

A 52

Gordon Research Conference on Plant  
Senescence.  
Plymouth, New Hampshire, USA.  
14-19 juli 1996

W.G. van Doorn

ato-dlo



## **Gordon Research Conference on Plant Senescence. Plymouth, New Hampshire, USA. 14-19 juli 1996.**

W.G. van Doorn

Het programma van de conferentie is bijgevoegd (bijlage 1). Van Gordon conferenties worden geen proceedings gemaakt en er worden ook geen abstracts gevraagd of gepubliceerd. De bedoeling hiervan is de sfeer informeel te houden en de laatste resultaten 'off the record' te kunnen bespreken.

De conferentie was vooral gericht op een vergelijking tussen de recente, in een stroomversnelling geraakte, ontwikkelingen op het gebied van de veroudering in dierlijke cellen en de veroudering in plantaardig weefsel.

De geprogrammeerde celdood in cellen van gewervelde dieren wordt apoptose genoemd, van het grieks apo, erboven, en ptosis, dat zoveel als het vallen van de bladeren betekent (ptosis is een 'diphthong' waarvan de p niet duidelijk wordt uitgesproken). Het belangrijkste kenmerk van apoptosis is het breken van DNA, al in een vrij vroeg stadium van de veroudering. De criteria van apoptose zijn:

a) DNA ladderling. De brokstukken zijn vaak ongeveer 180-200 basenparen lang, en zijn op gels te zien als een aantal duidelijke banden, die even ver van elkaar af staan. Vanwege de gelijkens met een ladder wordt het breken van het DNA ook wel aangeduid als DNA ladderling.

b) De TUNEL reactie. In vivo is het gebroken DNA aan te tonen, in de celkern.

Bij plantaardige veroudering zijn recent een aantal systemen beschreven die voldoen aan bovenstaande criteria voor apoptose: de dood van wortelcellen van tomaat en van cellen in maisblad na infectie met een schimmel (de zgn. hypersensitive response). Bij schimmelinfectie van tabaksblad werd wel de TUNEL reactie gevonden maar geen duidelijke DNA ladderling. In endosperm cellen van maiszaad, die ook doodgaan en een holte achterlaten, werd wel ladderling waargenomen, terwijl de TUNEL reactie niet werd getest.

De endonucleases die betrokken zijn bij de afbraak van DNA zijn geïsoleerd en gescheiden op gels. Een aantal van deze enzymen wordt geremd door zink ionen.

Bij dierlijke cellen zijn een aantal genen gevonden die nodig zijn voor celdood, terwijl enkele andere genen de celdood vertragen. De 'verouderings'genen (voor zover deze homologie hebben met eiwitten waarvan de werking duidelijk is) blijken steeds cysteine-proteases. Ze verbreken de dipeptide binding van asparaginezuur met een ander aminozuur te verbreken; het zijn aspases. Ze hebben allen verwantschap met CED3 een gen dat nodig is voor de celdood van 131 cellen die nodig is voor normale embryonale ontwikkeling van de nematode *Caenorhabditis elegans*, en het daarop sterk lijkende ICE (interleukin convertend enzym) in zoogdiercellen. Deze groep wordt daarom ICE proteasen genoemd. Er zijn nu een zevental van deze cysteine-proteasen gesequenced. Ze hebben een sequentie van 4-5 aminozuren gemeen, hetgeen deel is van de active site.

In twee recente artikelen in Cell (zie referenties) is de werking van enkele van deze proteasen en de 'signaaltransductie' route beschreven. Als model worden humane B cellen veel gebruikt. Lymphocyten kunnen deze cellen opruimen door te binden met een receptor die ook in veel andere cellen aanwezig is. De receptor die zich in de celmembraan bevindt heeft een cytoplasmatisch deel dat bindt met een eiwit met een zogenaamd 'death domain'. Aan dit domain koppelt vervolgens een inactief cysteine-protease. Dit wordt daarop geactiveerd doordat een deel ervan wordt afgehaald. Het geactiveerde protease zorgt voor de activering van een ander cysteine protease, opnieuw door er een stuk af te halen, en dit proces herhaalt zich bij een volgende stap (zie **figuur**). Alle tot nu toe gevonden ICE proteasen worden als pro-enzym gevormd en worden pas actief na 'cleavage'.

Wat er gebeurt aan het einde van deze cascade van proteases is nog niet geheel duidelijk. Als 'targets' van de ICE proteases zijn beschreven: de enzymen poly(ADP-ribose) polymerase en DNA-dependent proteïne kinase, die beide betrokken zijn bij het waarnemen en repareren van DNA, en een tweetal andere eiwitten in de celkern (U1 ribonucleoproteïne en nucleair lamin).

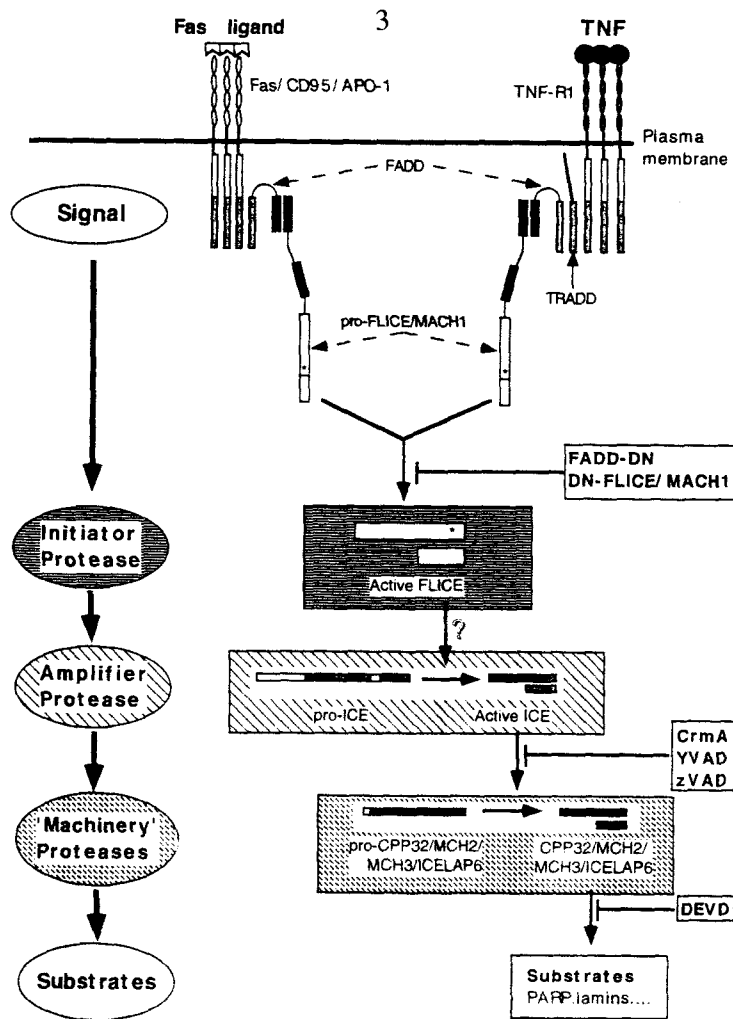


Figure 1. Possible Model of Hierarchy of ICE-like Proteases in CD95/Fas/APO-1- and TNF-Induced Apoptosis

In T-cell apoptosis is duidelijk dat een ICE protease (Granzyme B) een effect heeft op perforin, een porie-eiwit in de celmembranen. De rol van perforin is niet geheel duidelijk, het lijkt onderdeel van een groter complex dat celdood geeft. Gezuiverd Granzyme B heeft niettemin perforin nodig om de celdood van T-cellen te veroorzaken. De volgorde van werking is: Granzyme B activeert een (niet ICE) protease, die vervolgens een ICE protease activeert, en deze lijkt vrij direct op het perforin te werken.

Een aantal factoren remmen de ontwikkeling van dierlijke cellen naar apoptose (o.a. SPI-1 uit pokken-virus, NAIP, dad-1 en Crm A). Crm A, bijvoorbeeld, is een virus eiwit dat ICE proteases remt. Ook gesynthetiseerde peptiden met een fluoromethyl keton groep eraan, zoals YVAD-fluoromethyl keton, zijn vrij specifieke remmers van ICE en daarmee van de celdood. Dit betekent dat de celdood nu redelijk goed van buitenaf te sturen is.

In planten is er geen sterke homologie met de ICE proteases. Wel is een geruim aantal cysteine proteases gevonden die een correlatie vertonen met celdood. De rol ervan is niettemin nog niet duidelijk. Voorbeelden van processen waarbij deze proteasen zijn ontdekt zijn bladvergeling en de ontwikkeling van levende cel naar (dood) houtvat.

In planten zijn cysteineproteases mogelijk gedeeltelijk in de vacuole aanwezig, maar verondersteld wordt dat er ook een deel in het cytoplasma aanwezig is. De geïsoleerde proteases hebben soms een 'signal peptide sequence' die ze voorbestemd om naar de vacuole te worden vervoerd, andere hebben een sequentie voor vervoer naar het endoplasmatisch reticulum.

Een mogelijk verband tussen cysteineproteases en de afbraak van DNA kan worden afgeleid uit een terloopse opmerking van Fukuda, die de ontwikkeling van cel naar houtvat bestudeert: E64, een specifieke remmer van cysteine-proteases, onderdrukte eveneens de nuclease activiteit en de zichtbare afbraak van de celkern.

Fukuda suggereert dat het lek worden van de tonoplast (vacuole membraan) een belangrijk moment is in de veroudering, omdat dan een geruim aantal hydrolytische enzymen vrijkomen. Hij heeft tijdens de veroudering tevens een sterke toename van de RNase activiteit gevonden.

Eiwitten worden afgebroken door proteasen, maar ook in het zgn. proteasoom. Het bevindt zich in het cytoplasma en de structuur ervan is recent duidelijk geworden. Eiwit wordt voor proteasoom-afbraak 'getarged' door koppeling met ubiquitin. De secundaire en tertiaire structuur van het eiwit gaat verloren, de rechte keten van aminozuren wordt in de holte van het proteasoom geleid. Vervolgens worden alle aminozuren er één voor één afgeknipt. Intussen is een remmer van het proteasoom bekend (lactocystin; Calbiochem). Deze remmer gaat celdood tegen bij T-cel lymphocyten, waaruit wordt geconcludeerd dat het proteasoom bij deze cellen essentieel is in de processen die tot celdood leiden. Dit is ook geconcludeerd voor de celdood van neuronen. Bij planten daarentegen is de rol van het proteasoom tijdens de veroudering nog niet duidelijk. Ze lijken vroeg tijdens de veroudering al grotendeels te verdwijnen. Dit is aangetoond door gebruik te maken van een antilichaam (dr. Raymond in het lab van Pradet in Bordeaux).

Andere interessante gegevens:

Autar Mattoo: vond carboxypeptidase (exoprotease) in vacuole van rijpende tomaat (antilichaam). Dit enzym lijkt een rol te spelen bij verwonding, rol bij veroudering nog niet duidelijk.

Sonia Philosoph-Hadas: EDTA remt bladvergeling; Ca-ionophoor bevordert het. Hieruit, en uit aanvullende gegevens, wordt afgeleid dat calcium betrokken is bij de signaaltransductie van de veroudering, tussen ethyleenreceptor en de expressie van genen.

Roy Atkinson: Gebruikte tobacco yellow dwarf virus om hoog aantal kopieën van antisense construct te krijgen, na infectie via *Agrobacterium*. Bracht ACC antisense in tomaat: geen abscissie meer van bloembladeren en stijlen.

Tony Bleeker: werkt aan *Arabidopsis* mutanten en heeft een aantal zeer belangrijke gegevens omtrent de perceptie en de signaaltransductie van ethyleen:

*Etr* mutant: Is ethyleen receptor; volledige sequentie nu bekend. Vier puntmutaties, steeds in het hydrofobe deel. Twee ervan (*etr1-1* en *etr1-4*) onderdrukken ethyleengevoeligheid geheel, twee doen dit gedeeltelijk. Correlatie met de mate van ethyleenbinding. Ook voorlopige verklaring waarom de mutanten dominant zijn, gebaseerd op het dimere karakter van de receptor.

*Ers* mutant: kinase functie van de receptor is geremd. Het receptor molecuul bevat een hydrofiel deel dat in het cytoplasma steekt en een histidine-kinase functie heeft. Dit deel fosforyleert vervolgens de eerste verbinding in de signaal-transductie route.

*Ctr* mutant: is suppressor, mutant ziet er als ethyleen begast uit.

*Ein2* mutant: ws. signaaltransductie factor.

Harry Klee: Tomaat *Nr* mutant (al gevonden door Rick in 1956; de mutant heeft sterk uitgestelde abscissie van bloemen, gecorreleerd aan lagere cellulase en polygalacturonase activiteit in de abscissie zone) is een puntmutatie in de ethyleenreceptor, ook in het hydrofobe deel, maar op een andere plaats dan de vier mutant *etr1* allelen. Voorts: *etr1-1* in *Petunia* gezet: stopt bloemverwelking. Idem *etr1-1* in tomaat gezet: petalen en stigma vertonen geen abscissie meer.

**Conclusies:**

1. De rol van DNA afbraak in de door ons onderzochte verouderende systemen moet worden bekeken.

2. Cysteineproteases zijn belangrijk voor celdood in dierlijke cellen. Het belang van deze proteases in planten dient te worden nagegaan. Ook nagaan of de verschillende factoren die de celdood bij dierlijke cellen uitstellen een dergelijke functie bij planten hebben. In planten zijn er bovendien verschillende protease-remmers bekend. Het is van belang na te gaan of deze in verband staan met de cysteine-proteases en overexpressie de veroudering zou kunnen remmen.

3. Het *etr1-1* gen kan van grote betekenis worden bij uitstel van de veroudering van bloemen die verwelken onder invloed van ethyleen, waarvan er een aantal economisch belangrijk zijn. Abscisie van bloemen en petalen is bij een geruim aantal potplanten en snijbloemen eveneens van geruim economisch belang en wordt altijd gereguleerd door ethyleen. *Etr1-1* zal dit proces geheel onderdrukken.

Op regeringsniveau is geformuleerd dat men op termijn het gebruik van STS wil afbouwen, in elk geval zodra er goede alternatieven zijn. Dit is bij anjer al gebeurd, waar het STS is vervangen door een ander chemisch middel. Bij andere snijbloemen is tot nu toe geen goede STS vervanger gevonden. Door *etr1-1* in te bouwen, aangenomen dat dit succes heeft, kunnen we het gebruik van STS staken. Voor sommige gewassen is daartoe ontwikkeling van regeneratie en transformatie-techniek noodzakelijk.

**Referenties:**

1. Recent review apoptose (dierlijke cellen):  
Fraser and Evan. 1996. *Cell* 85: 781-784.
2. Recente opheldering van eerste stappen na de receptor:  
Boldin et al. 1996. *Cell* 85: 803-815.  
Muzio et al. 1996. *Cell* 85: 817-827.
3. Veroudering plantencellen komt overeen met apoptose:  
Wang et al. 1996. *Plant Cell* 8: 375-391.  
Ryerson and Heath. 1996. *Plant Cell* 8: 393-402.
4. Expressie cysteine protease:  
Minami and Fukuda. 1995. *Plant Cell Physiol.* 36: 1599-1606.
5. Carboxypeptidase:  
Mehta and Mattoo. 1996. *Plant Physiol.* 110: 875-882.
6. Ethyleen mutanten (resp. Arabidopsis en tomaat):  
Bleecker and Schaller. 1996. *Plant Physiol.* 111: 653-660.  
Lanahan et al. 1994. *Plant Cell* 6: 521-30.



# PLANT SENESCENCE & PROGRAMMED CELL DEATH

GORDON RESEARCH CONFERENCE  
PLYMOUTH STATE COLLEGE, NEW HAMPSHIRE  
JULY 14-19, 1996

## SESSION I: SUNDAY EVENING -- 8:00 - 10:00 PM, July 14

### PROGRAMMED CELL DEATH

*Session Chair: Alan Bennett*

- 8:00 - 8:20 Welcome and Introduction to the Conference  
8:20 - 9:10 Arnold Greenberg - Apoptosis, proteases and the cell cycle  
9:10 - 10:00 Barbara Osborne - Mechanisms of Apoptosis in T lymphocytes

## SESSION II: MONDAY MORNING -- 8:30 - 12:00 NOON, July 15

### PROGRAMMED CELL DEATH: PLANT PATHOGENESIS *Session Chair: David Gilchrist*

- 8:30 - 8:35 David Gilchrist - Introduction  
8:35 - 9:10 David Gilchrist - The role of apoptosis in plant disease  
9:10 - 9:45 Michelle Heath - Apoptosis and the hypersensitive response to fungal pathogens  
9:45 - 10:30 Break and conference photograph  
10:30 - 11:05 Robert Dietrich - *Arabidopsis* cell death mutants which affect pathogen response  
11:05 - 11:40 Eric Lam - Calcium-regulated endonucleases participate in hypersensitive response

4:30 - 6:00 PM Poster session

## SESSION III: MONDAY EVENING -- 7:30 - 10:00 PM, July 15

### PROGRAMMED CELL DEATH: PLANT DEVELOPMENT *Session chair: Hiroo Fukuda*

- 7:30 - 7:35 Hiroo Fukuda - Introduction  
7:35 - 8:10 Alice Cheung - Pollination induces mRNA tail-shortening and cell deterioration  
8:10 - 8:45 Dan Gallie - Programmed cell death in maize endosperm  
8:45 - 9:20 Hiroo Fukuda - Xylogenesis: a model of programmed cell death  
9:20 - 10:00 Eric Beers - Protease expression in developing xylem

## SESSION IV: TUESDAY MORNING -- 8:30 - 12:00 NOON, July 16

### ENDOGENOUS REGULATION OF SENESCENCE

*Session chair: Larry Nooden*

- 8:30 - 8:35 Larry Nooden - Introduction  
8:35 - 9:10 Larry Nooden - Senescence-inhibiting effects of the stay-green gene in soybean  
9:10 - 9:45 Michael Reid - Regulation of ethylene-independent senescence  
9:45 - 10:20 Linda Hensel-Burke - Proliferous, a mutant line with delayed monocarpic senescence  
10:20 - 10:50 Break  
10:50 - 11:25 Howard Thomas - Characterization of a leaf senescence gene  
11:25 - 12:00 Susheng Gan - Hormonal control of senescence in transgenic plants

3:30 - 6:00 PM Poster session

**SESSION V: TUESDAY EVENING -- 7:30 - 9:30 PM, July 16****POSTER PRESENTATIONS***Session chair: Alan Bennett*

- 7:30 - 7:50 Nilgum Tumer - RNA depurination activity of pokeweed antiviral protein  
 7:50 - 8:10 \*Bonnie Woffenden - Ubiquitin pathway during tracheary element differentiation  
 8:10 - 8:30 \*Isaac John - Cloning and characterization of leaf senescence-related cDNAs  
 8:30 - 8:50 Vicky Buchanan-Wollaston - Characterization of a senescence enhanced cysteine endopeptidase in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*  
 8:50 - 9:10 Tadahiko Mae - The large subunit of Rubisco is fragmented by active oxygen in chloroplast lysates  
 9:10 - 9:30 Martine Verhoeven - Genetic manipulation of fruit texture

**SESSION VI: WEDNESDAY MORNING -- 8:30 - 12:00 NOON, July 17****ENVIRONMENTAL REGULATION OF SENESCENCE***Session chair: Michael Reid*

- 8:30 - 8:35 Michael Reid - Introduction  
 8:35 - 9:10 Koh Iba - Regulation of chilling sensitivity by lipid desaturation  
 9:10 - 9:45 Daniel J. Kliebenstein - Ozone induced Oxidative Stress and *Arabidopsis thaliana*  
 9:45 - 10:20 Dean DellaPenna - Regulation of carotenogenesis-protection from oxidative stress  
 10:20 - 10:50 Break  
 10:50 - 11:25 Catherine M. Griffith - Using differential display to isolate cDNAs associated with cold-induced senescence in maize  
 11:25 - 12:00 Karin Krupinska - Characterization of barley leaf senescence under field conditions and isolation of senescence associated genes

5:30 - 6:00 PM Poster session

**SESSION VII: WEDNESDAY EVENING -- 7:30 - 9:55 PM, July 17****NUCLEIC ACID AND PROTEIN TURNOVER***Session chair: Richard Vierstra*

- 7:30 - 7:35 Rick Vierstra - Introduction  
 7:35 - 8:10 Rick Vierstra - The ubiquitin system of protein turnover  
 8:10 - 8:45 Richard Amasino - Senescence-regulated ClpB homologs targeted to the chloroplast  
 8:45 - 9:20 Autar Mattoo - Ripening-regulated carboxypeptidases  
 9:20 - 9:55 Amnon Lers - Senescence-regulated RNases

**SESSION VIII: THURSDAY MORNING -- 8:30 - 12:00 NOON, July 18****MEMBRANE AND CELL WALL TURNOVER***Session chair: John Thompson*

- 8:30 - 8:35 John Thompson - Introduction  
 8:35 - 9:10 John Thompson - Membrane turnover and cellular aging  
 9:10 - 9:45 Rick Bostock - Lipid turnover and cellular signaling of cell death  
 9:45 - 10:20 Phillipe Matile - Chlorophyll catabolism in senescing leaves  
 10:20 - 10:50 Break  
 10:50 - 11:25 Alan Bennett - Cell wall hydrolase gene families in ripening and senescence  
 11:25 - 12:00 Mark Harpster - Suppression of endoglucanase expression in ripening fruit

**SESSION IX: THURSDAY EVENING-- 7:30 - 10:00 PM, July 18****GENERAL TRANSDUCTION REGULATING SENESCENCE***Session chair: Tony Bleeker*

- 7:30 - 7:35 Tony Bleeker - Introduction  
 7:35 - 8:10 Tony Bleeker - Ethylene binding and perception by ETR1  
 8:10 - 8:45 Harry Klee - Regulation of ethylene production and perception in tomato  
 8:45 - 9:20 Jill Deikman - Ethylene-regulated gene expression  
 9:20 - 9:55 Sonia Philosoph-Hadas - Role of cytosolic calcium in regulation of leaf senescence