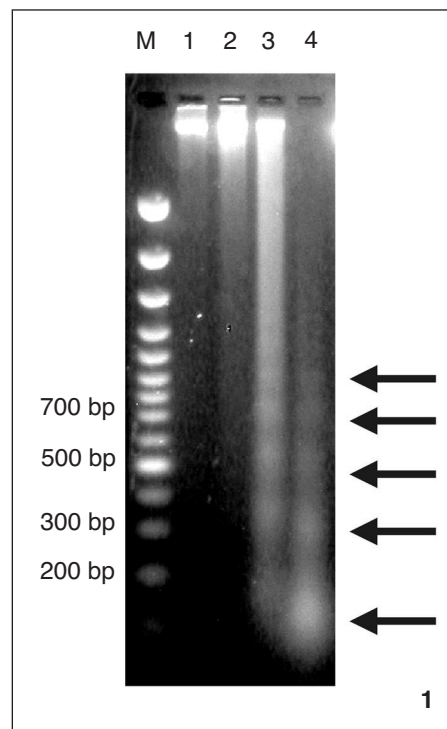


# Sebevražda v zájmu celku, aneb programovaná buněčná smrt (nejen) u rostlin

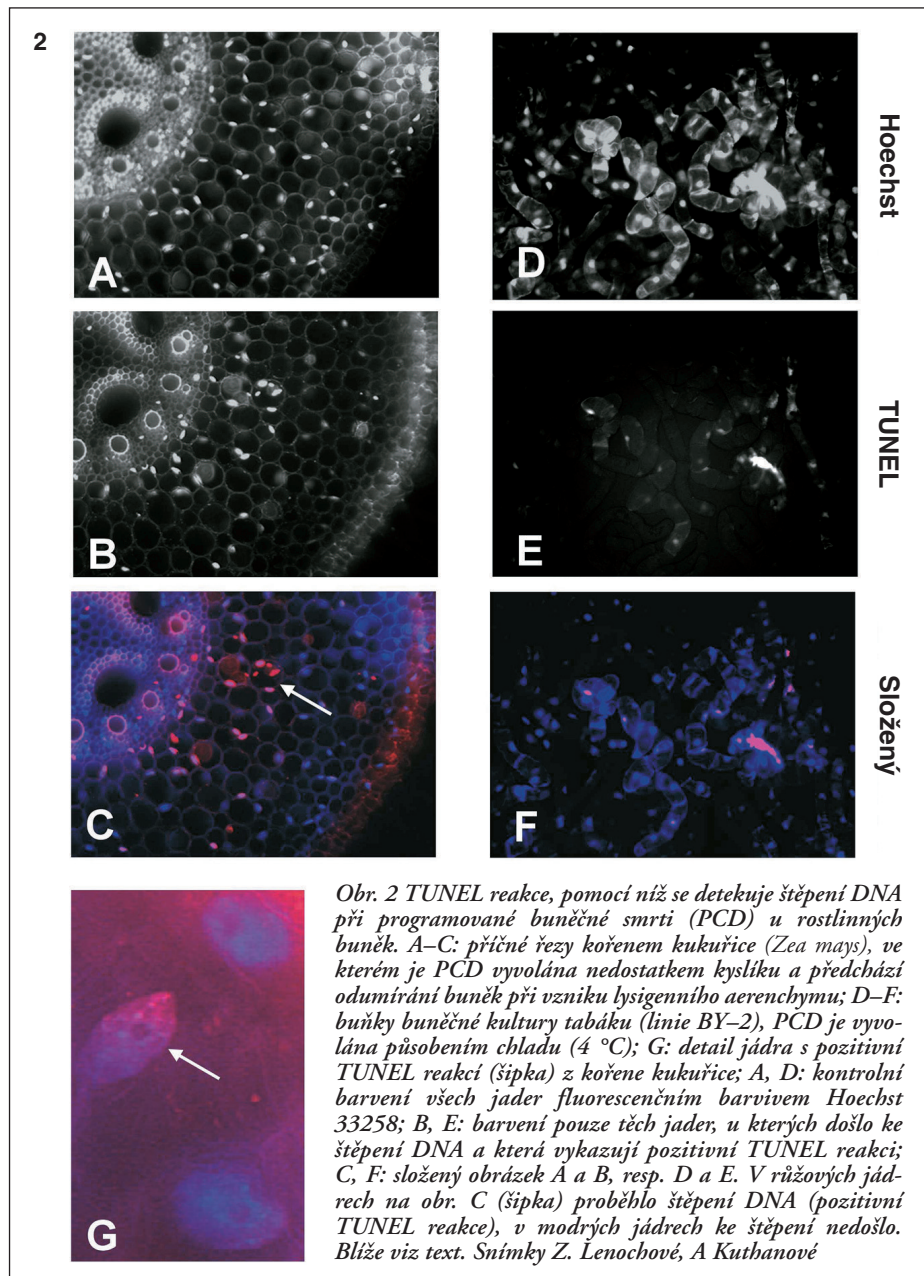
Zuzana Lenočová, Andrea Kuthanová, Olga Votrubová

Pod tímto poněkud morbidním nadpisem se skrývají děje, které jsou pro organismy povětšinou překvapivě spíš přínosem, často dokonce životní nutností. Mohou být nezbytnou součástí jejich běžného vývoje, nebo jsou vyvolány stresem. Jak se vlastně liší programované buněčné smrti od těch neprogramovaných? Předně jde o děje fyziologické, jejichž nástup a průběh organismus přísně reguluje. Probíhají podle přesného programu s jasným sledem morfologických a biochemických změn. Vyžadují energii, proteosyntézu, uplatnění specifických genů, transkripci a zapojení speciálních signálních drah, které umožní jejich spuštění a regulují jejich průběh a dokončení. Programovaná buněčná smrt (PCD — angl. Programmed Cell Death) se u eukaryotních organismů vyskytuje v mnoha podobách. I když různé typy PCD mají výše uvedené obecné charakteristiky, jsou vždy řízeny vlastním genetickým programem, takže se jejich průběh může lišit jak spouštěcím mechanismem, tak i morfologickými a biochemickými změnami v jejich průběhu (terminologie vysvětlena v anatomickém slovníku, Živa 2001).



Obr. 1 Fragmentace DNA vyvolaná aplikací  $Cd^{2+}$  u buněk tabákové linie BY-2 (DNA žebříček). M — marker, 1 — kontrolní neošetřené buňky, 2 — nespecifická degradace po jednodenní aplikaci 1 mM kadmia, 3 — buňky po pětidenní aplikaci 50  $\mu M$  kadmia, 4 — buňky po sedmidenní aplikaci 50  $\mu M$  kadmia. Po pěti- a sedmidenní aplikaci vznikají charakteristické štěpy DNA (viz šipky). Foto A. Kuthanová

V souvislosti s pojmem programovaná buněčná smrt se možná nejednomu čtenáři vybaví termín apoptóza. Ale zdaleka ne každý ví, že apoptóza je jen jeden z mnoha zatím popsaných typů programované buněčné smrti. Ačkoli slovo apoptóza původně pochází od rostlin, a sice z řeckého výrazu pro opad květních plátků či listů (apo = od, ptosis = padání), jde o typ PCD probíhající u živočichů. Vyznačuje se několika charakteristickými změnami v buňkách, z nichž některé se vyskytují i u jiných typů PCD. Jednou z prvních pozorovatelných změn je kondenzace cytoplazmy a vznik tzv. pyknotického chromatinu, což jsou shluky DNA natěsnané u vnitřní strany dosud neporušeného jaderného obalu. V jádře přitom většinou dochází ke specifickému štěpení DNA, které probíhá mezi nukleozomy. (Nukleozom je kulovitý útvar tvořený bílkovinným jádrem, kolem něhož se obtáčí dvoušroubovice DNA. Délka úseku DNA obtáčeující histony je poměrně konstantní, tvoří jej 146 párů bází.) Vzniklé fragmenty DNA jsou pak násobky 180 párů bází (bp) a v závislosti na své délce se na elektroforetickém gelu řadí do tzv. apoptotického žebříčku (obr. 1). Štěpení DNA lze obvykle zjistit i histochemicky pomocí tzv. TUNEL reakce. Ta je založena na tom, že detekuje volné 3' -OH konce DNA vzniklé při jejím štěpení (obr. 2). Na jaderné změny navazuje tvorba apoptotických tělísek, což jsou části cytoplazmy s fragmenty jádra a některými buněčnými organelami, obalené jednou či více membránami. Tato tělíška jsou pak pohlcena okolními fagocyty. Kromě apoptózy, která je dosud nejlépe popsaným typem PCD, lze jak u živočichů,



Obr. 2 TUNEL reakce, pomocí níž se detekuje štěpení DNA při programované buněčné smrti (PCD) u rostlinných buněk. A–C: příčné řezy kořenem kukuřice (*Zea mays*), ve kterém je PCD vyvolána nedostatkem kyslíku a předchází odumírání buněk při vzniku lysigenního aerenchymu; D–F: buňky buněčné kultury tabáku (linie BY-2), PCD je vyvolána působením chladu (4 °C); G: detail jádra s pozitivní TUNEL reakcí (šipka) z kořene kukuřice; A, D: kontrolní barvení všech jader fluorescenčním barvivem Hoechst 33258; B, E: barvení pouze těch jader, u kterých došlo ke štěpení DNA a která vykazují pozitivní TUNEL reakci; C, F: složený obrázek A a B, resp. D a E. V růžových jádrech na obr. C (šipka) proběhlo štěpení DNA (pozitivní TUNEL reakce), v modrých jádrech ke štěpení nedošlo. Blíže viz text. Snímky Z. Lenočové, A Kuthanové

tak u rostlin najít řadu dalších typů PCD, které však jsou zejména u rostlin daleko méně poznány. Obvykle u nich byly nalezeny alespoň některé výše popsané znaky apoptózy (obr. 1, 2).

Podíváme-li se do historie, poprvé popsal buněčnou smrt jako fyziologický děj v tkáních obratlovců v r. 1951 A. Gluecksmann. Přívlástek „programovaná“ poprvé použil o několik let později Carl Leopold, který takto označil specifické odumírání buněk u rostlin, kterému tyto organismy vděčí za svůj zdravý vývoj. Donedávna zdědával výzkum PCD u rostlin v pozadí, zastíněn zájmem odborné veřejnosti o tuto problematiku týkající se živočichů, potažmo i člověka. Za roky výzkumů na živočišných organismech bylo zjištěno, že apoptóza se např. odbourávají buňky, které ztratily svou funkci. Příkladem může být ztráta ocasu při přeměně pulce v dospělou žabu. Jiný případ najdeme třeba při přeměně (metamorfóze) hmyzu na dospělého jedince, kdy jsou odstraňovány již nepotřebné buňky. U lidského plodu se takto odstraňují části tkáně, které by jinak vyplňovaly prostory mezi prsty. Tvorba vrstvy odumřelých keratinocytů na povrchu lidské kůže je dalším příkladem. Ke zmínce o významu PCD pro člověka je však nutno dodat, že právě tímto způsobem jsou likvidovány i lidské T-lymfocyty CD4, které napadl virus HIV a změnil jejich morfologii natolik, že se pro ně navázání protilátky a antigenu, jinak jejich běžný úkon, stává smrtelným. Také odumírání neuronů při Huntingtonově, Alzheimerově či Parkinsonově chorobě má na svědomí mj. i apoptóza. Na její obhajobu je však třeba říci, že likviduje i poškozené a potenciálně nebezpečné buňky, jakými jsou např. buňky rakovinné. Na principu podobné apoptóze funguje řada chemoterapeutik.

Signály spouštějící PCD a signální kaskády, které vedou k jejímu dokončení, jsou složité a zdaleka nejsou pro všechny typy PCD přesně známy; zejména u rostlinných organismů je ještě velmi mnoho „bílých míst“. U apoptózy v živočišné buňce je významná kaskáda tzv. kaspázy — specifických enzymů rozkládajících bílkoviny. U rostlin byly nalezeny sekvenčně podobné proteázy, označované jako metakaspázy. Pro mnohé typy PCD rostlin i živočichů je dále společná účast vápenatých iontů ( $Ca^{2+}$ ), oxidu dusnatého (NO), reaktivních forem kyslíku (ROS) a také cytochromu c. Cytochrom c se uvolňuje z mitochondrie a tím mimo jiné způsobuje zablokování přenosu elektronů v mitochondriálním elektrontransportním řetězci, které vede k tvorbě ROS. Fakt, že se zmíněné děje vyskytují i u evolučně dosti vzdálených organismů, vyvolává zatím nezodpovězenou otázku, zda mají různé typy PCD společné znaky u všech eukaryot a zda tedy jde o evolučně konzervovaný proces.

Obr. 3 Případy PCD u rostlin. 1 — smrt inkompatibilního pylu, 2 — smrt synergid, 3 — odumírání megaspor, 4 — odumírání pohlavních orgánů, 5 — pukání prašníků, 6 — odumírání buněk suspensoru, 7 — odumírání endospermu, 8 — stárnutí (senescence) a opad, 9 — vznik lyzigenního aerenchymu, 10 — oddělování buněk kořenové čepičky, 11 — vznik sítkových elementů, 12 — vznik cévních elementů, 13 — hypersenzitivní reakce, 14 — vznik perforovaných a vykrájaných listů. Orig. Z. Lenochová, D. Bartáková

U rostlin se spouštění různých typů PCD a regulace jejich průběhu často účastní fytohormony (např. etylen, gibbereliny, cytokininy).

Rozklad buněčného obsahu a závěr PCD u rostlin může mít několik podob. Jednou z možností je postupný rozklad jednotlivých složek protoplastu poté, co praskne tonoplast a z vakuoly se vylijí hydrolytické enzymy schopné štěpit bílkoviny, nukleové kyseliny a další složky cytoplazmy. Jinou možností je odbourávání jednotlivých organel spolu s cytoplazmou v menších, tzv. autofagických vakuolách neboli autofagosomech, ve kterých jsou přítomny potřebné hydrolytické enzymy. V obou případech následuje kompletní rozložení všech složek buňky, někdy i její buněčné stěny. Po odbourání protoplastu ale nemusí nutně dojít k odbourání buněčné stěny. Tak tomu je např. u buněk tvořících cévní elementy, vodivé dráhy xylému (viz dále). U rostlin se nikdy nesetkáváme s fagocytózou odumřelých buněk, nenajdeme u nich ani žádné specializované fagocyty.

Sledování různých typů rostlinných PCD ukazuje, že tento proces může být často zastaven, nebo že je dokonce vratný. To je také jeden ze znaků, kterými se rostlinné

PCD odlišují od živočišných, kde jednou započatý program PCD už nemůže být přerušen.

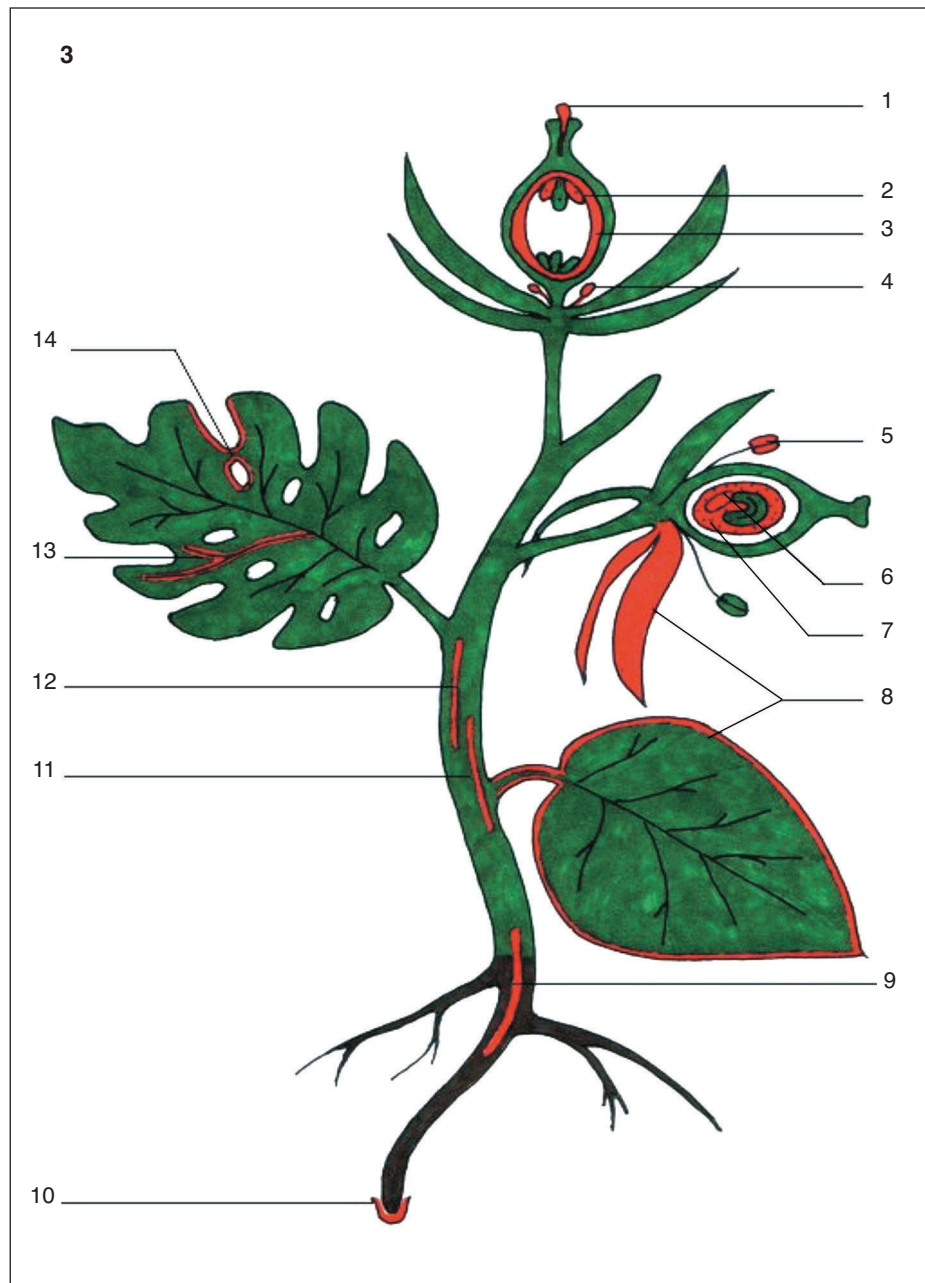
### Kdy se můžeme setkat s PCD u rostlin?

Různé typy PCD mohou být u rostlin buď součástí jejich normálního vývoje, nebo reakcí na působení okolního prostředí (obr. 3).

### PCD jako součást vývoje rostliny

Programovaná buněčná smrt se uplatňuje jak při vývoji vegetativních orgánů, tak i v orgánech generativních při procesech vedoucích k pohlavnímu rozmnožování rostlin.

K PCD dochází hned na počátku vývoje mladé rostliny ze semene, kdy např. odumírá endosperm. Ten se poté, co jsou z jeho buněk využity rezervní látky pro růst nové rostliny, stává nepotřebným. Zvláště zajímavým způsobem probíhá PCD u obiliek trav (obr. 4). Během jejich vývoje se dají velmi záhy rozlišit dvě části endospermu. Ve středu obilky je to škrobový endosperm obklopený buňkami aleuronové vrstvy, ve které jsou uloženy zásobní



bílkoviny. Buňky aleuronové vrstvy zůstávají živé, zatímco buňky škrobového endospermu prodělávají během zrání obilky poté, co se do nich uloží zásobní škrob, zvláštní typ PCD. Odumírají, ale nedochází u nich ani k rozložení jádra, ani ostatních organel. Vnitřní obsah těchto „mumifikovaných“ buněk se činností enzymů vylučovaných buňkami aleuronové vrstvy rozkládá při klíčení obilky, ke kterému může dojít až po řadě let. Jakmile je dokončen rozklad zásobních látek ze škrobového endospermu i z aleuronové vrstvy, buňky aleuronové vrstvy hynou, pravděpodobně rovněž procesem PCD.

Také vznik cévních elementů, buněk specializovaných pro transport vody a rozpuštěných minerálních živin (TĚs, tracheidy a tracheální články — cévice a články cév, Živa 2004, 1: 14–16) je případem rostlinné PCD. Tyto buňky jsou příkladem maximální specializace, jsou plně funkční až po odumření protoplastu. Jejich ontogeneze zakončená vznikem buněk se sekundární lignifikovanou stěnou, postrádajících protoplasty, je příkladem dokonalé koordinace PCD s diferenciací buněk. TĚs vznikají z meristematičkových buněk prokambia nebo kambia. Poté, co přestanou růst, dochází u nich k nerovnoměrnému ztlouštění buněčných stěn a zároveň k syntéze hydrolytických enzymů, které se ukládají do vakuoly. Po dokončení tvorby sekundární stěny praskne tonoplast a obsah vakuoly se smísí s cytoplazmou, která se postupně rozkládá. Rozklad protoplastu je v tomto případě velmi důsledný, dochází k jeho úplné autolýze. Vznikají tak mikrokapilární prostory ohraničené buněčnou stěnou, jimiž je veden transpirační proud. V případě, že by likvidace protoplastu nebyla dokonalá, mohlo by později dojít k ucpání cévních elementů a k jejich vyřazení z funkce. Zajímavé je, že sekundární stěny jsou lignifikovány až po prasknutí tonoplastu, tedy v době, kdy už obsah buňky odumírá. Jako modelový systém bývá pro výzkumy PCD u cévních elementů používána buněčná kultura parenchymatičkových buněk listového fotosyntetického pletiva (mezofylu) ostálky sličné (*Zinnia elegans*). V přítomnosti rostlinných hormonů auxinu a cytokininu (Živa 2001, 3: 105–106) jsou buňky mezofylu donuceny k dosti synchronizované přeměně v buňky TĚs. Vzhledem k tomu, že při vhodném postupu může k této přeměně dojít u 40–60 % buněk, je tento systém nepostradatelným pomocníkem téměř pro všechny výzkumy týkající se vývoje cévních elementů, ať už jde o studium exprese genů, propustnosti tonoplastu či změn v buněčné morfologii. Není bez zajímavosti, že parenchymatičkové buňky jsou podobné přeměny schopné též *in vivo*, tedy v pletivech celé rostliny, v případě, že je poškozen přilehlý cévní svazek.

Zajímavý je osud sítkových elementů, které jsou základní stavební jednotkou floému, pletiva zajišťujícího rozvod asimilátů po rostlině. Dochází v nich k výběrovému odbourávání některých buněčných struktur včetně jádra, čili vlastně k jakési nedokončené PCD. V tomto stavu pak buňky fungují a odumírají až poté, co přestávají fungovat — obvykle po jedné vegetační sezoně.

Zajímavými strukturami podléhajícími PCD jsou i některé chlupy (trichomy) na povrchu listů či stonků. Ty fungují také až

poté, co odumřou a jsou vyplněny vzduchem. Díky tomu mohou např. odrážet světlo a na slunných stanovištích tak zabránit nadměrnému ozáření a přehřátí listu.

PCD se uplatňuje i při vzniku některých siličných nádržek, kde spolu s ukládáním silic a esenciálních olejů dochází k programovanému rozkladu (lyzi) buněk. Asi nejznámějším příkladem je vznik siličných nádržek v oplodí citrusových plodů.

Zvláštním případem PCD je vznik vykrajovaných a perforovaných listů u r. *Monstera*. Tento tvar je následkem odbourání jen několika buněk ve vyvíjejícím se listovém základu (primordiu). Následně „chybějí“ nejen tyto buňky, ale i ty, které by měly vzniknout jejich dělením. Nejde však o běžný způsob vzniku vykrajovaných listů, u většiny rostlin se při jejich vývoji uplatňuje nerovnoměrný růst okrajů čepelí způsobený nestejným množstvím a růstem buněk.

PCD se uplatňuje i v závěrečných fázích života orgánů či pletiv, při jejich stárnutí (senescenci). Je to obvykle pomalý, přesně regulovaný proces, při kterém jsou živiny a jiné užitečné látky odváděny ze stárnoucích pletiv do zásobních nebo reprodukčních orgánů. Dobře je tento proces popsán u listů. V nich se postupně rozkládají zejména bílkoviny a chlorofyl a produkty rozkladu jsou následně transportovány do živých částí rostliny, kde jsou spotřebovány nebo uloženy do zásoby. Chloroplasty se nevratně přeměňují na zvláštní typ plastidů — gerontoplasty. Klesá rychlost fotosyntézy a současně se zvyšuje rychlost dýchání, které poskytuje energii pro všechny procesy spojené se senescencí. Během tohoto procesu vznikají produkty specifických genů, např. enzymy účastnící se degradace proteinů nebo tvorby látek chránících před patogeny. Pro studium senescence jsou důležité některé mutanty nebo genetické varianty, které buď nemohou tvořit některé enzymy nutné pro průběh senescence, nebo mají nástup senescence opožděný. Genetické varianty s opožděným nástupem senescence se označují anglickým termínem stay-green.

Jsou velmi perspektivní v zemědělství, neboť prodloužení doby, po kterou u nich může probíhat fotosyntéza, může za vhodných klimatických podmínek vést k výraznému nárůstu výnosů.

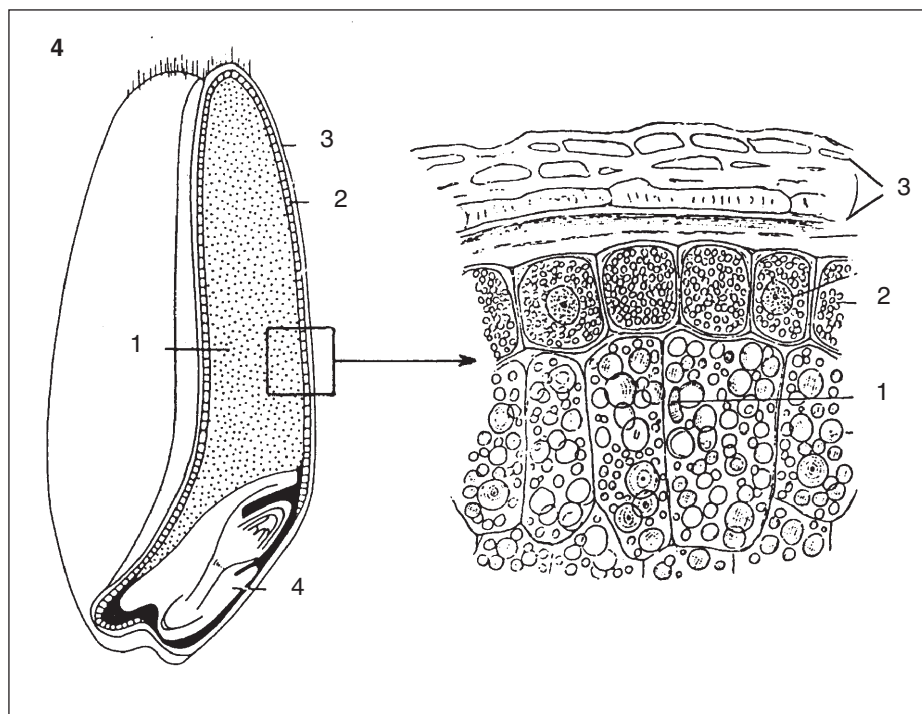
PCD se dále významně uplatňuje i při pohlavním rozmnožování rostlin, a sice při determinaci pohlaví květních orgánů, při tvorbě gamet, při oplození a při vývoji embrya.

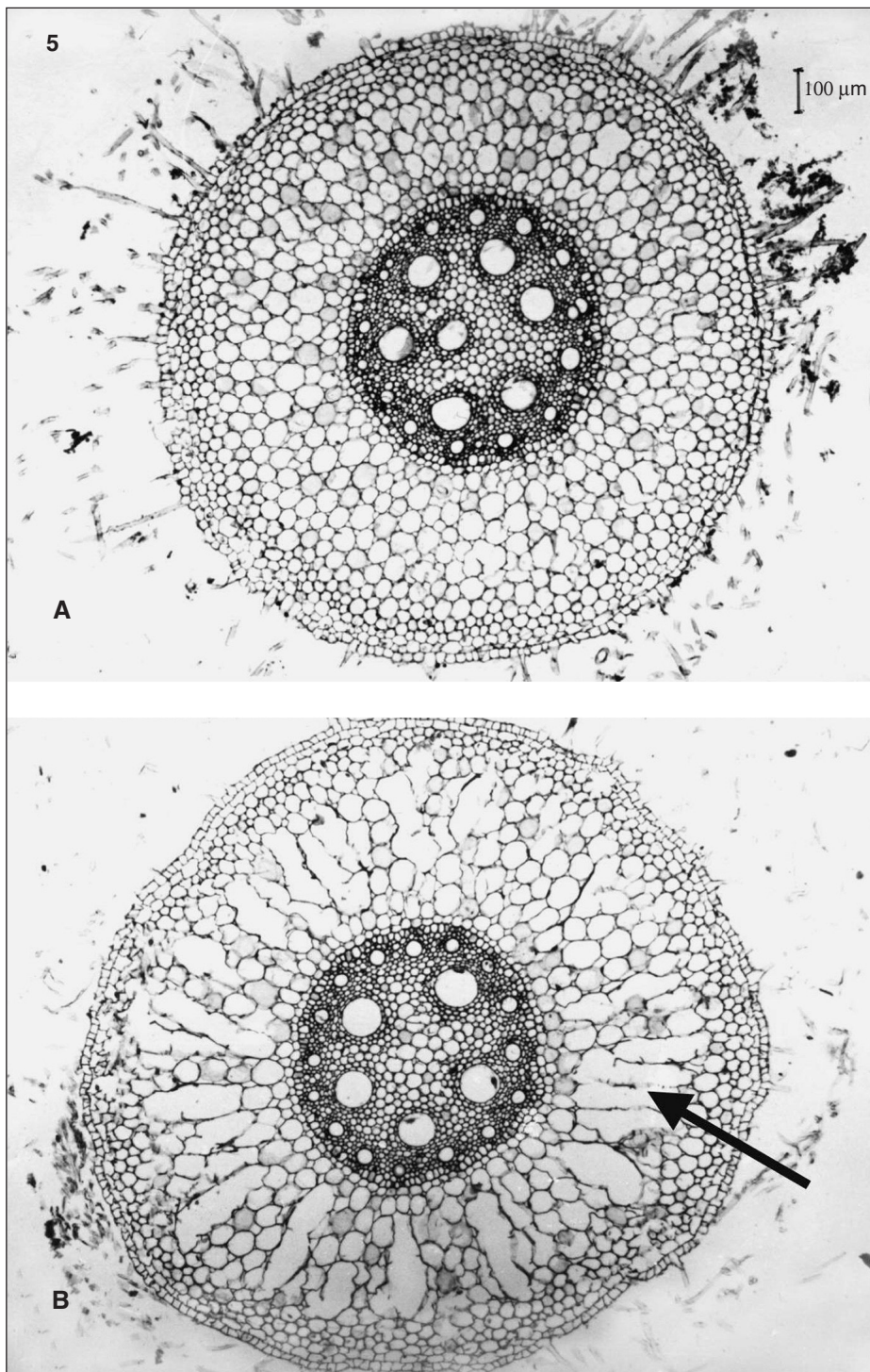
Přestože většina květů je oboupohlavných, tedy obsahujících jak samčí orgány — tyčinky, tak samičí — pestík, setkáváme se i s květy jednopohlavnými. Při vývoji těchto květů jsou však většinou vytvořeny základy jak samčích, tak i samičích orgánů. Před vykvetením jsou pak selektivně odbourány procesem PCD samčí orgány v samičích květech a opačně.

PCD je důležitá i pro správný vývoj uvnitř generativních orgánů. V samičích pohlavních orgánech krytosemenných rostlin je to např. při tvorbě zárodečného vaku. Ten se vyvíjí z megaspor, haploidní buňky vzniklé meiotickým dělením. Tímto dělením však vznikají čtyři buňky. Tři z nich jsou většinou vyřazeny, zřejmě procesem PCD, a v zárodečný vak se vyvíjí jen jedna.

Pylové zrno uvolněné z prašníku klíčí po dosednutí na blíznu v pylovou láčku. V některých případech však brzy následuje smrt pylu. Čnělka pestíku má několik rolí. Jednou z nich je umožnit pylové láčce prorůst až k semeníku, druhou je rozlišení vhodného a nevhodného pylu. Tímto způsobem lze zabránit opylení jiným druhem, ale mnohdy i samoopylení.

*Obr. 4 Schéma stavby obilky trav. Vlevo podélný řez obilkou pšenice (*Triticum aestivum*), vpravo detail jejích povrchových vrstev. 1 — škrobový endosperm, hlavní zásobní pletivo, ve kterém probíhá při zrání obilky zvláštní způsob programované buněčné smrti — PCD (bližší viz text), 2 — buňky aleuronové vrstvy, které obsahují zásobní proteiny a během klíčení produkují enzymy rozkládající jak látky v buňkách škrobového endospermu, tak v aleuronové vrstvě; po odbourání zásob rovněž podléhají PCD, 3 — osemení a oplodí obilky, 4 — embryo. Orig. O. Votrubová, D. Bartáková*





*Obr. 5 Vznik aerenchymu v kořeni kukuřice (Zea mays). A — kořen kukuřice pěstovaný v prokysličovaném médiu, mezi buňkami jsou jen drobné mezibuněčné prostory — interceluláry; B — kořen kukuřice pěstovaný v prostředí s nedostatkem kyslíku (hypoxie). Některé buňky jsou po odumření nabazeny rozsáhlými mezibuněčnými prostory (šipka). Orig. Z. Mašková*

Při opylení prorůstá pylová láčka do zárodečného vaku, kde se uvolní samčí gameta nesená pylovou láčkou. Její cesta k vaječné buňce (samičí gametě) vede přes jednu z podpůrných buněk (synergid), která poté umírá. Zdá se, že zde jsou impulsem k její PCD signály od pylové láčky.

Z oplozené vaječné buňky, zygoty, vzniká posléze embryo. U většiny semenných rostlin je první dělení asymetrické a dává vznik jedné buňce, ze které se vytváří vlastní embryo, a druhé, z níž se vytvoří suspenzor, jenž po určité době obvykle odumírá, opět procesem PCD.

#### PCD vyvolaná vnějšími vlivy

Do této skupiny rostlinných PCD patří např. hypersenzitivní reakce (HR). Je to odpověď rostliny na napadení neinfekčním patogenem (např. houbovým), který rostlina dokáže rozpoznat a právě tímto způsobem

„své buňky, aby zabránila šíření patogenu, je v tomto případě stěžejní. Napadení rostliny virulentním (infekčně účinným) patogenem hypersenzitivní reakci nespustí a dojde k onemocnění. Že opravdu jde o programovaný proces řízený napadenou rostlinou a nikoli o prosté zabití rostlinných buněk patogenem, lze dokumentovat např. tím, že tento proces může u odolných rostlin vyvolat nejenom patogen, ale i preparáty tzv. elicitorů, specifických látek uvolňovaných buď patogenem, nebo samotnou rostlinou po napadení.

Další případ rostlinné PCD vyvolané vlivy okolního prostředí je vznik lyzigenního aerenchymu. Aerenchym je druh parenchymatického pletiva, ve kterém nad buňkami převažují mezibuněčné prostory vyplněné vzduchem (obr. 5). To, že vzniká lyzigenně, znamená, že jsou odstraněny některé buňky umístěné nad sebou. Vzniklé prostory představují potom jakési „potrubí“ zprostředkávající výměnu plynů mezi nadzemní a podzemní částí rostliny. U rostlin, které nejsou adaptovány na zaplavený substrát, tedy u rostlin nemokřadních, se často tvoří aerenchym v primární kůře kořenů jako odpověď na zaplavení, které je doprovázeno nedostatkem kyslíku v půdě. Na vině bývá zatopení vzdušných prostor v půdě v okolí kořenů, kde jsou zbytky kyslíku velmi záhy spotřebovány dýcháním mikroorganismů a podzemních orgánů rostlin. V buňkách primární kůry přitom dochází k fragmentaci DNA v buněčných jádrech, která je detekovatelná TUNEL reakcí (obr. 2).

Pro spuštění PCD vedoucí k tvorbě lyzigenního aerenchymu je nezbytný rostlinný hormon etylen, jehož syntéza stoupá při nedostatku kyslíku. V hypoxických kořenech (s nedostatkem kyslíku) bylo prokázáno zvýšené množství jak etylenu, tak jeho prekurzorů. Krom toho sám exogenně dodaný etylen spouští tvorbu aerenchymu, a to i u rostlin rostoucích v dobře provzdušněném substrátu, a naopak inhibitory tvorby nebo účinku etylenu vznik aerenchymu blokuje i v podmínkách hypoxie. U mnohých mokřadních rostlin, které jsou adaptovány k životu v substrátech s nedostatkem kyslíku, se aerenchym vytváří i tehdy, když tyto rostliny rostou v provzdušněném substrátu. O regulaci jeho vzniku u těchto rostlin se mnoho neví, nicméně je pravděpodobné, že probíhá obdobně (např. u rýže).

Na závěr lze tedy říci, že programovaná buněčná smrt hraje v životě rostlin významnou roli, ať už jde o PCD, která je součástí vývoje rostliny, či o PCD způsobenou vlivy vnějšího prostředí. Ukázali jsme, že procesem PCD jsou odstraňovány buňky poškozené a neschopné řádně fungovat, buňky, které mají v organismu pouze dočasnou funkci, které jsou již nepotřebné nebo které jsou extrémně specializovány a plní své funkce až poté, co u nich dojde k odumření protoplastů. Fenomén PCD, ač u rostlin dlouho opomíjený, je v současné době intenzivně studován a dá se předpokládat, že výzkumy přinesou množství zajímavých informací, které umožní porozumět mechanismu řízení, signalizace i samotného průběhu rostlinné PCD a snad i odhalení dalších případů, v nichž k PCD dochází.

*Tato práce je podporována grantem COST OC 844.20.*