



# APOPTOSI E NECROSI

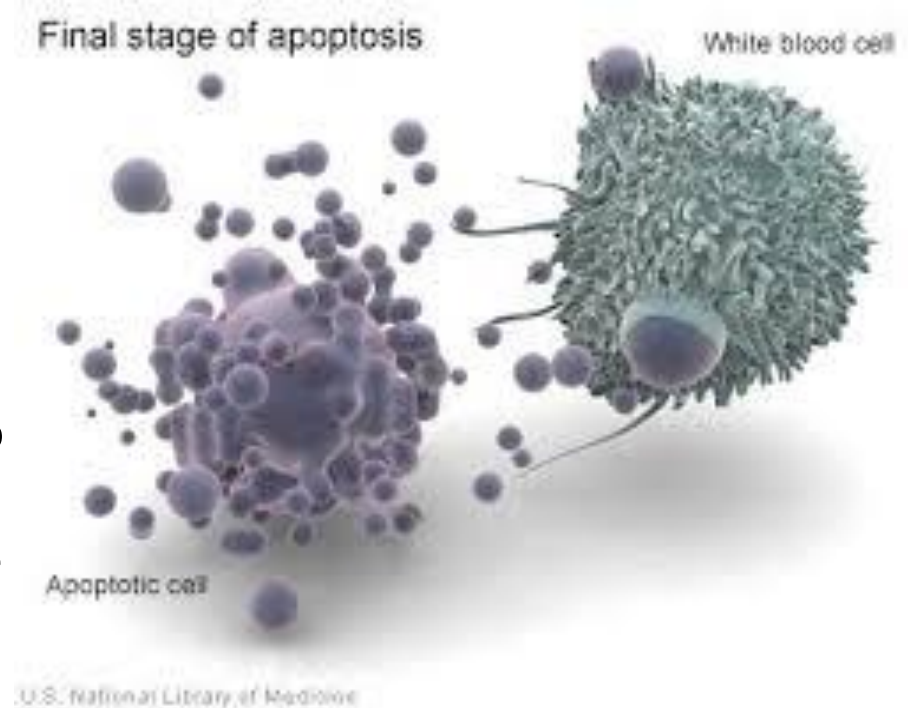
# MORTE CELLULARE

Il concetto di morte cellulare programmata (PCD) è stato 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. Questo 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

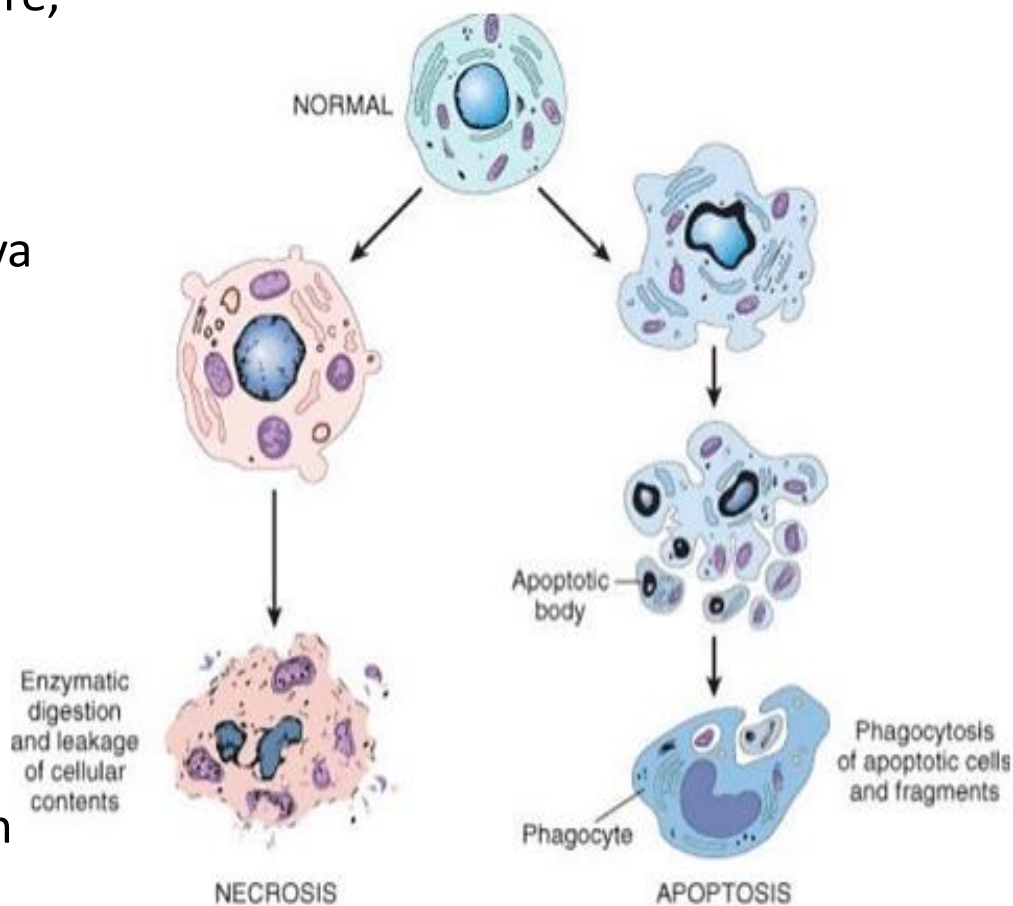
Esistono due modalità di morte cellulare, distinte e ben riconoscibili

## 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 (apoptosi)

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.

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 alla 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.

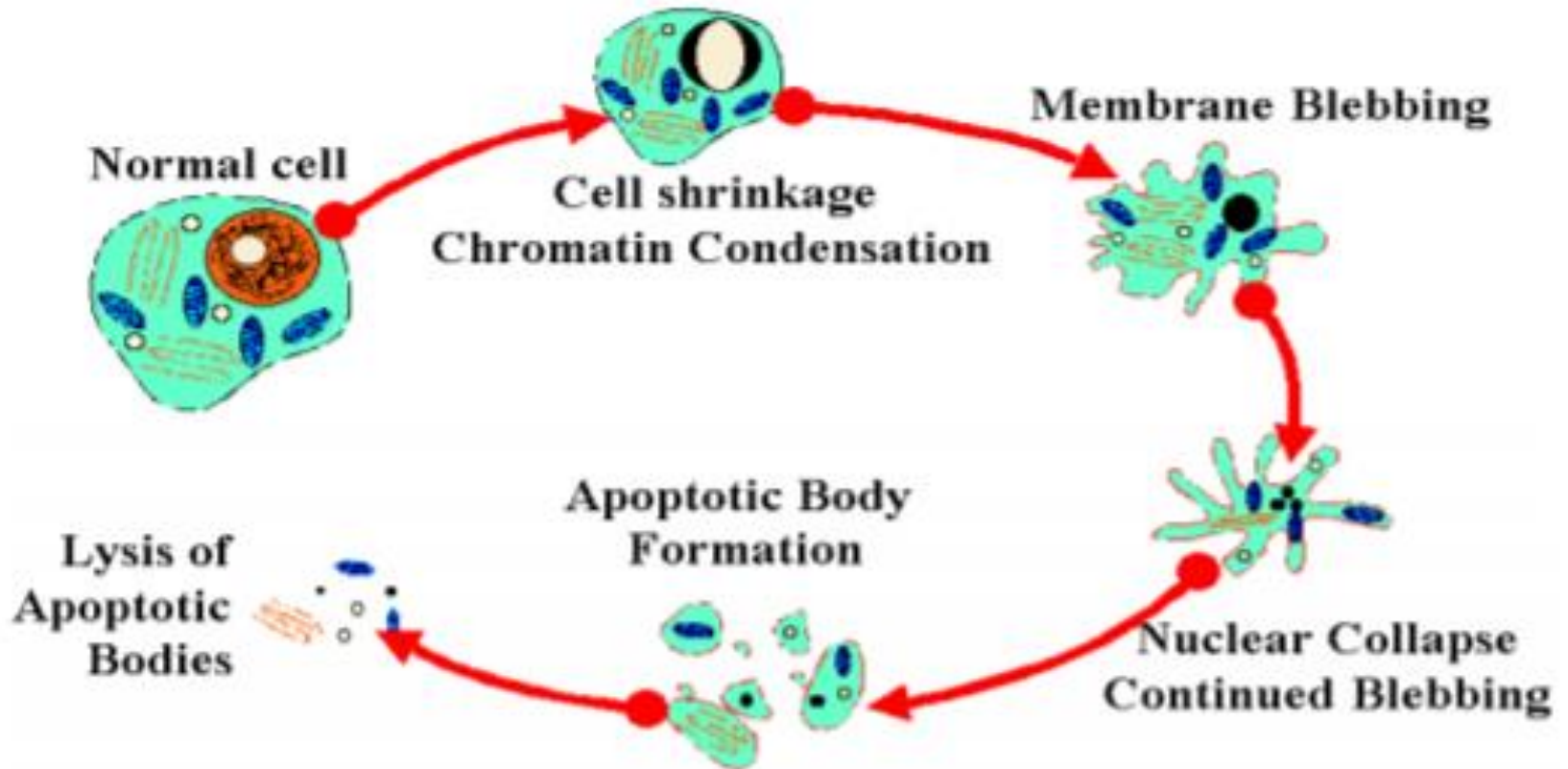
L'apoptosi presenta significative differenze morfologiche rispetto alla necrosi, per esempio comporta diminuzione di volume della cellula con efflusso di ioni cloro e potassio, attivazione di enzimi che determinano gli eventi di morte in modo controllato, inoltre è un evento rapido (poche decine di minuti) 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

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. *apwptosis* = caduta) il processo di PCD





# PCD e APOPTOSI

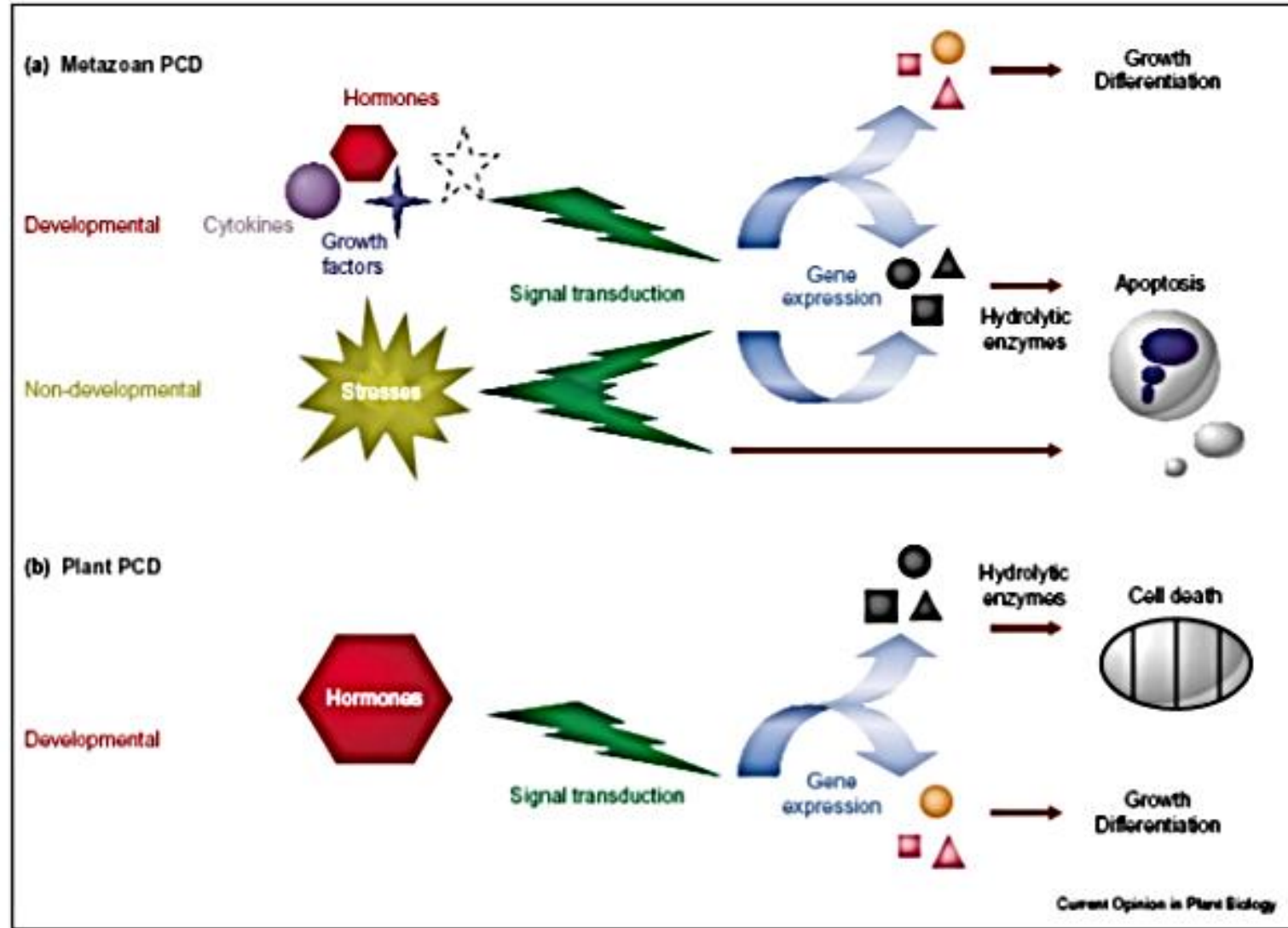
Nel mondo vegetale la PCD è parte essenziale del processo di sviluppo e dei meccanismi di difesa da patogeni (nelle piante manca il sistema immunitario)

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”
- prevede il coinvolgimento del vacuolo: la rottura del tonoplasto ed il rilascio nel citoplasma degli enzimi idrolitici coincide con l'inizio dell'autolisi (autofagia)
- è regolata da ormoni o da altre molecole endogene bioattive
- è accompagnata dall'attivazione di enzimi idrolitici che portano al caratteristico aspetto citologico delle cellule che vanno incontro a morte programmata

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 NELLE PIANTE E NEGLI ANIMALI



## A) Risposta ipersensibile ai patogeni

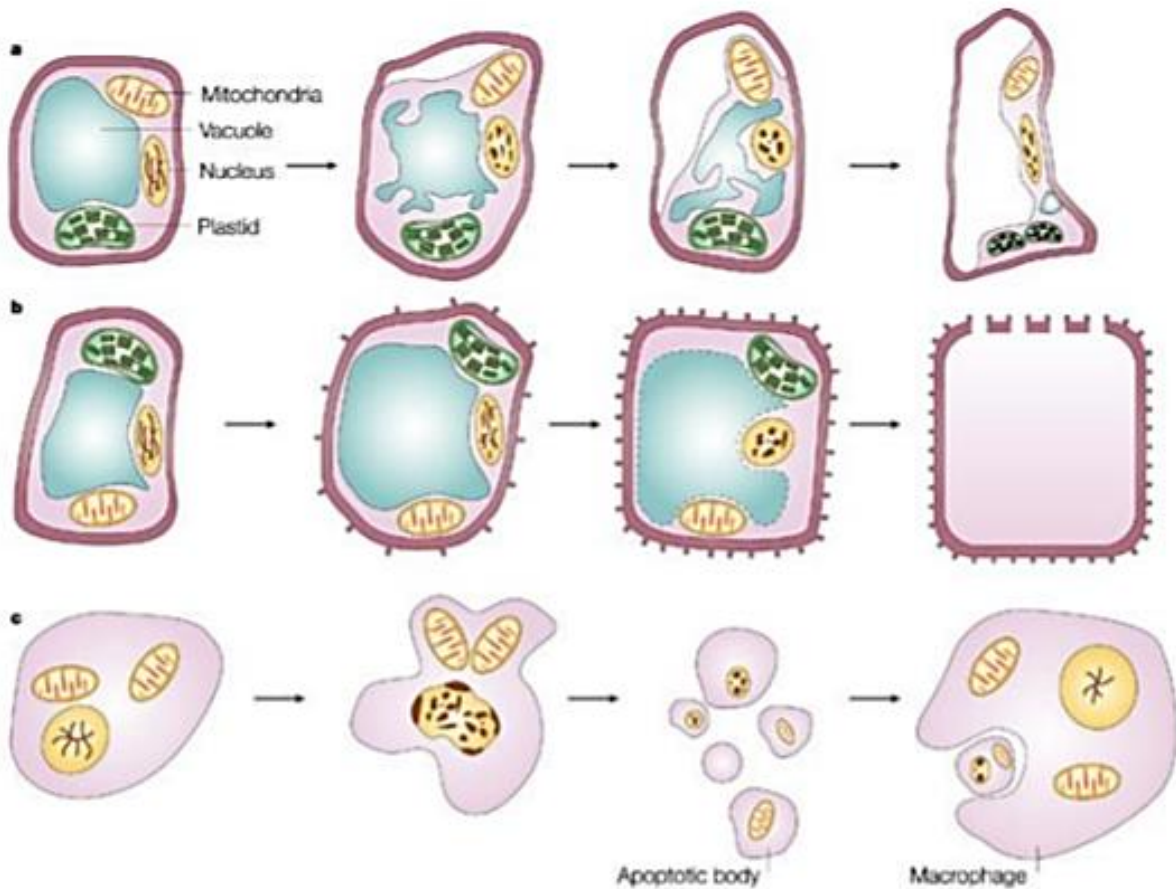
Si osserva la condensazione della cromatina, frammentazione del DNA prima della rottura del vacuolo, collasso della membrana cellulare e distacco dalla parete.

## B) Xilogenesi

Si osserva la contrazione del vacuolo e successiva deposizione della parete secondaria, lignificazione e rottura del vacuolo con rilascio di enzimi idrolitici

## C) Apoptosi

Si osserva la condensazione e la frammentazione della cromatina, rigonfiamento della membrana seguita dalla formazione dei corpi apoptotici che vengono fagocitati dai macrofagi o dalle cellule adiacenti



# **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 o di organi come nei fiori 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.

Il risultato è una complessa rete d'interazioni che contribuisce alla plasticità dello sviluppo delle piante, che è riflessa nella vasta varietà di forme che queste mostrano.

## **Alcune molecole possono innescare la PCD nelle piante:**

- Le specie reattive dell'ossigeno (ROS),
- le gibberelline (GA),
- l'etilene

## **Alcune molecole tendono a sopprimerla:**

- Acido abscissico (ABA)
- le citochinine

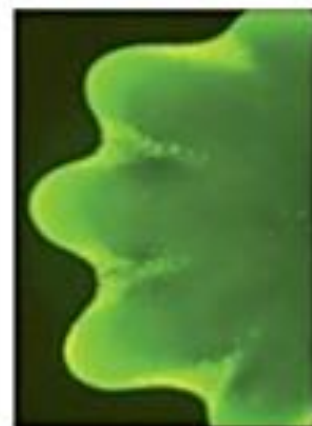
Tutti gli eventi di PCD nelle piante condividono il coinvolgimento del vacuolo e un efflusso di ioni calcio. La rottura del tonoplasto ed il conseguente collasso del vacuolo calciodipendente determinano il rilascio degli enzimi presenti al suo interno e portano alla degradazione di tutto il contenuto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

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



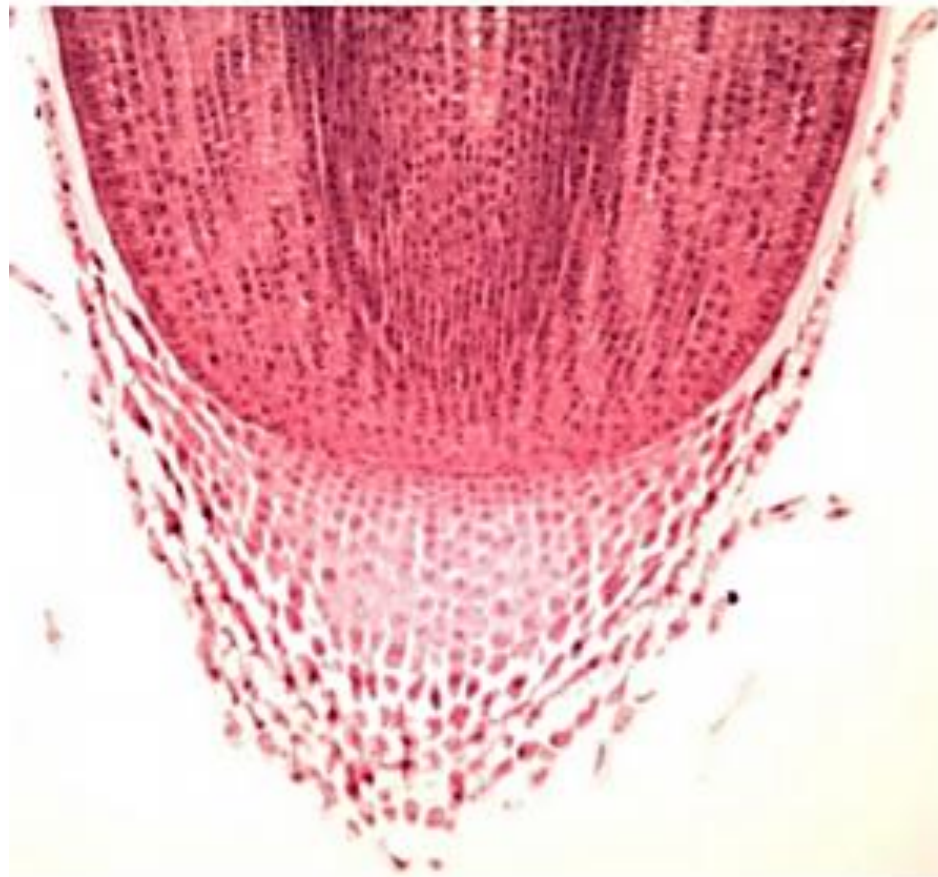
*Monstera deliciosa*

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

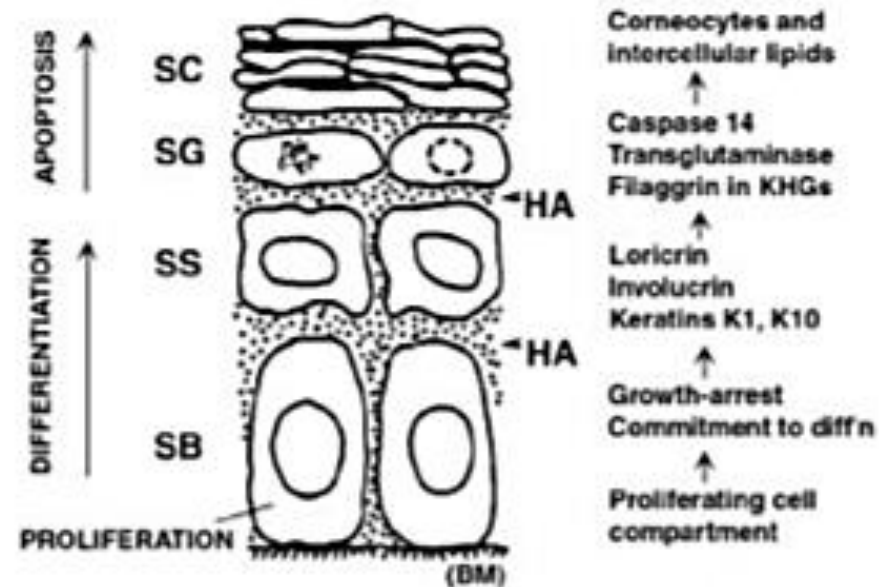


*Bufo bufo*

# Sfaldamento delle cellule del cappuccio radicale



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



A differenza degli animali che usano la PCD per rimuovere specifiche cellule, le piante la usano anche per rimuovere interi organi non più utili ad esempio le foglie senescenti o i petali dei fiori appassiti.



La senescenza è un fenomeno adattativo che ha reso alcune specie vegetali capaci di sopravvivere a condizioni ambientali avverse. La rapida senescenza delle piante annuali e biennali, ad esempio, permette un cambiamento totale della popolazione ad intervalli frequenti, permettendo a cambiamenti genetici vantaggiosi a diffondersi



La senescenza può manifestarsi nelle piante in maniera estremamente diversa.

Alcune piante annuali, come i cereali, mostrano una senescenza totale in cui radici, fusto e foglie muoiono contemporaneamente. Altre annuali posseggono, invece, una senescenza sequenziale in cui le foglie più basse ingialliscono e muoiono subito, mentre il resto della pianta morirà soltanto dopo la fioritura.

Le piante erbacee perenni mostrano una senescenza apicale autunnale, in cui muore soltanto la parte superiore della pianta. Nelle altre perenni, la senescenza rimane invece limitata soltanto a pochi organi, come le infiorescenze o qualche foglia (nelle sempreverdi), o può coinvolgere l'intero fogliame annuale (nelle specie decidue).

Nelle piante bulbose, tutte le parti al di sopra del terreno muoiono ogni anno



# 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; i geni di regolazione della senescenza danno inizio ad una cascata di eventi che causano la morte.

Senescenza ed abscissione sono caratterizzati da profondi cambiamenti finalizzati al recupero e alla redistribuzione di metaboliti e di materiale strutturale.

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 a causa della 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.
- 3) Ai 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.

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.

Funzione dei carotenoidi:

- supporto alla fotosintesi stessa perché può essere infatti fonte di stress ossidativo
- assorbono parte della luce che non viene assorbita dalla clorofilla
- fotoprotezione

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).



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 la luce può indurre la formazione di specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). Carotenoidi e 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.

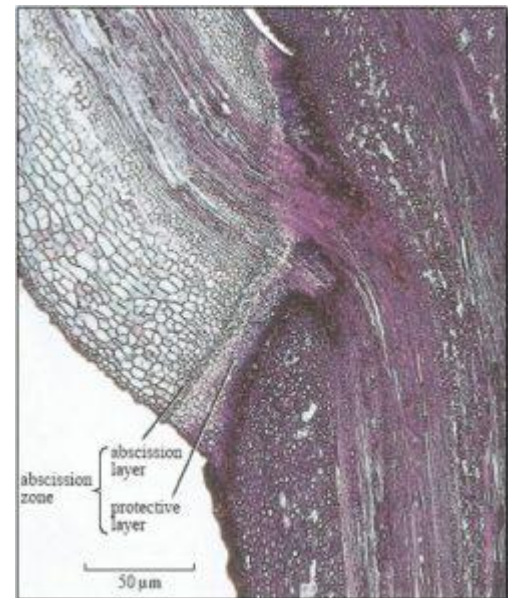
La foglia, sebbene senescente, continua a rappresentare un'importante risorsa per la pianta dal momento che tutti gli elementi derivati dall'attività idrolitica (zuccheri, nucleosidi, amminoacidi) possono essere recuperati, trasportati fuori dagli organi senescenti per via floematica, per essere infine 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.



# SENESCENZA E ABSCISSIONE

Responsabili dell'abscissione fogliare 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.



# 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

## RISPOSTA IPERSENSIBILE

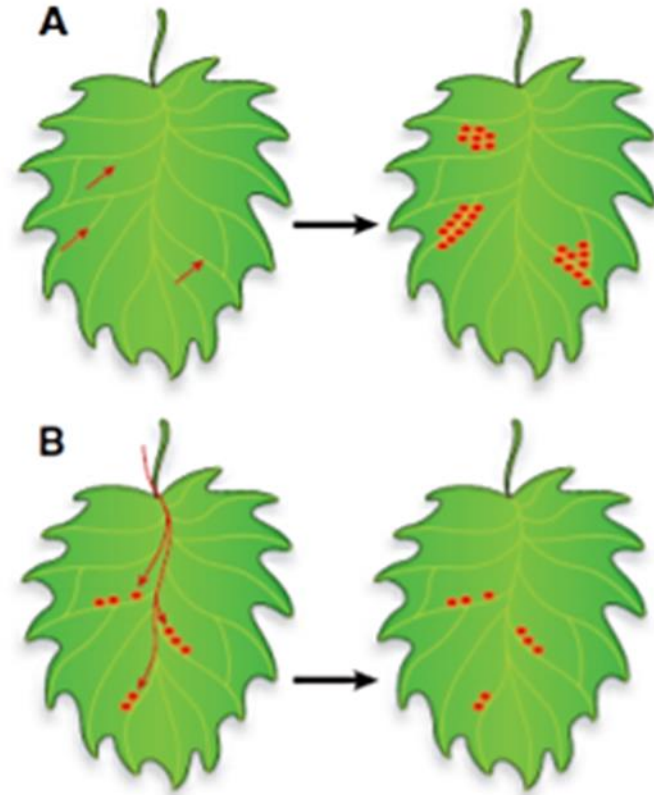
Le piante sono costantemente minacciate da microrganismi patogeni (funghi, batteri e virus), poiché non hanno un sistema immunitario hanno sviluppato una strategia per difendersi definita **risposta ipersensibile (HR)** che porta ad una rapida e localizzata morte cellulare nel sito di infezione e la 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

L'ossido nitrico prodotto contemporaneamente al burst ossidativo coopera con le specie reattive dell'ossigeno (ROS) 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).



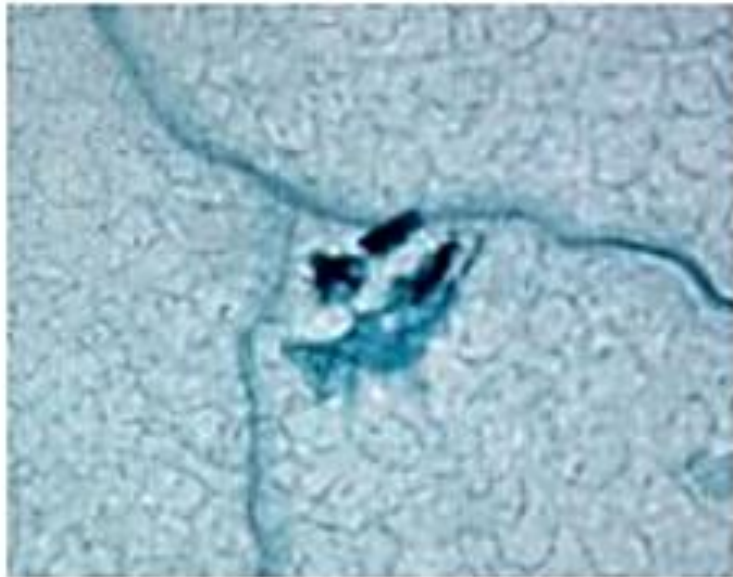
**Figura 11.6**

**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.





**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**

## **RISPOSTA IPERSENSIBILE**

La risposta ipersensibile è un processo attivo nel quale l'accumulo di radicali liberi e ossido nitrico ( $O_2$ ,  $H_2O_2$  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.

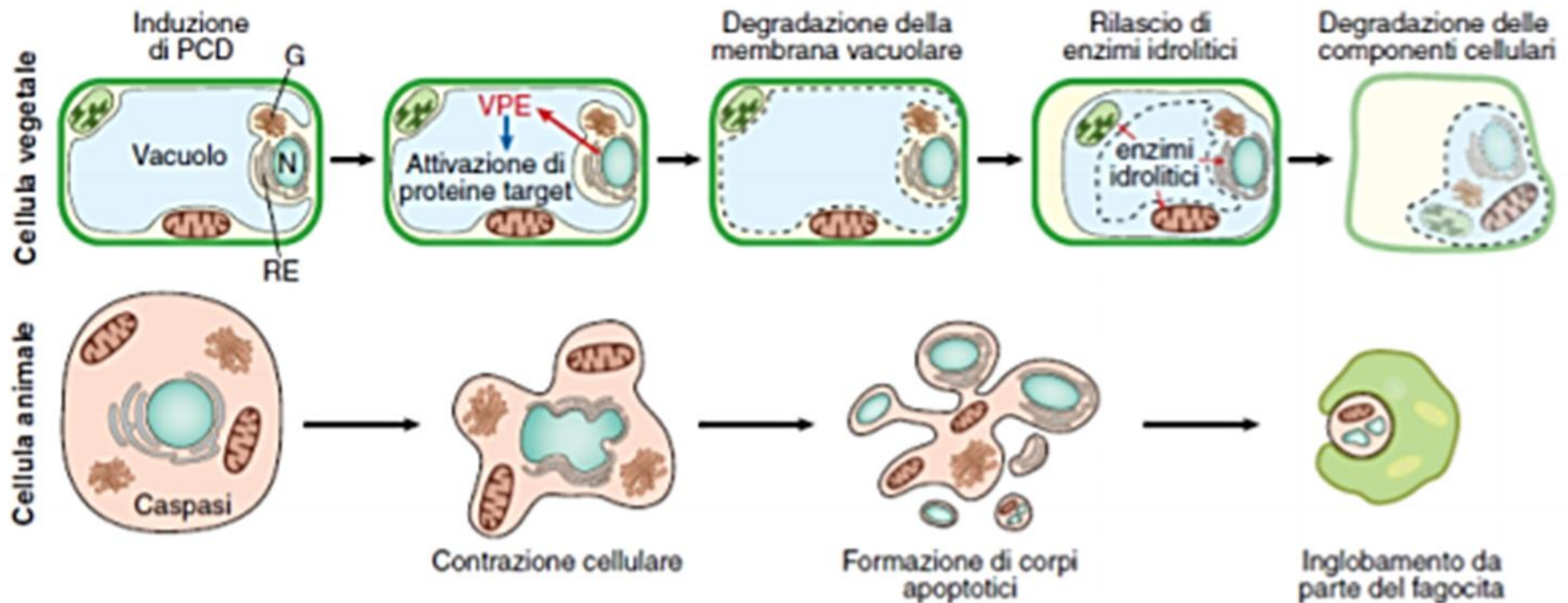
I ROS hanno un ruolo importante nell'avvio della HR ed il programma con cui si realizza ha alcune analogie con l'apoptosi delle cellule animali.

L'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  $Ca^{2+}$  citosolico, per attivare l'espressione di meccanismi di resistenza e per mediare una rete sistemica di segnali responsabile dell'induzione dell'immunizzazione della pianta.

# GENI COINVOLTI NELLA PCD DELLE CELLULE VEGETALI

Nelle piante è stato ipotizzato un modello di PCD dipendente dal vacuolo. Una varietà di proteine vacuolari sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico come pro-proteine e poi sono trasportate nel vacuolo. Tra queste **VPE (Vacuolar Processing Enzyme)** è sintetizzata come pro-proteina inattiva e poi indirizzata al vacuolo dove è convertita nella forma matura attiva. 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 (tonoplasto), conseguentemente gli enzimi idrolitici vacuolari vengono rilasciati nel citosol dove degradano le componenti cellulari.



## **RUOLO DEL CITOCROMO C E SUL SUO RILASCIO DAI MITOCONDRI**

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 ortologhi delle caspasi.

In modelli cellulari vegetali, il citocromo c viene effettivamente rilasciato dal mitocondrio in seguito ad uno stimolo di morte. 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- ed 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 possa avvenire in un modo diverso.

ROS derivati dai mitocondri potrebbero controllare il processo di PCD

Anche il cloroplasto è fonte di ROS quindi potrebbe giocare un ruolo significativo nell'attivazione di PCD nelle piante.