

# Role plazmodezmů ve společenství rostlinných buněk

**Jak mezi sebou komunikují rostlinné buňky? Čím je jejich komunikace umožněna? Jak vypadají mezibuněčné „informační kanály“? Jak jsou rozděleny v rámci rostlinného těla a jaký to má dopad na život rostliny? A jak to víme?**

Pojem plazmodezmus vznikl složením dvou slov antického původu. První část je odvozena od řeckého plasma, stvoření, převedeného pak do latinského slovesa plasmare – vytvořit. Druhá část pochází z řeckého desmos, což znamená vaz, poutko, pojítka. Na základě těchto informací je možné termín přeložit třeba jako ten, který tvoří propojení, nebo jednoduše plazmatické propojení.

A co tedy plazmodezmy jsou? Jde o cytoplazmatické tunely o průměru několika desítek nm, které tvoří propojení buněk v rostlinném těle. Díky nim se mezi buňkami pohybují ionty, metabolity, nukleové kyseliny, proteiny, fytohormony a další signální molekuly mnohem rychleji, než při komplikovaném překonávání celistvé plazmatické membrány pomocí specifických transportních proteinů. Transport přes plazmodezmy je regulovatelný a díky tomu, že někde jsou tato spojení průchozí a jinde alespoň pro některé látky uzavřená, dochází k rozdělení rostlinného těla na symplasticky oddělené celky (tedy takové, mezi

nimiž neexistuje propojení cytoplazmatického obsahu). Mezi nimi může probíhat pouze tzv. transport apoplastický, tedy prostřednictvím kapilárních sítí mezi jednotlivými vláknitými složkami buněčných stěn. Jeho možnosti, především co do velikosti procházejících látek, jsou však omezené. Kromě role transportní mají tedy plazmodezmy a jejich stav a počet také vliv na růst a vývoj rostliny, o čemž se přesvědčíme níže.

## Obyčejná díra ve stěně?

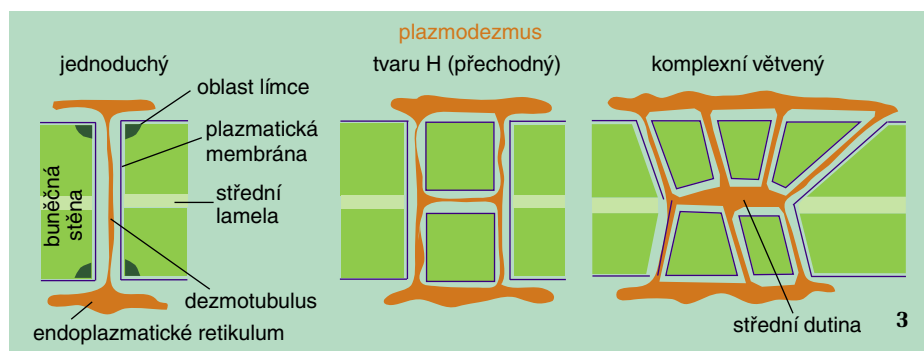
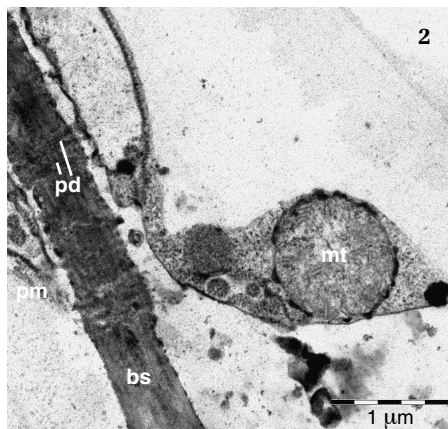
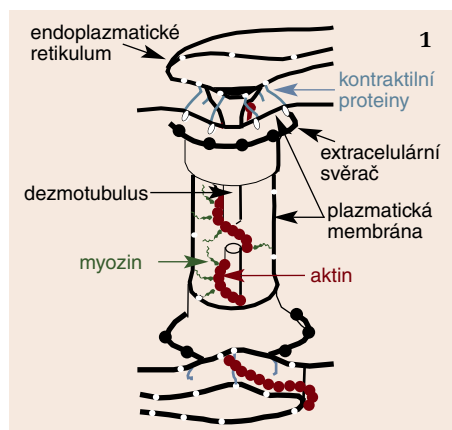
Na první pohled by se plazmodezmus mohl skutečně zdát jako obyčejná „díra v buněčné stěně“. Při bližším ohledání zjistíme, že je tento okrouhlý tunel vystlán „rukávem“ tvořeným plazmatickou membránou propojující sousední buňky. Na obou okrajích buněčné stěny, kterou prochází, je obvykle zúžený do tzv. krčků, mezi krčky se nachází centrální dutina. Tato dutina však není tak docela dutá, vyplňuje ji cytoplazma (používá se termín cytoplazmatický rukáv), jejím středem se

táhne svinutá membrána endoplazmatického retikula (ER), tzv. dezmotubulus, a mezi ním a plazmatickou membránou se vyskytuje řada proteinů (obr. 1, 2).

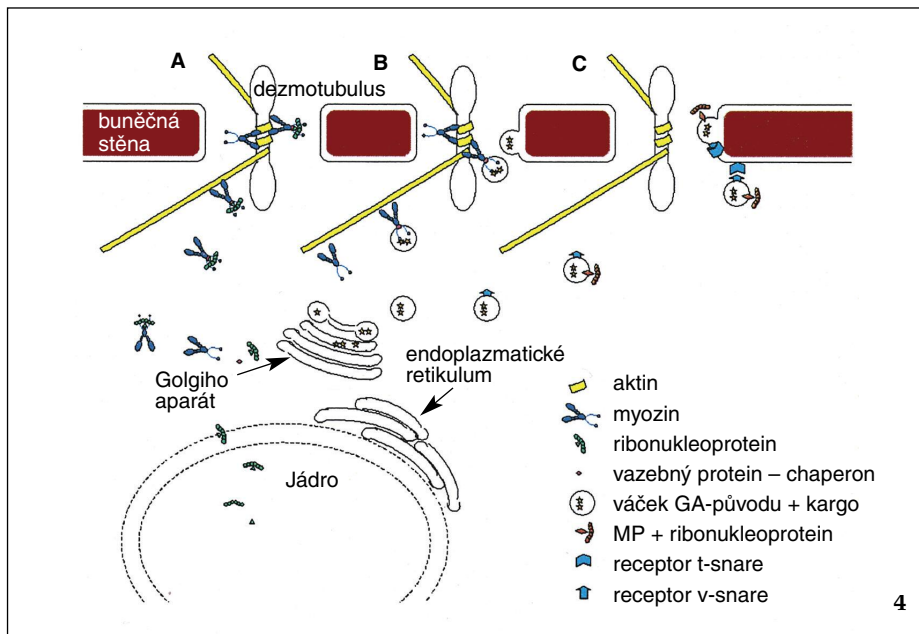
Abychom si situaci lehce zkomplikovali, dodejme, že lze rozlišit různé typy plazmodezmů – primární a sekundární, dále jednoduché, větvené, splynuvší, uzavřené či degradované. Zásadní rozdíl mezi plazmodezmy primárními a sekundárními tkví v tom, že zatímco první z nich jsou utvářeny ve vznikající buněčné destičce při cytokinezi, druhé se tvoří v již existující buněčné stěně zcela *de novo*, na místech, kde předtím mezibuněčné spojení neexistovalo. Jako typické příklady bývají uváděny plazmodezmy mezi buňkami v buněčné kultuře, mezi buňkami podnože a rouby nebo na přechodu mezi buňkami parazita a jeho hostitele, ale je pravděpodobné, že takováto spojení vznikají i mezi sousedními buňkami vyvíjejícího se pletiva. Ačkoli i u primárních plazmodezmů může v průběhu vývoje dojít k dalším strukturálním modifikacím, jako je vznik větvených či splyvajících plazmodezmů, bývají větvené a komplexní spíše plazmodezmy sekundární (obr. 3).

Budeme-li chtít sledovat strukturu typického plazmodezmu detailněji, musíme se v našem pozorování „snížit“ na molekulární úroveň, abychom se mohli seznámit s jednotlivými přítomnými proteiny. Nejznámějšími z nich jsou asi aktin a myozin, typičtí představitelé buněčného cytoskeletu (jakési dynamické vnitřní kostry buňky). Aktin se zde vyskytuje ve své vláknité formě (F-aktin) a obtáčí se kolem dezmotubulu, na něj jsou napojeny paprscitě uspořádané molekuly myozinu, které se zřejmě podílejí na mezibuněčném transportu, a to buď jako molekulové „motory“, (vážou břemena v podobě membránových váčků a díky dodané energii se s nimi pohybují po vlákně cytoskeletu) nebo na základě toho, že jsou napojeny na plazmatickou membránu. Cytoplazmatický prostor mezi dezmotubulem a plazmatickou membránou tak připomíná síto s cca čtyřnanometrovými kanálky, jejichž aktuální průsvit má dopad na průchodnost plazmodezmu pro různé látky (obr. 1, 2).

V plazmodezmech byl nalezen i pro rostlinu specifický myozin VIII, regulovaný vápenatými ionty. Jelikož byly v oblasti plazmodezmů zjištěny i další proteiny spojené s uspořádáním aktinu, nahlížejí někteří autoři na tato místa jako na aktin-organizující centra. Z evolučního hlediska jistě stojí za zmínku, že přítomnost F-aktinu byla prokázána i v živočišných buňkách pěstovaných *in vitro*, v tenkých trubicovitých útvarech označovaných anglicky jako



- 1 Model plazmodezmu zachycující lokalizaci aktinu, myozinu, kontraktilních proteinů a proteinů tvořících „svěrač“ v oblasti krčku. Upraveno podle R. L. Overall a L. M. Blackman (1996)  
 2 Snímek plazmodezmu na podélném řezu z transmisního elektronového mikroskopu: pd – plazmodezmy, pm – plazmatická membrána, mt – mitochondrie, bs – buněčná stěna. Foto Z. Lenočková  
 3 Vznik větvených plazmodezmů. Upraveno podle A. G. Roberts a K. J. Oparka (2003)



4 Schéma transportu prostřednictvím plazmodezmu. Vysvětlení v textu. Upraveno podle K. J. Oparka a kol. (2004)

5 Transport fluoresceinu „propuštěného z klece“ v buňkách pokožky suknice cibule. Sekvence snímků pořízených 10, 30 a 100 sekund po ozáření buňky v centru snímků. Foto H. J. Martens a kol. (2004), se svolením autorů

6 Šíření fluorescenčně značeného dextransu v primární kůře kořene rýže (příčný řez). Dextran byl injekčně vpraven do buňky č. 2, odkud se radiálně šířil směrem ke středu i povrchu kořene. Upraveno podle P. K. Samarajewa a kol. (1999) a M. Kawai a kol. (1998)

tunnelling nanotubes (obr. 9). Bylo dokonce pozorováno, že prostřednictvím těchto cytoplazmatických „brček“, která krátkodobě propojují sousední buňky, dochází k pohybu váčků asociovaných s myozinem.

Nyní ještě pár slov o ostatních proteinech vyskytujících se v oblasti plazmodezmu. Mnohé z nich jsou spojené s funkcí vápenatých iontů, např. kalretikulín, lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu (váže  $Ca^{2+}$ ), centrin, považovaný za jeden z regulátorů průchodnosti plazmodezmu (nachází se v oblasti krčku a na zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  reaguje kontrakcí), či kalmmodulin. V rámci desmotubulu byly detekovány různé proteiny, které jsou zřejmě pohyblivé v rámci membrány i „spolu s ní“ – hovořit pak můžeme o tzv. tekuté membráně desmotubulu. Těchto proteinů využívají některé molekuly, které se jimi nechají „provézt“ plazmodezmem. Dále v plazmodezmu narazíme na kinázy (účastní se fosforylací) asociované s buněčnou stěnou, pektin-metyl-esterázy (enzymy,

které mění propojení složek buněčné stěny) interagující s některými transportovanými molekulami a ubikvitin, pravděpodobně se účastnící degradace plazmodezmu či alespoň některých jejích proteinů. Nеспециfikované proteiny se vyskytují také v oblasti mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou, kde tvoří trny propojující tyto dvě vrstvy.

Zvláštní strukturou, která pravděpodobně s plazmodezmy souvisí, jsou tzv. cytoplazmatické kanály, perforace buněčné stěny o velikosti desítek až stovek nanometrů, tedy řádově  $10\times$  širší než plazmodezmy. Díky nim mohou mezi buňkami procházet nejen makromolekuly, ale i organely, a to nejen drobné ribozomy, ale i mitochondrie, plastidy a nežírdka i buněčná jádra. Původ a funkce cytoplazmatických kanálů jsou zatím málo probádány, uvážíme se jak o vzniku v podstatě náhodném (defektní cytokineze), tak daném splýváním plazmodezmu nebo činností lytických enzymů schopných degradovat buněčnou stěnu. Jejich přítomnost ve stárnoucích orgánech naznačuje možnost transportu z odumírajících buněk do živých, jinde, např. u mikrosporocytů, by mohlo jít o způsob, jak se „podělit“ o organely ještě během cytokineze, tedy dělení buněk.

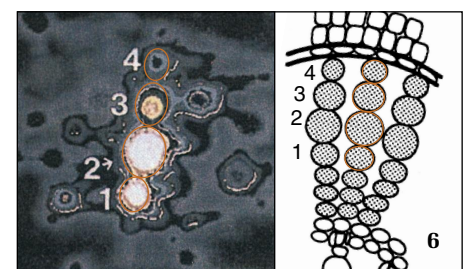
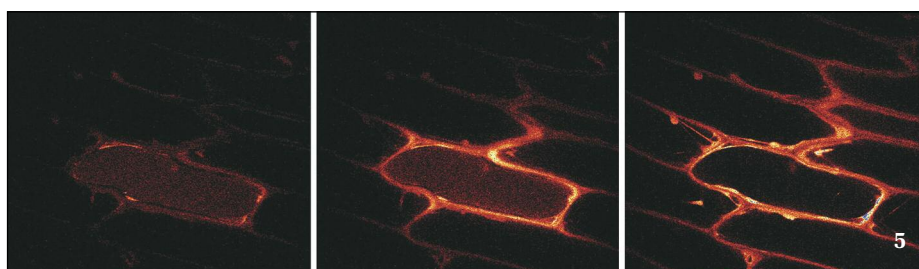
#### Plazmodezme, otevři se!

Jak již bylo řečeno, plazmodezmy slouží k mezibuněčnému, tzv. symplastickému transportu. Maximální velikost molekul, které mohou tím kterým plazmodezmem projít, se vyjadřuje jako tzv. size exclusion limit (SEL). Je třeba zdůraznit, že SEL plazmodezmu pro určité pletivo se udává pro transport necílený. O transportu cíleném se zmíníme dále. SEL je dán lokalizací pleti-

va i samotné buňky, vývojovým stadiem rostliny i jejím fyziologickým stavem, je regulovatelný a jako maximum bývá uváděno 60 kDa. Ke konkrétním případům se dostaneme v části věnované symplastickým doménám. Propustnost plazmodezmu je regulována jednak již popisovanými proteiny lokalizovanými v plazmodezmu, jednak vratným ukládáním polysacharidu kalózy do prostoru mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Lokalizace tohoto polysacharidu je typickým oříškem rostlinné mikrotechniky, protože k depozici kalózy dochází často v odpovědi na mechanické či patogenní poškození rostliny, a to během několika sekund. Příprava preparátu dokumentujícího přirozené ucpání plazmodezmu kalózou proto není snadnou záležitostí.

A jak se různé látky skrz plazmodezmy pohybují? Asimiláty, další drobné molekuly a makromolekuly do velikosti dané SEL procházejí z buňky do buňky difúzí, po koncentračním spádu. Makromolekuly, které se pohybují cíleně a mají „napsáno na čele“, že jsou určeny pro dopravu přes plazmodezmu, se do vedlejší buňky prosoukají aktivně, a to často i přesto, že jejich velikost je větší než SEL daného plazmodezmu (obr. 7). Mezi takovéto molekuly patří např. transkripční faktory, které mohou být určeny pro regulaci transkripce v jiné buňce, než ve které byly syntetizovány. Dalším příkladem je RNA, která se může pohybovat po rostlině a buď se překládá jinde než ve své „rodné“ buňce, nebo může být použita k jevu označovanému jako umlčování genů (gene silencing), což je umlčování jiných RNA na základě vzájemné kompatibility těchto molekul a „cestující“ RNA. Poněkud zvláštním případem makromolekul mířících do plazmodezmu jsou proteiny sloužící k pohybu (movement proteins – MP). Jejich hlavní odlišností je skutečnost, že jsou virového původu, slouží tedy virům k systémovému ovládnutí rostliny. Často s sebou nesou též virovou genetickou informaci. Právě tyto proteiny se hojně využívají při studiu symplastického transportu v rostlinách.

Vyvstává otázka, jak je zajištěno, že zmíněné makromolekuly nejen neomylně najdou plazmodezmy, ale navíc se jimi s většími či menšími potížemi provedou. Budeme-li vycházet z uznávaných teorií, zodpovězení se dočkáme (obr. 4). Odpověď na první část otázky logicky vyplývá jednak z obecného způsobu transportu látek uvnitř buňky, jednak z toho, jak vypadá plazmodezmu. Po aktinové složce cytoskeletu se makromolekuly mohou pohybovat prostřednictvím myozinových molekul, na které jsou navázány pomocí proteinu chaperonu, a to jak přímo, tak uzavřené v membránovém váčku (obr. 4 A, B). Druhý způsob transportu (obr. 4 C) je



založen na tom, že v membráně váčku pohyblivého se v cytoplazmě je začleněn speciální protein, tzv. v-snare, který „zapadne“ do receptoru t-snare umístěného v plazmatické membráně. Je-li daný t-snare lokalizován v blízkosti plazmodezmu, makromolekula takový váček využije, naváže se na něj a spolu s jeho membránou se nechá začlenit do plazmalemy u svého cíle, plazmodezmu. Další transport, tedy skrz kanál plazmodezmu, se pak odehrává buď interakcí s aktinem a dalšími proteiny, nebo endocytózou do sousední buňky. Pro úplnost zbývá dodat, že pravděpodobně existují i látky lipidického charakteru, které plazmodezmem cestují díky pohybu v membráně dezmotubulu.

### Jak zkoumat plazmodezmy?

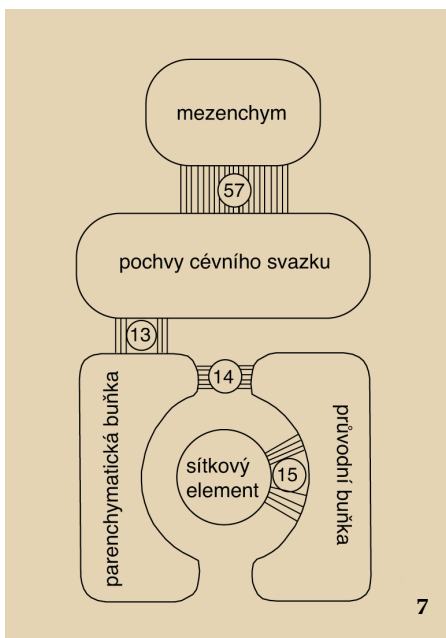
Známa fakta popisující plazmodezmy a jejich funkci jsou plodem široké škály metod sahající od elektronové mikroskopie přes využití fluorescenčních sond o různé velikosti až po přípravu transgenních rostlin.

Výstupem úmorného počítání plazmodezmů na přesně lokalizovaných elektronmikroskopických snímcích jsou obvykle plazmodezmoznamy (obr. 7), vyznačující četnost a často i funkčnost cytoplazmatických spojení mezi buňkami různých typů. Fluorescenčně značené dextrany o různých velikostech, vpravované do rostliny infiltrací do poškozeného pletiva nebo mikroinjekcí, se používají např. pro studium vývojových změn v průchodnosti plazmodezmů. Jako nejméně invazivní se jeví nově zaváděná metodika, při níž se používá tzv. fluorescein v kleci (caged fluorescein). Tato látka (nebo další fluorofory) je do rostliny infiltrována v neaktivní formě a fluorescenčně aktivní se stává až po odštěpení o-nitrobenzylových zbytků, ke kterému dojde cíleným ozářením některé buňky nebo skupiny buněk. Vzniká tak efektivní model pro sledování symplastického transportu z ozářených buněk do jejich okolí (obr. 5). Symplastické propojení rostlinných buněk lze sledovat také díky dočasné nebo trvalé expresi zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), nežádka spojeného s expresí či přímým transportem dalšího proteinu, jakým může být některý virový membránový protein nebo rostlinný transkripční faktor.

### Spolupráce, individualismus, nucená izolace

S informacemi o stavbě plazmodezmu a transportu skrz něj můžeme přistoupit k „sociální“ roli plazmodezmů, k jejich schopnosti rostlinné buňky nejen propojovat, ale v podstatě i oddělovat. Řeč bude o symplastických doménách (symplasticky zcela oddělených od zbytku rostlinného těla) a symplastických polích (izolovaných dočasně, dynamicky).

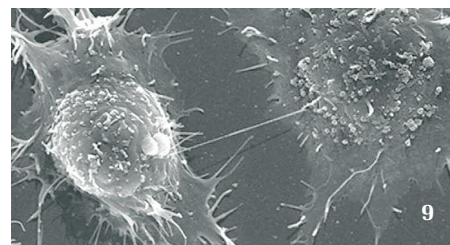
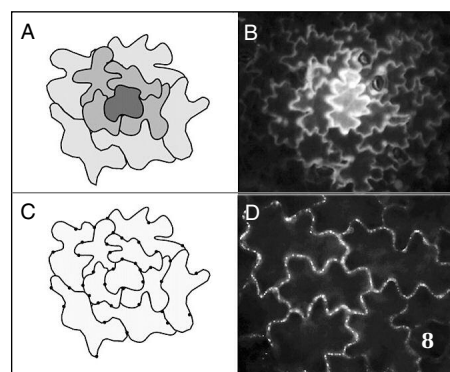
Ve vývoji totipotentní rostlinné buňky (schopné dediferenciace a diferenciaci v buňku jiného typu) hraje významnou roli tzv. poziciční informace, místo, kde se buňka v rámci rostlinného těla nachází. Je tedy zřejmé, že mezi sousedními buňkami sdílejícími stejný osud musí probíhat komunikace, která je odlišná od komunikace s buňkami ostatními. Takovou výměnu informací umožňují plazmodezmy, jejich četnost, funkčnost a SEL. Asi



nepřekvapí, že se tyto parametry v průběhu vývoje rostliny či v její reakci na vnější vlivy mění a dávají vzniknout již zmíněným symplastickým doménám a polím.

Pracovně si tyto symplastické celky můžeme rozdělit na ty, které jsou od zbytku rostlinného těla odděleny z důvodu specifické funkce, dále pak na ty, které se mění v průběhu ontogeneze, a jako poslední skupinu vyčleňme ty, jejichž vznik indukuje vnější působení. Do první skupiny patří osmoticky autonomní svěrací buňky průduchů, izolované od okolních epidermálních buněk uzavřenými plazmodezmy. Pro jejich správnou funkci je bezpodmínečně nutné, aby mohly měnit svůj vnitřní tlak (turgor) bez ohledu na okolní buňky. Dalším příkladem může být komplex článku sítkovic a průvodní buňky, který je u rostlin využívajících apoplastické naplňování lýka cukrem od okolního pletiva izolován, ale o to více symplastických propojení (ve formě specificky větvených plazmodezmů) se nachází mezi těmito dvěma buňkami. Obě totiž vznikly z jedné buňky mateřské, avšak zatímco sítkový element v průběhu vývoje přišel o všechny své ribozomy, Golgiho aparát, vakuoly, ba i jádro, buňka průvodní je všemi organelami plně vybavena a pro svou ochuzenou sestru představuje nepostradatelný zdroj proteinů a dalších látek. Nově se ukazuje, že by se do této skupiny mohly zařadit i buňky primární kůry některých mokřadních rostlin, které jsou radiálně symplasticky propojené. Zdá se, že na základě tohoto propojení se může šířit signál spouštějící programované odbourání právě jen některých řad těchto buněk a vznik lyzigenního aerenchymu v kořenech (Živa 2004, 5: 194–197).

Vznik a zánik symplastických domén během vývoje rostliny je dán změnami v SEL, jako je tomu např. při přechodu embrya huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) do torpédovitého stadia nebo při přechodu listu z pletiva energeticky závislého (sinku) na zdroj, který již nepotřebuje přijímat látky přicházející floémem. V obou těchto příkladech jde o snížení SEL a tedy vznik nově oddělených symplastických domén. Jiným příkladem může být uzavírání plazmodezmů v listových



7 Plazmodezmoznam znázorňující symplastické kontinuum od listového mezenchymu přes buňku pochvy cévního svazku až po sítkový element, četnými plazmodezmy propojený s buňkou průvodní a izolovaný od buňky parenchymatické. Čísla uvádějí počet plazmodezmů nalezených mezi danými buňkami. Upraveno podle C. E. J. Botha a kol. (1992)

8 Rozdíl mezi cíleným (C, D) a necíleným (A, B) transportem v pokožkových buňkách. DNA pro syntézu zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) byla „vstřelena“ do buňky ve středu snímku. Cíleného transportu bylo dosaženo jejím spojením s DNA pro virový membránový protein, díky čemuž GFP signál nevykazuje v buňkách gradient, ale okamžitě míří do oblastí s plazmodezmy, v nichž tvoří typické tečky. Foto P. Zambryski a K. Crawford (2000), se svolením autorů

9 Trubicovité útvary zvané tunnelling nanotubes, které krátkodobě propojují sousední buňky v kultuře živočišných buněk. Foto F. Baluška (2004), se svolením autora

pupenech při jejich přechodu do dormance, díky němuž je dočasně izolován meristém. Opětovné obnovení průchodnosti těchto plazmodezmů má za následek další růst pupene a jeho přeměnu v listy.

Jako nucenou izolaci pak můžeme označit odříznutí buněk i celých pletiv od zbytku rostliny v reakci na mechanické poranění, při němž hraje roli změna vnitřního tlaku v buňce, na útok patogena z říše virů i hub či dokonce na působení některých toxických látek, jakými mohou být např. ionty hliníku.

Plazmodezmy tedy nepředstavují pouhý otvor v buněčné stěně, jsou to rafinovaně stavěné, regulovatelné a značně flexibilní útvary umožňující rostlině šíření životně důležitých látek, zdravý vývoj i vhodnou reakci na působení vnějšího prostředí, ačkoli jsou zároveň i potenciálními průchody pro šíření infekcí. Toto nebezpečí se odráží v rostlinných protiopatřeních ve formě malých molekul mRNA schopných umlčet virové RNA, či bleskurychlého uzavírání napadených cest.