenorhabditis elegans* (verme lungo 1 mm), che hanno portato all'identificazione di geni coinvolti nella PCD. *C. elegans* presenta un numero ben definito e costante di cellule. L'ermafrodita ne presenta 959, tutte visibili al microscopio ottico, di cui 302 di tipo nervoso. Il 10 % di cellule somatiche vengono eliminate nel corso dello sviluppo. Tra i molti geni identificati, tre sono centrali in questo processo: ***CED3*** (cell death defective) ***CED9*** e ***CED4***; ***i prodotti di CED3 e CED4 attivano il programma di morte cellulare*** e partecipano direttamente all'uccisione della cellula, forse codificando per proteine citotossiche, ***CED9 invece regola negativamente l'apoptosi, legando CED4, ed impedendo che quest'ultimo attivi CED3.*** Quindi la competizione tra attività proapoptotica di *CED3* e *CED4* e antiapoptotica di *CED9*, determinano il destino delle cellule embrionali di *C. elegans*.



Studi biochimici su cellule di mammifero *hanno* individuato geni omologhi ai geni *CED*. *Nei mammiferi l'omologo di CED9 è BCL2; CED3 è invece omologo alla grande famiglia delle caspasi e CED4 è omologo al fattore APAF1 (apoptotic protease-activating factors) che attiva le caspasi nell'apoptosi.* Le **caspasi sono proteasi cisteiniche** che svolgono un ruolo importante nell'innescamento (caspasi iniziatrici) e nell'evoluzione (caspasi effettrici) del meccanismo apoptotico. Sono state identificate due vie di morte per apoptosi, la **via estrinseca** attivata da recettori sulla membrana, appartenenti alla famiglia del recettore del TNF (Fattore di Necrosi Tumorale) e la **via intrinseca** (più frequente nei vertebrati) che invece dipende da composti rilasciati dai mitocondri, in particolare dal **citocromo c**. Il citocromo c viene rilasciato dal mitocondrio attraverso dei pori che si formano sulla membrana grazie alla proteina BAX e si lega ai domini WD40 (formano 7 raggi) causando una modifica conformazionale che porta APAF in uno stato aperto tale da poter legare più efficacemente ATP.

APAF si assembla a formare una struttura chiamata apoptosoma, o ruota della morte che recluta la procaspasi 9 che si lega all'apoptosoma, attivandosi. La caspasi 9 attiva la procaspasi 3 innescando il meccanismo di morte.

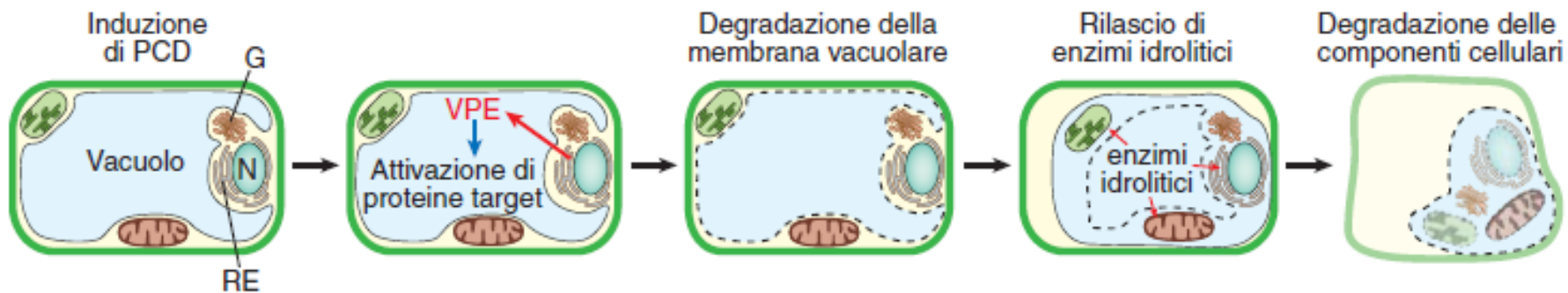
NELLE PIANTE

Recente è la scoperta di 7 geni BAG in *Arabidopsis thaliana*. Le proteine Bag sono una famiglia di proteine multifunzionali, conservata evolutivamente, che promuovono la sopravvivenza cellulare interagendo con Bcl-2. I membri della famiglia BAG nelle piante regolano processi simili all'apoptosi. Se nelle piante la PCD mostra delle dinamiche simili a quelle riscontrabili negli animali, per altri aspetti essa presenta delle caratteristiche uniche. Infatti, la presenza del cloroplasto, un grande vacuolo e la parete cellulare sono i tratti distintivi della cellula vegetale che inevitabilmente ne influenzano la morte. Inoltre l'assenza di un meccanismo di fagocitosi che rimuove i corpi apoptotici è però compensata dal vacuolo che, rilasciando il suo contenuto ricco di idrolasi e proteasi, funge da "spazzino" della cellula morente

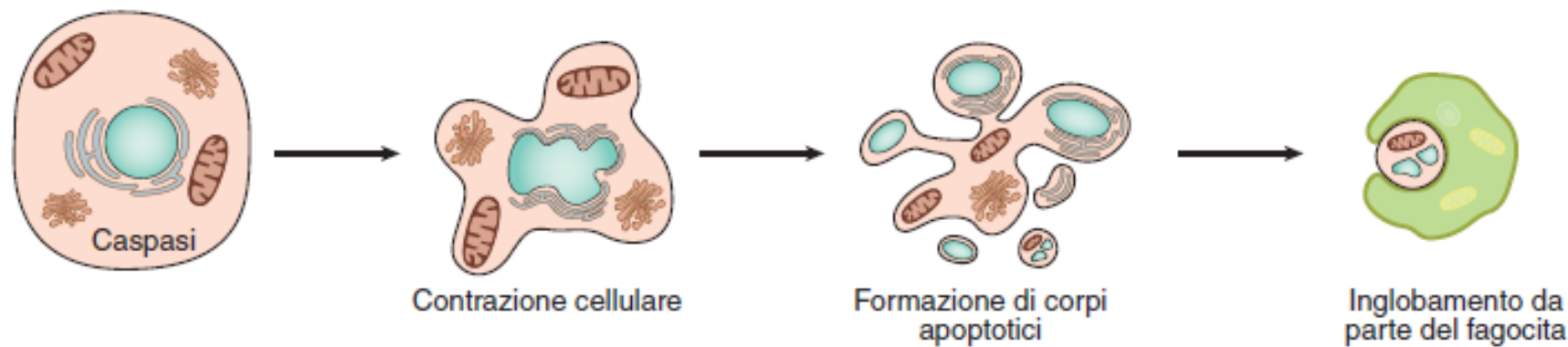
GENI COINVOLTI NELLA PCD DELLE PIANTE

Nelle piante è stato ipotizzato un modello di PCD dipendente dal vacuolo. Una varietà di proteine vacuolari sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico come proproteine e poi sono trasportate nel vacuolo. Tra queste **VPE (Vacuolar Processing Enzyme)** è sintetizzata come proproteina inattiva e poi indirizzata al vacuolo dove è autocataliticamente convertita nella forma matura attiva. Non sono necessari altri fattori per attivare VPE che funziona come un enzima chiave del sistema di processamento vacuolare. **VPE mostra proprietà enzimatiche simili ad una caspasi 1** sebbene ci sia una limitata identità di sequenze tra i due enzimi. **VPE e la caspasi 1 condividono proprietà strutturali ma la localizzazione subcellulare è completamente differente. VPE è localizzata nel vacuolo mentre la caspasi 1 nel citosol.** VPE è coinvolto nell'attivazione di proteine target che provocano la disintegrazione della membrana vacuolare, conseguentemente gli enzimi idrolitici vacuolari vengono rilasciati nel citosol dove degradano le componenti cellulari.

Cellula vegetale



Cellula animale



Molti studi sulla PCD nelle piante si sono focalizzati sul ruolo del **citocromo c** e **sul suo rilascio dai mitocondri** ma fino ad oggi non ci sono evidenze che il citocromo c attivi direttamente le proteasi nelle piante. **Dato il ruolo centrale delle caspasi nell'apoptosi in cellule animali, sono stati condotti molti studi per trovare queste proteine nelle piante, tuttavia, sebbene siano emerse evidenze indirette, basate sull'effetto inibitorio esercitato da specifici inibitori delle caspasi, nel sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* non è stata rivelata l'esistenza di omologhi delle caspasi.** In modelli cellulari vegetali, è stato mostrato che il citocromo c viene effettivamente rilasciato dal mitocondrio in seguito ad uno stimolo di morte come un *heat shock*. Negli animali la permeabilizzazione della membrana mitocondriale avviene attraverso un poro controllato da BAX/BCL-2. La famiglia *BCL-2* è composta da proteine pro-antiapoptotiche. Sotto normali condizioni l'integrità della membrana mitocondriale è mantenuta attraverso un bilanciamento tra queste proteine ed il citocromo c non può essere rilasciato dal mitocondrio. ***BAX di topo induce PCD ed attiva una risposta ipersensibile in cellule di tabacco. In Arabidopsis sono stati scoperti recentemente 7 geni BAG. BAG promuovono la sopravvivenza cellulare interagendo con BCL-2.*** È possibile che nelle piante la **permeabilizzazione della membrana mitocondriale (PMM)** possa avvenire in un modo diverso. ROS derivati dai mitocondri potrebbero controllare il processo di PCD, ma anche il cloroplasto è fonte di ROS e potrebbe giocare un ruolo significativo nell'attivazione di PCD nelle piante.

SENESCENZA ED ABSCISSIONE

La **senescenza nelle piante può coinvolgere l'organismo** intero o organi specifici; gli stimoli possono essere esterni come la lunghezza del giorno e la temperatura o interni; in tutti i casi comunque i geni di regolazione della senescenza danno inizio ad una cascata di eventi che causano la morte. È caratterizzata da profondi cambiamenti finalizzati al recupero e alla redistribuzione di metaboliti e di materiale strutturale, in particolare delle riserve di azoto e fosforo. **La PCD coinvolta nella senescenza ha tre caratteristiche distintive:**

- 1) coinvolge l'intero organismo o organo (la foglia o il frutto) e non tipi cellulari specifici o un tessuto;
- 2) è un processo più lento; la sua lentezza è dovuta alla mobilitazione di nutrienti in altre parti della pianta prima che si giunga al così detto "punto di non ritorno". Questo evento è fondamentale affinché tutte le risorse accumulate per esempio nella foglia, organo di maggiore attività fotosintetica, non vengano perse. La senescenza comporta cambiamenti nei plastidi che diventano **gerontoplasti nelle foglie e cromoplasti nei frutti**. Questi cambiamenti strutturali si associano a cambiamenti biochimici come la degradazione della clorofilla e delle proteine di riserva. Il catabolismo della clorofilla rende visibili i carotenoidi. **Nei frutti durante la maturazione vengono sintetizzati nuovi carotenoidi che si accumulano in strutture cristalline o globulari.**

SENESCENZA ED ABSCISSIONE

La comparsa di colori autunnali nella chioma è un fenomeno tipico delle foreste decidue dei climi temperati. Le piante decidue (o caducifoglie) sono alberi e arbusti che perdono le foglie prima di una stagione climatica sfavorevole, che nelle regioni temperate dell'emisfero Nord è rappresentata dall'inverno. Non tutte le piante decidue presentano i colori autunnali tipici del *foliage*: si stima infatti che sia **solo un quarto delle specie arboree dei climi temperati** a mostrare questa caratteristica. In autunno, con l'invecchiamento delle foglie, nelle piante decidue la clorofilla viene progressivamente degradata, e si rivelano gli altri pigmenti presenti, **i carotenoidi**.



I colori dei diversi tipi di carotenoidi spaziano dal giallo, all'arancione e al rosso, anche se i carotenoidi rossi (come il [licopene](#) che colora i frutti del pomodoro) non sono comuni nelle foglie. La funzione dei carotenoidi è sia di supporto alla fotosintesi, perché assorbono parte della luce che non viene assorbita dalla clorofilla, sia di fotoprotezione: la fotosintesi stessa può essere infatti fonte di stress ossidativo e **i carotenoidi sono importanti antiossidanti naturali.**

Negli alberi con colori autunnali che virano verso il rosso sono chiamati in causa ulteriori pigmenti, le antocianine (o [antociani](#)), che costituiscono una particolare categoria di [flavonoidi](#). A differenza di clorofilla e carotenoidi, **le antocianine non hanno un ruolo nella fotosintesi e non sono normalmente presenti nelle foglie.**

Vengono prodotte in condizioni di stress, per esempio a causa del freddo, e in alcune specie anche durante l'invecchiamento delle foglie (senescenza). L'idea di fondo è che la colorazione autunnale sviluppata da alcune piante debba rappresentare una forma avanzata di protezione, nei confronti di stress fisici o nei confronti di insetti parassiti. Nel primo caso si parla di **un'ipotesi fotoprotettiva: con l'arrivo dell'autunno la pianta si prepara a recuperare i nutrienti dalle foglie e smantellare i loro apparati fotosintetici. Senza clorofilla infatti la luce può indurre facilmente la formazione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). Non solo i carotenoidi che sono già presenti nella foglia, ma anche le antocianine sintetizzate specificamente in autunno possono avere una funzione fotoprotettiva: in particolare le antocianine svolgono un ruolo schermante perché assorbono luce senza trasmetterla agli apparati fotosintetici.**

SENESCENZA E GENI ASSOCIATI

La fase di senescenza è caratterizzata dall'inattivazione dei geni codificanti per le proteine fotosintetiche e dall'espressione dei geni associati alla senescenza, responsabili dell'induzione dei processi catabolici, ma anche dei meccanismi di recupero di metaboliti. La foglia, sebbene senescente, continua a rappresentare un'importante risorsa per la pianta dal momento che tutti gli elementi derivati dall'attività idrolitica (zuccheri, nucleosidi, amminoacidi) possono essere recuperati, trasportati fuori dagli organi senescenti per via floematica, per essere infine riutilizzati in altri tessuti o conservati per la formazione di nuove foglie nella primavera successiva.

I geni associati alla senescenza codificano anche per gli enzimi che sintetizzano l'etilene, ormone coinvolto nell'abscissione fogliare. Responsabili dell'abscissione sono alcune cellule differenziate del picciolo che rispondono all'aumento di etilene con la produzione e secrezione di enzimi capaci di degradare le proprie pareti cellulari. L'indebolimento delle maglie di cellulosa e dei diversi polisaccaridi di parete allenta l'adesione delle cellule contigue. Il vento o il peso della foglia stessa è sufficiente a causare il suo distacco definitivo dalla pianta. Le foglie cadute, sebbene siano ormai inutili per la pianta, rappresentano un elemento fondamentale per il bilancio energetico degli organismi abitatori del suolo, i quali ne completano la degradazione, traendone energia utile per i loro processi vitali. È nel suolo che la sostanza organica complessa è trasformata in forme elementari, che possono essere assimilate e riutilizzate dalle piante, assicurando così la chiusura del ciclo degli elementi e dell'energia dell'ecosistema forestale.

SENESCENZA ED ABSCISSIONE

Le **citochinine agiscono da induttori negativi della senescenza** e ciò è dimostrato dal loro alto tasso di degradazione durante la senescenza.

L'etilene promuove la senescenza; trattamento di foglie di *Arabidopsis* con questo ormone inducono cambiamenti simili a quelli che si osservano durante la senescenza come ingiallimento delle foglie, riduzione dell'espressione dei geni coinvolti nella fotosintesi ed una sovraespressione di **SAG (geni induttori della senescenza)**.

L'etilene è anche coinvolto nella produzione di cellulasi e pectinasi che giocano un ruolo importante nella degradazione della parete cellulare che porta alla separazione delle cellule e quindi all'**abscissione fogliare**.

In diverse specie sono stati isolati **geni che vengono attivati nella senescenza (SAG) che codificano per enzimi idrolitici, come le proteasi, le ribonucleasi, le lipasi e le ossidasi** ma anche enzimi coinvolti nella mobilitazione di prodotti di degradazione, come la glutammina sintetasi che catalizza la conversione dell'ammonio in glutammina.

SENESCENZA ED ABSCISSIONE

Altri **SAG** codificano enzimi, componenti del sistema proteolitico cellulare attivo durante la senescenza, come aspartico-proteasi, e ubiquitina. In foglie senescenti di *Arabidopsis* sono state identificate delle cisteinproteasi, **SAG12**, localizzate, nelle cellule del mesofillo e nelle cellule di guardia, **in vacuoli specializzati nella senescenza, mostranti un'acidità più alta rispetto al vacuolo centrale**. Probabilmente i due tipi di vacuoli sarebbero deputati a smantellare specifici componenti cellulari nelle foglie senescenti.

Nell'ambito dei SAG si annoverano anche geni che codificano per proteine implicate nella risposta di difesa ai patogeni come glucanasi e chitinasi.

Un altro gruppo funzionale di proteine codificate dai SAG comprende diverse metallothioneine che possono proteggere le cellule dagli stress ossidativi provocati da ioni metallici o favorire l'accumulo ed il trasporto dei metalli stessi.

Allo stato attuale delle conoscenze non è possibile proporre un modello semplice ed attendibile per la regolazione dell'espressione genica durante la senescenza.