

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ROSTLIN**

**INDUKCE A DETEKCE PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI (PCD)
V BUNĚČNÝCH LINÍCH TABÁKU**

ANDREA KUTHANOVÁ

DIZERTAČNÍ PRÁCE



PRAHA 2008

Školitel: Prof. RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc.
Konzultanti: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.
RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
RNDr. Sylva Zelenková, CSc.

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. Zdeňka Opatrného v letech 2000-2008 a že nebyla předložena jako dizertační práce na žádné jiné vysoké škole.

V Praze dne 28. 3. 2008

Andrea Kuthanová



Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni při vypracování předkládané dizertační práce, jmenovitě pak:

Prof. Zdeňku Opatrnému za přivedení k zajímavému tématu – tj. programované buněčné smrti u rostlinných kultur a nadchnutí pro studium tohoto procesu; za vedení práce, podnětné diskuze a za korektury předkládaného textu.

Dr. Lukáši Fischerovi za cenné konzultace, diskuze a rady při vypracování práce. A také za korektury konečného textu.

Dr. Heleně Lipavské a Dr. Petře Maškové za kvantitativní stanovení škrobu v dodaných vzorcích.

Dr. Zuzaně Lenochové za TEM dodaných vzorků a za diskuze nad TUNEL reakci.

Dr. Kateřině Schwarzerové a Dr. Janu Petráškoví za poskytnutí transgenních linií BY-2/GT16 a BY-2/TGFP3 a občasné podnětné konzultace.

Prof. Seiichiro Hasezawovi za poskytnutí trasgenní linie BY/GV7.

Mgr. Ondřeji Smetanovi za přínosné (živé) diskuze nad tématem a za to že je takový kamarád.

Doc. Jaromíru Kutíkovi za diskuze nad elektronmikroskopickými obrázky.

Celé Laboratoři buněčné biologie a biotechnologie za vytvoření přátelského tvůrčího prostředí (jmenovitě Evě, Erice, Halce, Janě, Lenkám, Mirkovi a Zdeňkovi) a všem ostatním nejmenovaným za cenné diskuze nad tématy mé dizertační práce.

Nakonec bych ráda poděkovala svým rodičům a hlavně manželovi Braňovi za obrovskou trpělivost a podporu během studia.

Práce byla vypracována za finanční podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (VS 96145, LN00A081, MSM1131000003 a MSM0021620858) a programem COST (OC 844.20).

OBSAH

OBSAH	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	12
1. ÚVOD	15
2. CÍLE PRÁCE	17
3. LITERÁRNÍ ÚVOD	19
3.1. Programovaná a neprogramovaná buněčná smrt – základní pojmy	19
3.1.1. Morfotyp I. - apoptotická buněčná smrt.....	19
3.1.2. Morfotyp II. - autofagie nebo také cytoplazmaticky degenerativní buněčná smrt.....	19
3.1.3. Morfotyp III. - tzv. lyzozomálně degenerativní buněčná smrt.....	21
3.1.4. Paraptóza.....	22
3.1.5. Mitotická katastrofa.....	22
3.1.6. Onkóza nebo také onkotická buněčná smrt.....	22
3.1.7. Neprogramovaná buněčná smrt či nekontrolovaná buněčná smrt.....	23
3.2. Molekulární mechanizmy a signální dráha vedoucí k PCD	23
3.2.1. Regulační mechanizmy signálů při apoptóze.....	23
3.2.2. Proteolytické enzymy a apoptóza.....	24
3.2.2.1. Živočišný model.....	24
3.2.2.2. Rostlinný model.....	27
3.2.2.2.1. Serinové a neutrální proteázy.....	28
3.2.2.2.2. Cysteinové proteázy.....	29
3.2.2.2.3. Aspartátové proteázy.....	33
3.2.2.2.4. Metaloendopeptidázy.....	33
3.2.2.2.5. Treoninové proteázy.....	33
3.2.2.2.6. Endonukleázy.....	34
3.2.3. Rodina Bel-2.....	35
3.2.3.1. Živočišný model.....	36
3.2.3.2. Rostlinný model.....	36
3.3. Buněčný cyklus a PCD	38
3.3.1. Buněčný cyklus – základní pojmy.....	38
3.3.2. PCD a buněčný cyklus u živočišných buněk.....	39
3.3.3. PCD a buněčný cyklus u rostlinných buněk.....	39
3.4. Degradace organel během PCD	40
3.4.1. Buněčné jádro.....	40
3.4.2. Golgiho komplex (GK).....	42
3.4.3. Endoplazmatické retikulum (ER).....	42
3.4.4. Mitochondrie.....	43
3.4.5. Vakuoly.....	44

3.4.6. Plastidy	45
3.4.7. Plazmatická membrána	45
3.5. PCD ve vývoji rostlin	46
3.5.1. PCD při vegetativním vývoji rostlin	46
3.5.1.1. Aleuronová vrstva a endosperm	46
3.5.1.2. Tracheální elementy	47
3.5.1.3. Autolýza floémových buněk	50
3.5.1.4. PCD během somatické embryogeneze	50
3.5.1.5. Umírání buněk kořenové čepičky	50
3.5.1.6. Vykrajování listů	51
3.5.1.7. Opad listů	51
3.5.1.8. Senescence	52
3.5.2. PCD při generativním vývoji rostlin	53
3.5.2.1. Květní orgány	53
3.5.2.2. Gametofyty	53
3.5.2.3. Opylení a oplození	54
3.5.2.4. Smrt suspenzoru	54
3.6. PCD a stres u rostlin	55
3.6.1. Biotický	55
3.6.1.1. Patogeny	55
3.6.1.1.1. Hypersenzitivní reakce	55
3.6.2. Abiotický stres	57
3.6.2.1. Vznik lyzigenního aerenchymu	57
3.6.2.2. Složky znečišťující atmosféru	58
3.6.2.3. UV záření a ozáření	59
3.6.2.4. Teplotní ovlivnění buněk	59
3.6.2.5. Toxické ionty	60
3.7. Metody studia programované buněčné smrti	62
4. MATERIÁL A METODY	65
4.1. Materiál	65
4.1.1. Buněčná linie BY-2	65
4.1.2. Buněčná linie BY-2/HDEL	66
4.1.3. Buněčná linie BY-GT16	66
4.1.4. Buněčná linie BY-2/TGFP3	66
4.1.5. Buněčná linie BY-GV7	66
4.2. Metody	66
4.2.1. Kultivace buněčných kultur	66
4.2.1.1. Stresové působení	66
4.2.1.1.1. Indukce buněčné smrti pomocí rychlého zabíjení	67

4.2.2. Viabilita buněk	68
4.2.3. Barvení jader a mitotický index	68
4.2.3.1. Barvení jader	68
4.2.3.2. Mitotický index	69
4.2.4. Měření délky a šířky buněk	69
4.2.5. Vizualizace vakuol <i>in vivo</i>	69
4.2.5.1. Barvení tonoplastu lipidickou sondou FM4-64	69
4.2.5. Vizualizace vakuol za použití transgenní linie BY/GV7	69
4.2.6. Vizualizace endoplazmatického retikula <i>in vivo</i>	69
4.2.7. Vizualizace cytoskeletu	70
4.2.7.1. Vizualizace mikrotubulárního cytoskeletu <i>in vivo</i>	70
4.2.7.2. Imunochemická metoda vizualizace tubulinu	70
4.2.7.3. Značení aktinu	71
4.2.7.4. Vizualizace aktinového cytoskeletu <i>in vivo</i>	72
4.2.8. Příprava protoplastů	72
4.2.9. Izolace jader	72
4.2.10. Synchronizace buněk BY-2	73
4.2.11. Hodnocení fragmentace DNA	73
4.2.11.1. Izolace chromozomální DNA	73
4.2.11.1.1. Měření koncentrace	74
4.2.11.1.2. Výpočet nanášení	74
4.2.11.1.3. Elektroforéza DNA	74
4.2.11.2. TUNEL reakce	75
4.2.12. Transmisní elektronová mikroskopie	76
4.2.13. Kvantitativní stanovení škrobu	76
4.2.14. Dokumentace a archivace obrazu	76
4.2.14.1. Mikroskopie	76
4.2.14.2. Digitální archivace dat a obrazová analýza	76
4.2.15. Statistické hodnocení dat	77
5. VÝSLEDKY	79
5.1. Indukce programované buněčné smrti	79
5.1.1. Chladový stres (4°C)	79
5.1.1.1. Viabilita buněk	79
5.1.1.2. Stav vakuomu / cytoplazmatické sítě	79
5.1.1.3. Morfologie buněk	81
5.1.1.3.1 Tvarové změny buněk	81
5.1.1.3.2. Morfologie jader	81
5.1.1.4. Fragmentace DNA	81
5.1.1.4.1. TUNEL reakce	81

5.1.1.4.2. Elektroforetická detekce	81
5.1.1.5. Změny v uspořádání aktinového cytoskeletu	84
5.1.2. Vliv kadmia	85
5.1.2.1. Viabilita buněk	85
5.1.2.2. Morfologie buněk	87
5.1.2.2.1. Tvarové změny buněk	87
5.1.2.2.2. Granulace cytoplazmy	88
5.1.2.2.3. Stav vakuom / cytoplazmatické sítě	91
5.1.2.2.4. Endoplazmatické retikulum	93
5.1.2.2.5. Ultrastruktura ovlivněných buněk	94
5.1.2.2.6. Morfologie jader	96
5.1.2.3. Fragmentace DNA	98
5.1.2.3.1. TUNEL reakce	98
5.1.2.3.2. Elektroforetická detekce	99
5.1.2.4. Cytoskelet	99
5.1.2.4.1. Aktinový cytoskelet	99
5.1.2.4.2. Mikrotubulární cytoskelet	102
5.2. Rychlá buněčná smrt	104
5.2.1. Fragmentace DNA	104
5.2.1.1. Elektroforetická detekce	104
5.2.1.2. TUNEL reakce	104
5.2.2. Morfologie umírajících / mrtvých buněk	106
5.2.3. Inhibitory proteáz	108
5.3. Buněčný cyklus a programovaná buněčná smrt	109
5.3.1. Citlivost dílčích fází buněčného cyklu	109
5.3.1.1. Účinky synchronizačních látek	109
5.3.1.1.1. Průběh synchronizace	109
5.3.1.2. Účinek iontů kadmia na dynamiku buněčného cyklu	110
5.3.1.2.1. Viabilita	111
5.3.1.2.2. Fragmentace DNA	112
5.3.1.2.2.1. TUNEL reakce	112
5.3.1.2.2.2. Elektroforetická detekce	113
5.3.1.2.3. Změny v morfologii jader	114
5.4. Prodlužování jader	115
5.4.1. Prodlužování jader po aplikaci HU a APC	115
5.4.1.1. Vliv buněčné stěny	115
5.4.1.2. Vliv cytoskeletu	119
5.4.1.2.1. Mikrotubulární cytoskelet	120

5.4.1.2.2. Aktinová filamenta	122
5.4.1.2.3. Jaderný cytoskelet - intermediální filamenta	124
6. DISKUZE	125
6.1. Buněčná smrt u tabákové linie BY-2	125
6.1.1. Viabilita buněk - buňky živé, mrtvé nebo něco mezi tím	126
6.2. Abiotický stres jako induktor PCD u buněk BY-2	127
6.2.1. Koncentrační závislost stresové odpovědi na působení kadmia	127
6.2.2. Cytologické hodnocení	127
6.2.2.1. Zastavení mitotické aktivity buněk	127
6.2.2.2. Prodlužování buněk	127
6.2.2.3. Granulace cytoplazmy	128
6.2.2.4. Vakuolizace cytoplazmy	129
6.2.2.5. Změny v architektuře endoplazmatického retikula	129
6.2.2.6. Morfologie jader	130
6.2.2.7. Souhrn cytologických pozorování	132
6.2.3. Fragmentace DNA	132
6.3. Rychlé zabíjení buněk	134
6.4. Buněčný cyklus	137
6.4.1. Účinná a jemná synchronizace buněk BY-2 pomocí hydroxymočoviny	137
6.4.2. Kadmium způsobuje různé typy buněčné smrti při aplikaci v různých fázích buněčného cyklu	138
6.5. Protahování jader	141
6.5.1. Tvar interfázních jader	141
6.5.2. Mechanismus protahování interfázních jader	142
6.5.2.1. Úloha buněčné stěny	142
6.5.2.2. Úloha cytoskeletu	142
6.5.2.3. Úloha jaderného skeletu	144
7. SOUHRN	147
8. ZÁVĚRY	149
9. SEZNAM LITERATURY	151

Příloha volná: datový nosič (CD) - video

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, auxin
ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
Apaf-1	protease activating factor-1, součást aktivátoru kaspáz
APC	aphidicolin, antireplikativní látka
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin, cytokinin
Bcl-2	B cell lymphoma 2, anti-apoptotický gen nebo název genové rodiny
BI-1	Bax inhibitor-1
bp	basis pairs, páry bází
BSA	bovine serum albumin, albumin izolovaný z hovězího séra
BY-2	buněčná linie tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2
cdc	cell division cycle, geny spojené s buněčným cyklem
CDK(s)	cyclin-dependent kinase (s), cyklín-dependentní kináza(y)
DIC	Nomarského diferenciální kontrast
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	deoxyribonukleáza
E2F	transkripční elongační faktor 2
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraoctová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
EST	expressed sequence tag, náhodný úsek cDNA (z mRNA)
FDA	fluorescein diacetát
FITC	fluorescein isothiokyanát
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GA	gibereliny
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein (reportérový gen)
GK	Golgiho komplex
HR	hypersenzitivní reakce
HU	hydroxyurea, antireplikativní látka
iPA	izopentenyladenin, cytokinin
ISEL	in situ end labeling, metoda k vizualizaci jader s fragmentovanou DNA

kDa	kilodalton
MAPK	mitogen-activated proteine kinase, proteinkinázy aktivované signály, které přicházejí po regulačních drahách kontrolující buněčné dělení
MI	mitotický index
MS	Murashige a Skoog (médiu)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PBS	phosphate-buffered saline, roztok solí ve fosfátovém pufru
PBSA	BSA v PBS
PCD	programmed cell death, programovaná buněčná smrt
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PFA	paraformaldehyd
PIPES	1,4-piperazin dietansulfonová kyselina
Rb	retinoblastomový protein
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RT	room temperature, laboratorní teplota
SBI	subkultivační interval
SE	střední chyba průměru
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
ssDNA	single strand DNA, jednořetězová DNA
TAE	tris acetic acid EDTA
TE	tracheary elements, tracheální elementy
TE pufr	tris EDTA
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TRITC	tetramethylrhodamin isokyanát
TRITC/Ph	TRITC-phaloidin
TUNEL	terminal deoxynukleotidyl transpherase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL reakce pro vizualizaci jader s fragmentovanou DNA

1. ÚVOD

Programovaná buněčná smrt (PCD, z anglického *programmed cell death*) se uplatňuje jednak při vývoji rostlin v buněčné diferenciaci, utváření rostlinných orgánů a senescenci a jednak hraje významnou roli v obranných reakcích a odpovědích na nejrůznější stresové působení jak abiotických, tak i biotických stresorů. Mechanismus PCD umožňuje organizmu eliminovat staré či narušené buňky bez poškození okolních buněk / pletiva. Tento vysoce komplexní proces je oproti rostlinným buňkám velmi dobře prostudován u živočišných buněk, ve kterých existuje několik typů PCD: např. apoptotická, autofagická buněčná smrt, paraptóza či mitotická katastrofa (Bröker *et al.* 2005). Pouze některé znaky těchto živočišných PCD byly popsány u rostlinných buněk. Navíc některé typy PCD, jako mitotická katastrofa u rostlinných buněk, vykazují znaky neprogramovaného umírání. U rostlinných buněk, a zejména pak u buněčných kultur, však pravděpodobně zcela nelze, i když se o to různí autoři stále snaží, striktně odlišit jednotlivé typy programovaného umírání buněk. V poslední době se ukazuje, že existuje pouze jeden faktor společný všem rostlinným PCD, a to vakuolární kolaps (Groover *et al.* 1997, Groover a Jones 1999). Jde o rozpad vakuol a následné vyplavení hydrolytických enzymů ven z vakuol, vedoucí až k autolýze buněk (Jones 2001). Tato hypotéza vyplývá z faktu existence vakuol ve všech typech rostlinných buněk a znalosti jejich funkce nejen zásobní, ale zřejmě i cíleně lytické.

Studium mechanismu PCD v celých rostlinách je komplikované, zejména v důsledku toho, že se většinou vyskytuje jen v malém počtu často složitě přístupných buněk, které jsou obklopeny velkým množstvím buněk bez probíhající PCD. Ke studiu procesů PCD jsou proto často využívány buněčné kultury, které představují v mnoha případech použitelný zjednodušený model složitých fyziologických procesů probíhajících v celé rostlině *in vivo*. Studium PCD v buněčných kulturách *in vitro* je však nutné vždy srovnávat s mechanismem programovaného umírání buněk *in vivo*, kde je celá rostlina ovlivňována řadou různých faktorů. Nicméně v obou případech mají buňky pravděpodobně předem definovaný PCD program složený ze tří fází: iniciační, efektorové a exekuční fáze.

Existuje řada důvodů, proč jsou buněčné linie vhodným modelovým materiálem pro studium mechanismu PCD. Přednostně jde o vysoce uniformní populaci buněk. Díky intenzivnímu dělení buněk je velmi jednoduché získat velké množství materiálů v relativně krátkém čase pro pokusné účely. V neposlední řadě je nutné zdůraznit, že buněčné kultury jsou vlastně skupinou nediferencovaných buněk, což je vhodné pro studium základních odpovědí rostlinných buněk na PCD podněty.

Buněčné kultury různého typu, ať krátkodobé či dlouhodobé, je možné využívat ke

studiu vývojových programů PCD mj. studium embryogeneze - buněčné kultury smrku a jedle (Filonova *et al.* 2000, Bozhkov *et al.* 2004), studium xylogeneze - buněčné kultury *Zinna elegans* (Fukuda a Komamine 1980a) nebo umírání buněk aleuronové vrstvy - buněčné kultury ječmene (Fath *et al.* 2000). Ale jsou také velmi vhodným modelem PCD vyvolané stresem. Látky, které jsou schopné vyvolávat nebo inhibovat PCD, jsou jednoduše k buňkám přidány nebo naopak z média vymyty.

Zvláštní postavení mezi těmito pokusnými modely představují buněčné linie. Tedy buněčné kultury vyznačující se vysokou strukturální i funkční homogenitou dané buněčné populace a jejím standardním chováním v průběhu tzv. subkultivačního intervalu, do značné míry simulujícího různé fáze buněčné ontogeneze *in vivo* - fázi intenzivního dělení, fázi expanze, resp. růstu, fázi zrání až senescenční. Umožňují tak velmi detailní, přesnou a hlavně simultánní analýzu svého chování na úrovni molekulární, biochemické, cytologické, až morfologické.

2. CÍLE PRÁCE

Téma dizertační práce bylo zadáno v kontextu široké výzkumné problematiky týmu zaměřené na výzkum fyziologie stresu u rostlin (program „Rostlinná buňka a stres“). Z těchto důvodů se předložená dizertační práce zabývá programovanou buněčnou smrtí vyvolanou abiotickým stresem u buněk tabákové linie BY-2.

Hlavním cílem práce bylo pochopit mechanismy vedoucí k programovanému umírání buněk BY-2 po působení vybraných abiotických stresorů (síranu kademnatého a chladu – 4°C).

Dílčími cíli pak byl jednak detailní popis účinku jednotlivých induktorů PCD jak na cytologické, tak molekulární úrovni. Jednak podrobné studium mechanismů indukce PCD v různých fázích buněčného cyklu.

V průběhu řešení se samozřejmě strukturovaly i další oblasti studia, původně neplánované – např. detekce projevu PCD (specifické fragmentace DNA) u buněk podléhajících PCD a u rychle zabitých buněk (neprogramově).

3. LITERÁRNÍ ÚVOD

3.1. Programovaná a neprogramovaná buněčná smrt – základní pojmy

Buněčná smrt hraje velmi důležitou roli během fyziologických procesů u mnohobuněčných organizmů, zejména v ontogenezi a morfogenezi. Pojem **programovaná buněčná smrt (PCD, z anglického programmed cell death)** byl poprvé použit v roce 1951 Glücksmannem, jako buněčná smrt během vývoje organizmů (pro přehled Lockshin a Zakeri 2004).

Nejlépe je prostudována morfologie umírání buněk živočišných. PCD je většinou dělena do tří skupin (tab. 3.1, obr. 3.1, pro přehled Jones 2000, Noodén 2004):

3.1.1. Morfotyp I. - apoptotická buněčná smrt (Kerr *et al.* 1972). Pojem apoptóza (dnes často a nesprávně zaměňovan s významově širším pojmem programovaná buněčná smrt) byl poprvé použit v souvislosti s popisem morfologických změn jader a celé buňky Kerrem, Wylliem a Curriem (Kerr *et al.* 1972). Tento typ je odvozen od řeckého slova *apoptosis*, což znamená spad nebo opad v analogii s opadem květních plátků rostlin nebo listů ze stromů (*apo* = od, *ptosis* = padání). Tato analogie zdůrazňuje, že buněčná smrt je velmi důležitou a neoddelitelnou součástí životního cyklu organizmů. Apoptotická buněčná smrt je aktivní a přesně definovaný proces, který hraje důležitou roli ve vývoji mnohobuněčných organizmů, v regulaci a zachování buněčné populace v tkáních za fyziologických i patologických stavů. Je typická pro živočišné buňky, kde je také velmi častá. Jde o typ PCD, který je nejlépe prostudován u živočišných buněk. U rostlin mají i jiné typy buněčné smrti stejně důležitou biologickou funkci jako apoptóza.

Apoptotická buněčná smrt má tři základní charakteristické znaky:

- V jádře probíhá tzv. pyknóza, při níž jsou shluky DNA natěsnané u vnitřní strany dosud neporušeného jaderného obalu. DNA je specificky štěpena mezi nukleozómy a vzniká tzv. apoptotický žebříček. Tato fragmentace je způsobena nukleázami (Wyllie *et al.* 1980).
- Na tyto jaderné změny navazuje vznik tzv. apoptotických mechýřků (apoptotických tělísek). Což jsou části cytoplazmy s fragmenty jádra a některými buněčnými organelami, obalené jednou či více membránami.
- Mechýřky jsou potom často pohlceny okolními fagocyty.

3.1.2. Morfotyp II. - autofagie nebo také cytoplazmaticky degenerativní buněčná smrt (pro přehled Bursch 2001, Baehrecke 2003, Bursch *et al.* 2004).

- Jedním z hlavních rysů této PCD je „konzumace“ cytoplazmy autofagickými organelami. Často je doprovázena degradací jádra a pyknózou. Většinou nevyžaduje přítomnost makrofágů.
- V závislosti na dráze dopravovaného cytoplazmatického materiálu do lumen lyzozómů byla autofagie rozdělena na 4 typy (pro přehled Eskelinen 2005): 1) **makroautofagii** nebo také pouze autofagii, kde při degradaci cytoplazmy dochází nejprve k fúzi dvou a více membránových autofagozómů s endozómy nebo lyzozómy, 2) **mikroautogafii**, kde lyzozomální membrány pohlcují části cytoplazmy procesem podobným odškrubování fagozómů od plazmatické membrány, 3) **chaperony zprostředkovanou autofagii**, kde jsou proteiny se specifickou signální sekvencí transportovány z cytoplazmy do lumen lyzozómů přes lyzozomální membrány, 4) **crinofagii**, při níž sekretorické vāčky přímo fúzují s lyzozómy, čímž se degraduje obsah jednotlivých vāček.

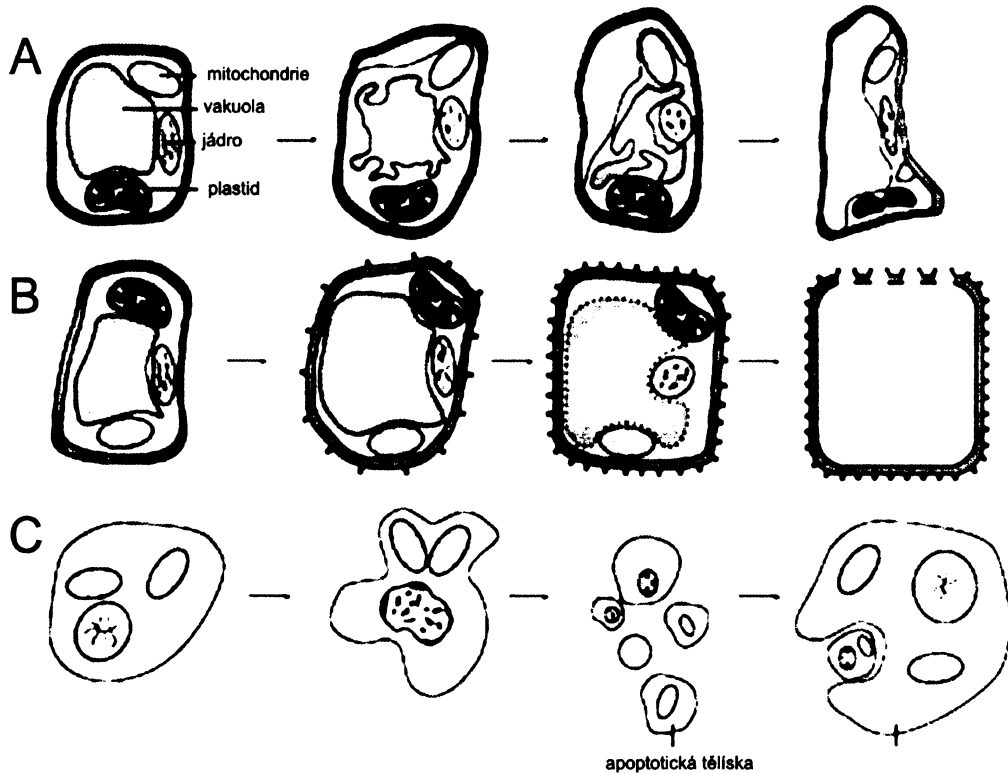
Tab. 1. Hlavní typy programované buněčné smrti a jejich projevy (upraveno podle Clarke 1990)

MORFOTYP PCD	JÁDRO	MEMBRÁNY	CYTOPLASMA
apoptóza	kondenzace chromatinu;		
degradace jádra a pyknóza	zkroucení; vytváření apoptotických měchýřků	ztráta ribozómů z drsného	
autofagická buněčná smrt	částečná pyknóza; část jádra může vytvářet měchýřky	endocytóza v některých případech a vznik puchýřků	autofagické vakuoly; rozšíření
lyzozomálně degenerativní buněčná smrt	pozdější vakuolizace a desintegrace	zlomy	desintegrace, rozšíření organel a vytváření "prázdných" míst, které splývají spolu navzájem nebo s extracelulárním prostorem
onkóza	pozdější zvýšení granularity a chromatinu	zaoblování	rozšíření endoplasmatického retikula, jaderná membrána, Golgiho komplex a někdy také mitochondrie vytvářejí "prázdná" místa

S tímto typem buněčné smrti se u živočichů setkáme v souvislosti s metamorfózami. U rostlin je tato buněčná smrt spojována a nejvíce prostudována zejména s odumíráním

suspensorových buněk v embryogenezi.

V posledních letech si degradace intracelulárních kompartmentů (autofagie) získává pozornost mnoha vědeckých skupin. Termín autofagie je běžně používán pro mnoho intracelulárních procesů, které končí degradací cytozolických komponentů uvnitř lysozómů.



Obr. 3.1. Porovnání programované buněčné smrti rostlinných a živočišných buněk na základě morfologie umírání buněk (upraveno podle Lam 2004)

A – Hypersenzitivní reakce rostlinných buněk zahrnuje následující po sobě jdoucí kroky: kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA, vakuolární kolaps, rozpad plazmatické membrány, rozpad organel a lyzi celé buňky.

B – Při diferenciaci mezofylových buněk v tracheální elementy dochází k bobtnání vakuol a následnému vakuolárnímu kolapsu, rozpadu buněčných stěn a fragmentaci DNA.

C – Apoptotická buněčná smrt živočišných buněk začíná kondenzací chromatinu a fragmentací, změnami na plazmatické membráně a vznikem apoptotických tělísek.

3.1.3. Morfotyp III. - lyzomálně degenerativní buněčná smrt

Tato PCD je u živočišných buněk prostudována nejméně. Zatímco u rostlin je právě tento typ PCD tím nejstudovanějším. Jelikož u rostlinných buněk dochází téměř vždy k přeměně vakuol na lytické kompartmenty, ze kterých se po aktivaci „vyplavují“ hydrolázy (např. Fukuda 2000).

- Je charakteristická degradací celého obsahu cytoplazmy bez jakékoliv pomoci jiných buněk.

- Předpokládaný mechanismus zahrnuje sekreci hydrolytických enzymů z lysozómů.

V některých případech je autofagická a lysozomálně degenerativní buněčná smrt zaměňována. Autoři van Doorn a Woltering (2005) ukazují, že přeměna mezofylových buněk v tracheální elementy (Fukuda 2000) je příkladem klasické autofagie. Tito autoři pravděpodobně vycházejí z toho, že u rostlin dochází často k prolínání všech typů PCD. Kombinace umírání buněk autofagicky a apoptoticky byla již dříve popsána u somatické embryogeneze smrku ztepilého (Filonova *et al.* 2000).

Dalšími, méně známými typy PCD jsou paraptóza nebo mitotická katastrofa.

3.1.4. Paraptóza

Je charakterizovaná intenzivní vakuolizací cytoplazmy, která často začíná zduřením mitochondrií a endoplazmatického retikula. Během této smrti nedochází k aktivaci cysteinových proteáz kaspáz, nevytvářejí se morfologické změny známé u apoptotické buněčné smrti a ani se nevytvářejí tzv. apoptotická tělíska. Přestože je prací o této buněčné smrti stále málo, je si vědecká komunita jistá, že se nejedná o autofagickou buněčnou smrt (pro přehled Sperandio *et al.* 2000).

U rostlin nebyl tento typ PCD zatím popsán.

3.1.5. Mitotická katastrofa

Je způsobená selháním mitózy, které následně vyvolá zastavení buněčného cyklu díky defektům v jeho kontrolních bodech. Tím se mohou vytvářet až aneuploidní buňky, které jsou odsouzené k zániku (Castedo *et al.* 2004). Charakterem podobná buněčná smrt byla pozorována i u rostlinných buněk, kde však měla charakter neprogramované buněčné smrti (Kuthanová *et al.* 2008).

3.1.6. Onkóza nebo také onkotická buněčná smrt je většinou považována za neprogramovanou buněčnou smrt (Van Cruchten a Van den Broeck 2002).

- Je charakteristická bobtnáním cytoplazmy, mitochondrií a dalších organel a vylitím obsahu buňky do okolí.

Přesto, že přítomnost celulózní buněčné stěny u rostlinných buněk znemožňuje bobtnání cytoplazmy, vykazují rostlinné PCD mnohé rysy živočišné onkotické buněčné smrti jako např. narušení membrán a bobtnání organel (Jones 2001).

3.1.7. Neprogramovaná buněčná smrt či nekontrolovaná buněčná smrt se někdy nazývá také **nekróza**. Jedná se o nefyziologický proces, který nevyžaduje téměř žádnou energii u velmi starých a poškozených buněk. Během nekrózy dochází k narušení iontových pump na plazmatické membráně, což vede k bobtnání jak některých organel, tak i celých buněk. Následkem pak dochází k prasknutí buněk a buněčný obsah se uvolní do okolí. Enzymy, které se tímto procesem uvolní, mohou způsobovat nekrózu okolních buněk a následně způsobit zánět v živočišných tkáních.

Vzhledem k velkému množství různých typů PCD, které byly v nedávné době identifikovány, byla ustanovena vědecká komise (NCCD, The Nomenclature Committee on Cell Death), která měla za úkol doporučit správné používání jednotlivých typů PCD. Kroemer *et al.* (2005) mj. navrhovali používat termín apoptóza pouze při konkrétních morfologických změnách (při pyknóze jader, kondenzaci cytoplazmy nebo bobtnání plazmatické membrány) během buněčné smrti. Naopak specifická fragmentace DNA není vhodným markerem pro apoptózu, jelikož může být aktivně inhibována. Proto je mnohem výhodnější používat termíny apoptóza závislá a nezávislá na kaspázách, tedy proteázách vedoucích k fragmentaci DNA. Druhým probíraným termínem je autofagie. Ta by měla být používána jen tehdy, pokud dochází k masivní vakuolizaci buněk během jejich umírání. Obdobnou snahou pro zpřesnění používání jednotlivých typů PCD měli i jiní autoři (např. Leist a Jäättälä 2001 nebo Bröker *et al.* 2005). Leist a Jäättälä (2001) rozdělili buněčnou smrt na 4 skupiny podle morfologie jader: na apoptózu s kondenzovaným chromatinem, apoptóze podobnou buněčnou smrt s méně kompaktním kondenzovaným chromatinem, nekrózu s úplnou a nahodilou lyzí buněk a nekróze podobnou buněčnou smrt bez kondenzace chromatinu. Všechny tyto návrhy platí pro živočišné buňky. U rostlin je situace mnohem složitější, některé typy živočišných PCD u nich stále nebyly detekovány anebo vykazují znaky neprogramované buněčné smrti. Proto je pravděpodobně nelze u nich bez výhrad používat.

3.2. Molekulární mechanizmy a signální dráha vedoucí k PCD

3.2.1. Regulační mechanizmy signálů při apoptóze

Existují tři hlavní signální dráhy, kterými se apoptóza u živočišných buněk spouští.

První dráha je spouštěna Fas ligandy, které se vážou na plazmatické membráně na Fas receptory. Ty pak aktivují kaspázu 8 a tím je aktivován komplexní proces reakcí vedoucích k postupnému rozpadu jádra.

Druhá cesta je také aktivována změnami na plazmatické membráně, na níž se vytváří speciální pór spojením molekul perforinu. Tímto pórem se dostávají do buňky molekuly granzymu B a vápníku, které aktivují kaspázu 10.

Třetí signální dráha je aktivována vyplavením molekuly cytochromu c z vnitřní strany mitochondriální membrány do cytozolu. Cytochrom c spolu s Apaf-1 a ATP vytváří velký proteinový komplex, tzv. apoptozóm, který aktivuje kaspázu 9. Kaspázy hrají jednu z důležitých úloh v procesu PCD.

3.2.2. Proteolytické enzymy a apoptóza

3.2.2.1. Živočišný model

Konečná stádia PCD živočišných buněk jsou až na výjimky charakterizována hydrolyzou genomové DNA. Během tohoto procesu je DNA fragmentována nukleázami a vzniká tzv. apoptotický žebříček. Jedná se o tzv. **doménovou nukleázu**, jejímž působením vznikají vysokomolekulární fragmenty o velikosti 200-300bp a 30-50bp. Tento enzym štěpí DNA v místech vazby s jadernou matrix a není inhibován zinečnatými ionty a serinovými proteázami. Fragmenty o nižší molekulové hmotnosti vznikají činností tzv. **fragmentační nukleázy**. Právě ta dává vznik internukleozomálního žebříčku. Aktivita těchto enzymů může být inhibována zinečnatými ionty (Wyllie *et al.* 1980). Fragmentační nukleázy byly identifikovány jako DNáza I. a II. Činností těchto enzymů vznikají fragmenty o velikosti 20-40 kDa. DNáza I. produkuje 3'OH a 5'P konce. Ke svému působení nutně vyžaduje hořečnaté a vápenaté ionty a neutrální pH (Gaido and Cidlowski 1991). Je také známa vazba DNázy I. na G aktin, čímž způsobuje zablokování polymerace aktinu do vláken a vznik „krystalické“ struktury. DNáza II. naopak produkuje 5'OH a 3'P konce. Ke své aktivaci nepotřebuje dvoumocné ionty a je aktivní při kyselém pH (Wu *et al.* 2000).

Až asi 13 let po Wylliem, v roce 1993, bylo prokázáno, že dalšími důležitými enzymy aktivovanými při apoptotické PCD jsou proteázy. Jde o rodinu **Ced-3/ICE proteáz**, které iniciují exekuční fázi PCD. Poprvé byly popsány u *Cenorhabditis elegans* v Ced-3 mutantech. Protein Ced-3 je homologní k živočišné cysteinové proteáze ICE (z anglického Interleukin-1 β -Converting-Enzyme, Yuan *et al.* 1993). Tyto proteázy také iniciují exekuční fázi rozkladem jednoho nebo více důležitých buněčných substrátů. Jejich inhibitorem je CrmA, který je sekvenčně podobný inhibitorům serinových proteáz. Dalším inhibitorem může být YVAD-chlorometylketon, jenž může zastavit PCD.

Dalším členem rodiny ICE proteáz je prICE (proteinase resembling ICE) proteáza. Jejím substrátem je PARP (z anglického polyADP-ribose polymerase), polypeptid, který je „rozštěpán“ již po 3 min po aktivaci prICE proteázou (pro přehled Soldani a Scovassi 2002). Rozpoznávací sekvencí pro ICE proteázu na PARP je vysoce konzervativní EVD↓G sekvence. Jde o ekvivalent k 1-2 sekvencím, které ICE proteázy obvykle rozpoznávají. PARP se účastní oprav poškozené DNA, replikace, transkripce a buněčné smrti (pro přehled Smith

2001). PARP-1 je jaderný enzym závislý na ADP (de Murcia a Ménissier-de Murcia 2003). Dalšími enzymy jsou PARP-2 (Amé *et al.* 1999) a -3 (Schreiber *et al.* 2002), VPARP (=PARP-4) a tankyráza (=PARP-5). Tankyráza je součástí lidské telomerázy a účastní se syntézy poly(ADP-ribózy) na RTF1 proteinu (Smith *et al.* 1998). Funkce VPARP souvisí s velkými ribonukleovými komplexy (Kickhoefer *et al.* 1999). Funkce jednotlivých homologů PARP (1, 2 a 3) zatím nejsou zcela známy. PARP jsou aktivovány zlomy DNA. Mají 3 funkční domény: 46 kDa DNA vazebnou doménu (DBD, z anglického DNA-binding domain), která je na N-konci, oboustranou jadernou lokalizační doménu (NLS, z anglického nuclear localization domain) a dvě domény s motivem zinkového prstu, které rozeznávají fragmentovanou DNA. V centrální oblasti je tzv. automodifikační doména, která je zodpovědná za autofosforylaci. Na C- konci je lokalizovaná NAD vazebná doména, kde probíhá konverze NAD⁺ na ADP-ribózu. Uvnitř DBD je DEVD sekvence, které je rozpoznáváno kaspázami. Jejich štěpením vznikají charakteristické fragmenty PARP. Větší 89 kDa fragment je na C-konci a obsahuje katalytickou doménu (pro přehled Amé 2004) a i po rozštěpení si tento fragment stále udržuje svoji enzymatickou aktivitu. Menší fragment, 24 kDa je umístěn na N-konci a obsahuje DBD, tudíž je stále schopný irreverzibilní vazby na DNA. *In vitro* je PARP-1 substrátem pro všechny kaspázy, ale *in vivo* bylo prokázáno štěpení pouze kaspázami 3 a 7 (Wesierska-Gadek *et al.* 2004). Navíc bylo potvrzeno, že PARP může být štěpena i při živočišné nekróze. Tímto štěpením vznikají fragmenty o jiné molekulové hmotnosti (větší 89 až 50 kDa a menší o velikosti 40-35 kDa) než při apoptotickém štěpení.

Další specifickou proteázou, která hraje roli v apoptóze, je Lam P proteáza. Jde o lamínovou proteázu, která je v signální dráze umístěná níže od pRICE. Ta způsobuje štěpení lamínů A a C na 46 kDa fragmenty, které mají ATPázovou aktivitu. Ke své aktivaci nutně potřebuje vápenaté ionty. Může být inaktivována leupeptinem a TLCK (z anglického tosyl-2-lysylchloromethylketon) a inhibitory serinových proteáz (Gorczyca *et al.* 1993).

Poslední skupinou proteolytických enzymů, které jsou aktivovány při apoptotické PCD procesech jsou **kalpainy** (z anglického calcium-activated neutral cysteine endopeptidase). U buněk thymocytů byly poprvé popsány jako thiolové proteázy (Saido *et al.* 1994) a jsou aktivovány v časných fázích apoptózy (Carafoli a Molinari 1998).

Kaspázy jako hlavní iniciátory a exekutory apoptotických procesů (pro přehled např. Villa *et al.* 1997, Fussenegger *et al.* 2000, Kumar 2007).

Kaspázy (z anglického cysteine-dependent asparatate-specific proteases) jsou cysteinové proteázy, které štěpí své substráty za zbytkem kyseliny asparagové. Na N-konci mají kaspázy konzervativní pentapeptid QACXG. Jsou syntetizovány jako inaktivní proenzymy (zymogeny) a jsou aktivovány přímo proteolýzou, čímž se pak odštěpí N-koncový

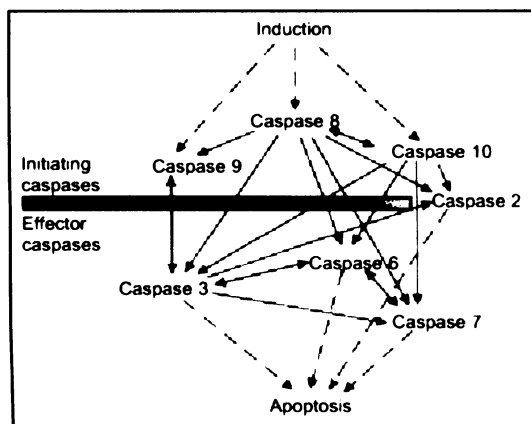
pentapeptid. Po štěpení kaspázové molekuly vznikají velká (α , 20 kDa) a malá (β , 10 kDa) podjednotka, které se spojují v enzymaticky aktivní heterodimer. Každý z aktivních heterodimerů jsou složeny ze šesti podjednotek, které vytvářejí stočenou strukturu β -listu se čtyřmi α -helixy. *In situ* se kaspázová molekula vyskytuje ve formě $(\alpha/\beta)_2$ tetramerů.

Do dnešní doby bylo identifikováno 7 různých kaspáz u drozofily a 14 u savců. Kaspáza 11 a 12 byla identifikována pouze u myši. Kaspázy lze rozdělit do tří skupin: iniciační, exekuční a zánětlivé (obr. 3.2). Iniciační kaspázy mají velkou pro-doménu, která je místem interakcí mezi proteiny. Obsahují také již zmíněný konzervativní pentapeptid. Mezi tyto kaspázy patří kaspáza 2, 8, 9, 10 a 12. Mezi exekuční kaspázy, které mají malou pro-doménu, patří kaspáza 3, 6, 7 a 14. Ty jsou aktivovány přímo štěpením iniciačních kaspáz. Iniciační kaspázy mohou obsahovat buď CARD doménu (z anglického caspase recruitment domains) jedná-li se o kaspázu 9 a 2 nebo DED doménu (z anglického death effector domains) jedná-li se o kaspázu 8 a 10. Poslední jmenovaná skupina kaspáz (zánětlivé) nejsou součástí dráhy PCD.

Kaspázy mohou být selektivně inhibovány malými peptidy, aldehydy, ketony nebo nitrily, jejichž C-konec reaguje s Cys aktivním místem. Dalšími inhibitory jsou tzv. IAP (z anglického inhibitors of apoptotic proteins, pro přehled Deveraux a Reed 1999, Yang a Li 2000).

Díky svým prodoménám iniciační kaspázy aktivují při buněčné smrti signální komplexy buď v odpovědi na ligaci receptorů buněčného povrchu (**vnější apoptotická dráha**), nebo v odpovědi na signály vnějšího prostředí (**vnitřní apoptotická dráha**).

Existují dva typy **vnější apoptotické dráhy**. První typ vnější apoptotické dráhy je aktivován tzv. receptory smrti. Ty patří mezi receptory buněčného povrchu, které přenášejí apoptotické signály po ligaci specifických ligandů. Receptory smrti patří k rodině TNFR (z anglického tumor necrosis factor receptor), která zahrnuje TNF-1, Fas/CD95 a také receptory TRAIL (DR-4 a 5, Armitage 1994). Všechny členové rodiny TNFR mají extracelulární subdoménu (bohatou na cystein). Ta jim dovoluje rozpoznat ligandy způsobující trimerizaci a aktivaci receptorů smrti. Dále je signál přenášen přes cytoplazmatické receptory smrti, které obsahují konzervativní doménu smrti (DD, z anglického death domain), jejím členem je i prokaspáza 8, která je aktivována svou DED doménou k DISC (z anglického death



Obr. 3.2. Schéma jednotlivých typů kaspáz (iniciační a efektorové)

inducing signalling complex). Ta je součástí receptorového komplexu vznikajícího při ligaci členů TNFR. Po spojení s DISC je mnoho prokaspázových 8 molekul velmi blízko sebe, čímž se předpokládá aktivace jedna druhé autolýzou (Denaut a Salvesen 2002).

Druhý typ vnější apoptotické dráhy zahrnuje signály přicházející z aktivovaných receptorů, které nejsou schopny generovat kaspázovou aktivitu v exekučních fázích PCD. Propojení mezi kaspázovou signální dráhou a mitochondriemi je zprostředkováno přes Bid protein, člena Bcl-2 rodiny. Bid je štěpen kaspázou 8, jeho transdukční forma (tBID) spolu s proapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 (Bak a Bax) způsobují vyplavení cytochromu c a dalších proapoptotických faktorů z mitochondrií do cytozolu (Eskes *et al.* 2000). Cytozolický cytochrom c se váže na monomerní Apaf-1, který oligomerizuje ve velký signální proteinový komplex, apoptozóm. Struktura apoptozómu je podobná kolu se sedmi symetrickými smyčkami, které způsobuje aktivaci iniciační prokaspázy 9 ležící v signální dráze níže od apoptozómu (Adams a Cory 2002). Pokud jsou ty již aktivovány, mohou sami proteolyticky aktivovat efektorové prokaspázy 3, 6 a 7 a později štěpí specifické substráty zahrnující i samy prokaspázy.

Vnitřní apoptotická dráha (obr. 3.3) souvisí také s mitochondriálními změnami signálů (degradace DNA, oxidativní stres, hladovění a také změny vyvolané chemoterapeutickými drogami), což způsobuje porušení mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\psi$). Tento fenomén je také nazýván jako PT (z anglického permeability transition). Osmotické bobtnání mitochondriální membrány bylo pozorováno při příjmu vody do mitochondriální matrix. Možné prasknutí vnější mitochondriální membrány způsobuje i vyplavení proapoptotických proteinů z intermembránového prostoru do cytoplazmy (pro přehled Desagher a Martinou 2000). Mezi tyto proteiny může být zahrnut i cytochrom c (Jemmerson *et al.* 2002), který aktivuje apoptozóm a tím i celou kaspázovou kaskádu. Spolu s cytochromem c se do cytoplazmy dostávají i AIF (z anglického apoptosis inducing factor, Joza *et al.* 2001) endonukleáza endoG (Li *et al.* 2001), Smac/Diablo (Chai *et al.* 2000) a Htr/Omi (van Loo *et al.* 2002).

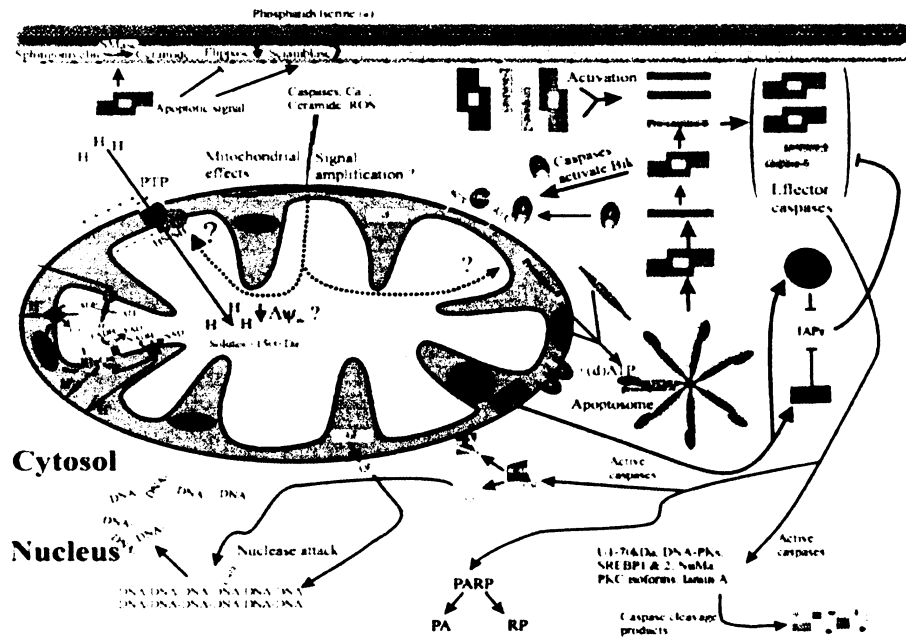
3.2.2.2. Rostlinný model

U rostlin je známo mnoho proteolytických enzymů, které hrají důležitou roli v procesech PCD (pro přehled Beers *et al.* 2000, Palma *et al.* 2002).

Proteolytické funkce u rostlin jsou následující: odstranění abnormálních, modifikovaných a špatně zacílených proteinů nebo doplnění aminokyselin potřebných ke vzniku nových proteinů.

Proteázy působící uvnitř peptidového řetězce jsou nazývány jako tzv. endopeptidázy

Extracellular space



Obr. 3.3. Vnitřní apoptotická dráha (Lawen 2003)

Vnitřní apoptotická dráha je spojená s vyplavením cytochromu c z mitochondrií do cytoplazmy, tvorbou apoptozómu a aktivaci kaspáz a dalších proteinů vedoucích ke smrti buněk.

(EP). Proteolytické enzymy působící na konci peptidového řetězce jsou nazývány jako exopeptidázy. EP se podle substrátové specifity dělí na aminopeptidázy, které jsou schopné štěpit peptidy na N-konci, a karboxypeptidázy, které degradují peptidy na jejich C-konci. Aminopeptidázy jsou ubikvitinační enzymy, které byly identifikovány v celé rostlinné říši, v různých stádiích růstu a vývoje, při zrání semen a plodů, senescenci nebo při interakci patogen-hostitel. Karboxypeptidázy jsou jednou velkou skupinou proteáz vyskytujících se v semenech, ve zralých zelených a také v senescentních listech. Endopeptidázy jsou dále klasifikovány podle svého katalytického mechanismu. Nejen u rostlin se dělí do několika skupin: na serinové proteázy, cysteinové proteázy, proteázy aspartátového typu a metaloproteázy.

3.2.2.2.1. Serinové a neutrální proteázy u rostlin stejně jako u živočišných buněk jsou důležitou součástí procesu PCD. Jsou nazývány podle aktivního serinu v katalytickém místě. Byly nalezeny při různých fyziologických procesech, např. v senescenci (Parrott *et al.* 2005), v xylogenezi (Groover a Jones 1999, Thomas *et al.* 1999) nebo v interakci hostitel-patogen (Yano *et al.* 1999). Většina serinových proteáz patří mezi chloroplastové ATP-závislé ClpP proteázy (Halperin *et al.* 2001a, b), aktivované v průběhu senescence, kde ale nejsou hlavními regulátory. Další skupinami jsou subtilisiny (Tanaka *et al.* 2001) a enzymy kexinového typu (Schaller *et al.* 2004).

Subtilisiny patří do velké multigenní rodiny, jejich exprese je odlišná v různých rostlinných orgánech. U rostlin byly identifikovány při řadě PCD procesů. Např. LIM9, subtilisin z lilie, který je důležitým enzymem mikrosporogeneze. Jiným subtilisinem je LeSBT1, který byl identifikován u kořenů a květů rajčat (Janžik *et al.* 2000) a je důležitou součástí PCD u těchto rostlinných orgánů. Do této rodiny patří také 60kDa protein *Zinnia elegans* (Beers a Freeman 1997), který je aktivován v cytoplazmě před tzv. vakuolárním kolapsem.

Kexiny byly doposud u rostlin popsány jen částečně. Jde o bioaktivní peptidy buněčné stěny, které iniciují signální dráhu související s obranou reakcí a také s PCD (Beers *et al.* 2000).

3.2.2.2.2. Cysteinové proteázy jsou nejvíce studovanou skupinou rostlinných proteáz. Do této skupiny patří **kaspázám podobné proteázy** (pro přehled Hoeberichts a Woltering 2003 nebo Woltering *et al.* 2004). Ačkoli do dnešní doby nebyly u rostlin identifikovány sekvenční homology živočišných kaspáz, obrovské množství nepřímých důkazů naznačuje na existenci pravé kaspázové aktivity u rostlin a zapojení těchto enzymů do rostlinné PCD. Studium kaspázové aktivity u rostlin je spojeno zejména s použitím specifických inhibitorů živočišných kaspáz (Lam a del Pozo 2000). Syntetické kaspázové inhibitory byly vytvořeny pro nejrůznější farmakologická použití. Tyto inhibitory jsou schopny potlačit kaspázovou aktivitu různých savčích a v poslední době i rostlinných enzymů. Nutno však podotknout, že doposud nebyl nalezen specifický kaspázový inhibitor (Krammer ústní sdělení). U rostlin tabáku, kde PCD byla navozena *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* docházelo po použití kaspázových inhibitorů k jejímu zastavení (Lam a del Pozo 2000). Jako inhibitory kaspáz byly použity chlorometylketon Ac-YVAD-CMK (irreverzibilní a více specifický pro kaspázu 1) nebo aldehyd Ac-DEVD-CHO (reverzibilní a více specifický pro kaspázu 3). Sekvence YVAD a DEVD kaspázových inhibitorů je založena na sekvencích štěpených kaspázou 1 v prointerleukinu 1b kaspázou 3 v PARP. Navíc při použití inhibitorů serinových a cysteinových proteáz (např. PMSF a TPCK) docházelo k částečnému zastavení buněčné smrti u tohoto systému (Lam a del Pozo 2000). Obdobně tomu bylo u protoplastů tabáku, kde po aplikaci inhibitoru kaspázy-3 Ac-DEVD-CHO docházelo k zastavení PCD vyvolané menadion (Sun *et al.* 1999). Na systému chemicky indukované buněčné smrti u suspenzní buněčné kultury rajčete bylo kromě již popsaných inhibitorů použito širokospektrého inhibitoru kaspáz Z-asp-CH2-DCB (de Jong *et al.* 2000, 2002). Pro efektivní působení těchto inhibitorů je nutné jejich použití v průběhu první hodiny po indukci PCD (Woltering *et al.* 2004). Při použití syntetických fluorogenních substrátů pro kaspázu 1 (Ac-YVAD-

aminometylcumarin, AMC) byla kaspázová aktivita naměřena v extraktu z listů tabáku infikovaných virem mozaiky tabáku. Tato kaspázová aktivita byla inhibována inhibitory kaspázy 1 (Ac-YAD-CMK) a kaspázy 3 (Ac-DEVD-CHO, Ac-DEVD-fluorometylketon, FMK). Naopak při použití jiného fluorogenního substrátu pro kaspázu-3 (Ac-DEVD-AMC) žádná aktivita nebyla detekována (Lam a del Pozo 2000). U embryonálních suspenzních buněk ječmene byla po použití fluorogenního substrátu pro kaspázu 1 (Ac-YVAD-AMC) a kaspázu 3 (Ac-DEV-AMC) naměřena aktivita obou kaspáz (Korthout *et al.* 2000). Pokud však existuje v rostlinných buňkách podobná aktivační kaskáda kaspázy 3 jako u živočišných buněk, která začíná vyplavením cytochromu c z mitochondrií do cytozolu, lze se pak domnívat, že lokalizace proteinu podobnému kaspáze 3 bude právě v cytoplazmě. Mikroinjekcí fluorogenního substrátu pro kaspázu 3 do velkých buněk řasy *Chara* byla zjištěna její lokalizace právě v cytoplazmě buněk (Korthout *et al.* 2000). U buněk buněčné kultury *Nicotiana Tabacum* cv. Xanthi byl použit efektivně inhibitor kaspáz zVAD-FMK. Po použití specifických fluorogenních substrátů byla sledována lokalizace kaspázy 1 v časných stádiích PCD v jádrech a v cytoplazmě. V pozdějších fázích byla kaspáza 1 pozorována pouze v cytozolu (Elbaz *et al.* 2002). Obdobně byly účinně použity inhibitory kaspáz 1 a 3 Z-YVAD-FMK a Z-DEVD-FMK u buněčné linie BY-2 vystavené vysokým koncentracím isopentenyladenosinu (iPA). Mikromolární koncentrace iPA vyvolaly u buněk smrštění cytoplazmy, kondenzaci chromatinu jader a internukleozomální fragmentaci DNA (Mlejnek a Procházka 2002).

Podle terciální struktury byly kaspázy rozděleny do dvou velkých skupin: na parakaspázy a metakaspázy (pro přehled Lamkanfi *et al.* 2002). Parakaspázy jsou např. lidské a z *Cenorhabditis elegans*, metakaspázy jsou rostlinné a houbové. Rostlinné metakaspázy se dále dělí na dva typy.

Metakaspázy typu I. obsahují kaspázám podobnou proteolytickou doménu a N-koncovou prodoménu s vysokým obsahem prolinu. U rostlin velmi často tato prodoména také obsahuje motiv zinkového prstu, který byl nalezen i u LSD1 proteinu (z anglického *lesion simulating disease 1*) *Arabidopsis thaliana*, který negativně reguluje hypersenzitivní reakci (Aviv *et al.* 2002).

Metakaspázy typu II. jsou typicky rostlinné. Místo charakteristické prodomény mají konzervativní 180 aminokyselinové místo podobné podjednotkám p20 a p10 aktivovaných kaspáz. V genomu *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny 3 metakaspázy typu I. (AtMCP1a-c) a 6 metakaspáz typu II. (AtMCP2a-f, Uren *et al.* 2000). Na základě srovnávacích analýz v existujících EST databázích bylo ukázáno, že AtMCP1a a AtMCP2d jsou velmi často exprimovány, oproti tomu AtMCP2c a AtMCP2e jsou nefunkčními pseudogeny (Watanabe

a Lam 2005). U buněk listů rajčete infikovaných *Botrytis cinerea* byla identifikována metakaspáza LeMCA1. Geny pro LeMCA1 leží v těsném sousedství genů souvisejících s PCD (Hoeberichts *et al.* 2003). Jde o geny kódující PIRIN, zprostředkovatele interakcí mezi proteiny během PCD (Orzaez *et al.* 2001) a 2 geny pro rezistenci (SW-5a,b). Ty oba obsahují jadernou NB-ARC vazebnou doménu typickou pro CED 4 a lidský APAF-1.

V systému somatické ebyogeneze jedle bělokoré, kde dochází k autofagické buněčné smrti při odumírání buněk suspensoru, byl popsán protein mcll-Pa (Bozhkov *et al.* 2004). Je vysoce konzervativní protein homologní k metakaspázám typu II. Nemá sice efektorovou a aktivační doménu, ale obsahuje p20 podobnou doménu s aktivním místem DXCHS typickým pro metakaspázy. Navíc byly testovány různé fluorogenní substráty pro kaspázy 1-9, nejúčinnějším byl nalezen VEID-AMC (substrát pro kaspázu 6). Jeho aktivita byla lokalizována v embryonálních buňkách trubcovitého tvaru a v přilehlých suspensorových buňkách (Bozhkov *et al.* 2004), jeho sekvence odpovídala sekvenci místa štěpení lamínu A savčí kaspázou 6.

Další možností jak studovat proteolytickou aktivitu rostlinných buněk procházejících procesem PCD je použití PARP (blíže kapitola 3.2.2.1) jako substrátu pro kaspázu-3. Jak u živočišných, tak i u rostlinných buněk existují nejméně dva různé druhy PARP. Oba se účastní oprav fragmentované DNA. PARP-1 *Arabidopsis thaliana* je homologem lidského jaderného PARP-1. Obsahuje konzervativní DSVD-N místo, které je rozpoznáváno kaspázou 3 (Soldani a Scovassi 2002). U živočišných apoptotických buněk dochází ke vzniku 89 kDa fragmentů PARP. U buněk tabákové linie BY-2 po aktivaci vysokou teplotou docházelo již 4 hodiny po indukci PCD ke štěpení PARP a ke vzniku 89 kDa fragmentů (Tian *et al.* 2000), navíc i aktivaci kaspázy 3.

Aktivita kaspáz může být kontrolována různými virovými nebo makromolekulárními inhibitory, a to zejména přímou vazbou na proteázy. IAP (z anglického inhibitors of apoptotic proteins) jsou vysoce konzervativní mezi různými organizmy. Všechny IAP se účastní procesu zastavení PCD. Mají stejnou BIR (z anglického baculoviral IAP repeat) doménu, která brání smrti buněk. Důležitým IAP je i p35 protein, který je efektivním supresorem CED-3 z *Cenorhabditis elegans* a lidských kaspáz 1, 3, 6, 7, 8 a 10 (Higashi *et al.* 2005).

Relativně nedávno byly u rostlin nalezeny i homology živočišných **legumaiunů**, ke kterým patří i tzv. **VPE** (z anglického vacuolar-processing enzymes, pro přehled Rosin *et al.* 2005). Jde o skupinu enzymů zodpovědných za zrání různých zásobních proteinů v zásobních vakuolách zrajících semen (Hara-Nishimura *et al.* 1991). VPE *Arabidopsis thaliana* (α -VPE a γ -VPE) jsou součástí lytických vakuol ve vegetativních orgánech (Kinoshita *et al.* 1995). Naproti tomu β -VPE a δ -VPE je protein zásobních vakuol (Kinoshita *et al.* 1999,

Hara-Nishimura *et al.* 2005, Nakaume *et al.* 2005). γ -VPE byly nalezeny v prekurzorech proteázových vezikulů, organelách obsahující hydrolázy (Schmid *et al.* 1999), ale i ve vakuolách (Yamada *et al.* 2005) při vakuolárním kolapsu, hlavní součásti PCD u rostlin. Nikdy však nebyla u buněk po aktivaci VPE nalezena internukleozomální fragmentace DNA, pouze nespecifická fragmentace DNA (Hatsugai *et al.* 2004). VPE tabáku a *Arabidopsis thaliana* jsou také schopny štěpit substráty rozpoznávané kaspázou 1 při hypersenzitivní buněčné smrti vyvolané *Pseudomonas syringae* nebo *Botrytis cinerea* (Kuroyanagi *et al.* 2001, Rojo *et al.* 2004). Pomocí inhibitoru pro VPE (Ac-ESEN-CHO) bylo ukázáno, že VPE silně inhibují tvorbu lézí vzniklých při HR (Hatsugai *et al.* 2004). Tento protein je syntetizován na drsném endoplazmatickém retikulu, kde probíhá i glykozylace jeho propeptidu. Proteolytickým štěpením dochází ke vzniku fragmentů o molekulové hmotnosti 43 kDa (iVPE) a 40 kDa (mVPE) (Hiraiwa *et al.* 1999). Matarasso *et al.* (2005) identifikovali ortologní VPE u rajčete. Aktivace VPE je založena na podobném principu jako u kaspáz autokatalýzou, kdy je odštěpena C-koncová doména propeptidu. Navíc je tento enzym schopen autoinhibice. Tato zjištění jsou naprosto odlišná od aktivity jiných cysteinových proteáz, které nikdy nemají autoinhibiční funkci.

Kalpainy nebo Ca-závislé peptidázy (pro přehled Margis a Margis-Pinheiro 2003). Kalpainy jsou cysteinové proteázy, které se liší koncentracemi vápenatých iontů potřebných pro jejich aktivaci. Mají vysoce konzervativní katalytickou doménu. Geny pro fytokalpainy byly identifikovány u kukuřice, ječmene, rýže, pšenice, *Arabidopsis thaliana* a dalších rostlinných druhů. Navíc byla jejich aktivita zjištěna i u hypoxických kořenů *Arabidopsis thaliana* a kukuřice (Ahn *et al.* 2004).

Další 2 typy cysteinových proteáz, **ubikvitin-C-koncové hydrovázy a ubikvitinové peptidázy**, jsou součástí ubikvitinové proteolytické dráhy u rostlin (Ingvarsdén a Veierskon 2001).

Posledním dosud známým typem cysteinových proteáz jsou **papainu podobné peptidázy**. Tyto enzymy, které se účastní autolýzy při PCD, se vyskytují jako cca 50 kDa zymogeny a jsou aktivovány kyselým pH. Byly lokalizovány v lumen endoplazmatického retikula (Okamoto *et al.* 2001, 2003), ve vakuole (Holwerda *et al.* 1990) a apoplastu (Holwerda *et al.* 1992). U *Arabidopsis thaliana* byla nalezena cysteinová proteáza RD21, jejíž akumulace v listech způsobuje jejich senescenci (Yamada *et al.* 2001). Do této skupiny patří i 38kDa protein, který je důležitý pro stádium II. přeměny mezofylových buněk *Zinnia elegans* na tracheální elementy (Ye a Varner 1996). Kromě již zmíněných vývojových typů PCD hrají důležitou roli při interakci rostlina – patogen (blíže Shino a van der Hoorn 2008).

3.2.2.2.3. Aspartátové proteázy

Tyto proteázy přednostně štěpí peptidové vazby mezi hydrofóbními zbytky aminokyselin a jsou aktivovány kyselým pH (Beers *et al.* 2000). Přestože se vyskytují po celé rostlinné říši, nejvíce poznatků je ze studia zm ječmene, kde tyto proteázy mají majoritní postavení (např. Voigt *et al.* 1997). Jelikož se výzkum rostlinných proteáz zaměřuje zejména na cysteinové a serinové proteázy, není jejich funkce zatím zcela známá. Do skupiny aspartátových proteáz patří **fytepsiny**, rostlinné enzymy pepsinového typu, které jsou inhibovány pepstatinem. Tato skupina také zahrnuje **kardosiny** a **kathepsinu D podobné proteiny**. Kardosiny jsou proteiny extrahované ze usušených květů rostliny *Cynaria cardunculus* L. V západním Španělsku a v Portugalsku se tento extrakt používá při tradičním zpracování ovčího mléka. Proteiny podobné živočišnému kathepsinu D byly u rostlin nalezeny jak u neklíčících semen, tak při klíčení semen (Park *et al.* 2000). U savčích buněk je známo propojení kathepsinu D s PCD, jeho funkce je spojená s lyzozomálním kompartmentem buněk.

3.2.2.2.4. Metaloendopeptidázy

V porovnání s cysteinovými, serinovými a aspartátovými proteázami jsou metaloendopeptidázy velmi malou a také velmi málo prostudovanou skupinou proteáz. Do této skupiny patří mnoho enzymů, které v sobě obsahují zinek, kobalt nebo mangan. Ty ve vodě aktivují molekuly pro hydrolyzu peptidových vazeb. Typicky rostlinou metaloendopeptidázou je ATP-závislá FtSH peptidáza chloroplastů, která je homologem bakteriální ATP-závislé peptidázy FtSH (Lindahl *et al.* 1996). Další rostlinnou peptidázou je CPE (z anglického chloroplast processing enzyme, Richter a Lamppa 1998). Oba tyto enzymy jsou lokalizovány v apoplastu a jejich koncentrace se zvyšuje v pozdním stádiu expanze listů (Graham *et al.* 1991) a jsou vysoce homologní k tzv. matrixovým proteázám živočišných buněk, MMP (z anglického matrix methalo proteinase), které se účastní degradace extracelulární matrix (Delorme *et al.* 2000).

3.2.2.2.5. Treoninové proteázy

Hlavním mechanismem, jakým jsou proteiny v cytozolu a v jádře eukaryotických buněk degradovány nelyzozomální cestou, je proteazom. Tento systém je složen z několika podjednotek vytvářející 700-kDa cylindr, kterým nesložené polypeptidy proplouvají a jsou štěpeny uvnitř na peptidy. Tzv. 20S proteazom, nazvaný podle svého sedimentačního koeficientu, sousedí s další multipodjednotkovým proteinem 19S čepičkou. Dohromady vytvářejí ATP-závislý 2100-kDa 26S proteazom. Eukaryotický proteazom má tři základní

proteolytické specifity: je trypsinu podobný (štěpí za bazickými zbytky), je chymotrypsinu podobný (štěpí za dlouhými hydrofóbními zbytky) a je peptidylglutamyl peptohydrolázou (štěpí za kyselými zbytky). Proteiny, které jsou předurčeny k degradaci v cytozolu, jsou označeny ubikvitinem. U buněk BY-2 ovlivněných vysokou teplotou se proteazom účastní aktivace PCD (Vacca *et al.* 2007).

3.2.2.2.6. Endonukleázy (pro přehled Sugiyama *et al.* 2000)

Nukleázy jsou enzymy, které štěpí fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy v nukleových kyselinách. Podle způsobu štěpení se dělí na exonukleázy a endonukleázy. Exonukleázy hydrolyzují fosfodiesterové vazby na 5' nebo 3' konci polynukleotidového řetězce. Endonukleázy jsou schopny rozštěpit molekulu nukleové kyseliny uvnitř řetězce nukleotidů. Stejně jako u živočišných buněk hrají endonukleázy důležitou roli v závěrečných fázích PCD u rostlin. Během hydrolyzy DNA dochází k fragmentaci genomové DNA a zvyšuje se množství volných konců DNA.

Rostlinné endonukleázy jsou děleny podle svých požadavků na dvoumocné ionty a optimální pH na dvě skupiny. První skupinou jsou Zn^{2+} závislé endonukleázy. Jsou obdobné živočišným nukleázám typu I. Tyto enzymy pro své působení vyžadují Zn^{2+} ionty a kyselé prostředí (pH 5-6.5). Jako své substráty preferují RNA a jednořetězcovou DNA (ssDNA). U rostlin byly identifikovány a sekvenovány dva tyto enzymy, 35kDa endonukleáza z ječmene (BEN 1, Zaina *et al.* 2003) a 43kDa endonukleáza z cínie (ZEN 1, Ito a Fukuda 2002). Jejich aminokyselinová sekvence je podobná Zn^{2+} závislým endonukleázám hub a protozoí (Aoyagi *et al.* 1998). V molekulárně biologických databázích nalezeno dalších 5 sekvenčně podobných endonukleáz (1 z denivky, 2 z huseníčku a 2 další z cínie). Poslední 2 nejsou však podobné ZEN 1. Což naznačuje, že u jednoho rostlinného druhu může existovat více druhů různých Zn^{2+} závislých endonukleáz. BEN 1 je syntetizována *de novo* během umírání buněk. Tento enzym byl identifikován jako 35kDa monomerní glykoprotein s Zn^{2+} závislou endonukleázovou aktivitou. Až později byl popsán jako BEN 1 (Aoyagi *et al.* 1998). V experimentálním systému kultury izolovaných mezofylových buněk, kde je diferenciací TE indukována auxiny a cytokininy byla identifikována 43kDa Zn^{2+} závislá endonukleáza, později popsána jako ZEN 1. Její aktivita koreluje s autolýzou během vývoje TE (Ito a Fukuda 2002). Oproti BEN 1 je ZEN 1 během diferenciací TE transportován do vakuoly. (Kuriyama 1999, Ito a Fukuda 2002). U denivky (Panavas *et al.* 1999), ječmene (Muramoto *et al.* 1999) a *Arabidopsis thaliana* (Perez-Amador *et al.* 2000) byly identifikovány geny (DSA 6, Bnuc 1 a BFN 1), které kódují předpokládanou Zn^{2+} závislou endonukleázu se signálním peptidem na N-konci. Aminokyselinová sekvence Bnuc 1 je podobná, ale ne

identická k BEN 1 (Muramoto *et al.* 1999).

Druhou skupinou rostlinných endonukleáz jsou Ca^{2+} závislé endonukleázy. Od předešlých endonukleáz se liší tím, že pro svou aktivitu vyžadují Ca^{2+} ionty a neutrálním pH (až 8.5, Nakamura *et al.* 1987). Substrátem pro tyto enzymy jsou ssDNA, méně pak RNA. Byly nalezeny od řas až po krytosemenné rostliny (Nakamura *et al.* 1987). Jsou podobné savčím $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ závislým endonukleázám, DNázám I. a γ . V prvním stádiu degradace buněk škrobového endospermu, kdy dochází k fragmentaci DNA, byly nalezeny 3 endonukleázy (33.5, 36 a 38.5 kDa, Young *et al.* 1997). První z nich je zodpovědná právě za fragmentaci DNA. Všechny tyto enzymy se sice řadí mezi Ca^{2+} závislé endonukleázy, i když je jejich pH optimum spíše kyselé (5-6.8). U mezofylových buněk *Zinnia elegans* podléhající diferenciaci v TE byla nalezena $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ závislá 24kDa endonukleáza, která je aktivní při neutrálním pH (Ito a Fukuda 2002). Další Ca^{2+} závislá endonukleáza byla nalezena u senescentních listů ječmene. Mittler a Lam (1995) popsali další 3 Ca^{2+} závislé endonukleázy při hypersenzitivní reakci u tabáku, které se liší molekulovou hmotností (100.5 kDa NUC I., 38 kDa NUC II. a 36 kDa NUC III.).

3.2.3. Rodina Bcl-2 (z anglického B cell lymphoma) proteinů

3.2.3.1. Živočišný model

Bcl-2 proteiny jsou velkou skupinou zahrnující více než 30 proteinů. Byla pojmenována podle anti-apoptického proteinu Bcl-2, identifikovaného v roce 1958 jako onkogen folikulárních lymfomů B buněk, který je často připojen na imunoglobulinový lokus pomocí chromozómové translokace t (14;18). Toto bylo poprvé popsáno u onkogenů, které způsobovaly buněčnou smrt ve větší míře než proliferaci buněk (Tsujimoto *et al.* 1984). U savců existuje více než 30 členů této rodiny, které zahrnují jak pro-apoptickou, tak i anti-apoptickou skupinu proteinů (pro přehled Tsujimoto 1998). Navíc jsou schopny tyto proteiny inhibovat i některé typy nekrotické buněčné smrti (např. díky inhibici kaspáz). Všechny proteiny této rodiny vykazují homologii alespoň v jedné ze 4 homologních domén (BH 1-4, z anglického Bcl-2 homology). Samotné BH 1, 2 domény jsou jen u anti-apoptických proteinů. BH 3 doména je někdy označována jako doména smrti a spolu s interakční doménou je zodpovědná za zabíjení buněk. Poslední doménou je BH 4 doména, která se nikdy nevyskytuje u induktorů PCD, kromě proteinu Bcl-x_s. Všechny proteiny této rodiny obsahují (TM) doménu (transmembránovou), která ukotvuje proteiny na membránách. Proteiny Bad a Bid, které mají tuto doménu blokovanou, jsou v důsledku toho umístěny v cytoplazmě. Proteiny s TM doménou byly lokalizovány na vnější straně mitochondriální membrány, kde jsou navázány C-terminální hydrofóbní doménou (Zha *et al.* 1996a). Proteiny

Bcl-2 a Bax jsou navázány na endoplazmatické retikulum (Gotow *et al.* 2000). V roce 1997 bylo pomocí fúzního Bax/GFP proteinu zjištěno, že Bax se po aktivaci PCD redistribuje z cytoplazmy na vnější stranu mitochondriální membrány (Wolter *et al.* 1997) a oligomerizuje (Nechushtan *et al.* 2001). Poslední doménou je tzv. variabilní smyčka (asi 60 aminokyselin), kde dochází k posttranslačním modifikacím (zejména k fosforylacím), díky nimž jsou Bcl-2 proteiny schopny vazby na membrány (Kelekar a Thompson 1998).

Mezi anti-apoptotické proteiny patří Bcl-2, Bcl-x_L, Bag, Bid nebo Bcl-w. Ty obsahují všechny čtyři BH domény. Pro-apoptotické proteiny jsou rozděleny do dvou podskupin. Podskupina Bax je složená z proteinů mj. Bax a Bak obsahující BH 1, 2 a 3 doménu. Druhou podskupinou jsou proteiny s BH3 doménou (např. Bid, Bim, Bad, Bmf, Blk a Puma, Zha *et al.* 1996b, Kelekar a Thompson 1998, Huang *et al.* 2000, obr. 3.4.).

Zatím však není zcela jasné jak Bcl-2 proteiny fungují. Existují dva modely účinku těchto proteinů. První model říká, že Bcl-2 přímo kontrolují kaspázy (Strasser 2000) a druhý naopak poukazuje na to, že tyto proteiny chrání integritu mitochondrií (Wang 2001). Bcl-2 jsou schopny zvyšovat permeabilizaci mitochondriální membrány tím, že mohou samy vytvářet kanály (Antonsson a Martinou 2000) nebo interagovat s komponenty mitochondriálního PT póru (podjednotkou VDAC, Tsujimoto a Shimizu 2000, Crompton 2000). Další důležitou charakteristikou této rodiny je schopnost vytvářet homo a hetero diméry (Sato *et al.* 1994) prostřednictvím svých BH domén. Např. homodimery Bax/Bax vedou k indukci PCD, naopak heterodimery Bcl-2/Bax zabraňují propuknutí PCD (Yang *et al.* 2002, Liu *et al.* 2004). Bylo prokázáno, že proteiny této rodiny jsou také schopny *in vitro* vytvářet kanály v syntetických lipidových membránách a tím umožňují pasivní tok iontů a malých molekul přes intracelulární membrány (Hennet *et al.* 1993).

3.2.3.2. Rostlinný model

Do dnešní doby nebyly u rostlin nalezeny žádné geny kódující některé proteiny z rodiny Bcl-2 proteinů. Nicméně srovnávací genomové studie ukazují, že u *Arabidopsis thaliana* by mohly existovat proteiny podobné savčím Bcl-2. Lancomme a Santa Crus (1999) vektor odvozený z viru mozaiky tabáku (TMV) a při overexpresi Bax se u rostlin tabáku vytvářely léze podobné těm, které vznikají při hypersenzitivní reakci. Také byla navozena indukce obranných PR-1 a N genů.

Bylo prokázáno, že rostliny jsou schopny exprese vnesených živočišných Bcl-2 proteinů z rodiny Bcl-2, např. Bcl-x_L, CED-9 nebo Bax (Kawai-Yamada 2001).

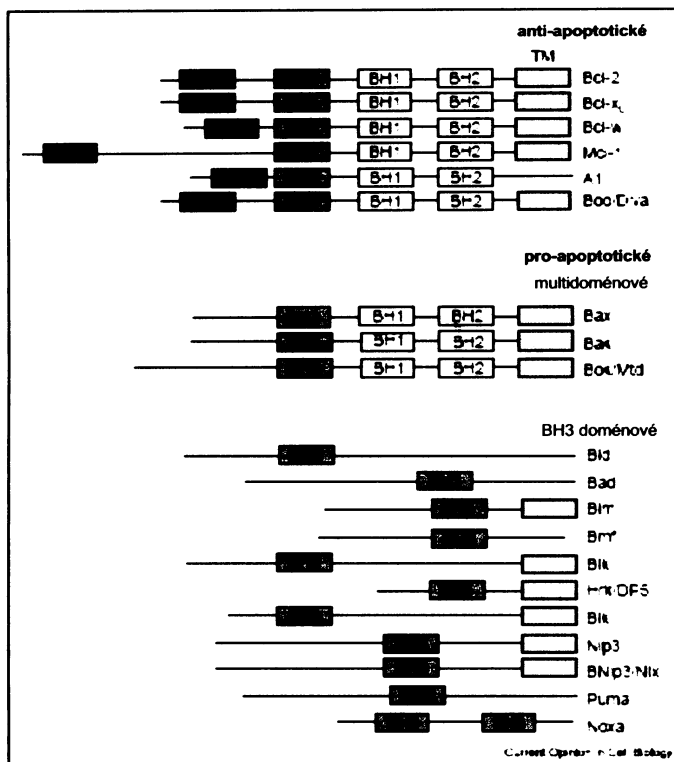
Jedním ze supresorů Bax je BI-1 (Bax inhibitor 1), který brání PCD u kvasinek a živočišných buněk (Xu a Reed 1998, Yu *et al.* 2002, Hüchelhoven 2004). Homolog BI-1 byl

Obr. 3.4. Klasifikace Bcl-2 proteinů (podle Kuwana a Newmeyer 2003)

TM – Transmembránová doména sloužící k ukotvení proteinů na membránách.

BH 1-3 – Pro-apoptotické domény.

BH 4 – Doména, která se nevyskytuje u induktorů PCD.



izolován z huseníčku a rýže

(Xu a Reed 1998), který stejně

jako živočišný BI-1 je schopen

zastavit PCD navozenou

Bax jak u kvasinek, tak i u

rostlin (Sanchez *et al.* 2000,

Matsumura *et al.* 2003, Kawai-

Yamada *et al.* 2004, Watanabe

a Lam 2006) a lidských HEK

293 buněk (Bolduc *et al.*

2003). Avšak mechanismus

potlačení aktivity Bax pomocí rostlinného BI-1 i role v regulaci a aktivaci PCD je zatím

neznámá. U *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny dva různé homology živočišných BI-1 (pro

přehled Lam *et al.* 2001). AtBI-2, který byl nejprve popsán jako AtBI-1 (Xu a Reed 1998) a

AtBI-3. Ten byl identifikován na základě sekvenčních analýz. Oba tyto geny kódují protein

s konzervativní C a N-koncovou doménu a jsou také strukturně podobné genu OsBH-1 rýže

(Sanchez *et al.* 2000). Na základě sekvencí byly předpovězeny ABRs (z anglického AtBI-2

related proteins), které jsou 650 aminokyselin dlouhé a obsahují 5-6 transmembránových

helixů. Díky tomu mohou podobně jako Bax a Bcl-2 vytvářet nebo modifikovat iontové

kanály v membránách vzniklé Bax nebo Bcl-2 (Lam *et al.* 2001).

Dva homology BI-1 byly nalezeny u *Brassica napus* (BnBI-1) a u *Nicotiana tabaccum*

(NtBI-1). Oba proteiny jsou vysoce identické k AtBI-1 a k lidským HuBI-1 (Bolduc *et al.*

2003). Jsou schopné potlačit PCD vyvolanou Bax u lidských embryonálních buněk ledvin

293. Lokalizační studie pomocí fúzního proteinu BnBI-1/GFP ukázaly, že BI-1 je asociován

s těžkou membránovou frakcí (mitochondrie, lysozomy a drsné endoplazmatické retikulum)

a s jadernou membránou (Xu a Reed 1998, Kawai-Yamada *et al.* 2001, Bolduc *et al.* 2003).

Jelikož je endoplazmatické retikulum rezervoárem vápenatých iontů a vzhledem k potenciální

aktivitě iontového kanálu BI-1, může být BnBI-1 regulátorem koncentrace cytozolického

vápníku (Bolduc *et al.* 2003).

3.3. Buněčný cyklus a PCD

3.3.1. Buněčný cyklus – základní pojmy

Buněčný cyklus eukaryotických buněk, který je složen ze čtyř po sobě jdoucích fází, G1, S, G2 a M fáze, je jedním z nejkonzervativnějších procesů všech eukaryotických buněk. Stejně jako všechny procesy v živých organizmech tak i buněčný cyklus je vysoce regulován. Systém má dva důležité kontrolní body. V prvním kontrolním bodě v pozdní G1 fázi se vlivem signálů z prostředí buňka rozhoduje, zda bude pokračovat v cyklu nebo vstoupí do tzv. klidové G0 fáze. Další kontrolní bod se nachází na přechodu G2/M fáze. Regulace buněčného cyklu probíhá u všech eukaryot na úrovni transkripční, posttranskripční a posttranslační.

Kontrolní body a vstupy do jednotlivých fází jsou řízeny klíčovými proteiny v komplexu. Hlavními hráči buněčného cyklu jsou cyklín-dependentní serin threoninové kinázy (CDK) a cyklíny.

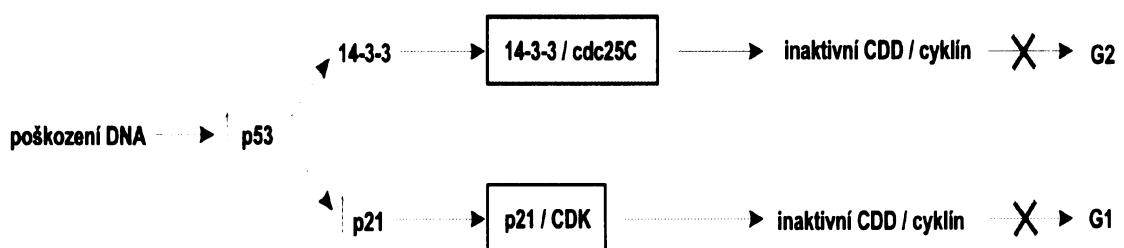
K pochopení indukce PCD během buněčného cyklu (resp. prostřednictvím kontrolních bodů) u rostlin je nutné nejprve pochopit jednotlivé přechody buněčného cyklu. První kontrolní bod je umístěn v pozdní G1 fázi (Gutierrez-2002, Rossi a Varotto 2002). Pro vstup to S fáze je nutná aktivita transkripčního faktoru E2F. Během G1 fáze je tento transkripční faktor navázán na retinoblastomový RB protein. Ten hraje u živočišných buněk důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a zejména pak tam, kde se buňky rozhodují mezi dělením, klidovou fází anebo smrtí. Jedná se vlastně o negativního regulátora E2F, který aktivuje histon deacetylázu v promotorech genů regulovaných E2F (např. Myb, Myc nebo DNA polymerázy II) a tím zastaví jejich transkripci. Fosforylace Rb cyklínem D vyústí v uvolnění vazby E2F a Rb a regulaci E2F závislých genů. U rostlin bylo nalezeno několik vysoce homologních proteinů k živočišným Rb (např. Zm RBR1, 2, 3 nebo At RbR, Dewitte a Murray 2003, Sabelli *et al.* 2005). Rostlinný transkripční faktor E2F má všechny hlavní domény jako savčí E2F (DNA vazebnou, dimerizační a interakční doménu s Rb). E2F se dělí podle toho, zda dimerizují s DP nebo jsou monomerické. Diméry E2F/DP mají vysoce konzervativní vazebnou doménu a pravděpodobně se díky tomuto vážou na stejnou sekvenci DNA jako jejich živočišné homology (Shen *et al.* 2002).

Druhý kontrolní bod je umístěn na přechodu G2 a M fáze (Inzé a De Veyled 2006) a je kontrolován aktivitou komplexu CDK-cyklínu B1. Ten je pravděpodobně u rostlin asociován jak s CDK typu A, tak typu B1. Jejich aktivita je regulovaná přes KRP proteiny (z anglického KIP-related protein, Nakai *et al.* 2006) patřící mezi inhibitory CDK a také inhibiční fosforylací WEE1 kinázy (De Schutter *et al.* 2007). I když nebyl u rostlinných buněk nalezen přímý homolog fosfázazy Cdc25, která u živočišných buněk aktivuje CDK,

hrají pravděpodobně fosfatázy důležitou roli při vstupu buněk do mitózy (Boudolf *et al.* 2006, Duan *et al.* 2007, Teichmanov *et al.* 2007).

3.3.2. PCD a buněčný cyklus u živočišných buněk

PCD apoptotického typu u živočišných buněk je indukovaná zejména na přechodu G1/S fáze pomocí p53 proteinu (obr. 3.5.). Jde o produkt tumor supresorového genu, který je důležitým jak v kontrole přechodových bodů buněčného cyklu, indukce buněčné smrti, tak i v genetické stabilitě (Levine 1997). Je sekvenčně specifický transkripční transaktivátor (Farmer *et al.* 1992), který kontroluje různé geny tím, že je schopen vazby do jejich regulační oblasti obsahující specifickou DNA konsenzus sekvenci. Do této skupiny patří mj. geny pro p21 nebo Bax proteiny (Bunz *et al.* 1998, Helt *et al.* 2001). Díky transkripční aktivaci těchto genů dochází k zastavení buněčného cyklu jak na přechodu G1/S, tak na přechodu G2/M fáze, který následně vede až k aktivaci PCD. p21 patří mezi tzv. CKI (z anglického cyclin-dependent kinase inhibitor, Besson *et al.* 2008) a je nezbytnou součástí pro zastavení buněk v G1 fázi v závislosti na poškození DNA. Je-li aktivován, naváže se na komplex CDK a cyklínu, čímž ho znefunkční a tak následně zabrání odpojení RB proteinu od E2F transkripčního faktoru a tím i postupu buněk v buněčném cyklu. Dále se váže na PCNA (z anglického proliferating-cell nuclear antigen), čímž brání replikaci DNA, ale už neovlivňuje pre-replikativní reparaci DNA (Chen *et al.* 1995). Ta je pravděpodobně také spouštěna p53 proteinem, který se účastní různých typů reparace DNA (blíže Bernstein *et al.* 2002).



Obr. 3.5. Schéma poškození DNA způsobující zastavení buněčného cyklu pomocí p53 (upraveno podle Hermeking *et al.* 1997)

3.3.3. PCD a buněčný cyklus u rostlinných buněk

Na přechodu G2/M fáze p53 zastavuje buněčný cyklus a navozuje PCD tím, že aktivuje protein kinázu Chk1 (z anglického checkpoint kinase 1), která inhibiční fosforylací inaktivuje Cdc25C a tím zablokuje průchod buněčným cyklem (Ruppenthal *et al.* 2007, Wang *et al.* 2007).

I když u rostlinných buněk nebyl v genomu nalezen homolog p53 (The Arabidopsis genome initiative 2000, Vanderpoele *et al.* 2002), byla snaha najít protein s podobnou funkcí. Ten však nebyl u rostlin nikdy nalezen ani pomocí různých heterologních sond u navozené PCD v buňkách hrachu (Klosterman *et al.* 2000) a ani pomocí monoklonální protilátky Pab 240 proti myši p53 u suspenzí kultury ječmene a klíčnicích semen ječmene ovlivněných UV zářením (Korthout *et al.* 2000, 2002). Pokud však nějaký funkční homolog živočišných p53 existuje, pak pravděpodobně vykazuje pouze nízkou sekvenční podobnost (Whittle *et al.* 2001).

Dosud existuje jen několik prací, které ukazují na propojení zastavení buněčného cyklu v určité fázi a aktivaci PCD po stresovém působení u rostlin. Modelem pro všechny tyto studie byla buněčná linie tabáku BY-2, jejíž buňky lze dobře synchronizovat. Herbert *et al.* (2001) ukázali rychlou indukci PCD během buněčného cyklu. Po aplikaci etylénu buňky vykazovaly nárůst mortality, v závislosti na aplikaci hormonu v S fázi a na přechodu G2/M fáze. U mrtvých buněk byla obarvena jádra s fragmentovanou DNA pomocí ApoTag testu. Kadota *et al.* (2004b) ukázali, že pomocí proteinového elicitoru kryprogeinu bylo indukováno zastavení buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi v závislosti na indukci buněčné smrti v předcházející fázi buněčného cyklu. Kryptogeinem indukovaná buněčná smrt byla detekována pouze u buněk, kterými byl tento elicitor rozpoznán v G1 nebo S fázi buněčného cyklu. Rozpoznání elicitoru buňkami v G2 nebo M fázi nebylo doprovázeno buněčnou smrtí. Což pravděpodobně souvisí s tím, že působení kryprogeinu může být inhibováno dělicími se buňkami (Kadota a Kuchitsu 2006). Ovlivnění kryprogeinem v G1 nebo S fázi indukovalo změny v koncentraci cytosolického vápníku, produkci ROS a aktivaci MAPK doprovázenou zastavením v buněčném cyklu a aktivací obranných reakcí (Kadota *et al.* 2005a, Kadota a Kuchitsu 2006). Prozatím je však mechanismus zastavení buněčného cyklu a signální dráha vedoucí k PCD u rostlin neznámá.

3.4. Degradace organel během PCD

Tato kapitola má za cíl ukazovat na rozdíly a podobnosti v degradaci rostlinných a živočišných buněčných organel. Jelikož je literatura týkající se rostlinné PCD značně v tomto ohledu omezená, bude výčet změn týkajících se organel při PCD zaměřen zejména na živočišné buňky.

3.4.1. Buněčné jádro

Buněčné jádro eukaryotických buněk je tvořeno nukleoplazmou a chromatinem (komplexem DNA a proteiny). Struktura chromatinu hraje u eukaryotických buněk různé

role. Je nástrojem strukturní organizace a sbalení genomu. A také spolu s proteiny jaderné matrix vytvářejí speciální fixní body genomu, které způsobují lokalizační typologii genomu. Tímto zabalením genomu způsobuje jeho přístupnost k transkripci. Avšak všechny tyto funkce souvisejí s určitou formou struktury chromatinu (blíže Paul a Ferl 1999).

Jedním z hlavních znaků apoptotické buněčné smrti je kolaps chromatinu vůči okrajům jádra, čímž vznikají větší shluky chromatinu uvnitř jádra. Často chromatin kondenzuje do malých denzních balónků, které se shlukují a vytvářejí strukturu podobnou vinným hroznům obklopenou jaderným obalem (Kerr *et al.* 1972). Změny chromatinu při apoptóze souvisejí se změnami na jaderné membráně. Změnou procházejí i jaderné póry, které klouzají po obalu jádra v důsledku rozpadu jaderné láminy a vytvářejí tak klastry mezi místy s kondenzovaným chromatinem (Holaska *et al.* 2002). Oproti rozpadu jaderné láminy při mitóze, který je způsoben fosforylací jednotlivých složek je apoptotický rozpad jader způsoben proteolytickou cestou (Buendia *et al.* 2001). Vzniklé fragmenty mohou poskytovat strukturální informaci membráně a tím jsou důležitými pro vznik mikrojadern a posléze i apoptotických tělísek (Earnshaw 1995). Bylo zjištěno, že chromatinové proteiny histon H1 a HMGB-1 (z anglického high-mobility group box protein 1) mohou sloužit jako signál během živočišné apoptózy i nekrózy. Histon H1 (resp. H1.2) předává informaci o poškozené DNA do mitochondrií a tím dochází k aktivaci mnoha molekul účastnících se apoptotického procesu (zejména vyplavení cytochromu c do cytozolu, Konishi *et al.* 2003). HMGB-1 naopak přenáší informaci o neprogramované buněčné smrti (Scaffidi *et al.* 2002). S fragmentací jader do mikrojadern souvisí i aktivace různých nukleáz. Jejich funkce byla již popsána v kap. 3.2.2.1 a 3.2.2.6.

Všechny tyto poznatky by mohly víceméně platit i u rostlin, avšak u nich nebyla existence lamínů potvrzena (Meier *et al.* 2001). Přesto však byly nalezeny kandidátní coiled-coil proteiny pro tuto funkci i u rostlin (např. NMCP1 - Masuda *et al.* 1997, FPPs - Gindullis *et al.* 2002, NMP1 - Rose *et al.* 2003 anebo MFPI - Meier *et al.* 1996).

Kromě fragmentovaných jader do mikrojadern (např. Danon a Gallois 1998, Kuthanová *et al.* 2004) byly u rostlin nalezeny také různé tvary interfázních jader buněk procházejících PCD. Prodloužená jádra byla pozorována u tabákové linie BY-2 vystavené působení H_2O_2 (Houot *et al.* 2001). Podobná jádra byla pozorována u rostlin tabáku podléhajících hypersenzitivní reakci po infekci virem mozaiky tabáku (Mittler *et al.* 1997). Při PCD u starších kořenů pšenice byly nalezeny pomocí TEM různé tvary jader (lalokovitá či prodloužená jádra) s vysoce kondenzovaným chromatinem (Liljeroth a Bryngelsson 2001). Obdobná extrémně elongovaná jádra byla nalezena i po působení $CdSO_4$ na BY-2 buňky (Kuthanová *et al.* 2004).

3.4.2. Golgiho komplex (GK)

Hlavní roli při zpracování a třídění membrán a jejich sekreci z endoplazmatického retikula k plazmatické membráně nebo post Golgi hraje GK. Degradace GA během apoptotického procesu je podobná rozpadu při mitóze. Proteiny GK golgin-160, GRASP 65 a p115 byly u živočišných buněk nalezeny jako substráty kaspáz (Machamer 2003), a tedy dochází k jejich štěpení během apoptotické buněčné smrti. Protein golgin-160 patří do skupiny tzv. golginů, periferních membránových proteinů asociovaných s GK. Ty jsou zodpovědné za udržení struktury GK. Při apoptóze dochází ke štěpení tohoto proteinu *in vitro* kaspázou 2, kaspázou 3 a 7. Kaspáza 2, která je lokalizovaná v jádře, cytoplazmě, ale také na GK štěpí tento protein v unikátním místě (Mancini *et al.* 2000), čímž vznikají fragmenty o 140 a 163 kDa. Vzniklý fragment s NH₂ koncem obsahuje NLS (z anglického nuclear localization sequences) a je tažen do jádra (Hick a Machamer 2002). Druhým proteinem GK, který je štěpen kaspázou 3, je GRASP 65 (z anglického Golgi reassembly and stacking protein of 65kDa) a je lokalizován ve střední části GK. Je štěpen kaspázou 3 v konzervativním místě na COOH konci na počátku exekuční fáze apoptózy. Při apoptóze je protein p115 štěpen kaspázami 3 a 8. Při kolapsu celého proteinu nebo jen N koncového fragmentu nedocházelo k žádným změnám ve struktuře GK. Naopak, exprese fragmentu s COOH koncem vyvolalo štěpení GK. Navíc docházelo k transportu tohoto fragmentu do jádra, kde aktivoval apoptotický program (Chin *et al.* 2002).

3.4.3. Endoplazmatické retikulum (ER)

Endoplazmatické retikulum eukaryotických buněk je místem syntézy, modifikace a transportu proteinů pomocí sekretorických drah spojující je s extracelulárním prostorem. Proteiny jsou v ER sbaleny do jejich nativní konformace a podléhají posttranslačním modifikacím. Pouze správně sbalené proteiny mohou být dále exportovány do GK. Ty, které nejsou správně sbalené, jsou zadržovány v ER, aby dokončily tento proces, anebo jsou v ER degradovány. V ER jsou také syntetizovány lipidy, steroly a velká část buněčné stěny. Pokud se však naruší nějaký z těchto procesů (nejčastěji jde o porušení správného sbalení proteinů), vzniká tzv. ER stres (např. Hussain a Ramaiah 2007). Existují tři hlavní signální dráhy, které vedou k redukci množství nově syntetizovaných proteinů přesunutých do lumen ER, zvýšenému přesunu a degradaci nesprávně sbalených proteinů a konečně zvětšení „sbalovací“ aktivity proteinů ER, čímž zabrání ER stresu. K těmto drahám patří tzv. UPR (z anglického unfolded protein response, Malhorta a Kaufman 2007), EOR (z anglického ER overloading response) a ERAD dráhy (z anglického ER assoiated degradation, Kincaid a Cooper 2007). Pomocí jednoduchých adaptačních mechanismů se

pak aparát ER vrací do fyziologického stavu. Pokud však tyto mechanismy selžou, spouští se dráha vedoucí k buněčné smrti apoptotického a autofagického typu (pro přehled Rao *et al.* 2004, Høyer-Hansen a Jäättelä 2007) a nesbalené proteiny jsou akumulovány v lumen ER. Transmembránové proteiny mají v lumen ER N-konec, C-konec je lokalizován v cytozolu, čímž vzniká most mezi těmito dvěma kompartmenty buněk. Za normálních podmínek je N-konec těchto transmembránových proteinů držen v lumen ER pomocí chaperonu Grp 78 (BiP) zabraňující jejich hromadění. Ale pokud dojde k hromadění špatně složených proteinů, Grp 78 se uvolní a tím se zvýší hromadění těchto transmembránových proteinů a iniciuje UPR dráhu. Buněčná smrt apoptotického typu vyvolaná ER stresem zahrnuje proteiny rodiny Bcl-2, které souvisejí s udržením homeostázy vápenatých iontů v ER (Rudner *et al.* 2002, Scorrano *et al.* 2003) a také s aktivací kaspázy 12, 9 a 7 (Morishima *et al.* 2001).

Analýzy chování Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula během PCD u rostlin jsou zatím spíše ojedinělé. Byla posána jejich degradace téměř ihned po vakuolárním kolapsu při přeměně mezofylových buněk *Zinnia elegans* na tracheární elementy (Obara a Fukuda 2004). Během vzniku lyzigenního aerenchymu u kukuřice docházelo k tvorbě jednoduchých měchýřků, ve kterých byly pozorovány zbytky organel, hlavně endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu. Tyto měchýřky pravděpodobně představují apoptotické měchýřky známé z živočišných buněk (Gunawardena *et al.* 2001).

3.4.4. Mitochondrie

Většina funkcí mitochondrií spojená s PCD byla již popsána v kap. 3.2.2.1 – vnitřní apoptotická dráha. Je nutné ale znovu připomenout, že mitochondrie jsou klíčovou organelou účastnící se zejména aktivace apoptotické dráhy u živočichů. Její funkce je jednak v koordinaci kaspázové aktivity přes vyplavení molekuly cytochromu c do cytozolu. Cytochrom c spolu s Apaf-1 a ATP vytváří velký proteinový komplex, tzv. apoptozóm, který aktivuje kaspázu 9. Existují alespoň dva mechanismy, jakými se cytochrom c dostává do cytoplazmy (Green a Reed 1998). Jednak pomocí tzv. PT pórů (z anglického permeability transition pore), které jsou vysoce vodivé neselektivní kanály vytvářející se mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou (Crompton *et al.* 1998). Jsou složeny z VDAC (z anglického voltage-dependent anion channel) umístěného na vnější mitochondriální membráně, z ANT (z anglického adenin nucleotide transporter) na vnitřní stranu mitochondriální membrány. Poslední složkou tohoto póru je cyklofilin D, který je umístěn v mitochondriální matrix. Otevření tohoto kanálu způsobuje mnoho fyziologických efektorů, jako jsou toky vápenaté ionty, snížená koncentrace adeninu, zvýšené koncentrace reaktivních forem kyslíku, změny pH (Green a Reed 1998). Při vytváření transientních pórů dochází k obrovskému toku vody,

bobtnání cytoplazmy a nakonec k prasknutí vnější mitochondriální membrány, čímž se dostává do cytozolu cytochrom c. Druhou možností jak dochází k vyplavení cytochromu c je přes samotný VDAC, označovaný také jako porín. V tomto případě většinou nedochází k bobtnání mitochondrií a ani k praskání mitochondriální membrány. U buněk krysích jater se PT póry vytvářejí pro průchod cytochromu c. Oproti tomu u mozkových buněk krys dochází k vyplavení cytochromu c do cytozolu jinou cestou, přes VDAC (Andreyev a Fiskum 1999). Vyplavení cytochromu c je také úzce spojeno s regulací pro a anti apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (blíže kap. 3.2.3.1).

U rostlinných buněk platí toto schéma vyplavení cytochromu c téměř bez výhrad. Translokace cytochromu c do cytozolu po ovlivnění kotyledonů okurky vysokou teplotou (55°C) byla doprovázena fragmentací DNA (Balk *et al.* 1999). U suspenzní kultury mrkve bylo ukázáno, že přidaný živočišný cytochrom c je schopen aktivovat enzymy podobné kaspázám (Zhao *et al.* 1999). Při hypersenzitivní reakci docházelo také k vyplavení cytochromu c z mitochondrií do cytozolu a to přes PT póry (Saviani *et al.* 2002). Po ovlivnění rostlin tabáku cv. BelW3 ozónem byly pozorovány léze podobné těm, které vznikají při HR, TUNEL-pozitivní jádra a translokace cytochromu c (Pasqualini *et al.* 2003).

Při PCD dochází ke změnám také na elektrontransportním řetězci na vnitřní mitochondriální membráně. Je složen ze 4 komplexů: NADH-dehydrogenázy, sukcinátdehydrogenázy, cytochromu b, c1 a cytochromu oxidázy. U rostlin ale existuje unikátní enzym alternativní oxidáza (AOX), která je aktivovaná, pokud je klasická respirační cesta saturovaná. Studium transgenních rostlin tabáku se zablokovanou AOX při HR ukázalo, že tyto mutanti podléhají ireverzibilní buněčné smrti. Byla pozorována i fragmentace DNA (Robson a Vanlerberghe 2002). Paradoxně, mitochondrie jsou také jedním z hlavních producentů reaktivních forem kyslíku v buňce. AOX tím, že je schopná přenášet elektrony z ubichinonu na kyslík, který je pak redukován na vodu, slouží jako ochrana před oxidativním stresem v mitochondriích. Konečně funkce mitochondrií při PCD souvisí s aktivací Mg^{2+} závislé nukleázy v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Po přidání této nukleázy k izolovaným jádrům docházelo k fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu těchto jader (Balk *et al.* 2003).

3.4.5. Vakuoly (pro přehled Jones 2001)

Vakuolizace u živočišných buněk pozorovaná během PCD je spojována zejména s apoptotickým a autofagickým umíráním buněk. U těchto typů PCD dochází k intenzivní vakuolizaci cytoplazmy a v případě autofagie i ke vzniku autofagických vakuol, a tak k degradaci cytozolu a organel.

U rostlinných buněk je situace odlišná. Rostlinné vakuoly jsou schopny transformace ve velké kompartmenty, které jsou zásobárnami hydrolytických enzymů. Ty se po prasknutí tonoplastu vyplavují do cytozolu, kde způsobují destrukci buněčného aparátu (Kuriyama 1999). Dramatickým změnám podléhají vakuoly např. při HR, senescenci a terminální diferenciaci TE. Kolaps tonoplastu byl poprvé popsán pomocí časosběrné videomikroskopie Grooverem *et al.* (1997). Vakuolární kolaps není výsledkem metabolického vyčerpání buňky, ale je řízen buňkou. Je indukován zvýšenou koncentrací vápenatých iontů, jejichž vtok přes plazmatickou membránu je způsoben pravděpodobně fragmentovanými proteiny. Téměř ihned po kolapsu vakuol dochází k rozpadu organel a nespecifické fragmentaci DNA. Během senescence listů byly pozorovány invaginace tonoplastu do vakuol, které často obsahovaly cytoplazmu a organely (Inada *et al.* 1998).

3.4.6. Plastidy

Mutanti *lin2* a *acd2* s tvorbou tzv. mimických lézí (podobných těm, které se objevují při HR) u *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays* se používají pro studium porfyrinového metabolismu, který je nutný pro biosyntézu chlorofylu. Během spontánní buněčné smrti u těchto mutantů vznikají tyto léze zřejmě poškozením chloroplastů (Hu *et al.* 1998).

Během senescence listů dochází u fotosynteticky aktivních pletiv k degradaci chloroplastů (dilataci a rozpadu tylakoidních membrán, zvětšení počtu plastoglobulů a snížení obashu pigmentů, Simeonova *et al.* 2000). Dále byla pozorována i degradace chloroplastové DNA (Inada *et al.* 1998). Degradace chloroplastů byla také popsána během druhého stádia přeměny mezofylových buněk *Zinnia elegans* v tracheální elementy (Obara a Fukuda 2004).

3.4.7. Plazmatická membrána

Plazmatická membrána prodělává během PCD plno modifikací jako např. ztrátu symetrie a přesun fosfatidylserinu z vnější na vnitřní stranu plazmatické membrány. Tento přesun fosfatidylserinu patří u živočišných buněk k časným markerům PCD. Je měřen pomocí vazby annexinu V, který se preferenčně váže na negativně nabitě fosfolipidy, ke kterým patří i fosfatidylserin. U rostlin existují práce, které ukazují na stejnou translokaci fosfatidylserinu na plazmatické membráně (Ning *et al.* 2002).

3.5. PCD ve vývoji rostlin (obr. 3.6)

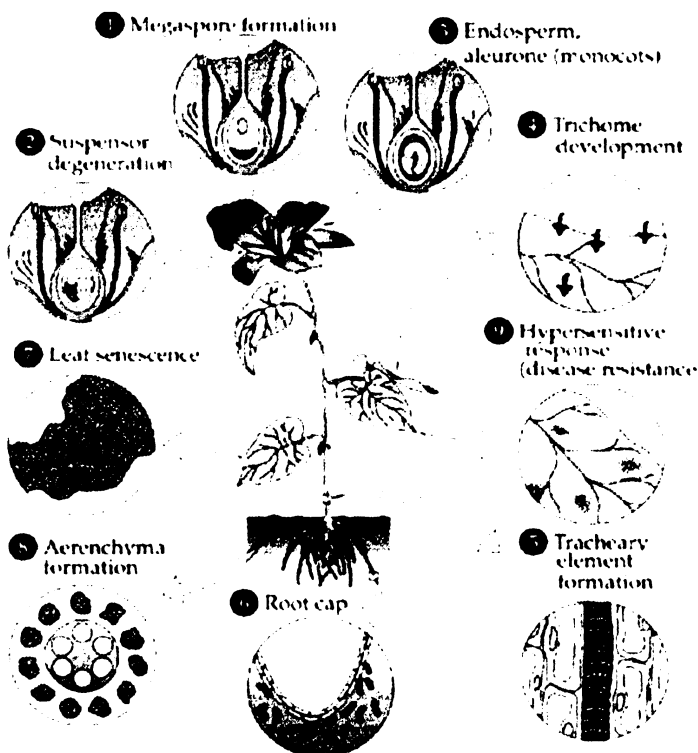
3.5.1. PCD při vegetativním vývoji rostlin

3.5.1.1. Aleuronová vrstva a endosperm (pro přehled Fath *et al.* 2000)

Degenerace buněk endospermu během zrání a klíčení embryí podporuje vývoj (růst) embrya při mobilizaci energetických rezerv. Vhodným modelem pro studium tohoto typu buněčné smrti je ječmen nebo kukuřice. Aleuronová vrstva obilných zrn je nejlépe prostudovaný systém hormonální signalizace ve vývoji rostlin. Jde o sekretorické pletivo, které produkuje hydrolytické enzymy používané pro mobilizaci zásobních produktů (uhlíku a dusíku) v endospermu během klíčení semen. U ječmene byl také vytvořen model odumírání těchto buněk. V prvním stádiu buňky škrobového endospermu degenerují, ztrácejí svou fyziologickou aktivitu během zrání semen. Proto je škrobový endosperm zralých zrn složen z mrtvých buněk. Přesto si však udržuje svou buněčnou strukturu se zbytky jader, ribozómů a endoplazmatického retikula. Tyto zbytky jsou poté „uklizeny“ za pomoci degradačních enzymů z aleuronové vrstvy. Jde o druhé stádium degradace buněk endospermu. Třetí stádium je charakteristické programovaným umíráním buněk aleuronové vrstvy (obr. 3.7, Fath *et al.* 2000).

Obr. 3.6. Schéma PCD (nejen) během vývoje rostlin (Buchanan *et al.* 2002)

- 1 Vývoj megaspóry.
- 2 Umírání buněk aleuronové vrstvy.
- 3 Vývoj trichomu.
- 4 Hypersenzitivní reakce po napadení patogeny.
- 5 Diferenciace mezofylových buněk v tracheální elementy.
- 6 Umírání buněk kořenový čepičky.
- 7 Vývoj lyzigemiho aerenchymu.
- 8 Senescence a opad listů.
- 9 Umírání buněk během somatické embryogeneze.



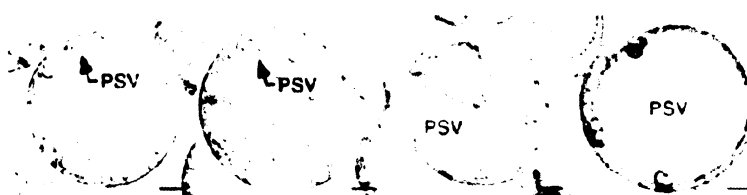
N u k l e á z y , které jsou aktivovány během umírání buněk aleuronové vrstvy, jsou regulovány etylénem (Young *et al.* 1997,

Young a Gallie 1999). Gibereliny (GA) a abscisová kyselina (ABA) také regulují produkci enzymů pro mobilizaci škrobových rezerv endospermu při PCD u ječmene (Wang *et al.*

1996a, Bethke *et al.* 1999), pšenice (Kuo *et al.* 1996) a rýže (Wei *et al.* 2002). Protoplasty vytvořené z buněk aleuronové vrstvy ovlivněné GA jsou více senzitivní k ROS (z anglického *reactive oxygen species*) než protoplasty ovlivněné ABA (Bethke a Jones 2001). GA indukují v aleuronových buňkách syntézu a sekreci hydroláz (α -amyláz a proteáz). Fath *et al.* (1999) ukázali, že existují alespoň 3 nukleázy, které mohou způsobit zlomy ssDNA a RNA stejně jako ds DNA. Aktivity těchto nukleáz jsou regulovány jak GA, tak ABA (Fath *et al.* 1999). Navíc bylo pozorováno značení jader TUNEL reakcí a internukleozomální DNA fragmentace (Wang *et al.* 1996a). Toto zjištění je však považováno částečně za technický artefakt, jelikož buňky škrobového endospermu nevykazují charakteristické znaky apoptotické PCD (Fath *et al.* 1999), spíše byla v protoplastech aleuronových buněk u ječmene pozorována zvýšená vakuolizace, náhlá ztráta integrity plazmatické membrány a následný rychlý úbytek zbytku protoplastu (Bethke *et al.* 1999). Aleuronové buňky obsahují zásobní vakuoly, kde se skladují proteiny (PVS, z anglického *protein storage vacuole*) s pH kolem 7. Po ošetření protoplastů z buněk aleuronové vrstvy GA docházelo ke zvýšené vakuolizaci (autofagické vakuoly), jejich pH se snižovalo na 5.5 a začaly se v nich hromadit hydrolytické enzymy. Působením ABA se naopak PCD oddaluje (Young a Gallie 2000), pH těchto vakuol se neměnilo.

Další součástí embrya, jehož buňky podléhají PCD během klíčení, je skutelum. S tímto typem buněčné smrti je spojováno studium živočišného anti-apoptotického genu *dad* (z anglického *defender against apoptotic cell death*). Exprese tohoto genu klesá před fragmentací DNA, naopak ve stejné době se zvyšuje exprese jiných genů (např. *dad 2* nebo *ost 1*, Lindholm *et al.* 2000).

Obr. 3.7. Zvýšená vakuolizace a vakuolární kolaps u buněk aleuronové vrstvy ječmene před PCD indukovanou GA (Bethke *et al.* 1999)
PSV - z anglického *protein storage vacuoles* (zásobní vakuoly s proteiny).



3.5.1.2. Tracheální elementy (pro přehled např. Fukuda 1996, Fukuda 1997, Fukuda 2000, Obara a Fukuda 2004)

Rostlinné cévní svazky, které jsou složeny z buněk xylému a floému, slouží k transportu živin, iontů a vody. Cévy a cévice, které jsou tvořeny mrtvými buňkami, jsou nazývány cévními (tracheálními) elementy (TE, z anglického *tracheary elements*). Prázdné TE jsou důležité pro vedení transpiračního proudu a musejí proto odolávat velkému sacímu tlaku. U těchto buněk dochází k nerovnoměrnému tloušťnutí buněčné stěny. Autolýza TE je

nejlépe prostudovaným typem rostlinné PCD. Xylémové buňky se diferencují z prokambia nebo kambia, avšak pouze terminální diferenciací xylému zahrnuje proces PCD. Na konci nově vzniklých TE dochází k perforacím buněčných stěn. *In vivo* tyto perforace vznikají pouze na jednom konci, v místě kde je vznikající element spojen s již vzniklým, mrtvým, TE (Shinohara *et al.* 2000). *In vitro* byla tato polarita potvrzena pomocí SEM u kultury mezofylových buněk cínie (Nakashima *et al.* 2000). Modelovým organismem pro studium této PCD je téměř ve všech laboratořích *Zinnia elegans* cv. Yellow Bird nebo Green Envy, u níž lze *in vitro* velmi snadno izolovat mezofylové buňky (Fukuda a Komamine 1980 a, b), které v přítomnosti auxinů a cytokininů jsou schopné takřka synchronní rediferenciací v TE. Tento proces zahrnuje 3 po sobě jdoucí kroky (Fukuda 1997, Obara a Fukuda 2004). Při prvním stádiu jsou mezofylové buňky izolovány, ztrácejí fotosyntetický aparát a dediferencují se. Druhé stádium je shodné s diferenciací prokambia v TE v meristémech. Ve třetím stádiu se vytvoří sekundární buněčná stěna, která se následně lignifikuje. Ihned po lignifikaci dochází k úplné autolýze celého protoplastu. Mezofylové buňky podléhající PCD procházejí řadou cytologických změn. Rychlá a postupná degradace organel zahrnuje endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex, mitochondrie, jádra, vakuoly, ztrátu plazmatické membrány i části primární buněčné stěny. Prvním a nejdůležitějším krokem vedoucím k úplné degradaci buněčného obsahu je tzv. vakuolární kolaps, změna permeability tonoplastu (obr. 3.8, Groover *et al.* 1997, Groover a Jones 1999, Kuriyama 1999). V centrální vakuole se akumulují hydrolytické enzymy, které se po prasknutí tonoplastu vyplavují do celého obsahu buňky. Vakuolárnímu kolapsu předchází vtok vápenatých iontů do buňky. Roberts a Haigler (1992) ukázali, že vtok Ca^{2+} je nutný pro vznik sekundární buněčné stěny a pravděpodobně není nutný pro přímou indukci vakuolárního kolapsu. Po vyplavení hydrolytických enzymů následuje popraskání jednomembránových organel. Endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex „bobtnají“, vytvářejí strukturu podobnou balonu a následně praskají. Degradace dvoumembránových organel (mitochondrií a chloroplastů) začíná porušením jejich matrix a až pak membrán. Buněčné jádro je v důsledku rozpínivosti centrální vakuoly tlačeno k buněčné stěně. Po vakuolárním kolapsu dochází k přeměně jeho tvaru z oválného na kulaté a do 20min k úplné degradaci jaderné i chloroplastové DNA (Obara *et al.* 2001). Avšak nikdy nebyla pozorována fragmentace chromatinu a celého jádra.

Diferenciací TE se účastní několik typů proteolytických enzymů, které jsou aktivovány prasknutím vakuolární membrány. Většina proteáz, které se účastní přeměny mezofylových buněk na TE, byly již popsány v kap. 3.2.2.2. Těsně před vlastní autolýzou buněk je přechodně aktivována 30kDa cysteinová proteáza p48h-17 (Minami a Fukuda 1995, Ye a Varner 1996) a také ZCP4 (Yamamoto *et al.* 1997). Dvě další proteázy podobné p48h-

17 a ZCP4 byly nalezeny u *Arabidopsis thaliana* (XCPI a 2, Zhao *et al.* 2000). Pomocí GFP fúze bylo ukázáno, že tyto proteázy jsou transportovány z cytozolu do vakuoly (Funka *et al.* 2000).

Obr. 3.8. Diferenciace mezofylových buněk *Zinnia elegans* v tracheální elementy (Groover a Jones 1999)

A – Izolované mezofylové buňky cínie.

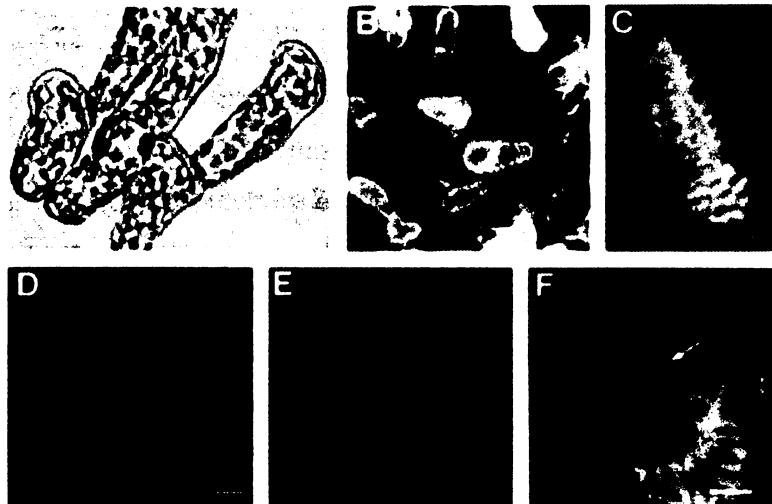
B – Izolované buňky po 96hod kultivace, fluorescenční mikroskopie nediferencované buňky vykazují červenou autofluorescenci jejich chloroplastů. Žlutá autofluorescence lignifikovaných buněčných stěn diferencovaných tracheálních elementů.

C – Sekundární buněčné stěny diferencovaných tracheálních elementů značené Caucofluorem white.

D – Tracheální elementy před vakuolárním kolapsem.

E – Tracheální elementy po vakuolárním kolapse. Barveno fluoresceindiacetátem.

F – Jádro označené TUNEL reakcí. Autofluorescence sekundárních buněčných stěn.



Jeden z hlavních znaků apoptotické PCD je fragmentace DNA do nukleozomů. Vzniklý DNA žebříček je důsledkem aktivace endonukleáz. U buněk *Zinnia elegans* kultivovaných *in vitro* bylo nalezeno 7 skupin s RNázovou nebo DNázovou aktivitou. Šest z nich jsou specifické pro TE. 43kDa nukleáza, ZEN1 má jako jediná RNázovou i DNázovou aktivitu. Je podobná S1 nukleáze z *Aspergillus*. Optimální pH pro tuto nukleázu je 5,5 a proto je funkční ve vakuolách nebo těsně po vakuolárním kolapsu (Sugiyama *et al.* 2000, Ito a Fukuda 2002).

Během diferenciace buněk v TE byly nalezeny geny, které se této přeměny účastní. TED geny (z anglického tracheary element differentiation) byly nalezeny zejména v časných stádiích diferenciace. TED 2 kóduje protein podobný alkoholdehydrogenáze. TED 3 je preferenčně exprimován v prekurzorových buňkách TE a kóduje protein a motivem asp-gly-tyr, který je pravděpodobně komponentem buněčné stěny (Demura *et al.* 1997). TED 4 z ječmene kóduje protein podobný nespecifickým lipid transferovým proteinům (Demura a Fukuda 1993, 1994) a slouží jako supresor proteazomu mrtvých buněk TE (Endo *et al.* 2001).

3.5.1.3. Autolýza floémových buněk

Základní stavební jednotkou floému jsou tzv. sítkové elementy, které slouží k transportu asimilátů (zejména cukrů, vody, ale i organických a anorganických sloučenin) v rostlině. V dospělosti jsou tyto elementy mrtvé. Během autolytické reakce dochází k degradaci jádra, porušení tonoplastu, změně plastidů a mitochondrií (Beers *et al.* 1997).

3.5.1.4. PCD během somatické embryogeneze

Somatická embryogeneze rostlinných buněk prochází stejnými stádii vývoje embrya jako zygotická embryogeneze. První dělení těchto buněk je asymetrické, dává vznik apikální a bazální buňce. Apikální buňka se dále vyvíjí v embryo, zatímco bazální buňka vytváří suspensor. PCD u somatické embryogeneze konifer je rozdělena do 2 fází. První fáze představuje umírání buněk proembryonální hmoty (PEM). Impulsem pro vývoj embrya je odebrání fytohormonů, nemění se buňky podléhají buněčné smrti. Následuje druhá fáze, která zahrnuje vývoj somatického embrya od PEM až po maturační fázi embrya. V časných stádiích embryonálního vývoje dochází k umírání suspensorových buněk. Ty tvoří mechanickou ochranu embrya a jsou jimi transportovány živiny. Při umírání těchto buněk dochází ke kondenzaci cytoplazmy. PCD u těchto buněk byla hodnocena pomocí znaků typických pro apoptotické umírání buněk. Pozitivní TUNEL reakce (Havel a Durzan 1996) a fragmentace DNA do oligonukleozomálních zbytků byla nalezena v obou vlnách umírání buněk (Filonova *et al.* 2000). Morfologické změny pozorované při umírání těchto buněk jsou však typické spíše pro autofagickou buněčnou smrt. Pomocí TEM byla popsána také zvýšená vakuolizace buněk vedoucí až k vakuolárnímu kolapsu a změny jaderného tvaru (Filonova *et al.* 2000). U suspensorových buněk byla pozorována kondenzace a fragmentace jader a vyplavení jadérek do cytoplazmy (Havel a Durzan 1996). Kromě morfologických změn byl na modelu somatické embryogeneze jedle bělokoré nalezen mcll-Pa protein, který je vysoce homologní k metakaspázám typu II. V tomto případě byla také naměřena aktivita kaspázy 6 pomocí jejího fluorogenního substrátu VEID-AMC (Bozhkov *et al.* 2004).

3.5.1.5. Umírání buněk kořenové čepičky

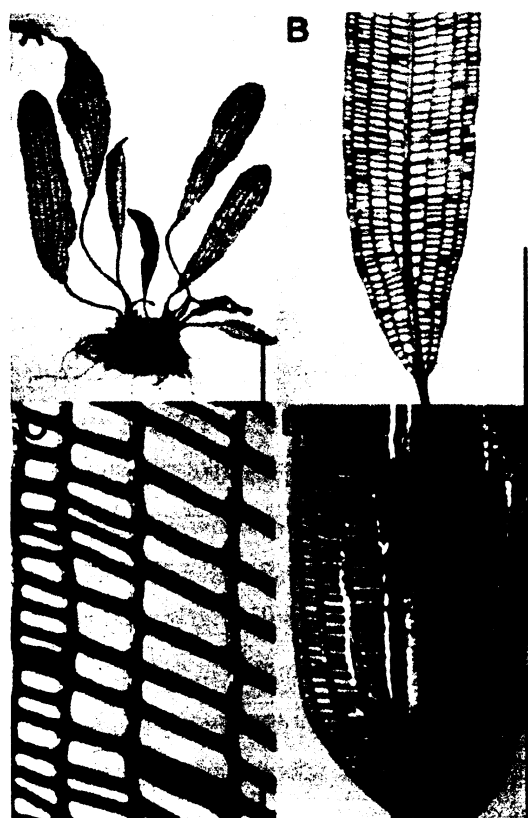
Buňky kořenové čepičky slouží k ochraně kořenového meristému během klíčení semen a růstu semenáčků. Tyto buňky vznikají z iniciál meristému a přesunují se k periferii kořenu pomocí nových buněk, kde po několika dnech umírají. U těchto buněk byla pozorována redukce jejich obsahu, kondenzace chromatinu jader a fragmentace DNA (pozorováno pomocí TUNEL reakce, Wang *et al.* 1996b).



3.5.1.6. Vykrajování listů

U některých vyšších rostlin dochází k programovanému umírání buněk při remodelaci listů. U perforovaných listů rostliny *Monsetra obliqua* vznikají malé dirky procesem PCD, které se pak zvětšují expanzí listů (obr. 3.9). Velké díry (pathces) vznikají dříve než trhliny na okraji listů a vytvářejí se tak hluboké laloky. Oproti tomu, ke vzniku perforovaných listů rostliny kalatka magaskarká dochází naprosto odlišným způsobem. Během expanze listů si listové čepele zachovávají podélný tvar. Při perforaci však vznikají obdelníkové díry, které se posouvají pravidelně mezi longitudinálně a transversálně uspořádané cévy (Gunawardena *et al.* 2005). U obou těchto rostlin byla buněčná smrt popsána zejména cytologicky. Podrobnější molekulární studie zatím nejsou známy. Pomocí elektronové mikroskopie (SEM a TEM) bylo zjištěno, že tyto buňky podléhající PCD procházejí podobnými stádii jako mezofylové buňky *Zinnia elegans* při přeměně v TE (Gunawardena *et al.* 2004). První stádium je charakterizováno vznikem okénka mezi longitudinálními a transversálními cévami. U epidermálních a mezofylových buněk dochází ke ztrátě chlorofylu v chloroplastech a antokyanů akumulovaných ve vakuolách. V dalších stádiích ochází k samotné perforaci listů. Obdobně jako při diferenciaci TE dochází i zde k vakuolárnímu kolapsu doprovázeného degradací jader a organel a oddálení plazmatické membrány od buněčné stěny. Ve těchto stádiích byla pozorována pouze nespecifická fragmentace DNA.

Obr. 3.9. Umírání buněk při vykrajování listu (Gunawardena *et al.* 2004)



3.5.1.7. Opad listů

Opad části rostlin je specifický proces, kdy dochází k oddělení určité části rostlin, zejména pak listů, plodů a květů aniž by byla nějak poškozena mateřská rostlina. Tomuto procesu podléhají buňky tzv. abscizní zóny, které syntetizují a sekretují hydrolázy potřebné k oddělení a úplnému zničení buněčných stěn, při němž dochází k odstranění střední lamely, části primárních buněčných stěn a celých buněk (Beers *et al.* 1997).

3.5.1.8. Senescence (pro přehled Orzaez a Granell 2004)

Termín senescence je často spojován a hlavně zaměňován s pojmem PCD. Tento problém se striktním vymezením používání těchto dvou termínů se snažili vyřešit různí autoři. Thomas *et al.* (2003) navrhovali používat termín senescence pouze pro umírání určitých orgánů (listů a kořenů) a to v případě, kdy začínají tyto orgány žloutnout, avšak žloutnutí listů nevede přímo k buněčné smrti. U buněk těchto orgánů může docházet k reverzibilnímu procesu senescence a termín senescence je možno používat až do tzv. bodu, kdy už není návratu. Pro ostatní části rostliny je vhodné používat termín PCD, ne senescence. K tomuto názoru se přiklání i jiní autoři, např. van Doorn a Woltering (2004).

Senescence rostlin je energeticky náročná, zahrnuje mnoho metabolických dějů, které se vyskytují ve finálních stádiích vývoje rostlin. Lze ji rozdělit do tří stádií: iniciace, degenerace (propagace) a terminace (Noodén *et al.* 1997). Jedním z nejdůležitějších aspektů senescence je také senescence listů. Zahrnuje ztrátu chlorofylu, která však nezpůsobuje smrt buněk listů (Dangl *et al.* 2000). U fotosynteticky aktivních pletiv byly pozorovány jako jedny z prvních změn degenerace chloroplastů: dilatace a poškození tylakoidů, zvětšení počtu a velikosti plastoglobulů a snížení obsahu pigmentů (Simeonova *et al.* 2000). Inada *et al.* (1998, 1999) ukázali, že téměř ihned po indukci PCD u koleoptile rýže docházelo k degradaci chloroplastové DNA, dříve než byly degradovány organely. Mitochondriální a jaderné DNA nebyla degradována v koncových stádiích senescence. Což je vysvětlováno nutností udržet ATP pro správný rozpad buněčného obsahu (Orzaez a Granell 1997). Ultrastrukturální analýzy ukázaly signifikantní změny ve vakuolárním systému. Často jsou pozorovány invaginace tonoplastu do vakuol někdy i s kousky cytoplazmy a organel. Ne vždy při senescenci byla pozorována fragmentace DNA, jeden z markerů živočišné apoptózy. U senescentních koleptilí rýže byl nalezen typický DNA žebříček (Kawai a Uchimiya 2000). Naopak fragmentace nebyla nalezena u senescentních listů rýže (Lee a Chen 2002). Což ukazuje na spojení fragmentace DNA s určitými orgány jedné rostliny nebo by fragmentace DNA mohla být spojena pouze s pozdními stádii rostlinné senescence (Gietl a Schmid 2001).

U rostlin *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno velké množství genů účastníci se senescence, tzv. SR (z anglického senescence related genes, Jones 2004). 30 z nich patří do skupiny SAG genů (z anglického senescence associated genes) a většinou jsou exprimovány v zelených nesenescentních listech (resp. různé SAG geny v různých stádiích zrání a vývoje listů, Weawer *et al.* 1998, Quirino *et al.* 2000).

3.5.2. PCD při generativním vývoji rostlin

3.5.2.1. Květní orgány

Asi 10% všech kvetoucích rostlin má jednopohlavní květy. Oddělení samčích a samičích orgánů a vznik jednopohlavních květů je dáno programovaným umíráním buněk základů generativních orgánů opačného pohlaví. Vhodným modelem pro studium této PCD je např. kukuřice. Pomocí SEM a TEM bylo ukázáno, že buňky odumírajícího pletiva jsou silně vakuolizované. Obdobně jako při vývoji TE dochází i zde k praskání tonoplastu a vyplavení hydrolytických enzymů a tím i spuštění celé řady reakcí vedoucí k programované smrti buněk (Cheng *et al.* 1983). Mutanti kukuřice dwarf (d1, 2, 3 a 5) a anthem ear 1 (an1) souvisejí s biosyntézou kyseliny gibberelové a mutanti tasselseed (ts 1, 2, 4, 5 a 6) se účastní vývoje samčích květů (pro přehled Buckner *et al.* 1998). Gen ts 1 je nutný pro aborci buněk pestíku a gen ts 2 je spojen s metabolismem brasinosteroidů. Kóduje protein (sekvenčně podobný alkoholdehydrogenáze) účastnící se aborce gynecia (DeLong *et al.* 1993).

3.5.2.2. Gametofyty

Při procesu megasporogeneze vznikají 4 haploidní jádra. Tři z nich umírají, preferenčně ta, která jsou blíže mikropyle. U kapradiny *Marsilea vestita* byly pozorovány během umírání buněk znaky charakteristické pro živočišnou apoptózu, kondenzace chromatinu a pyknóza jádra (Bell 1996).

Mikrosporogeneze prašníků spojená s PCD byla pozorována u různých rostlin. Smrt buněk tapeta je nutná pro vývoj pylu. U těchto buněk byla pozorována zvýšená vakuolizace a redukce celého buněčného obsahu, ztenčení a časté ruptury buněčných stěn. Předošetření prašníků hyperosmotickým šokem vyvolalo kondenzaci chromatinu jader a fragmentaci DNA (detekovanou pomocí TUNEL reakce, Wang *et al.* 1999). Buňky ovlivněných prašníků, jak už osmotickým šokem, tak zvýšenou teplotou nebo ABA, jsou schopny si zvýšit viabilitu buněk mikrospor a tím taky i zvýšit účinnost androgenese (Morgan a Drew 2004). Buňky tapeta mutanta ms 26 (z anglického male sterile 26) z kukuřice jsou vysoce vakuolizovány a předčasně umírají (Loukides *et al.* 1995).

Se smrtí buněk tapeta se setkáváme také při cytoplazmatické samčí sterilitě (CMS). CMS je samčí fenotyp dědicí se po samičí linii, kdy nejsou produkována viabilní pylová zrna. Mitochondriální DNA rostlin kukuřice „T cytoplasm“ (Texas male sterile cytoplasm) snižuje obsah genu Turf-13, jehož produkt URF 13 způsobuje tok iontů a tím taky změnu membránového potenciálu, což vyústí až ke sterilitě pylu (Loukides *et al.* 1995, Buckner *et al.* 1998). Obdobně byly popsány mutace PET1-CMS u slunečnice. Kondenzace jader a cytoplazmy mladých mikrospor je spojeno s internukleozomální fragmentací DNA a

vyplavením cytochromu c z mitochondrií do cytozolu (Balk a Leaver 2001).

3.5.2.3. Opylení a oplození

Opylení i oplození je také spojeno s programovaným umíráním buněk. Pylové zrno po dosednutí na bliznu klíčí v pylovou láčku. Ta přepravuje samčí pohlavní buňky do embryonálních vaků. Během tohoto procesu může docházet ke smrti pylu. Čnělka je mj. schopna rozlišit mezi tzv. kompatibilním a inkompatibilním pylem, čímž se u rostlin zabrání samoopylení nebo opylením pylem nesprávného druhu. Hlavní roli v tomto procesu hraje inkompatibilní reakce, která zabraňuje klíčení a růstu pylové láčky. S-RNÁzy čnělky, které buď proniknou do každé pylové láčky, ale pouze v té inkompatibilní pylové láčce zabrání S-lokus (z anglického *self-incompatibility locus*) inaktivaci S-RNáz. Nebo je produkt S-locusu pylové láčky schopen rozpoznat S-RNÁzy přítomné ve vodivém pletivu čnělky a umožní vstup těchto RNáz do inkompatibilní pylové láčky. Což vede k zástavě růstu pylové láčky a následně pak k jejímu odumření (pro přehled Beers *et al.* 1997, Wang *et al.* 1996a, Mc Clure *et al.* 2006).

PCD byla pozorována při opylení, kdy pylová láčka proniká až do zárodečného vaku přes mikropyle, kde dochází k praskání jedné ze dvou synergid. Následně pak může odumřít i druhá synergida procesem PCD (Russel *et al.* 1996).

Umírání parenchymatických buněk nucelu je doprovázeno fragmentací DNA (zjištěno pomocí TUNEL reakce, Dominguez *et al.* 2001). Tato fragmentace byla doprovázená také změnou morfologie jader a degradací různých organel. Chen a Foolad (1999) našli v buňkách nucelu aspartátovou proteázu nucellin, která se zřejmě účastnila degradace nucelárních buněk.

3.5.2.4. Smrt suspenzoru

Prvním dělením zygoty vznikají dvě buňky: apikální, která dává vznik embryu, a bazální buňka, ze které posléze vzniká suspenzor. Po několika následujících dělení však suspenzorové buňky zanikají. Degradace suspenzoru je často spojována s PCD. U rostlin, které mají velké suspenzory (např. *Phaseolus coccineus* a *Tropaeolum majus*) byly nalezeny několikamembránové útvary – autofagická tělíška (Beers *et al.* 1997).

3.6. PCD a stres u rostlin

3.6.1. Biotický

3.6.1.1. Patogeny

Patogeny (viry, bakterie, houby a nematody) jsou schopny penetrovat do rostliny i přes její mechanické a chemické bariéry a jsou schopny se v ní množit. Existují dvě hlavní interakce mezi rostlinou a patogenem (Nurnberger a Scheel 2001): 1) Patogen infikuje rostlinu, je schopen se v ní množit a může navodit onemocnění rostliny. 2) Rostlina ihned po setkání s patogenem vytvoří bariéry proti jeho šíření a brání se tak onemocnění. Tyto interakce jsou doprovázeny aktivací řady genů kódovaných rostlinou (R geny, geny rezistence) a další skupinou genů kódovaných patogenem (avr geny, geny avirulence). Interakce mezi těmito geny jsou nazývány jako gen proti genu. Při interakci rostlina-patogen (zejména tehdy, kdy byl potlačen růst patogenu) byly nalezeny různé typy PCD. Symptomy buněčné smrti, které byly pozorovány při vývoji nemoci, byly původně považovány hlavně za změny vyvolané toxiny produkované patogeny. Později však bylo ukázáno, že tímto způsobem jsou aktivované signální dráhy vedoucí k PCD. PCD propuká v buňkách infikovaných patogenem nebo v buňkách okolních, kde vytváří léze (suché jizvy, jasně oddělené od okolního živého pletiva) nazývané také jako léze hypersenzitivní reakce (Dangl *et al.* 1996). Název tato buněčná smrt dostala díky tomu, že je velmi rychlá a je velmi úspěšná v obraně proti patogenům, v jejich šíření a množení se v živých buňkách. Nicméně však existují tzv. nekrofilní patogeny, které jsou schopny se šířit i v mrtvých buňkách a aktivovat PCD (Govrin a Levine 2000).

3.6.1.1.1. Hypersenzitivní reakce (HR)

Po napadení rostliny patogenem dojde nejprve k rozpoznání avirulentního faktoru geny rezistence a následně k aktivaci signální kaskády obranných reakcí ústících v PCD. K HR dochází nejčastěji u buněk kolem cévních svazků, které patogeny používají ke svému šíření rostlinou. Na počátku HR většinou dochází k velmi rychlé produkci ROS (z anglického *reactive oxygen species*) ve formě superoxidu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu (Jabs 1999, Lamb a Dixon 1997, Kawano 2003), čímž dochází ke otevření iontových kanálů pro Ca^{2+} , K^+ , Cl^- a H^+ na plazmatické membráně (Mittler *et al.* 1995). Změna toku iontů, resp. vtok vodíku a vápníku je jedním z prvních biochemických změn po rozpoznání patogenu rostlinou (Pontier *et al.* 2002). Dále patogeny vyvolají zesílení buněčné stěny, syntézu fytoalexinů a aktivaci genů rezistence (Mittler *et al.* 1999, Romeis *et al.* 1999, Yang *et al.* 2001, Yoshicka *et al.* 2003). Přechodné zvýšení koncentrace vápenatých iontů a vodíku vede k okyselení cytoplazmy, což následně může vyvolat fosforylaci a aktivaci NADPH oxidázy a tím se zvýší i produkce ROS a také se může aktivovat MAPK dráha.

Důležitým druhým poslem při přenášení signálu u živočichů je NO, který hraje také důležitou roli při zprostředkování HR buněčné smrti (Van Camp a Van Montagu 1998). NO slouží jako inhibitor mitochondriální cytochrom c oxidázy, a tudíž zvyšuje produkci ROS. Funkce NO při HR byla především studována v souvislosti se zvýšenou koncentrací peroxidu vodíku (Delledonne *et al.* 1998). U buněčné linie BY-2 ovlivněné nitroprusidem sodným, který je donorem NO, a H₂O₂ byla pozorována kondenzace chromatinu a degradace periferie jader (Víteček *et al.* 2007). Kyselina salicylová, která je hlavním prostředníkem SAR (z anglického *systemic acquired resistance*), se také účastní HR (Durner a Klessig 1995) a inhibuje klíčový enzym účastnící se odstranění H₂O₂ v chloroplastech a cytoplazmě. Znovu tedy dochází ke zvýšené produkci ROS a vzniku lézí a amplifikaci signálu k vedoucího až k PCD (Shirasu *et al.* 1997). Endogenně přidaná kyselina salicylová vyvolává spontánní HR-PCD u mutantů *Arabidopsis thaliana* ssi1 a acd6 (Rate *et al.* 1999, Shah *et al.* 1999).

Ke studiu HR-PCD jsou často používány mutanty vytvářející tzv. mimické léze, které vznikají spontánně bez přítomnosti patogena (pro přehled Mittler a Rizhsky 2000, Dangl *et al.* 1996). Mutanty byly vytvořeny u rajčete, kukuřice, ječmene, rýže. Velké množství genů, které když jsou mutovány indukují tvorbu mimických lézí bylo izolováno z *Arabidopsis thaliana*. U *Arabidopsis thaliana* byly popsány mutanty *acd* (z anglického *accelerate cell death*, Greenberg *et al.* 1994). Zástupce těchto letálních mutací je např. mutant *acd 11*, který je defektní v genu kódující protein podobný savčí glykolipidtransfráze (Brodersen *et al.* 2002). Další skupinou mutantů jsou *lsd* mutanti (z anglického *lesion simulation disease resistance*, Dietrich *et al.* 1994), které jsou děleny do 2 kategorií. Jedná se o tzv. iniciační mutanty, jejichž léze se nezvětšují od iniciace HR. Další skupinu tvoří tzv. propagační mutanti, u nichž dochází po iniciaci HR rozšíření lézí. Mezi první skupinu patří např. mutant *lsd5*, kde je mutace v genu nutném pro spuštění HR (Dangl *et al.* 1996). Druhou skupinu reprezentuje např. *lsd1* mutant defektní v genu kódující protein s motivem zinkového prstu, fungující jako negativní regulátor buněčné smrti (Dietrich *et al.* 1997). U *Arabidopsis thaliana* byl charakterizován mutant *lol 1* (z anglického *lsd one like 1*, Epple *et al.* 2003). U kukuřice existují obdobní mutanti *lls 1* (z anglického *lethal leaf spot 1*, Gray *et al.* 2002), který je defektní v genu pro dioxigenázu a tím způsobuje detoxifikaci při propuknutí PCD (Gray *et al.* 1997). Mutant *mlo* z ječmene je zase defektní v genu kódující transmembránový protein lokalizovaný na plazmatické membráně. Všechny tyto mutanty vykazují mnohem vyšší rezistenci vůči houbovým a bakteriálním patogenům. Mutantní rostliny podléhající spontánní HR jsou také hojně využívány pro studium hlavních živočišných regulátorů PCD – proteinů z rodiny Bcl-2 a proteáz podobných kaspázám (Lam *et al.* 2001).

Působení řady mikroorganismů vede ke spuštění HR. Stejně efekty mohou mít

i elicitory extrahované z těchto patogenů. Jde o známé, většinou malé peptidy. Harpiny, sekretorické proteiny z gramnegativních bakterií (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*) indukovaly HR reakci u buněk kultury BY-2 (Andi *et al.* 2001, Ichinose *et al.* 2001). Pomocí elicitoru kryprogeinu z *Phytophthora Cryptogea* byla úspěšně indukována HR také u buněk tabákové linie BY-2, která byla doprovázená změnou v koncentraci Ca²⁺ iontů (Kadota *et al.* 2004a, Kadota *et al.* 2005a), produkcí ROS a aktivací MAPK (Kadota *et al.* 2004a, Kadota *et al.* 2005b, Kadota a Kuchitsu 2006). Dále byly aktivovány obranné mechanismy a buněčná smrt v závislosti na postavení buněk v buněčném cyklu, které tento elicitor rozpoznaly (Kadota *et al.* 2004b, Kadota *et al.* 2005b, Kadota a Kuchitsu 2006).

K odlišení HR od běžné senescence byly vybrány 2 markerové geny. Oba tyto tabákové geny jsou indukovány TMV nebo působením iontů mědi (Pontier *et al.* 1999). HSR203J je specifickým markerem HR, který kóduje esterázu (Pontier *et al.* 1998). Druhým markerem HR je HIN 1. Jde o gen izolovaný z rostlin jejich po ovlivnění elicitem harpinem nebo avikulární bakteriální patogenem (Gopalan *et al.* 1996). Jelikož se však vyskytuje i při senescenci, je jeho použití jako marker HR omezené.

Proteolytické enzymy účastníci se HR reakce byly popsány v kap. 3.2.2.2.

3.6.2. Abiotický stres

3.6.2.1. Vznik lyzigenního aerenchymu

Buněčná smrt u primárních kořenů je spojena s umíráním buněk kortikální vrstvy téměř ihned po dokončení expanze buněk, většinou již pár centimetrů od kořenové špičky. Aerenchym je druh parenchymatického pletiva tvořeného velkým množstvím intercelulár. Jeho funkce souvisí s přizpůsobením rostlin hypoxickému prostředí, kde je nutné umožnit dostatečné vedení kyslíku z nadzemních orgánů ke kořenům a odvod CO₂ a dalších plynů. Existují dva hlavní typy aerenchymu lyzigenní a schizogenní (Seago *et al.* 2005). Vznik lyzigenního aerenchymu je spojen a programovaným umíráním buněk (Gunawardena *et al.* 2001). V hypoxickém prostředí dochází k akumulaci etylénu uvnitř pletiva. U kukuřice může být tvorba aerenchymu indukována jak hypoxickým prostředím, tak etylémem endogenně přidaným nebo endogenně produkovaným a je inhibována vápenatými ionty (Gunawardena *et al.* 2001). Během PCD při vytváření aerenchymu byly nalezeny četné změny v ultrastruktuře buněk ve střední kůře: invaginace plazmalemy, kondenzace cytoplazmy, tvorba malých membránových měchýřků, zvýšená vakuolizace, degradace buněčné stěny a vytváření apoptotických váčků, tj membránou obalených měchýřků obsahujících chromatin a zbytky organel (Gunawardena *et al.* 2001, Lenochová 2004). V buňkách primární kůry a epidermis byla nalezena TUNEL-pozitivní jádra, tedy jádra s jednořetězcovými zlomy v DNA.

Vývoj aerenchymu je také někdy spojován s pojmem smrt buněk kůry v mladých kořenech některých trav a obilnin (RDC, z anglického *root cortical cell death*). RDC může být indukovaná stresem, a také může být tato PCD vyvolána působením mikrobů – především saprofytů. Pomocí DNA elektroforézy a TUNEL reakce byla prokázána fragmentace DNA v buňkách primární kůry a středního válce již u 2 dny starých kořenových segmentů pšenice a ječmene. Při porovnání těchto dvou rostlin bylo zjištěno vyšší procento TUNEL-pozitivních jader u pšenice, u níž také dochází k PCD dřívě. Liljeroth a Bringelsson (2001) popsali pomocí TEM různé změny tvaru jader (lalokovitá i prodloužená jádra) se silně kondenzovaným chromatinem při RDC.

3.6.2.2. Složky znečišťující atmosféru

Různé plynné polutanty jsou schopny indukovat tvorbu ROS, které nejen u rostlin vedou k buněčné smrti. Studium ROS je často spojeno s HR. Oxidativní stres je převážně zprostředkován ROS (někdy taky nazývány jako AOS, z anglického *active oxygen species*), které zahrnují superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH). Zvýšená tvorba ROS ovlivňuje nukleové kyseliny, proteiny a lipidy. Při této reakci se také aktivují obranné mechanismy, aktivuje se syntéza nízkomolekulární látky (glutathion, kyselina askorbová, α -tokoferol) nebo antioxidantních enzymů (superoxid dismutáza, peroxidáza a alternativní oxidáza, pro přehled Blokhina *et al.* 2003).

Ozón (O_3) je nejrozšířenějším atmosférickým polutantem. Do rostlin se dostává přes otevřené póry, poté apoplastickou cestou do mezofylových buněk. Je známo, že ozón v apoplastu intenzivně indukuje tvorbu ROS. Interakce O_3 s buněčnou stěnou a plazmalemou vyvolávají vznik lézí podobným při HR (Langebartels *et al.* 2002). U buněk listů břízy bělokoré doprovázená tvorbou nekrotických lézí po aplikaci O_3 dochází k akumulaci H_2O_2 a indukci různých obranných genů (Pellinen *et al.* 2002). Ke studiu indukce ROS ozónem jsou často používány ozón-senzitivní mutanty *Arabidopsis thaliana* *rcd 1* (z anglického *radical-induced cell death*, Overmyer *et al.* 2000) nebo kultivar tabáku Bel W3, který je senzitivní k ozónu (van Buuren *et al.* 2002). Po ovlivnění rostlin tabáku různými koncentracemi ozónu se vytvářejí léze podobné HR lézím, které byly doprovázeny akumulací PR-1a proteinu (jednoho z hlavních markerů HR), vyplavením cytochromu c z mitochondrií do cytozolu, TUNEL-pozitivní reakcí a aktivací proteáz. Pomocí TEM byly nalezeny i ultrastrukturální změny: kondenzace chromatinu a bobtnání plazmalemy (Pasquallini *et al.* 2003). Díky tomu, že rostliny ovlivněné O_3 vykazují stejné odpovědi na stres jako při HR (zejména se jedná o produkci ROS, vznik nekrotických lézí a buněčnou smrt) je ozón ideálním nástrojem pro studium funkce a role extracelulárních ROS v regulaci odezvy rostlin a buněčné smrti (Rao

et al. 2000, Rao a Davis 2001). U buněk BY-2 ovlivňovaných H_2O_2 bylo detekováno snížení celého obsahu buňky, kondenzace chromatinu, zvýšená tvorba vezikulů u plazmatické i jaderné membrány a fragmentace jader do mikrojader (Hout *et al.* 2001). Dalším producentem ROS je např. menadion, který po konjugaci s glutationem vyvolává tvorbu ROS. Obdobně i quinony se mohou redukovat na hydroquinonové nebo semiquinonové radikály. Obě tyto látky jsou schopné rychlé autoxidace a tvorby ROS (zejména H_2O_2). Tyto látky také redukovaly S fázi buněčného cyklu a jejich autoxidace souvisela se zablokováním buněčného cyklu v obou přechodových bodech (Reichheld *et al.* 1999). Zvýšená produkce ROS byla nalezena také po aplikaci elicitoru kryprogeinu k buňkám linie BY-2 (Kadota *et al.* 2004a), která byla doprovázená změnami v koncentraci cytozolického vápníku, aktivací MAPK a zastavením buněčného cyklu na v G1 nebo G2 fázi, což vedlo až k aktivaci HR (blíže Kadota a Kuchitsu 2006).

3.6.2.3. UV záření a ozáření

Vyšší ozáření způsobuje rozpad fotosyntetického aparátu rostlin, což indukuje uzavírání průduchů a tím se přetížá transport elektronů a často se také začínají tvořit ROS.

Změny spojené s programovaným umíráním buněk byly nalezeny u protoplastů semenáčků *Arabidopsis thaliana* vystavených působení UV-C záření. Toto záření není fyziologicky relevantní, jelikož jeho efekt je blokován stratosférou. Dóze ovlivnění $10-50 \text{ kJm}^{-2}$ vyvolala již po 6 hodinách fragmentaci DNA detekovanou pomocí TUNEL reakce a DNA elektroforézy. Navíc byla nalezena prodloužená jádra a také jejich fragmentace jader do mikrojader (Danon a Gallois 1998). Navíc byla u těchto semenáčků detekována aktivita kaspázy 1 a 3 pomocí jejich substrátů (YVAD-CHO a DEVD-CHO). Pomocí inhibitoru kaspáz p35 byla úspěšně zablokována specifická fragmentace DNA a buněčná smrt (Danon *et al.* 2004). U suspenzní kultury ječmene a také u klíčících semen ječmene byla po ovlivnění buněk UV-B zářením úspěšně navozena internukleozomální fragmentace DNA (Korthout *et al.* 2002).

3.6.2.4. Teplotní ovlivnění buněk

Vliv zvýšené teploty vyvolávající u rostlinných buněk PCD byl popsán u semenáčků a kalusů kříženců *Nicotiana suaveolius* Lehm. a *Nicotiana tabacum* L. cv. Hicks-2. Teplota 28°C vyvolávala letalitu těchto semenáčků. U buněk byla pozorovaná kondenzace chromatinu, fragmentace jader a snížení obsahu cytoplazmy doprovázená fragmentací DNA (Yamada *et al.* 2000). U buněk suspenzní kultury mrkve kultivované v 55°C po dobu 10 min byly v čase 5-7 hodin po ovlivnění pozorovány protoplasty odchlípnuté od buněčné

stěny, kondenzovaná jádra a fragmentace DNA (detekovaná jak elektroforeticky tak TUNEL reakcí). Ovlivnění buněk nižší teplotou (45°C, 10min) vedlo k přežití téměř všech buněk a DNA žebříček nebyl pozorován. Obdobně se chovaly buňky ovlivněné vyšší teplotou než 55°C. V obou těchto případech byla pozorována pouze nespecifická degradace buněk (McCabe *et al.* 1997). Specifická internukleozomální fragmentace DNA byla detekována také u buněk kotyledonů okurky vystavených působení 55°C (Balk *et al.* 1999).

Nízká teplota (0°C) vyvolávala u buněk rostliny *Saintpaulia ionantha* kondenzaci chromatinu. U buněčné kultury *Vigna radiata* bylo po 3min inkubaci buněk v 10°C pozorováno „zduření“ jader s fragmentovaným chromatinem a jadérek (pro přehled Evans *et al.* 2004). Koukalová *et al.* (1997) ukázali typický apoptotický žebříček po působení 4°C na buňky linie BY-2. K fragmentaci DNA docházelo po 14 dnech působení, v době, kdy byly již všechny buňky mrtvé.

3.6.2.5. Toxické ionty

Je známo, že některé ionty (zinek, železo nebo kadmium) jsou užitečné nebo nutné pro růst rostlin, ale pouze v nižších koncentracích. Vyšší koncentrace jsou většinou pro rostlinu toxické a mohou vyvolat až buněčnou smrt. Mnoho toxických iontů vyvolává v závislosti na použité koncentraci velmi rychlou smrt buněk. Kationty železa, manganu a mědi jsou důležitými kofaktory mnoha enzymatických reakcí. Jiné kovy, např. zinek, hrají důležitou strukturální roli v proteinech. V posledních letech se ukazuje, že se tyto ionty mohou účastnit i signalizace.

Kadmium (Cd) patří mezi jedny z nejtoxičtějších kovů jak u živočišných, tak rostlinných buněk. Jde o relativně vzácný prvek, který má však významné toxikologické vlastnosti. Efekt kadmia na rostliny je vysoce pleiotropní. Je známo tím, že velmi drasticky ovlivňuje různé metabolické procesy, zahrnující fotosyntézu, respiraci, metabolismus dusíku, snížení vodního a látkového přesunu. Změny v metabolismu rostlin vyúsťují ve změny v růstu rostlin. Bylo ukázáno, že k působení kadmia je mnohem senzitivnější fotosystém II, kde kadmium vyvolávalo změny jak v donorové (oxidované), tak akceptorové (redukované) části. Poškozená může být jak struktura proteinů, tak enzymatická aktivita reakčního centra fotosystému II (Wu *et al.* 2003a). U semenáčků *Brasica napus* docházelo k inhibici syntézy chlorofylu a snížení fotochemických kvant (Larsson *et al.* 1998).

Kadmium je schopno indukovat tvorbu ROS. Nejde však o přímou indukci, ale pravděpodobně zprostředkovanou přes Fentonovu reakci (di Toppi a Gabrielli 1999). U buněk tabákové linie BY-2 kadmium stimuluje produkci H₂O₂. Při indukci biosyntézy H₂O₂ se aktivují NADPH oxidáza a antioxidační enzymy (Piqueras *et al.* 1999, Olmos *et*

al. 2003). U semenáčků ječmene byla popsána indukce oxidačních enzymů v kořenech. V listech se sice akumulovalo jen 1-3% z celkového množství kadmia, které však vedlo ke snížení obsahu chlorofylu v chloroplastech (Hegedüs *et al.* 2001). Schützendübel *et al.* (2001) popsali u hydroponicky pěstovaných semenáčků *Pinus sylvestris* již po 12 hodinách zastavení prodlužování kořenů, indukci nespecifických peroxidáz, akumulaci fenolyckých látek v cytozolu a zvýšenou lignifikaci. U listů hrachoru (*Pisum sativum*) byla po aplikaci $CdCl_2$ nalezena oxidace Rubiska, glutation reduktázy, mangan superoxid dismutázy a katalázy. Proteolytická aktivita po oxidaci proteinů se zvětšila až o 20 % (Romero-Puertas *et al.* 2002). Tato oxidace souvisí také se senescencí peroxizomů (Mc Carthy *et al.* 2001). V ovlivněných listech byly pozorovány zvětšené buňky palisádového parenchymu a snížení počtu chloroplastů. Na ultrastrukturální úrovni byla pozorováno porušení ultrastruktury chloroplastů (dezorganizace tylakoidního systému a zvýšení počtu a množství plastoglobulí a škrobových zrn). Často byly pozorovány i invaginace tonoplastu do vakuol (Sandalio *et al.* 2001). Kademnaté ionty také ovlivňují fungování membrán v důsledku peroxidace lipidů (Skorzynska-Polyt a Krupa 2003, Wu *et al.* 2003b). Kadmium se také účastní signalizace tím, že aktivuje signální MAPK dráhu. Po přidání kadmia byly aktivovány různé MAPK u vojtěšky (SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK, Jonak *et al.* 2004), u rýže byla nalezena aktivovaná OsMAPK2 (Yeh *et al.* 2004). Stále však není jasné, zda je MAPK dráha aktivovaná přímo ionty kadmia nebo přes tvorbu ROS. Navíc bylo zjištěno, že Cd indukuje vyplavení vápenatých iontů z vnitrobuněčných zásob a reguluje kalmodulin tím, že si konkuruje s vápníkem o vazebné místo na kalmodulinu (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002). Pomocí patch-clamp techniky, která umožňuje analyzovat proudy tekoucí přes jednotlivé iontové kanály, byla u protoplastů buněk průduchů rostlin *Vicia faba* studována senzitivita různých iontových kanálů pro Cd^{2+} . K^+ kanály nejsou senzitivní k působení Cd, naopak vápenatými kanály je kadmium schopno procházet (Perfus-Barbeoch *et al.* 2002). Olmos *et al.* (2003) dosáhli stejných výsledků při použití specifických inhibitorů vápenatých kanálů u buněk tabákové linie BY-2. La^{3+} vyvolalo absolutní inhibici vzniku peroxidu vodíku vylané působením kadmia. Přenosu kademnatých iontů přes plazmatickou membránu se účastní také integrální membránové proteiny Nramp (z anglického natural resistance associated macrophage protein), které byly nalezeny u bakterií, hub, živočichů a rostlin. Exprese AtNramp 3 z *Arabidopsis thaliana* se zvyšovala při ovlivnění buněk kadmíem a při nedostatku železa (Thomine *et al.* 2000). Do vakuoly jsou pak transportovány pomocí ABC transportérů (z anglického ATP binding cassette), mezi které patří AtMRP3 (Bovet *et al.* 2003), AtHMA4 (Mills *et al.* 2003) a TcHMA4 (Bernard *et al.* 2004). Další možností jak se kademnaté ionty dostávají do vakuoly je pomocí Ca^{2+}/H^+ antiportu (Clements 2001). V

cytozolu je kadmium vyvazováno chelatony (fytochelatiny – Cobbett a Goldsbrough 2000 nebo kyselinou citrátovou) a jsou sekretovány do vakuoly (Vogelilange a Wagner 1990). Uložení kademnatých iontů do vakuol je základní proces detoxifikace buněk kadmiiem. Pro studium fytochelatinů jsou často používány rostliny schopné akumulace většího množství toxických kovů. *Brassica jincea* L. je schopná odebírat kadmium ze zamořené půdy a vody a akumulovat ho v listech. Tato akumulace je doprovázena metabolickou adaptací, např. rychlou indukcí biosyntézy fytochelatinů, které jsou enzymaticky syntetizovány z glutationu a jeho množství se v buňkách snižuje při aplikaci kadmia (Haag-Kerwer *et al.* 1999).

Kadmium způsobuje také genotoxické změny v buňce. Zejména u živočichů bylo nalezeno velké množství mutací (bodové mutace nebo chromozomální aberace, Zhang a Xiao 1998, Coen *et al.* 2001). Symptomy charakteristické pro PCD (fragmentace jader a DNA) byly nalezeny u buněk BY-2 ovlivněných různými koncentracemi CdSO₄ (Fojtová a Kovařík 2000). Cytologické změny byly pozorovány po aplikaci 50 μM CdSO₄ u buněk tabákové linie BY-2. Zvýšená vakuolizace buněk, tvorba škrobových zm, elongace a fragmentace jader byly doprovázeny fragmentací DNA (zjištěno pomocí TUNEL reakce, Kuthanová *et al.* 2004). Efekt kadmia na růstové parametry, viabilitu a morfologii buněk jiné tabákové linie, VBI-0 byl ukázán Domažlickou a Opatrným (1989). Tito autoři také ukázali, že je možné *in vitro* selektovat sublinii, která je schopná tolerovat vysoké dávky kadmia.

Poškození DNA po aplikaci kadmia bylo zjištěno také pomocí kometového testu u kořenů *in vitro* rostlin tabáku a bramboru (Gichner *et al.* 2004, 2006). U živočišných buněk byla uvažována možná kovalentní vazba kadmia na DNA nebo nepřímá interakce související s oxidativním poškozením DNA (Hossain a Hug 2002). Kademnaté ionty působí na reparaci DNA asi nejspíš díky interakci s proteiny s motivem Zn prstu (Predki and Sarkar 1992 a 1994, Hartwing *et al.* 2002).

3.7. Metody studia programované buněčné smrti

Existuje velké množství metod pro zjištění a měření různých typů PCD. Fenomén apoptóza byl poprvé definován na základě morfologických metod (Kerr *et al.* 1972). Hlavní rysy apoptózy jsou nejlépe pozorovány pomocí elektronové mikroskopie a někdy i pod světelným mikroskopem při použití jaderně specifických kyselých barviv (např. propidium jodid, akridinová oranž). Elektronová mikroskopie, zejména pak transmisní elektronová mikroskopie je velmi dobrým dokumentačním zařízením pro sledování časných morfologických změn nejen při apoptóze, ale i jiných typů PCD.

Jedním z prvních znaků apoptotických buněk je kondenzace chromatinu a následné morfologické změny jádra, na které navazuje redukce celého buněčného obsahu. Při

fragmentaci živočišných buněk vznikají puchýřky, tzv. blebs (Kerr *et al.* 1972). Tento proces se dá velmi dobře prozkoumat pomocí časověné *in vivo* video mikroskopie (např. <http://www.biologie-lfhk.cz/index.php?node=48>). I když existuje mnoho jiných metod a technik, kterými se dá apoptóza kvantifikovat, studium morfologie má stále vysokou důležitost. Rostlinné buňky oproti živočišným obsahují buněčnou stěnu, která znemožňuje bobtnání a vytváření buněčných puchýřků. Avšak změny tvaru jader a fragmentace jader do mikrojadér byly u rostlinných buněk nalezeny (např. Mittler *et al.* 1997, Danon a Gallois 1998, Houot *et al.* 2001, Kuthanová *et al.* 2004).

Během procesu PCD se aktivují specifické endonukleázy, které štěpí DNA v místech mezi nukleozómy. Vzniklé oligonukleozomální fragmenty různé velikosti na neutrální gelové DNA elektroforéze podávají spec. obraz, typický **DNA žebříček** (Wyllie *et al.* 1980). U rostlinných buněk je často DNA žebříček používán pro detekci PCD. Avšak často byla specifická fragmentace DNA pozorována až u mrtvých buněk (Koukalová *et al.* 1997 nebo Fojtová a Kovařík 2000). U buněk rostlinných pletiv však fragmentace DNA není zcela vždy detekována, a to zejména díky vysoké heterogenitě použitého materiálu (např. Drew *et al.* 2000). Existuje několik způsobů, kterými je možné zvýšit pravděpodobnost detekce internukleozomálních žebříčků DNA. Giuliani *et al.* (2002) při studiu PCD během embryogeneze využili PCR. Při použití primerů vázajících se na volné konce DNA a po 20-25 cyklech bylo dosaženo typického DNA žebříčku. Jiný přístup zvolili Koukalová *et al.* (1997), kde při použití repetitivní DNA sondy HRS60 zvýraznili fragmentaci DNA u chladem vyvolané PCD u tabákové linie BY-2. Poškozenou DNA lze také detekovat pomocí **kometového testu** nebo také gelové elektroforézy jednotlivých buněk (Collins 2004). U rostlin byla mj. použita po aplikaci kadmia u kořenů *in vitro* pěstovaných rostlin tabáku a bramboru (Gichner *et al.* 2004, 2006).

Mezi metody, které detekují zlomy DNA buněk podléhajících apoptóze, patří také komerčně dostupná **TUNEL reakce** (z anglického terminal deoxynukleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, Gavrieli *et al.* 1992). Tato metoda je založená na enzymu terminální transferázy, který je přidáván ke 3'OH volným koncům dvouřetězových zlomů vzniklých během PCD značených nukleotidů (např. fluoresceinem). Takto značený vzorek může být dále pozorován pod fluorescenčním mikroskopem nebo otestován na průtokovém cytometru. V obou případech může být kvantifikováno velké množství značené DNA. TUNEL reakce má však u rostlinných buněk i svá úskalí, nevýhodou je přítomnost falešně pozitivních, resp. negativních nálezů. Díky vysoké autofluorescenci jader mrtvých buněk je s výhodou u rostlinných buněk používat komerční testy založené na červené fluorescenci (Bozhkov ústní sdělení) nebo dokonce i nefluorescenční TUNEL testy (Lenochová a

Kuthanová nepublikováno). **ISEL** (*in situ* end-labeling) reakce využívá jiný enzym Klenow fragment DNA polymerázy I pro zařazení značených nukleotidů do zlomů DNA během internukleozomálního štěpení. Po Klenowem zprostředkovaném značení nukleotidů může být signál amplifikován kaskádou reakcí antigen-protilátka podle detekčního systému **FISH**. Tato metoda umožňuje vizualizovat PCD *in situ* na chromozómech a je běžně používaná i u rostlinných buněk (Ning *et al.* 2002). Senzitivita tohoto testu je však mnohem nižší než TUNEL reakce (pro přehled Mundle 1995, Hall 1999). Kromě těchto metod založených na fluorescenčním značení existuje velké množství jiných značících metod. Mezi ně patří i značení radioaktivními nukleotidtrifosfáty.

V poslední době se objevilo mnoho **protilátek** proti nejrůznějším proteinům (např. protilátky proti proteinům rodiny Bcl-2, Apaf-1, cytochromu c, komponentům VDAC nebo PARP), které hrají různé role při procesech PCD.

Dalším nástrojem jak pozorovat expresi různých pro- i antiapoptotických proteinů je vytváření nejrůznějších **fúzních proteinů s GFP**, zejména z rodiny Bcl-2. Tento přístup je v poslední době hojně využíván jak u živočišných, tak u rostlinných buněk.

Další metodou jak detekovat PCD v buňkách je **FRET** (z anglického *fluorescence resonance energy transfer*) technika. V živočišných buňkách je často používána ke studiu proteinových interakcí *in vivo*. Tato metoda založená na přenosu energetických kvant z donorové fluorescenční molekuly na akceptorovou molekulu fluoroforu. U živočišných buněk byla tato technika využita mj. pro studium kaspázové aktivity (Wu *et al.* 2006a, b). U rostlin byla poprvé tato metoda použita při studiu chování buněčné linie BY-2 po aplikaci BAP (Smetana 2006).

Pomocí **fluorogenních substrátů pro různé proteázy a také pomocí jejich účinných inhibitorů** lze studovat aktivaci různých typů proteáz aktivující exekuční fáze PCD.

Fosfatidylserin je v určitém stádiu apopózy translokován na povrch buněk. Tento proces je možné prokázat pomocí fluorescenčně značeného anexinu V (např. Calderon a Kim 2008). Anexin V se specificky váže na negativně nabitě fosfolipidy, jako je fosfatidylserin. U rostlinných buněk bylo ukázáno, že fosfatidylserin se stejným způsobem jako u živočišných buněk translokuje na vnější stranu plazmatické membrány při PCD (Ning *et al.* 2002).

Integrita mitochondrií je často studována pomocí společného obarvení specifickým mitochondriálním barvivem MitoTrackeremRed a pomocí protilátky proti cytochromu c. Rozpad mitochondriálních membrán lze také měřit jako množství vzniklého superoxidu. Samozřejmostí ve studiu PCD je také použití **metod molekulární biologie**, které zahrnují mj. exprese genů, DNA čipy nebo inzerční mutagenezi.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

Jako pokusný materiál byly použity různé buněčné linie tabáku odvozené od původního, dnes již celosvětového „standardu“, buněčné linie tabáku BY-2.

4.1.1. Buněčná linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L., cv. Bright Yellow 2), byla v sedmdesátých letech vyselektována z průmyslově využívané suspenzní kultury tabáku. Ta byla ještě několik let předtím odvozena z kalusu na *in vitro* pěstovaných semenáčcích tabáku (bližší Nagata *et al.* 1992, Nagata 2004). Je trvale vedena jako zásobní suspenzní kultura na modifikovaném Murashige a Skoog médiu (tab. 4.1). Je však schopna růst také ve stacionární kultuře, na agarovém médiu. Získána nebyla přímo od prof. Nagaty, ale z kolekce vedené v IBMP CNRS ve Strasbourgu.

Tab. 4.1. Složení kultivačního média pro tabákovou linii BY-2 (Nagata *et al.* 1992)

	Složky média	Množství (mg/l)
Mikroelementy a makroelementy podle Murashige a Skooga (1962), Sigma - Aldrich	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	H ₃ BO ₃	6,2
	KH ₂ PO ₄	170
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
	CaCl ₂	322
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	24,05
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA	37,2
Vitamíny	Vitamin B1 (Sigma)	1
Růstové regulátory	Kyselina 2,4dichlorfenoxyoctová (2,4D) (Sigma)	0,2
Ostatní složky	KH ₂ PO ₄ (Lachema)	200
	Inositol (Sigma)	100
	Sacharóza (Lachema)	30000

K vizualizaci různých buněčných struktur *in vivo* bylo použito různých transgenních linií odvozených od linie BY-2 buď dříve připravených naší laboratoří, nebo získaných z jiných pracovišť.

4.1.2. Buněčná linie BY-2/HDEL

Transgenní linie BY-2/HDEL (Petrášek *et al.* 2003) s vneseným genovým konstruktem m-gfp5-ER, který kóduje fúzní protein mGFP5-ER lokalizovaný v ER (Haseloff *et al.* 1997) byla použita ke sledování chování endoplazmatického retikula za stresových podmínek *in vivo*.

4.1.3. Buněčná linie BY-2/GT16

Změny mikrotubulárního cytoskeletu byly *in vivo* sledovány za pomoci transgenní linie BY-2/GT16 s vneseným genovým konstruktem sGFP-TUA kódující fúzní protein sGFP a TUA3 (Kumagaki *et al.* 2001).

4.1.4. Buněčná linie BY-2/TGFP3

Chování aktinového cytoskeletu bylo pozorováno *in vivo* pomocí transgenní linie BY-2/TGFP3 (Srba, nepublikováno). Tato linie nese konstrukt GFP-mTn, kódující fúzní protein GFP s myším talin F aktin vazebnou doménou (Kost *et al.* 1998).

4.1.5. Buněčná linie BY-2/GV7

Změny v uspořádání vakuolární sítě po aplikaci síranu kademnatého byly *in vivo* studovány za pomoci transgenní linie BY-2/GV7 s vneseným genomovým konstruktem, kódující fúzní protein GFP a AtVam3p (protein tonoplastu z *Arabidopsis thaliana*, Kutsuna a Hasezawa 2002).

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace buněčných kultur

Standardně byly linie BY-2 vedeny ve 100 ml Erlenmayerových baňkách v tekutém mediu, ve tmě při 25°C na orbitální třepače IKA KS.125 se 150-200 otáčkami za minutu. Byly pasážovány jednou za 7 dní v poměru 1 díl narostlé subkultury : 30 dílům nového tekutého média. Fenotyp zásobních kultur byl průběžně kontrolován.

4.2.1.1. Stresové působení

Účinky různých abiotických stresorů, byly - pokud není uvedeno jinak - studovány na

buňkách BY-2 nacházejících se v exponenciální fázi růstu (3 dny staré). Jako PCD induktory PCD byly ve většině srovnávacích studií použity dva abiotické stresory: chlad (4°C) a síran kademnatý (CdSO₄). V případě chladových pokusů byly buňky v souladu s našimi dřívějšími pracemi - kultivovány ve 4°C po dobu 1-14 dnů. Účinek CdSO₄ byl nejprve ověřen pomocí koncentrační řady. Jako nejvhodnější byly vybrány dvě: 50μM a 1mM CdSO₄, které byly použity téměř pro všechny pokusy.

4.2.1.1.1. Indukce buněčné smrti pomocí rychlého zabití

Zamražení buněk v tekutém dusíku.

Buňky BY-2 (jak neovlivněné, tak po aplikaci 1mM CdSO₄) nebo listy 3 týdny starých rostlin tabáku byly zabyty rychle zamražením v tekutém dusíku (3min). Po rozmražení 5min v 60°C byly následně tyto mrtvé buňky kultivovány za standardních kultivačních podmínek.

Mechanické zabití.

Buňky BY-2 byly přefiltrovány přes filtrační zařízení Nalgene (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA) s nylonovou membránou (20 μm), čímž se snížil objem kultury cca 20x. Tyto buňky byly zabity mechanicky ve 2ml eppendorfkách homogenizací v kulovém mlýnku Retsch MM301 (Retsch GmbH, Haan, Germany, 5 min, 25 kmitů/s, 25°C).

Následně byly takto zabitě buňky kultivovány 7 dnů za standardních kultivačních podmínek pro buňky BY-2. Zamražené a následně rozmražené listy tabáku byly kultivovány až 7dnů ve sterilních falkonách s malým obsahem Murashige a Skoog média pro udržení vlhkosti.

Detergent Triton X-100.

Detergent byl přidán k třidenním buňkám BY-2 ve výsledné koncentraci 5 %. Buňky byly následně kultivovány 7 dnů za standardních kultivačních podmínek pro BY-2 buňky.

Ke třidenním buňkám BY-2 byly při studiu proteolytických enzymů indukujících internukleozomální fragmentaci DNA přidány inhibitory proteáz těsně před jejich zabitím v tekutém dusíku. K těmto pokusům byly použity následující inhibitory proteáz: inhibitor cysteinových proteáz E-64c (rozpuštěný v 1% metanolu) ve finální koncentraci 10μM a 50μM (Moriyasu *et al.*, 1996), inhibitor serinových a částečně cyteinových proteáz PMSF (phenylmethansulfonyl fluoride, rozpuštěn v DMSO) ve finální koncentraci 1mM a 10mM a inhibitor serinových proteáz aprotinin (rozpuštěný v destilované vodě) ve finální koncentraci 0,10μM a 0,05μM.

4.2.2. Viabilita buněk

Viabilita (životaschost) buněk byla hodnocena pomocí FDA (fluorescein diacetát, Molecular Probes) testu., ověřujícího jednak esterázovou aktivitu buněk, jednak zachování integrity jejich membrán po různém stresovém ovlivnění.

Po přidání do suspenze proniká FDA do buněk. Je štěpen esterázami a vzniklý fluorescein coby nepolární substance, obtížně pronikající intaktní membránou, se hromadí v živých buňkách, které v modrém světle září světlezeleně (excitační vlnová délka 493nm, emisní vlnová délka 520nm). Mrtvé buňky nesvítí, protože buď nemohou uvolnit molekulu fluoresceinu z komplexu, nebo ji nemohou hromadit v cytoplazmě (jejich cytoplazmatická membrána je narušena). Buňky se pozorují při kombinaci fluorescenčního a bílého světla.

Zásobní roztok FDA byl uchováván při -20°C (20mg FDA bylo rozpuštěno v 10 ml acetonu). Pro barvení suspenze bylo přidáno 2 µl zásobního roztoku do 7 ml čerstvého media a pak smícháno na podložním skle 1:1 se suspenzí buněk. Pracovní roztok FDA byl připraven vždy čerstvý.

Při stanovení viability bylo vždy počítáno 3 x 500 buněk.

4.2.3. Barvení jader a mitotický index (MI)

4.2.3.1. Barvení jader

Jádra buněk byla obarvena pomocí různých fluorescenčních jaderných barviv Hoechst 33258, SYTO 12 a SYTO 64 (vše Molecular Probes).

Hoechst 33258 je DNA fluorescenční barvivo, které se preferenčně váže na A-T páry DNA a má schopnost omezeně procházet přes membrány.

Postup při barvení: Substance Hoechst 33258 (zásobní roztok 10mg/ml Hoechst 33258 v DMSO, ředění 1:10 000 na konečnou koncentraci 0,1 µg/1ml). Pro obarvení 1 ml suspenze bylo použito 0,2 µl zásobního roztoku.

Excitace: 350nm, emise:450nm.

SYTO barviva jsou netoxická fluorescenční barviva volně procházející membránou a váží se na DNA i RNA. Veškerá SYTO barviva se liší svou afinitou k DNA nebo RNA a absorpcí. Jak SYTO 12, tak i SYTO 64 v komplexu s DNA vykazují až 2x vyšší fluorescenci než v komplexu s RNA.

SYTO 12: excitace: 499nm, emise: 522nm

SYTO 64: excitace: 599nm, emise: 611nm

4.2.3.2. Mitotický index

Stanovení mitotického indexu bylo provedeno po fluorescenčním obarvení buněk barvivem Hoechst 33258 a počítáno pod fluorescenčním mikroskopem.

MI = podíl počtu buněk v mitóze ku celkovému počtu buněk, vyjádřeno v procentech.

Pro stanovení MI bylo počítáno vždy 3 x 500 buněk.

V některých případech, zejména při delším časovém počítání a velkém množství vzorků byly buňky fixovány v Carnoyově fixáži (směs 96% ethanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1) a následně postupně zpracovávány.

4.2.4. Měření délky a šířky buněk

Délka buněk byla měřena pomocí obrazového analyzátoru LUCIA G. Pomocí interaktivního měření vybraného objektu (Measure, Length). Vždy bylo počítáno 3 x 500 buněk, pro jednotlivá měření délky buněk.

4.2.5. Vizualizace vakuol *in vivo*

4.2.5.1. Barvení tonoplastu lipidickou sondou FM4-64

Vakuoly byly zobrazeny pomocí membránového markeru FM4-64 (Molecular Probes). Jde o netoxické lipofilní styrylové barvivo, které se u kvasinek běžně používá k vizualizaci lyzozómů a vakuol (Vida a Emr 1995), a u rostlinných buněk barví kyselé kompartmenty trans-Golgi, endozómy a také rostlinné vakuoly, resp. tonoplast (Kutsuna a Hasezawa 2002).

Zásobní roztok FM4-64 se uchovává ve tmě při 4°C. Pro obarvení suspenze byly přidány 4μl ze zásobního roztoku do 2,5ml suspenze (výsledná koncentrace 32 μM). Po 24 hodinách inkubace buněk ve tmě a za kontinuálního třepání byly obarveny všechny vakuolární membrány v buňce.

4.2.5. Vizualizace vakuol za použití transgenní linie BY/GV7

Změny v uspořádání tonoplastu po aplikaci síranu kademnatého byly sledovány *in vivo* při použití transgenní linie BY/GV7 (Kutsuna a Hasezawa 2002, viz kap. 4.1.5).

4.2.6. Vizualizace endoplazmatického retikula *in vivo*

Změny v uspořádání endoplazmatického retikula *in vivo* během stresového působení iontů kadmia bylo použito transgenní linie BY-2/HDEL (Petrášek *et al.* 2003, viz kap. 4.1.2).

4.2.7. Vizualizace cytoskeletu

4.2.7.1. Vizualizace mikrotubulárního cytoskeletu *in vivo*

Změny v uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu byly *in vivo* hodnoceny pomocí transgenní linie BY-2/GT16 (viz kap. 4.1.3).

4.2.7.2. Imunochemická metoda vizualizace tubulinu

K vizualizaci tubulinového cytoskeletu byla použita modifikovaná metoda nepřímé imunofluorescence podle Smertenko *et al.* 1997 (Schwarzerová *et al.* 2002) s využitím monoklonální anti- α tubulinové protilátky (Amersham) a sekundární protilátky značené FITC (Sigma). Jádra byla barvena pomocí Hoechst 33258 (Sigma).

Použité roztoky:

MSB (Microtubule stabilizing buffer): 0,05M PIPES (Sigma), upravit pH na 6.9, 2mM EGTA (Sigma), 2mM, MgSO₄ (Lachema)

Fixáž PBS: 3,7% paraformaldehyd (Serva) v PBS

Fixáž MSB: 3,7% paraformaldehyd, 0,05M PIPES, pH=6.9, 5mM EGTA, 2mM MgSO₄, 1%, Triton X-100 (Serva)

PBS (phosphate buffered saline): NaCl (P-lab) 8 g/l, KCl (Lachema) 0,2 g/l, KH₂PO₄ (Lachema) 0,158 g/l, Na₂HPO₄·12 H₂O (Lachema) 2,31 g/l

Enzymatický koktejl: 1% macerozym (Serva), 0,2% pektináza (Serva) v MSB

0.5% PBSA: BSA (bovine serum albumin) v PBS. Hoechst 33258 zásobní roztok: 100mg Hoechst /ml PBS

Postup:

A. Příprava krycích sklíček:

1. Skla byla důkladně očištěna vroucí destilovanou vodou a odmaštěno v 96% ethanolu. Poté byla skla inkubována 30 min s poly-L-lysinem ve vlhké komůrce (40 μ l/sklo) a následně vysušena 30 min při 60°C.

B. Příprava buněk:

Buněčná suspenze byla převedena do „košíčku“ s nylonovým dnem a odsáto médium. Buňky byly fixovány hodinu v PBS fixáži a 20min v MSB fixáži. Po promytí v MSB (3 x 10min) byla buněčná stěna natrávena enzymy enzymatického koktejlu (7 min). Poté byly buňky znovu promyty v MSB (3 x 10 min). Buňky byly přeneseny na poly-L-lysinová skla vrstvou vzhůru a nechala se 10 min sedimentovat na podklad. Dále byly buňky promyty 20 min v roztoku 1% Tritonu X-100 v MSB, 5 min v PBS a 30

min v 0,5% PBSA. Inkubace s primární protilátkou (ředění 1:500) byla prováděna ve vlhké komůrce (45 min, RT nebo přes noc v lednici, 40 μ l protilátky/sklo). Poté byly buňky promyty v PBS (3 x 10 min). Buňky byly inkubovány se sekundární protilátkou (ředění 1:30) znovu 45 min ve vlhké komůrce a temnu při laboratorní teplotě (40 μ l protilátky/sklo). Po promytí buněk v PBS (2 x 10 min) byla obarvena jádra buněk roztokem Hoechst (4 μ l zásobního roztoku Hoechst 33258/3ml PBS, 10 min). Poté byly buňky promyty v destilované vodě (2 x 1 min) a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem při použití excitačního filtru 450 až 480 nm a bariérového filtru 515 nm.

4.2.7.3. Značení aktinu

Aktinová filamenta byla zobrazena fluorescenčně pomocí značeného faloidinu (TRITC, Sigma) (Pokorná *et al.* 2004).

Použité roztoky:

Základní pufr: 100mM PIPES, pH=7.0, 1 mM MgCl₂, 5mM EGTA, 0,1% Triton X-100

Fixáž I: 1,8% paraformaldehyd v základním pufru bez tritonu

Fixáž II: 1,8% paraformaldehyd v základním pufru

TRITC/faloidin (TRITC/Ph): zásobní roztok 6,6 μ M komerčně dostupné substance v 96% ethanolu. Uchovávat při -20°C.

Zásobní roztok zředit 10x v 1%PBSA (výsledná koncentrace 0,66 μ M TRITC/Ph)

PBS (phosphate buffered saline): NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,158 g/l, Na₂HPO₄ x12 H₂O 2,31 g/l

1%PBSA: 1%BSA (bovine serum albumin) v PBS

Hoechst: zásobní roztok 100 mg Hoechst /ml PBS

Protokol:

Buňky byly přeneseny do „košíčku“ s nylonovým dnem a odsáto medium. Buňky byly nejprve inkubovány 5 min ve fixáži I, při RT a poté 5 min ve fixáži II, při RT. Po promytí v základním pufru byla fixáž odsáta z „košíčku“ a buňky byly 10 min inkubovány při laboratorní teplotě v základním pufru. Pro obarvení aktinu byly buňky v pufru inkubovány 25 min při RT s roztokem TRIC/faloidinu (výsledná koncentrace 0,33 μ M). Buňky sedimentovaly na dno eppendorfky. Po odstranění supernatantu byly promyty v PBS. Jádra buněk byla obarvena Hoechst 33258 (2 μ l zásobního roztoku Hoechst/1 ml suspenze buněk). Takto byly buňky připraveny k pozorování pod fluorescenčním mikroskopem při použití excitačního filtru 510

až 550 nm a bariérového filtru 590 nm.

4.2.7. 4. Vizualizace aktinového cytoskeletu *in vivo*

Změny v uspořádání aktinového cytoskeletu byly *in vivo* sledovány pomocí transgenní linie BY-2/TGFP3 (viz. kap. 4.1.4).

4.2.8. Příprava protoplastů

Technika byla použita v pokusech sledujících tvarové změny jader, vyvolané aplikací některých stresorů, souvisejí s přítomností či absencí buněčné stěny.

Použité roztoky:

kultivační médium pro BY-2

kultivační médium pro BY-2 obohacené o 0,4M sacharózou

enzymatický koktejl: 1% celulóza, 1% pektolyáza, 0,45M manitol

Postup:

Protoplasty byly izolovány ze 7denní kultury BY-2 (stacionární fáze růstu). 10ml 7denní kultury bylo přefiltrováno přes filtrační zařízení Nalgene a rozsuspendováno v 10ml enzymatické směsi a necháno velmi mírně třepat na třepačce. Po 3-4 hodinách se uvolňovaly protoplasty. Do centrifugačních zkumavek s 10ml MS média obohaceného o 0,4M sacharózu byly opatrně připipetovány protoplasty v enzymatickém roztoku, tak aby se mezi nimi vytvořilo viditelné rozhraní. Po centrifugaci (10min, 200g, RT) byly flotující protoplasty na rozhraní fází odebrány špičkou s ustřiženým hrotem a znovu rozsuspendovány v čerstvém roztoku kultivačního média s 0,4M sacharózou. Po centrifugaci (200g, 10 min, RT) protoplasty sedimentovaly na dně. Po odsátí supernatantu byly protoplasty resuspendovány v kultivačním médiu obohaceném o 0,4M sacharózu.

4.2.9. Izolace jader

Jádra byla izolována velmi rychle pomocí sonikátoru.

Použité roztoky:

pufr stabilizující jádra: 10mM Tris, 50mM NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 7

Postup:

1 ml suspenze buněk byl převeden do 2ml ependorfeku a buňky se nechaly sednout na

dno (cca 10 min). Poté bylo odebráno přebytečné médium. Takováto kompaktní suspenze byla sonikována pomocí sonikátoru (Bandelin electronic) 1 min, 10 impulzů/s, výkon 70%. Poté byly zbytky buněk promyty v pufru stabilizujícím jádra a izolovaná jádra byla pak pozorována pod fluorescenčním mikroskopem po obarvení barvivem Hoechst 33258.

4.2.10. Synchronizace buněk BY-2

Účinná synchronizace buněk BY-2 byla provedena za použití blokátorů syntézy DNA hydroxymočoviny (HU) nebo aphidicolinu (APC). Pro synchronizaci buněk BY-2 byl použit modifikovaný protokol podle Nagata *et al.* 1992 a Samuels *et al.* 1998.

Postup:

3 ml 7 denní kultury BY-2 byly přepipetovány do 30 ml čerstvého média pro BY-2 bohatého o 4mM hydroxymočovinu (HU). Buňky kultivovány na třepačce 24 hodin při 25°C a tmě. Obsah baňky byl převeden do horní části filtračního zařízení Nalgene, a přefiltrován do dolní části. Buňky byly zachyceny na filtru z mlynářského hedvábí (30 μm). Do horní části bylo přidáno 80 ml 3% roztoku sacharózy (odpovídá 30 ml buněčné suspenze). Tento okamžik byl považován za čas 0. Celá uzavřená nádoba byla dána znovu na 15 minut třepat na třepačku. Suspenze byla přefiltrována a znovu přidáno 80 ml 3% roztoku sacharózy. Tento krok byl opakován ještě čtyřikrát. 10 ml pipetou se špičkou s ustřiženým koncem bylo odpipetováno 30 ml suspenze a převedeno do 100 ml Erlenmayerovy baňky. V hodinových intervalech byl monitorován výskyt mitóz (po obarvení jader Hoechst 33258). Ve srovnávacích pokusech bylo místo HU použito 15 μM aphidicolinu. Postup byl stejný jako při synchronizaci buněk BY-2 pomocí HU.

Pro zjištění indukce programované buněčné smrti v určité fázi buněčného cyklu bylo 50 μM kadmium přidáno v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Tedy v čase 1, 5, 7 a 10.5 hodin vymytí antireplikativních látek (resp. v S fázi, pozdní G2 fázi, M fázi a časně G1 fázi buněčného cyklu, podle Świątek *et al.* 2002, obr. 5.28).

4.2.11. Hodnocení fragmentace DNA

Fragmentace DNA byla hodnocena pomocí DNA elektroforézy a TUNEL reakce.

4.2.11.1. Izolace chromozomální DNA

Celková DNA byla izolována pomocí cetyltrimethylamonium bromidovou metodou, blíže Fojtová a Kovařík 2000.

Použité roztoky:

Koncentrovaný lytický pufr (na 33ml): 2,5ml 1M tris-HCl, pH8, 8,0ml 5M NaCl, 1,0ml 0,5M EDTA, 0,5g CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), 21,5ml destilované vody

0,05ml merkaptoetanolu - přidat těsně před použitím

Fenol/chloroform: 1:1, pH 8

Roztok RNázy: (10mg/ml)

Postup:

250mg čerstvé hmotnosti suspenze bylo zmraženo v tekutém dusíku. Vzorky byly homogenizovány (rozemlety) v kulovém mlýnku (Retsch MM301, 5 min, 25 kmitů/s). K homogenátu bylo přidáno 450μl lytického pufru a směs byla inkubována 1 hodinu v 60°C. Po přidání 650μl roztoku fenol/chloroform byla směs důkladně promíchána pomocí vortexu (5 min) a poté centrifugována (15 min, 13000g, RT). K horní fázi bylo přidáno 2/3 objemu izopropanu a promícháno převrácením zkumavky. Sedimentace sražené DNA bylo dosaženo centrifugací (5 min, 13000g, RT). Odsolení DNA promytím v 70% etanolu (3x5 min). Přečištěná DNA byla vysušena (cca 1 hod., RT), resuspendována v 50μl TE pufru s 1μl roztoku RNázy a inkubována 30min v 55°C. Izolované DNA byla skladována při -20°C.

4.2.11.1.1. Měření koncentrace

Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru (Thermo Spectronics – BioMate5) po stonásobném zředění vzorku. v kyvetě z křemenného skla při vlnové délce 260nm. Koncentrace byla spočítána z absorbance OA260 podle vztahu: $c(\mu\text{g/ml}) = 50 \times \text{ředění} \times \text{OA260}$. OA260 je optická aktivita při $\lambda=260\text{nm}$

4.2.11.1.2. Výpočet nanášení

Z koncentrace byl vypočítán objem nanášeného roztoku DNA podle vzorce $V = m/c$, kde V je objem (μl), m hmotnost nanášené DNA (μg, použito 10) a c je koncentrace (μg/μl).

4.2.11.1.3. Elektroforéza DNA

Integrita DNA byla hodnocena za pomoci 1,8% agarózového gelu (agaróza v 0,5 TAE pufru). Po vychladnutí rozpuštěné agarózy na cca 50°C byl přidán etidiumbromid (5μl zásobního roztoku/100μl roztoku agarózy). Do vaničky na elektroforézu byl nalit gel,

odstraněny bubliny a nasazen hřeben. Po ztuhnutí gelu byl celý přelit 0,5x TAE pufrem. DNA byla nanášena do jamky v gelu po smíchání vzorku s roztokem bromfenolové modři v poměru 5:1. Elektroforéza byla nastavena tak, že „běžela“ cca 15-20 hod při napětí 14V. Agarózový gel byl pak snímán digitální kamerou pod UV zářením.

4.2.11.2. TUNEL reakce

TUNEL reakce (terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated deoxy-uridinetriphosphate (dUTP)-nick labelling) byla použita pro detekci 3'OH konců jaderné DNA. TUNEL reakce byla provedena podle Jones *et al.* 2001 s kitem od firmy Roche TMR-red in situ cell death detection kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Německo).

Použité roztoky:

PBS 10x: NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,158 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 2,31 g/l

Fixáž: 150 μl paraformaldehydu (37%), 850 μl kultivačního média pro BY-2

Permeabilizační pufr: 0,1% Triton X-100, 0,1% sodium citrát (pH 7,2)

TUNEL reakce (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red, Roche Molecular Biochemicals):

9:1 (pufr:enzymatická směs)

Postup:

250 μl buněčné suspenze bylo převedeno do centrifugačních zkumavek s modrým víčkem. Po centrifugaci (1000rpm, 3 min, RT) byl odstraněn supernatant. Dále byly buňky inkubovány v 1ml fixáži 30 min při RT (v tomto kroku se dají vzorky skladovat v lednici). Po promytí 1ml kultivačního média byly buňky znovu centrifugovány (1000rpm, 3 min, RT) a odstraněn supernatant. Tento krok (promývání kultivačním médiem a centrifugace) byl opakován. Poté byly buňky inkubovány ve 200 μl permeabilizačního pufru 5 min, při 4°C. Buňky byly promyty 1ml PBS 1x a po centrifugaci (1000rpm, 3 min, RT) byl odstraněn supernatant. Tento krok byl ještě jednou opakován. Buňky byly inkubovány v TUNEL reakci 30 min při 37°C (50 μl TUNEL směsi/varianta). Poté byly buňky promyty v 1ml PBS 1x a centrifugovány (1000rpm, 3 min, RT) a odstraněn supernatant. Jádra byla obarvena pomocí barviva Hoechst (4 μl Hoechst 33258/3ml PBS 1x) 10 min. Po přidání 50-100 μl PBS 1x byla suspenze připravena k okamžitému pozorování pod mikroskopem.

TMR red je při pozorování pod fluorescenčním mikroskopem excitováno zeleným světlem o vlnové délce 520-560 nm, detekováno v červené oblasti (570-620nm), (Roche Instruction manual 1999). Jako kontrola metody byl proveden standardní postup bez přidání enzymatické směsi a standardní postup bez fluorescenčně značených nukleotidů

4.2.12. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Změny vyvolané působením kadmia na buňky BY-2 byly pozorovány také pomocí TEM, která byla provedena zakázkově Zuzanou Lenočovou (bližší popis viz. Lenočová 2004).

4.2.13. Kvantitativní stanovení škrobu

Obsah škrobu byl stanoven kvantitativně jako obsah glukózy vzniklé enzymatickým štěpením škrobu pomocí HPLC za použití Pb^{2+} kolony. Kvantitativní stanovení škrobu bylo provedeno zakázkově laboratoří RNDr. Heleny Lipavské, PhD.

4.2.14. Dokumentace a archivace obrazu

4.2.14.1. Mikroskopie

K mikroskopickým hodnocením byl použit fluorescenční mikroskop Olympus Provis AX 70 (objektivy UplanApo 2x, 4x, 10x, 20x, 40x, LUM Plan FI 40x a 60x) s využitím Nomarského fázového diferenciálního kontrastu.

Pomocí **konfokální mikroskopie** byly sledovány změny v uspořádání mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu a v uspořádání tonoplastu *in vivo* při použití BY-2 transgenických linií. Konfokální skenovací mikroskop Leica TCS SP2 AOBS (TCS NT; Leica, Heideberg, Německo) je vybaven ArKr lasery využívající sety filtrů pro FITC (excitace 488nm a emise 500-530nm) a TRITC (excitace 543nm a emise 545-590nm) a UV laserem (excitace 350nm a emise 450nm). Pro pozorování byl použit objektiv Plan Apo (63x, 1.2).

Elektronmikroskopické preparáty byly hodnoceny pomocí **elektronového mikroskopu** Philips 268 Morgagni a snímány pomocí digitální kamery Megaview 2. Použité zvětšení činilo 1 500 až 100 000. K digitalizaci obrazu byl použit software Soft Imaging System s prohlížečem Soft Imaging Viewer.

4.2.14.2. Digitální archivace dat a obrazová analýza

Mikroskopické preparáty byly archivovány v podobě digitálního obrazu na obrazovém analyzátoru **LUCIA 4.60** (Laboratory Imaging, Praha). Tato archivace umožňuje zobrazit jak fixované, tak živé buňky a pomocí vhodného programu vyhodnotit nejrůznější parametry buněčných linií.

LUCIA G je softwarový systém obrazové analýzy pro snímání a digitalizaci barevného obrazu. Obraz z fluorescenčního mikroskopu Olympus Provis AX70 byl snímán přes 1/2“ 3 CCD TV kameru Sony DXC-950P v normě PAL a digitalizován kartou Matrox

Magic (RGB (3M) s rozlišením 600x800x24 bitů).

Pomocí této sestavy byly zpracovávány mikroskopické preparáty po obarvení FDA, FM4-64, Hoechst 33258, SYTO 12 a Lugolovým barvivem a buňky pod Nomarského diferenciálním kontrastem. Videomikroskopie využívala tento systém obrazové analýzy.

LUCIA G/F je barevný analyzátor obrazu vyrobený speciálně pro práci s jednotlivými složkami barevného obrazu (červená, zelená a modrá složka). Signál byl snímán 1/2“ integrující monochromatickou TV kamerou COHU4910 ze tří kanálů (R, G, B) a výsledný obraz vznikl složením těchto signálů. Jednotlivé monochromatické kanály mohly být samostatně upravovány (zvýšení či snížení intenzity jednotlivých fluorescenčních signálů). Tímto systémem byly zpracovávány zejména preparáty s vícečetným značením.

4.2.15. Statistické hodnocení dat

U hodnocení viability buněk, mitotického indexu a měření délky buněk byly z naměřených hodnot, jejichž počet je udáván v kapitolách u jednotlivých parametrů, vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky pomocí statisticko-grafického programu SigmaPlot 8.00 (Sigma).

5. VÝSLEDKY

5.1. Indukce programované buněčné smrti

Pro navození PCD u buněk tabákové linie BY-2 nejprve testovány známé induktory apoptotické PCD u živočišných buněk: camptothecin či staurosporin (inhibitory enzymů topoizomerázy I. a proteinkinázy C) a mykotoxin fumonisin B (inhibitor syntézy sfgnolipidů). Žádná z těchto látek však nebyla po aplikaci ke kulturám schopná vyvolat takovou buněčnou smrt, jež by vedle obecných, nespecifických příznaků (jako celkový kolaps buňky, nulová viabilita ap.) byla doprovázena specifickými symptomy – internukleozomální fragmentací DNA. Proto byly později pro systematické studium procesu PCD použity jiné xenobiotické faktory, známé induktory PCD v rostlinných buňkách: chladový stres a ionty kadmia.

5.1.1. Chladový stres (4°C)

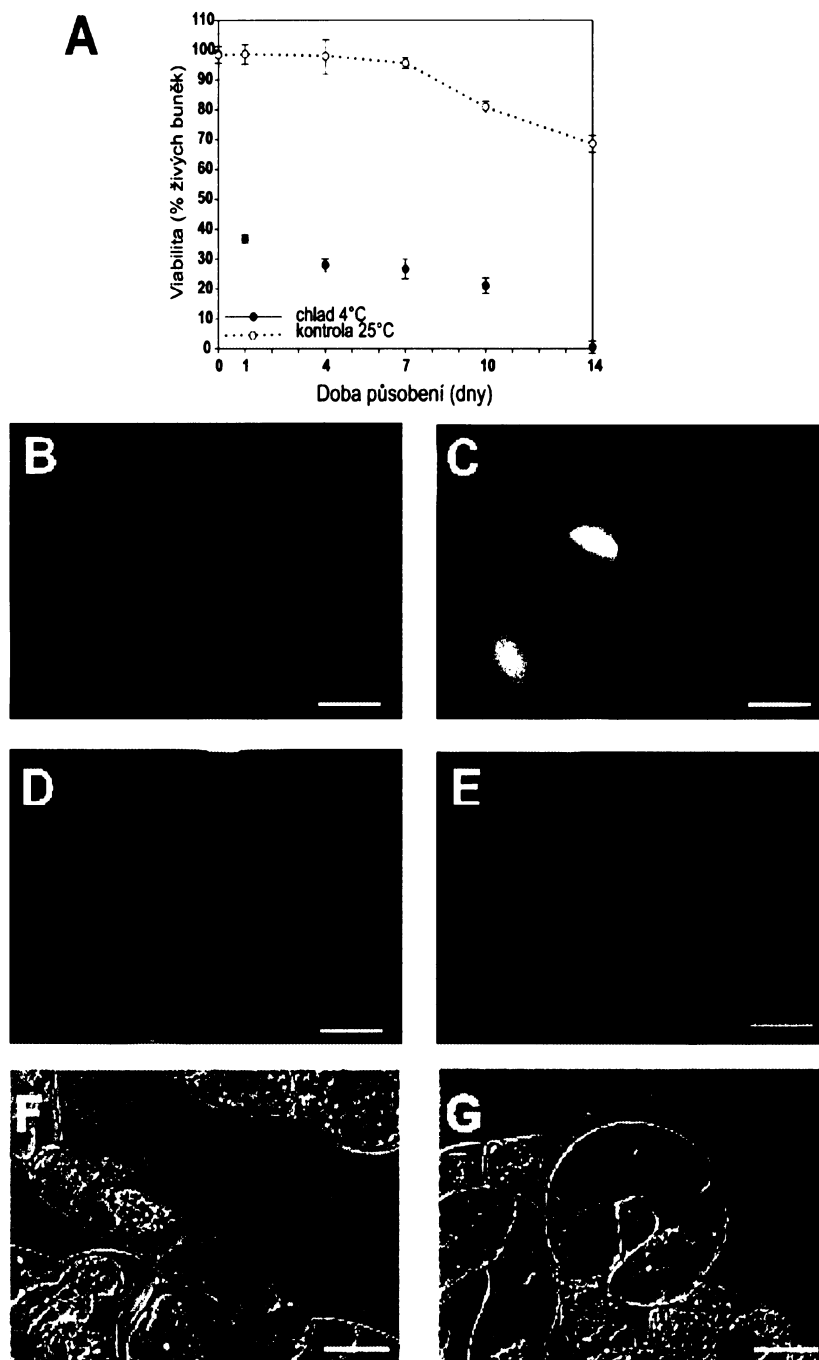
Jako relativně spolehlivý stresor vyvolávající v systémech rostlinných buněčných linií příznaky PCD byl použit dlouhodobě aplikovaný chlad (kultivace při 4°C). Fragmentaci DNA u tabákových buněk linie BY-2 po ovlivnění 4°C pozorovali a jako fenomén PCD Koukalová *et al.* 1997, avšak neprovedli žádnou podrobnější cytologickou charakteristiku kultur.

5.1.1.1. Viabilita buněk

V našich pokusech vyvolal chlad, při teplotě 4°C výrazný pokles viability buněk až na cca 40 % již po prvním dnu kultivace (obr. 5.1 A). Následný pokles byl pozvolný až do čtrnáctého dne působení, kdy byly již všechny buňky mrtvé. Během celého standardního kultivačního intervalu nebyl pozorován výrazný pokles viability kontrolních buněk oproti viabilitě buněk ovlivněných. Až ke konci kultivace umíraly i buňky kontroly (cca 70 % živých buněk, 14.den), zejména v důsledku hladovění a hypoxie, vyvolanými extrémně dlouhou dobou, bez subkultivace do čerstvého media (obr. 5.1 A).

5.1.1.2. Stav vakuomu / cytoplazmatické sítě

Proti kontrolním buňkám s dlouhodobě zachovanou sítí cytoplazmatických provazců (obr. 5.1 B), byly u buněk ovlivněných chladem pozorovány rychlé změny v uspořádání této vnitřní architektury. Docházelo k postupnému rozpadu sítě cytoplazmatických provazců (obr. 5.1 E, šipka). Navíc se od prvního dne působení až u 80 % všech buněk objevovaly drobné vakuoly zejména v perinukleární oblasti (obr. 5.1 C). Po delším působení (4 dny) byly pozorovány četné granule po celé buňce (obr. 5.1 D).



Obr. 5.1. Viabilita a vnitřní architektura buněk BY-2 po chladovém působení (4°C)

A - Graf viability buněk BY-2 během 14denní kultivace ve 4 °C. Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů ± SE.

B - Kontrolní neovlivněné buňky v exponenciální fázi růstu (4 dny staré). FDA je u těchto buněk lokalizován v perimikleární oblasti, v cytoplazmatických provazcích a v nástěnné vrstvě cytoplazmy.

C - Buňky vystavené jednodennímu působení 4 °C s čtyřmi drobnými vakuolami.

D - Buňky vystavené čtyřdennímu působení 4 °C s velkými granulemi značenými fluoresceinem, které se vyskytují po celém obsahu buňky.

E - Buňky vystavené sedmidennímu působení 4 °C s rozpadlými cytoplazmatickými provazci (šipka).

F, G - Tvarové malformace buněk BY-2 vystavených 4 °C.

F - Výrazně elongované buňky po 4 dnech působení.

G - Buňky rohlikovitého tvaru po 4 dnech působení.

C - E - Viabilní barvení FDA; F, G - Nomarského diferenciatlní kontrast; měřítko = 50 μm

5.1.1.3. Morfologie buněk

5.1.1.3.1 Tvarové změny buněk

U buněk ovlivněných chladem byly již po prvním dnu kultivace pozorovány také změny tvaru buněk. Téměř všechny buňky se výrazně protahovaly, u některých buněk způsobil nerovnoměrný růst buněčné stěny rohličkovité stočení (obr. 5.1 F, G). Od desátého dne se tvořily pouze velké buněčné shluky s menšími spíše sférickými buňkami (data neuvedena).

5.1.1.3.2. Morfologie jader

Na rozdíl od neovlivněných kontrolních buněk (obr. 5.2 A, B, C) se u buněk kultivovaných ve 4°C objevovaly malformace tvaru jader. Zvláštní tvary jader byly pozorovány již po prvním dnu kultivace a jejich výskyt se postupně zvyšoval až na 25 % čtrnáctý den kultivace (obr. 5.2 D-I, M). Také byl pozorován zvýšený rozpad mitotických struktur (až cca 30% 14.den kultivace, obr. 5.2 J). Pomocí jaderného barviva Hoechst 33258 však byla obarvena všechna jádra v buňkách, tedy jádra živých i mrtvých buněk a nelze odlišit změny předcházející smrti buněk od těch „postmortálních“.

5.1.1.4. Fragmentace DNA

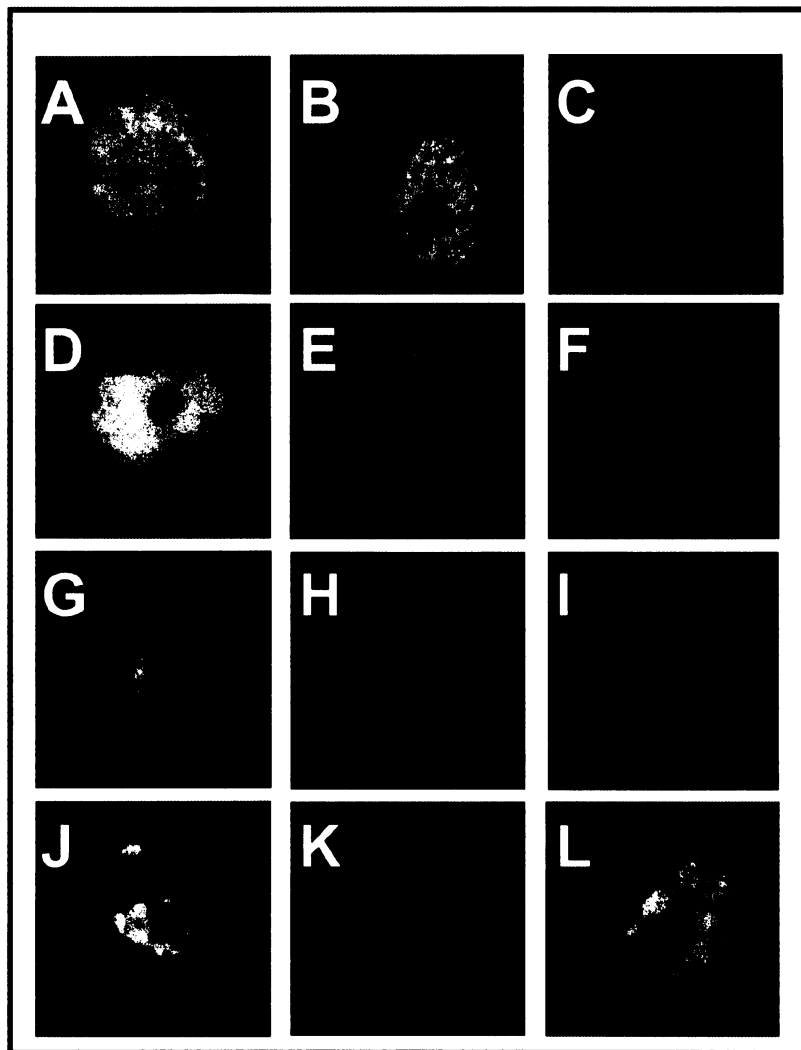
Specifická fragmentace DNA je jedním z charakteristických znaků apoptotického typu PCD. Zlomy genomové DNA je možné detekovat pomocí tzv. TUNEL reakce in situ či elektroforeticky.

5.1.1.4.1. TUNEL reakce

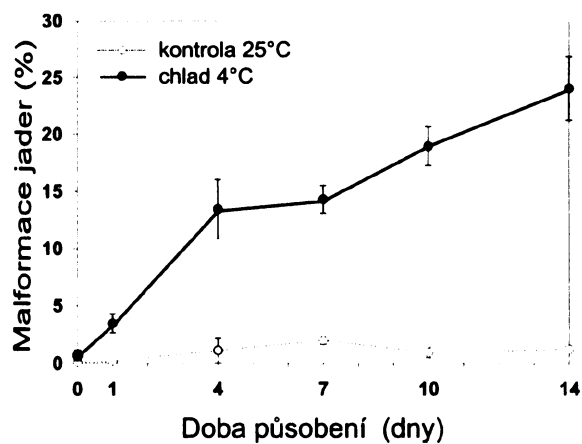
V porovnání s kontrolními buňkami, které po celou dobu kultivace vykazovaly pouze 1 – 2 % TUNEL-pozitivních jader (obr. 5.3 A, B, C, J), buňky kultivované při 4°C vykazovaly až 10 % TUNEL-pozitivních jader již čtvrtý den kultivace (obr. 5.3 D-J). Procento takovýchto jader se zvyšovalo s dobou působení až na 35 % čtrnáctý den kultivace (obr. 5.3 J). Negativní kontrola (pouze použití enzymatické směsi nebo pouze fluorescenčně značených nukleotidů - substrátu pro enzymy) nedávala téměř žádný signál (cca 1-2% data neuvedena).

5.1.1.4.2. Elektroforetická detekce

Fragmentace DNA na délku oligonukleozomálních jednotek (typický apoptotický „DNA žebříček“) bylo možné detekovat až sedmý a desátý den kultivace (obr. 5.3 K). Většina DNA izolované z buněk kultivovaných při 4°C však zůstala nefragmentována podobně jako DNA izolovaná z neošetřených buněk.



M



Obr. 5.2. Malformace jader buněk BY-2 po chladovém působení (4°C)

A - C - Kontrolní neovlivněné buňky, 4 dny staré.

D - L - Lalokovitá jádra pozorovaná po 4 dnech kultivace buněk ve 4°C.

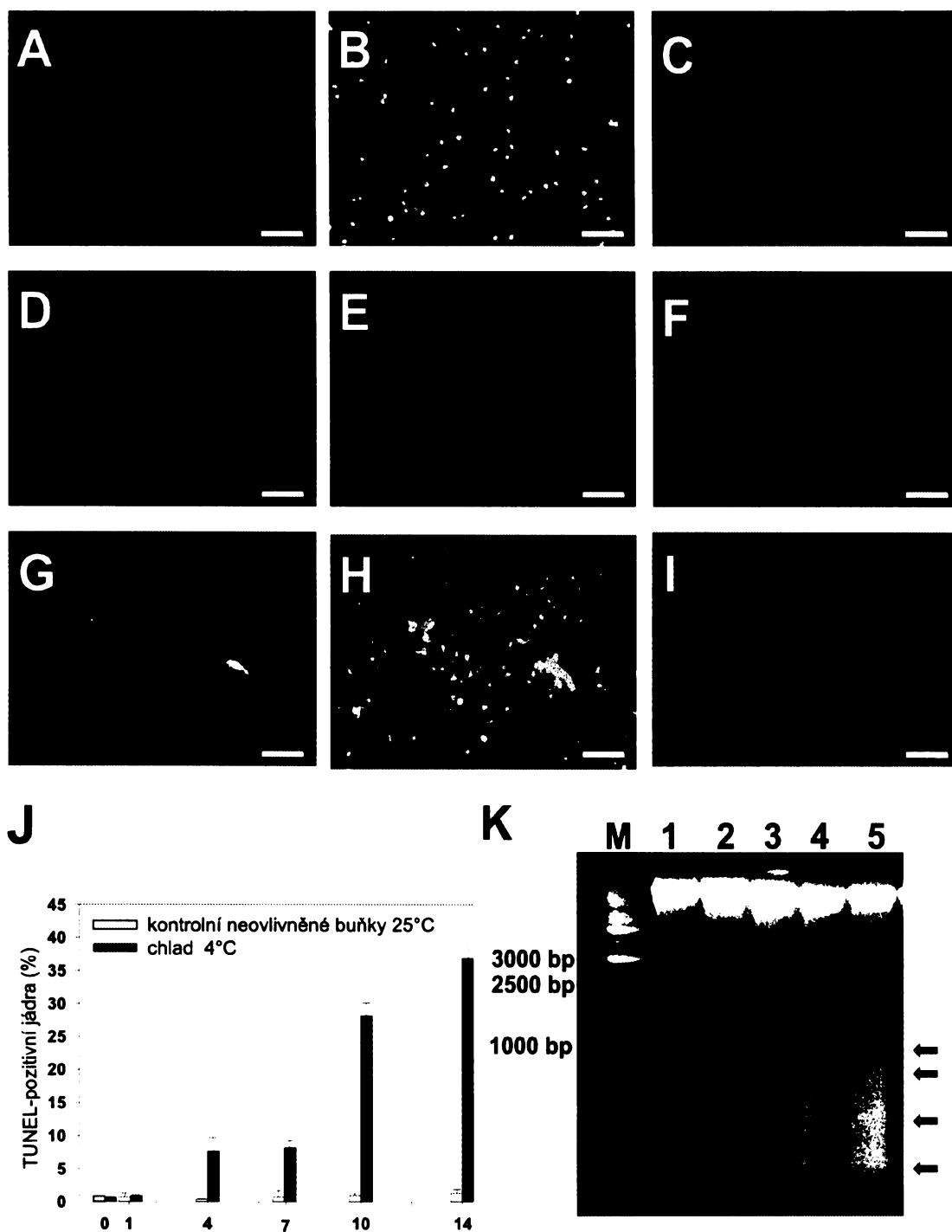
J - Rozpad mitotických struktur po 7 dnech kultivace.

M - Graf malformovaných jader buněk BY-2 po 4°C působení.

Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů ± SE.

A - L - Jaderné barvení Hoechst 33258.

Měřítko = 25 μm



Obr. 5.3. Detekce fragmentace DNA u buněk BY-2 vystavených 4°C

A - J - In situ detekce fragmentace DNA.

A - C - Neovlivněné kontrolní buňky po 24 hod kultivace.

D - F - Buňky ovlivněné 4°C po dobu 1 dne.

G - I - Buňky ovlivněné 4°C po dobu 4 dní.

A, D, G - TUNEL-pozitivní jádra.

B, E, H - Hoechst 33258.

C, F, I - Složený obrázek.

J - Graf množství TUNEL-pozitivních jader během 14 denní kultivace ve 4°C.

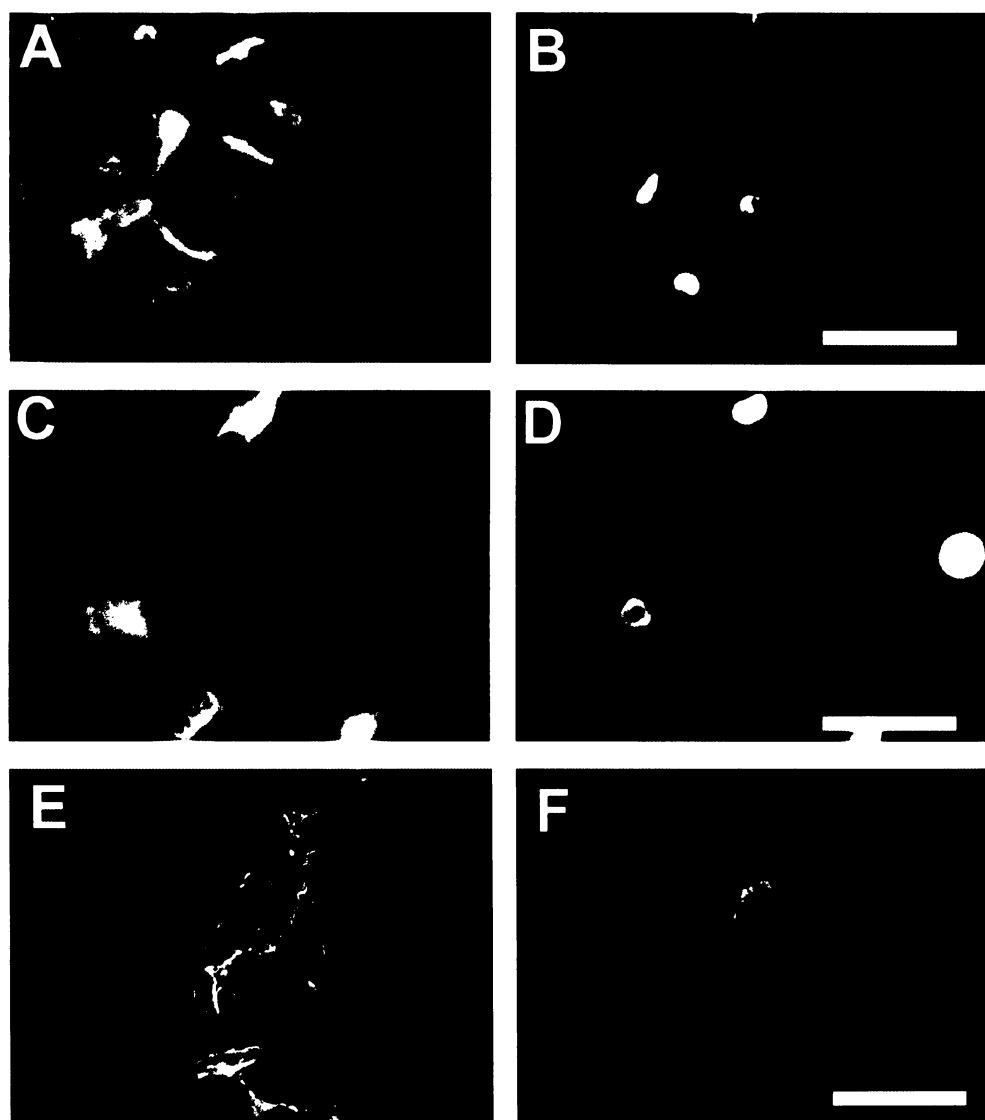
Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů ± SE.

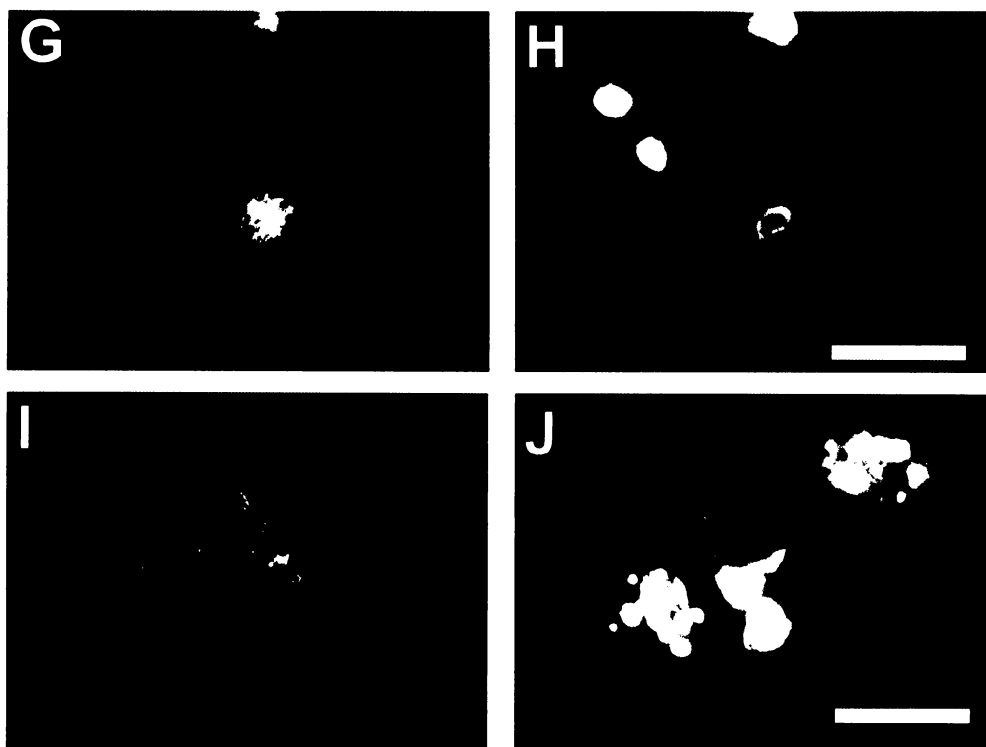
K - fragmentace DNA, M - marker molekulárních vah, 1 - kontrolní neovlivněné buňky 4 dny, 2 - chladové působení 4°C 1 den, 3 - chlad 4°C 4 dny, 4 - chlad 4°C 7 dní, 5 - chlad 4°C 10 dní, specifická degradace DNA do oligonukleozomálních fragmentů (šipky), měřítko = 50 µm

5.1.1.5. Změny v uspořádání aktinového cytoskeletu

Aktinová filamenta byla zobrazena fluorescenčně pomocí značeného faloidinu (TRITC).

V kontrolních tří denních buňkách byla pozorována jemná síť transversálně uspořádaných aktinových filament v kortikální oblasti (obr. 5.4 A). Změny v uspořádání aktinového cytoskeletu byly u buněk kultivovaných v teplotě 4°C již po prvním dnu působení, kdy byly pozorovány jednak buňky protažené (50 %) s hustou sítí jemných vláken v kortikální oblasti buňky (obr. 5.4 C) a jednak buňky se silnými dezorientovanými vlákny zejména v cytoplazmatických provazcích a hustou sítí těchto vláken v perinukleární oblasti vytvářející jaderný košíček (obr. 5.4 E), který se vyskytoval až do sedmého dne kultivace (až u 75 % všech buněk s barvitelným cytoskeletem, obr. 5.4 G). Později, desátý den byl aktinový cytoskelet již detekován pouze ve sférických buňkách, kde byl tvořen chaoticky





Obr. 5.4. Stav aktinového cytoskeletu u buněk BY-2 po chladovém působení (4°C)

A - B - Kontrolní neovlivněné buňky BY-2 v exponenciální fázi růstu (3 dny staré) s hustou sítí jemných aktinových filament v kortikální oblasti cytoplazmy.

C - D - Elongované buňky s transversálně uspořádanou hustou sítí aktinových filament v kortikální oblasti cytoplazmy po 24 hod působení chladu (4°C).

E - F - Buňky se zvláštním aktinovým košíčkem a silnými vlákny v cytoplazmatických provazcích po 24 hod působení chladu (4°C).

G - H - Buňky se zvláštním aktinovým košíčkem a silnými vlákny v cytoplazmatických provazcích po 7denním působení chladu (4°C).

I - J - Sférické buňky se značně chaoticky uspořádanými silnými vlákny po 10 denním působení chladu (4°C).

A, C, E, G, I - TRITC-faloidin.

B, D, F, H, J - Jaderné barvivo Hoechst 33258.

Měřítka = 50 μm

5.1.2. Vliv kadmia

Proces programovaného umírání buněk tabákové linie BY-2 byl dále studován po aplikaci iontů kadmia. Obdobně jako v případě chladového stresu byla u kadmiiem ovlivněných buněk již dříve potvrzena specifická internukleozomální fragmentace DNA (Fojtová *et al.* 2001). Komplexní cytologická charakteristika tohoto procesu však chyběla.

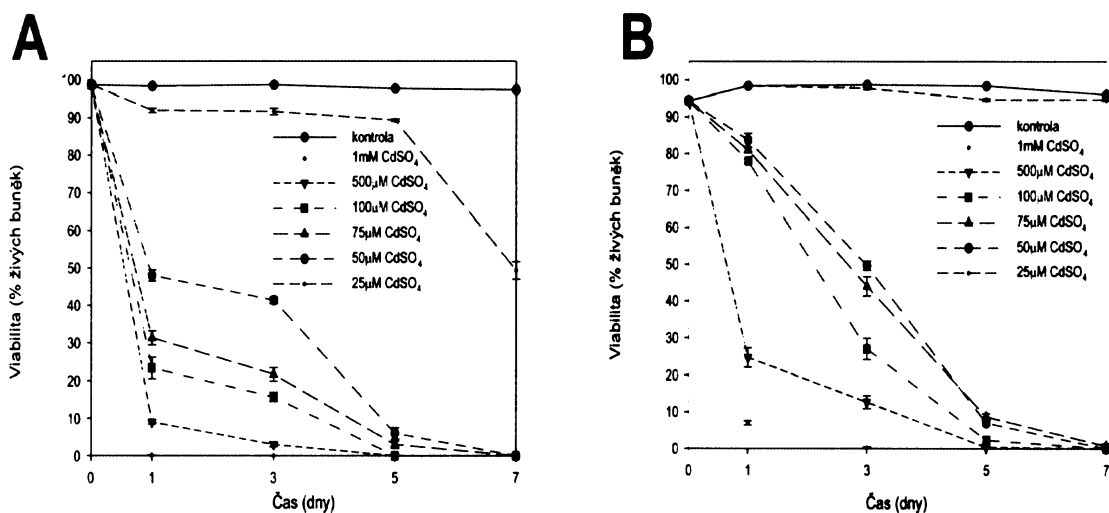
5.1.2.1. Viabilita buněk

Před zahájením detailnějších analýz byly na základě stanovení viability buněk vybrány vhodné koncentrace iontů kadmia, které při aplikaci ke kultuře v exponenciální fázi růstu způsobovaly buď rychlé (1mM CdSO₄), nebo pozvolné umírání buněk (50μM CdSO₄ obr. 5.5 A). Byla také provedena srovnávací analýza citlivosti buněk různého stáří. Při

aplikaci kadmia k buňkám ve stacionární fázi růstu bylo umírání buněk při všech použitých koncentracích výrazně pomalejší (obr. 5.5 B). Pro následné pokusy proto byla používána kultura (inokulum) v exponenciální fázi růstu.

Kontrolní buňky si udržely vysokou viabilitu (cca 98 %, obr. 5.6) po celou dobu týdenního kultivačního intervalu. Při použití 1mM koncentrace kadmia došlo k rychlému odumření buněk již po 12 hodinách kultivace (obr. 5.6). V případě 50 μ M koncentrace kadmia klesla viabilita buněk během prvního dne na cca 50-60 %. Následující pokles byl již méně výrazný, pátý den kultivace byly téměř všechny buňky mrtvé.

Díky velmi rychlému umírání buněk po ošetření 1mM CdSO₄, byly k hodnocení většího parametru umírajících buněk použity buňky ovlivněné 50 μ M koncentrací síranu kademnatého.

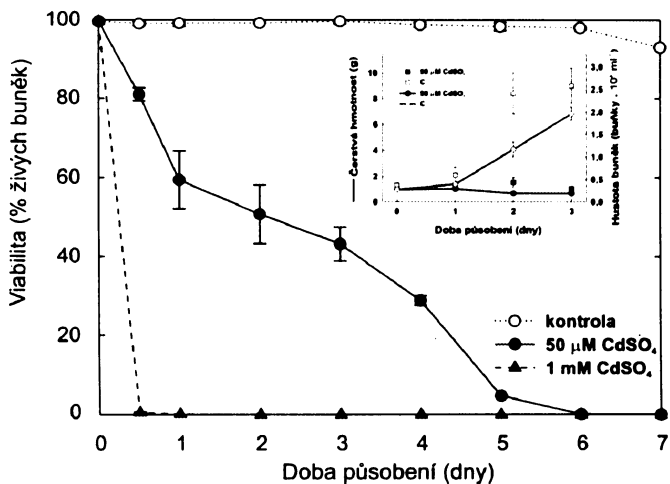


Obr. 5.5. Viabilita buněk po vystavení působení různých koncentrací kadmia

A - Graf viability buněk v exponenciální fázi růstu vystavených působení různých koncentrací kadmia.

B - Graf viability buněk ve stacionární fázi růstu vystavených působení různých koncentrací kadmia.

Každý bod reprezentuje průměr z počítání třikrát pětset buněk \pm SE.



Obr. 5.6. Viabilita buněk BY-2 po aplikaci 50mM kadmia

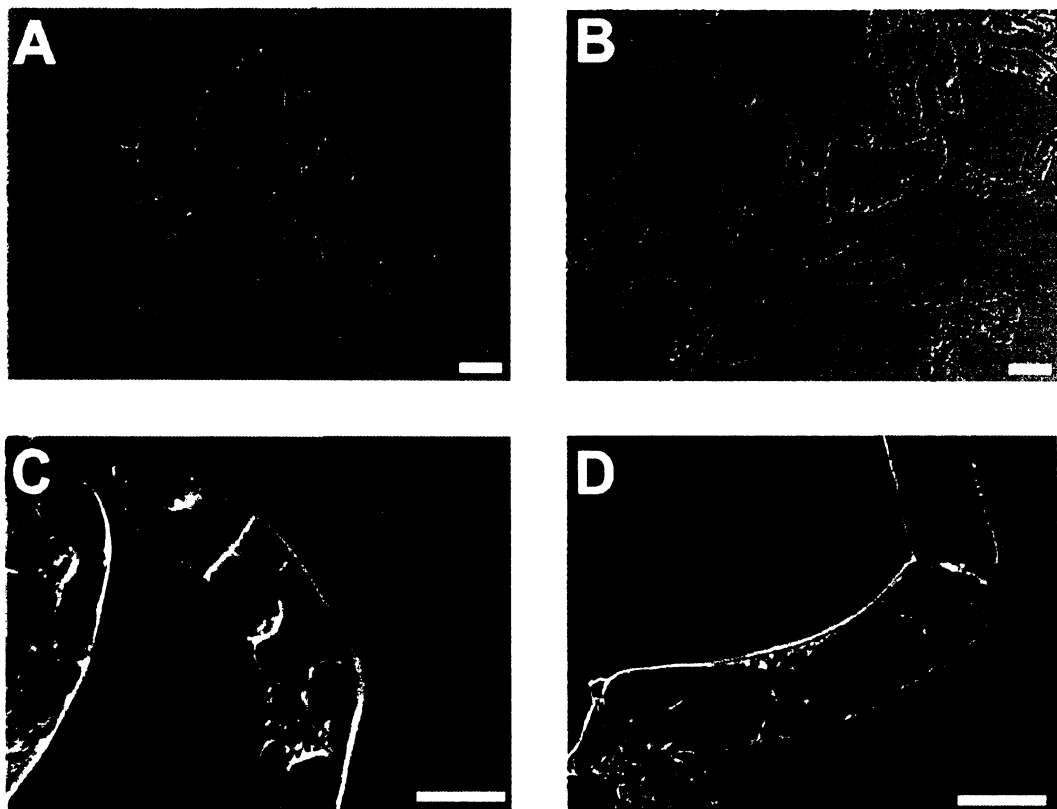
Graf viability buněk po aplikaci 50mM kadmia.

Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů \pm SE.

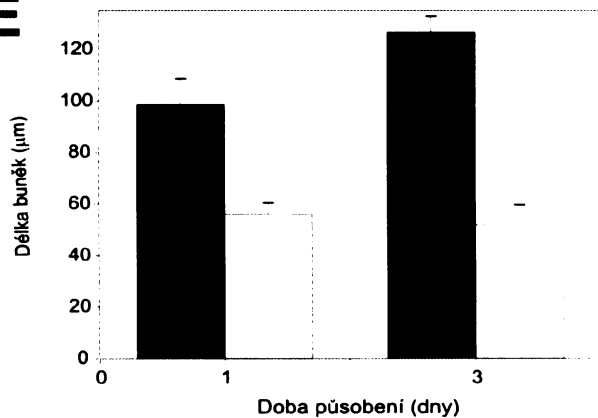
5.1.2.2. Morfologie buněk

5.1.2.2.1. Tvarové změny buněk

Nižší koncentrace iontů kadmia ($50\mu\text{M}$) vyvolala znatelné změny ve tvaru a velikosti přeživších buněk (obr. 5.7). Již od prvního dne kultivace buněk za přítomnosti $50\mu\text{M}$ kadmia, kdy se buňky již vůbec nedělily, byly pozorovány výrazně protažené buňky, jejichž délka se zvyšovala s dobou působení (obr. 5.7 B, D, E). Třetí den kultivace dosahovala až $120\ \mu\text{m}$, což bylo až dvakrát více než u neovlivněných kontrolních buněk.



E



Obr. 5.7. Abnormálně protažené buňky BY-2 po aplikaci $50\mu\text{M}$ kadmia

A, C - Kontrolní neovlivněné buňky po jednodenní kultivaci.

B, D - Buňky po jednodenní kultivaci v médiu obohaceném o $50\mu\text{M}$ kadmium.

E - Graf délky buněk BY-2 vystavené působení $50\mu\text{M}$ kadmia.

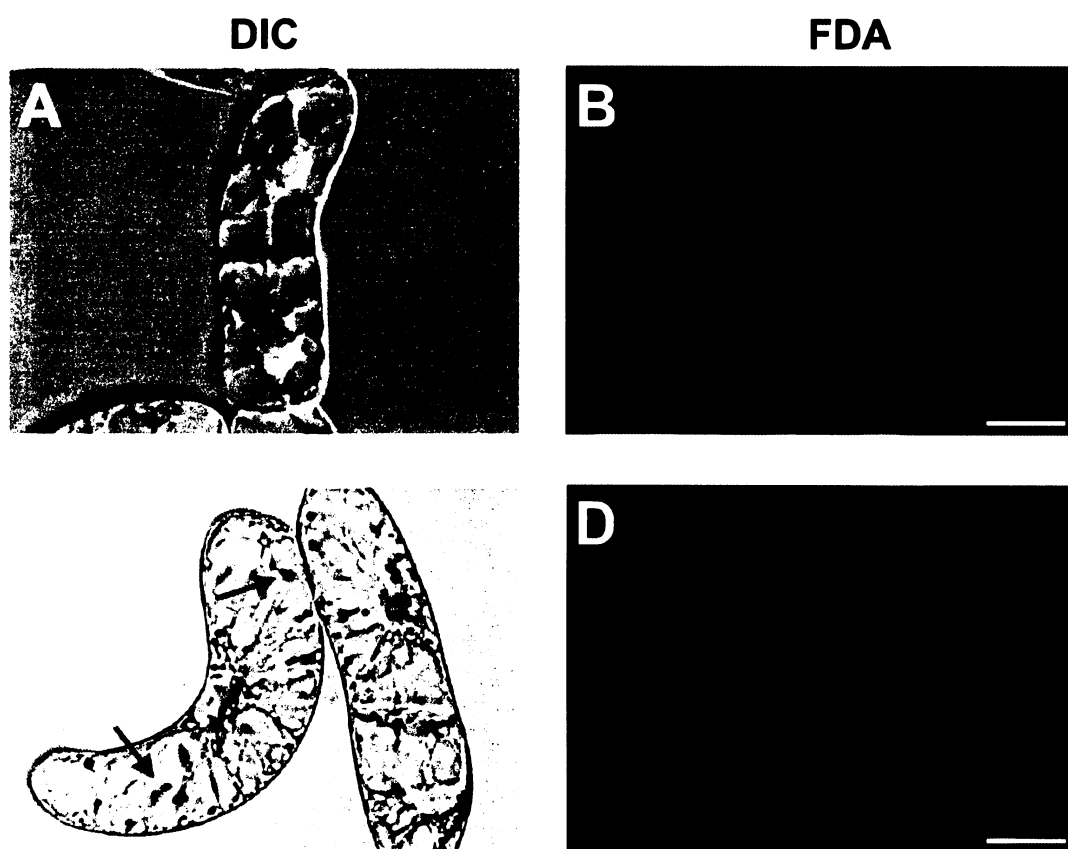
Každý bod reprezentuje průměr ze tří nezávislých pokusů \pm SE.

Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

Měřítko = $25\ \mu\text{m}$

5.1.2.2.2. Granulace cytoplazmy

Na rozdíl od kontrolních buněk (obr. 5.8 A, B), již od prvního dne kultivace v médiu s $50\mu\text{M CdSO}_4$, byly v buňkách pozorovány granule neznámého složení a původu. Granule dvoji velikosti (relativně malé a výrazně velké) byly pozorovatelné jak Nomarského diferencíálním kontrastem (obr. 5.8 C), tak po obarvení buněk pomocí FDA (obr. 5.8 D). Menší granule se nacházely po celé cytoplasmě, větší kopírovaly cytoplazmatické provazce (obr. 5.8 C, D, šipka) nebo se vyskytovaly v perinukleární oblasti. Tyto větší granule byly nalezeny až u 80 % všech buněk.



Obr. 5.8. Vnitřní architektura buněk BY-2 v exponenciální fázi subkultivačního intervalu (3 dny staré)

A, C - Kontrolní neovlivněné buňky. FDA barví cytoplazmatické provazce a jádro s perinukleární cytoplazmou.

B, D - Buňky vystavené působení $50\mu\text{M}$ kadmia. Četné granule po celé buňce a poblíž cytoplazmatických provazců (šipky).

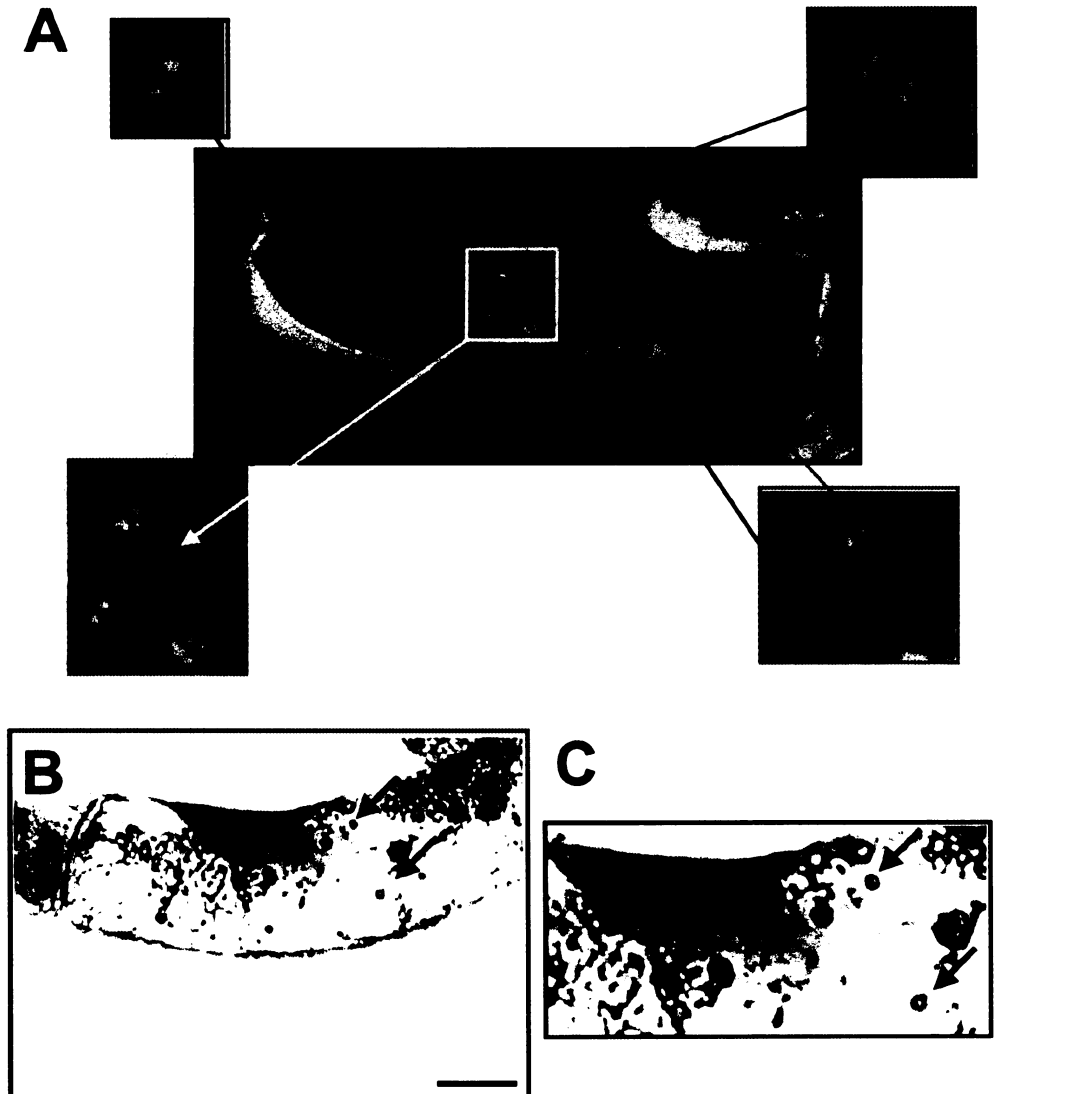
A, C - Nomarského diferencíální kontrast (DIC).

B, D - Viabilní barvivo FDA.

Měřítka 50 μm

Při použití polarizačního filtru byl u malé části granul pozorován tzv. maltézský kříž typický pro škrobová zrna (obr. 5.9 A). Přítomnost škrobu v těchto granulích se podařilo prokázat i po barvení Lugolovým roztokem (modře zbarvené granule označené šipkou v obrázku obr. 5.9 B, C). Většina granulí však byla obarvena žlutohnědě (obr. 5.9 B, C).

Zvýšené množství škrobu bylo prokázáno i kvantitativně pomocí HPLC - u ovlivněných buněk byl třetí den kultivace zjištěn až čtyřnásobný nárůst obsahu škrobu oproti kontrolním buňkám (obr. 5.9 D).



Obr. 5.9. Analýza škrobu u buněk tabákové linie BY-2 po aplikaci 50mM kadmia

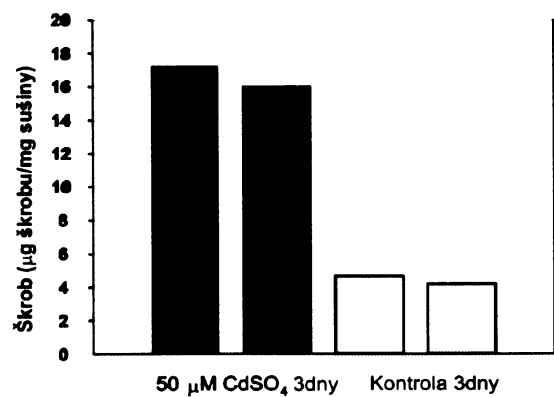
A - Četné granule po celém obsahu buňky, které vykazují pod polarizačním světlem typický lom světla ve tvaru kříže. Barevné čtverce ukazují zvětšení jednotlivých „maltézských křížů“.

B, C - Buňky vystavené působení 50μM kadmia. Četné granule po celé buňce po obarvení Lugolovým roztokem žlutohnědě. Modře obarvené granule (šipky).

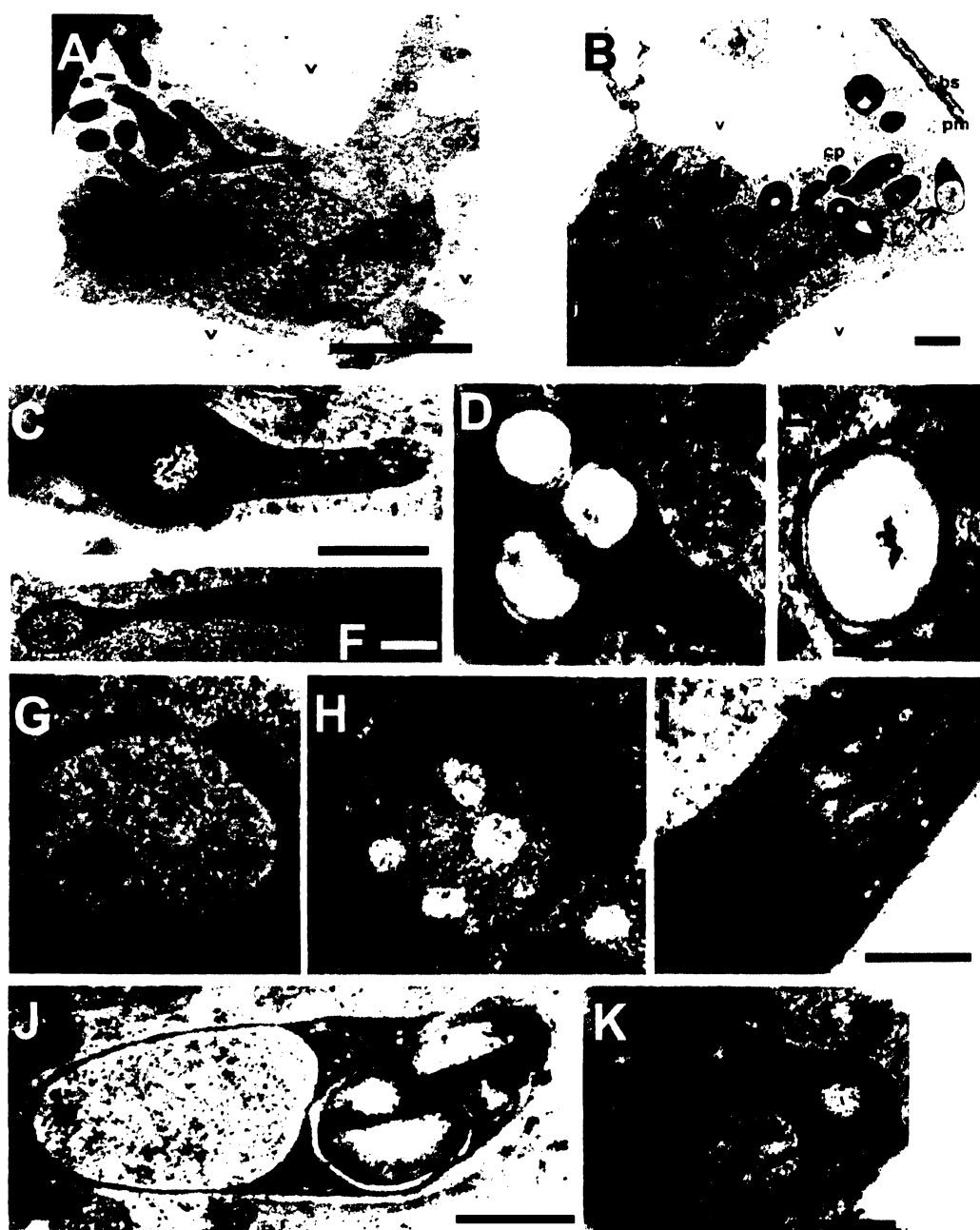
C - Detail obrázku B.

D - Kvantitativní analýza škrobu pomocí HPLC.

Měřítka - 25 μm



Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) se ukázalo, že četné granule přítomné zejména v perinukleární oblasti buňky jsou pravděpodobně různé typy plastidů (obr. 10). Jednalo se zejména o amyloplasty s jedním i více škrobovými zrny (obr. 5.10 A-E) a tzv. číškovité plastidy s vchlípenou cytoplazmou uvnitř stromatu (obr. 5.10 A, B, F, G, H, I). V této cytoplasmě byly často pozorovány drobné vakuoly nebo zbytky endoplazmatického retikula (obr. 5.10 H, I). V některých případech obsahovaly číškovité plastidy i škrobová zrna (obr. 5.10 J, K). U kontrolních neovlivněných buněk byly rovněž nalezeny různé tvary plastidů, často se zbytky tylakoidních membrán, včetně velkého množství číškovitých plastidů (obr. 5.10 A).



Obr. 5.10. Různé typy plastidů v buňkách BY-2 vyskytující se v oblasti kolem jádra

A - Plastidy kontrolních buněk BY-2, číškovité plastidy (šipky)

Měřítko = 5 μm

B - Amyloplasty se škrobovými zrny a číškovité plastidy (šipky) buněk vystavených působení kadmia po 3 dny.

Měřítko = 2 μm

C, D - Amyloplasty buněk po aplikaci kadmia s 1-vice škrobovými zrny.

E - Škrobové zrno obalené dvouvrstevnou membránou.

Měřítko = 1 μm

F - I - Číškovité plastidy buněk po aplikaci kadmia s cytoplazmou uvnitř.

Měřítko = 1 μm

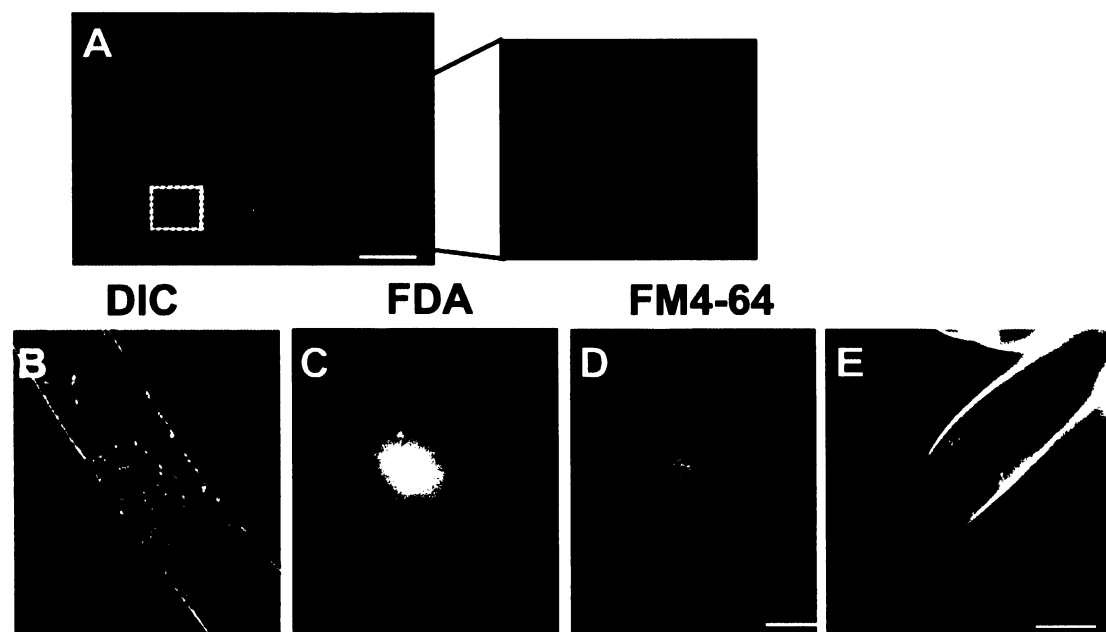
J, K - Kombinace amyloplastů a číškovitých plastidů.

Měřítko = 1 μm

bs - buněčná stěna, c - cytoplazma, cp - cytoplazmatické provazce, j - jádro, p - plastidy, v - vakuola

5.1.2.2.3. Stav vakuom / cytoplazmatické sítě

V části populace buněk ovlivněných 50μM kadmiem (70-80 % všech buněk) bylo po obarvení buněk FDA od třetího dne kultivace pozorováno velké množství malých váčků, které se vyskytovaly zejména v cytoplazmatických provazcích (obr. 5.11 A). Vystala otázka, zda tyto váčky mohou být drobnými vakuolami? Proto bylo použito fluorescenční barvivo FM4-64, které se specificky váže na buněčné membrány (obr. 5.11 B, C, D). Téměř ihned po aplikaci docházelo ke koncentrování barviva v plazmatické membráně (obr. 5.11 E) a byl také pozorován signál membrán ER a GA (obr 5.11 E, šipka).



Obr. 5.11. Vizualizace vakuol u buněk BY-2

A - Mnoho drobných vakuol v perimikleární oblasti buňky BY-2 po třídenním působení 50μM kadmia, vizualizovaných pomocí viabilního barviva FDA.

B - D - Porovnání vizualizace vakuol pomocí Nomarského diferenciálního kontrastu, FDA a specifického vakuolárního barviva FM4-64 u kontrolních buněk BY-2 (3 dny staré).

E - Obarvení plazmatické membrány a endomembránového systému (šipka) pomocí barviva FM4-64.

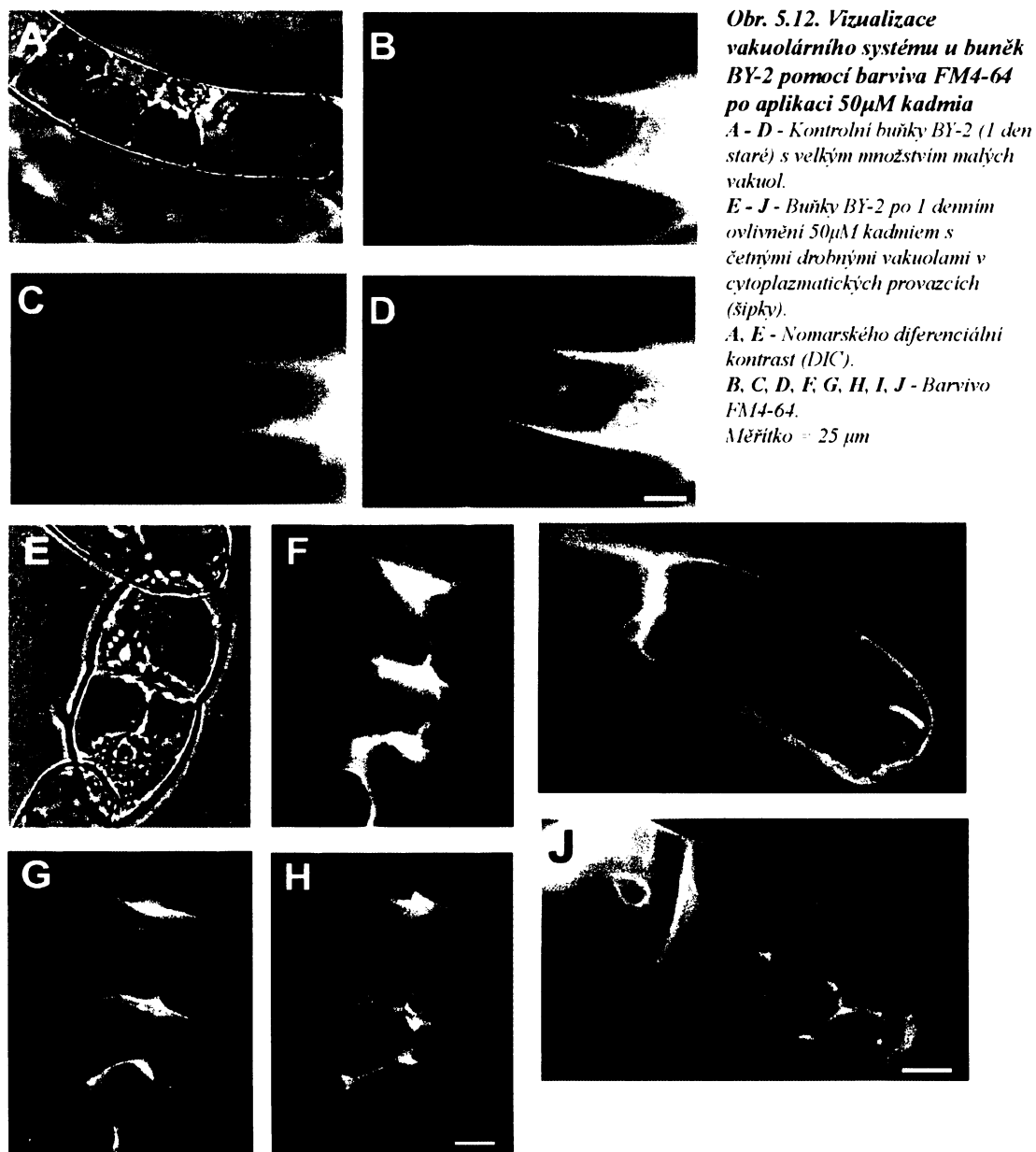
A, C - Viabilní barvivo FDA.

B - Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

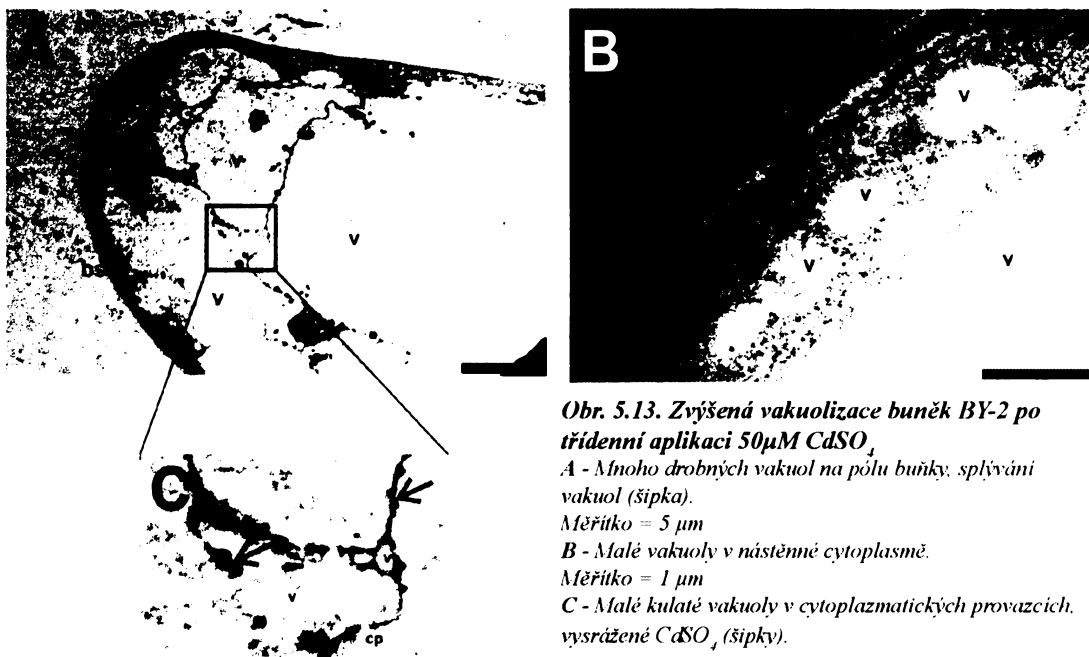
D, E - Barvivo FM4-64.

Měřítko = 25 μm

Po 24 hodinovém působení, kdy se pomocí FM4-64 vizualizují zejména vakuolární membrány, byly u kontrolních buněk pozorovány pouze velké vakuoly, zatímco u buněk ovlivněných kadmiiem byly navíc obarveny i zmiňované malé váčky, které tedy zřejmě mají charakter vakuol (obr. 5.12 A – F). Některé z nich se vyskytovaly v cytoplazmatických provazcích (obr. 5.12 F, J, šipka).



Stejně tak jako pod fluorescenčním mikroskopem, také za pomoci transmisní elektronové mikroskopie byla pozorována zvýšená vakuolizace ovlivněných buněk. Drobné vakuoly se vyskytovaly zejména na buněčných pólech (obr. 5.13 A) v oblasti nástěnné cytoplazmy (obr. 5.13 B), ale také v cytoplazmatických provazcích (obr. 5.13 C).



Obr. 5.13. Zvýšená vakuolizace buněk BY-2 po třídení aplikaci $50\mu\text{M CdSO}_4$

A - Mnoho drobných vakuol na pólu buňky, splývání vakuol (šipka).

Měřítko = $5\mu\text{m}$

B - Malé vakuoly v nástěnné cytoplasmě.

Měřítko = $1\mu\text{m}$

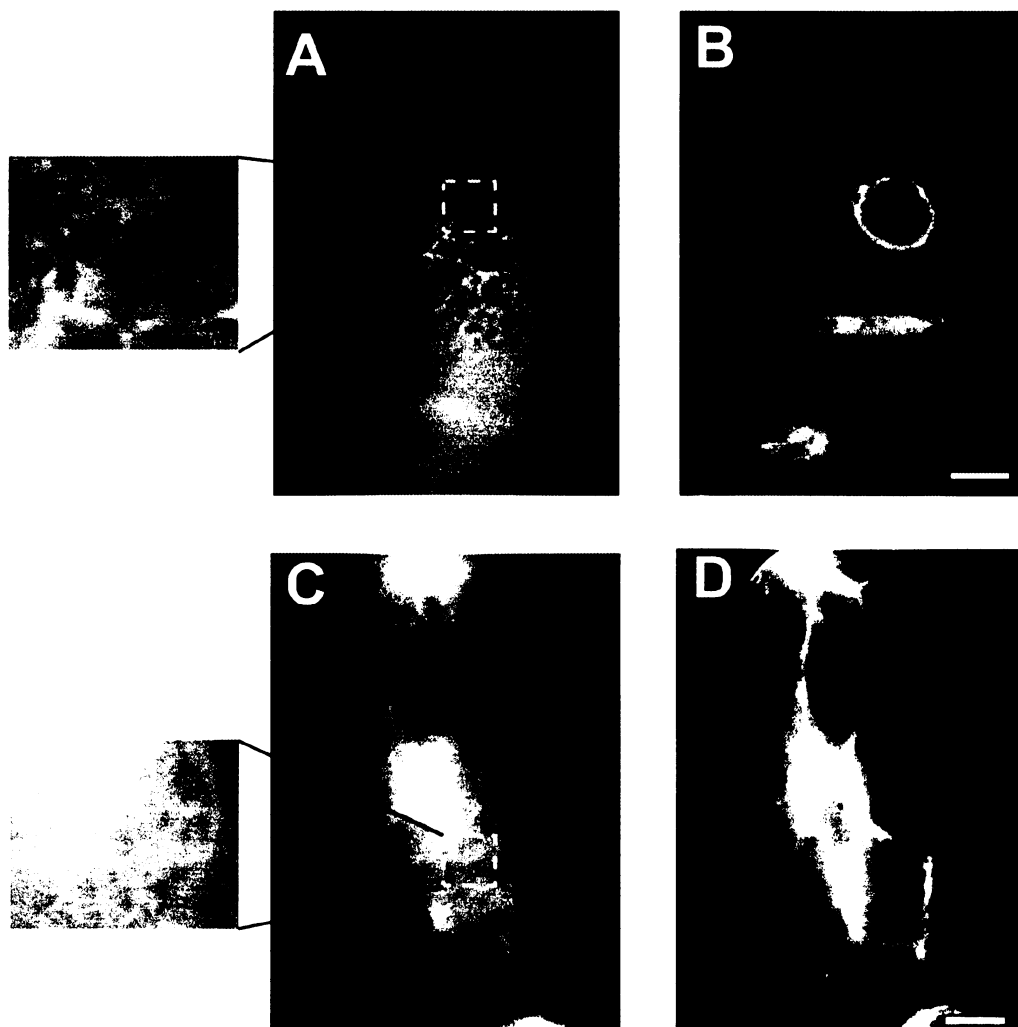
C - Malé kulaté vakuoly v cytoplazmatických provazcích, vysrážené CdSO_4 (šipky).

bs - buněčná stěna, c - cytoplazma, cp - cytoplazmatické provazce, er - endoplazmatické retikulum, pm - plazmatická membrána, v - vakuola

5.1.2.2.4. Endoplazmatické retikulum

Pro studium reakce endoplazmatického retikula na aplikaci kadmnatých iontů *in vivo* byla použita transgenní linie BY-2/HDEL s vneseným genovým konstruktem m-GFP5-ER, který kóduje fúzní protein mGFP5-ER lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu.

U neovlivněných buněk BY-2/HDEL byla pozorována jemná tubulární síť endoplazmatického retikula v kortikální oblasti cytoplazmy (obr. 5.14 A), v oblasti kolem jádra a v cytoplazmatických provazcích (obr. 5.14 B). Také byl pozorován velmi intenzivní pohyb membránových útvarů (příloha – video). Na rozdíl od kontrolních buněk byla tubulární síť v kortikální oblasti po jednodenním působení $50\mu\text{M CdSO}_4$ víceméně zachována (obr. 5.14 C), navíc byl pozorován výrazný signál v cytoplazmatických provazcích (obr. 5.14 D). Zvláštní tělíčka endoplazmatického retikula se v ovlivněných buňkách objevovala již kolem třetího dne působení kadmia (obr. 5.15 A, C). Tato tělíčka skoro vždy korelovala s přítomností těch, která byla pozorována pod Nomarského diferenciálním kontrastem (obr. 5.15 B, D). Navíc nikdy nebyla pozorována u kontrolních buněk. Jejich motilita byla sledována pomocí časosběrné mikroskopie. Ta ukázala, že tyto granule jsou víceméně statické (příloha - video).



Obr. 5.14. Stav endoplazmatického retikula u buněk BY-2/HDEL po aplikaci 50 μ M kadmiu

A - B - Kontrolní neovlivněné buňky (1 den staré).

A - Endoplazmatické retikulum v oblasti okolo jádra a v cytoplazmatických provazcích.

B - Tubulární síť endoplazmatického retikula v kortikální oblasti cytoplazmy.

C - D - Buňky ovlivňované 50 μ M kadmiem po dobu 24 hod.

C - Endoplazmatické retikulum v oblasti okolo jádra a hlavně v cytoplazmatických provazcích.

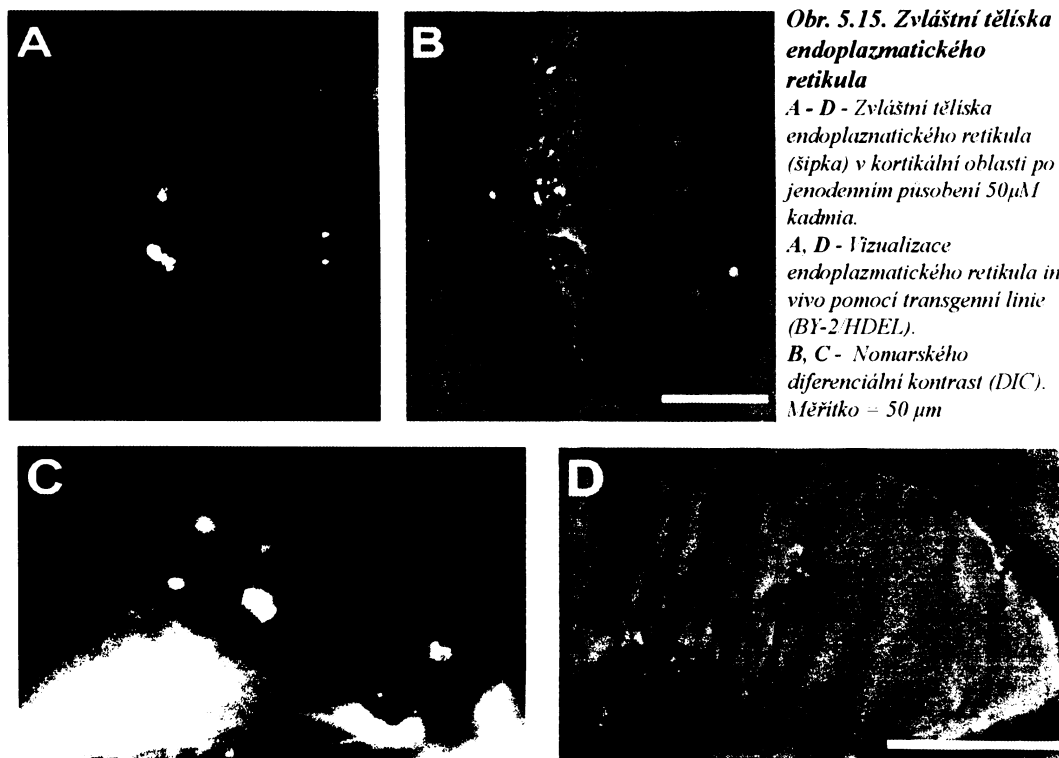
D - Tubulární síť endoplazmatického retikula v kortikální oblasti cytoplazmy.

Měřítko – 25 μ m

5.1.2.2.5. Ultrastruktura ovlivněných buněk

U kontrolních neovlivněných buněk BY-2 byl pomocí TEM pozorován standardní stav mitochondrií, membrán endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, odpovídající aktuálnímu stáří subkultury / pozice v SBI (obr. 5.16). U buněk BY-2 ovlivňovaných 50 μ M CdSO₄ po 3 dny nebylo pomocí této mikroskopie pozorováno intaktní endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. Navíc docházelo k invaginacím plazmatické membrány a k jejímu odchlípnutí od buněčné stěny. Tím mohly vznikat jednoduché kulaté měchýřky (obr. 5.17, šipka). U všech ovlivněných buněk byla pozorována tzv. membránová klubka.

Jde o kulovité útvary s četnými membránami uvnitř často posetými ribozómy (obr. 5.18). Tato klubka byla nalezena zejména ve vakuolách (obr. 5.18 A).



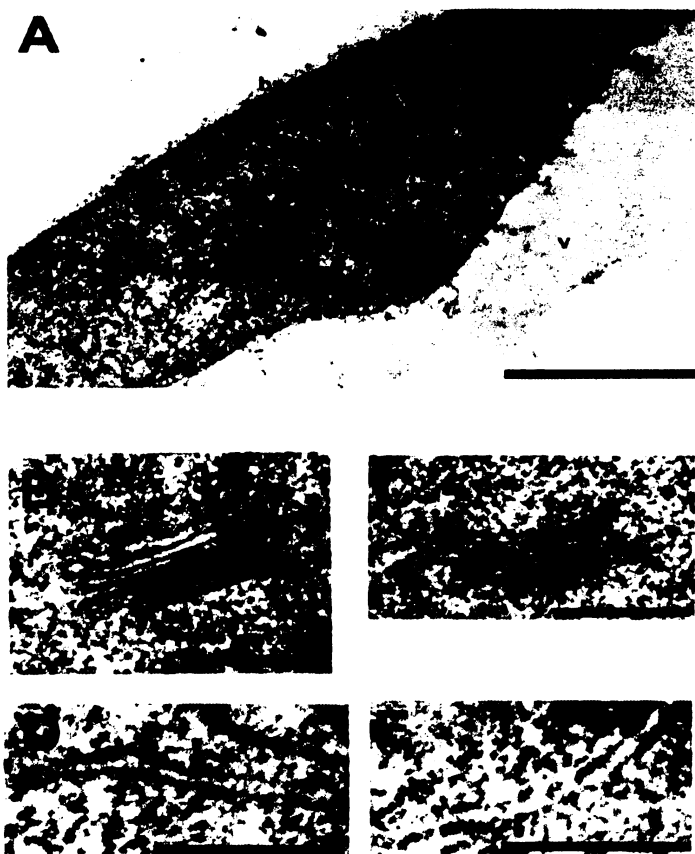
Obr. 5.15. Zvláštní tělíska endoplazmatického retikula

A - D - Zvláštní tělíska endoplazmatického retikula (šipka) v kortikální oblasti po jenodenním působení 50 μ M kadnia.

A, D - Vizualizace endoplazmatického retikula in vivo pomocí transgenní linie (BY-2/HDEL).

B, C - Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

Měřítka = 50 μ m



Obr. 5.16. Nezměněné mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex

A - Mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex v nástěnné cytoplazmě kontrolních buněk BY-2.

Měřítka = 2 μ m

B - Golgiho komplex kontrolních buněk (3 dny).

Měřítka = 500 μ m

C - Golgiho komplex.

Měřítka = 500 μ m

D - Endoplazmatické retikulum kontrolních buněk (3 dny).

Měřítka = 500 μ m

E - Endoplazmatické retikulum.

Měřítka = 500 μ m

bs - buněčná stěna

c - cytoplasma

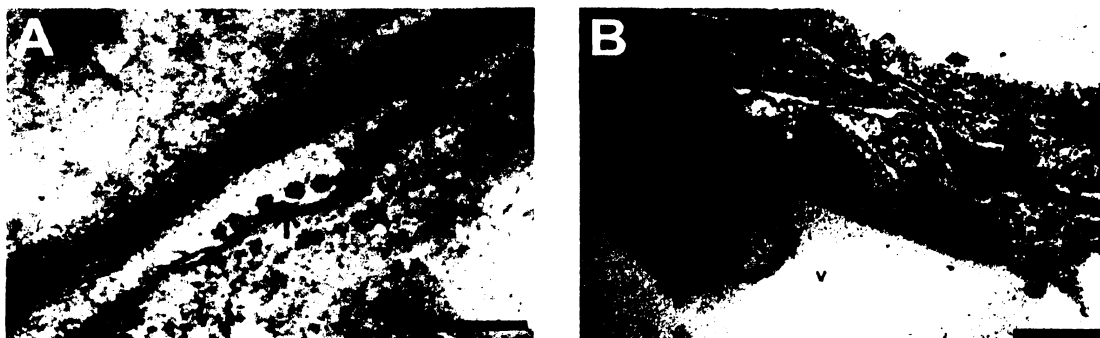
er - endoplazmatické retikulum

gk - Golgiho komplex

m - mitochondrie

pm - plazmatická membrána

v - vakuola



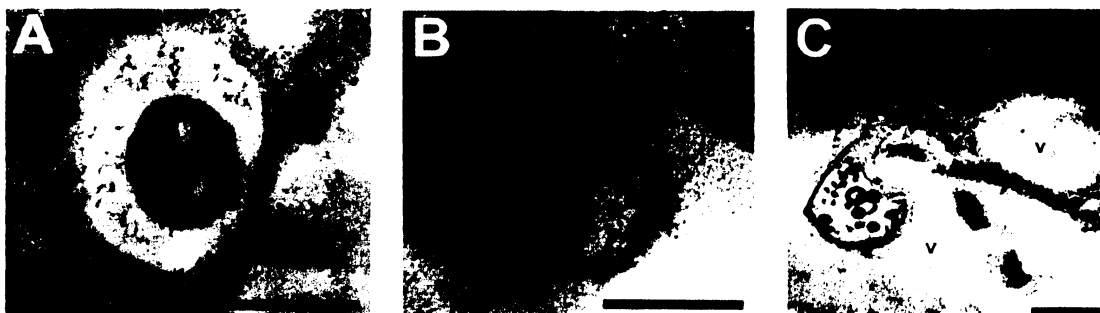
Obr. 5.17. Odchlipování plazmatické membrány od buněčné stěny a vznik měchýřku

A - Vznik jednoduchých měchýřků (šipka) v místě odchlipování plazmatické membrány od buněčné stěny u buněk vystavených působení kadmia po 3 dny.

B - Vznik jednoduchých měchýřku (šipka) v místě odchlipování plazmatické membrány od buněčné stěny u buněk vystavených působení kadmia po 3 dny, v nástěnné cytoplazmě zachované mitochondrie.

Měřítko - 500 nm

bs - buněčná stěna, c - cytoplazma, m - mitochondrie, mk - membránová klubka, pm - plazmatická membrána, v - vakuola



Obr. 5.18. Vznik membránových klubek u buněk BY-2, 3 dny po aplikaci kadmia

A - Membránové klubko ve vakuole.

Měřítko = 1 μ m

B - Membránové klubko ve vakuole.

Měřítko - 500 nm

C - Membránové klubko volně v cytoplazmě.

Měřítko - 500 nm

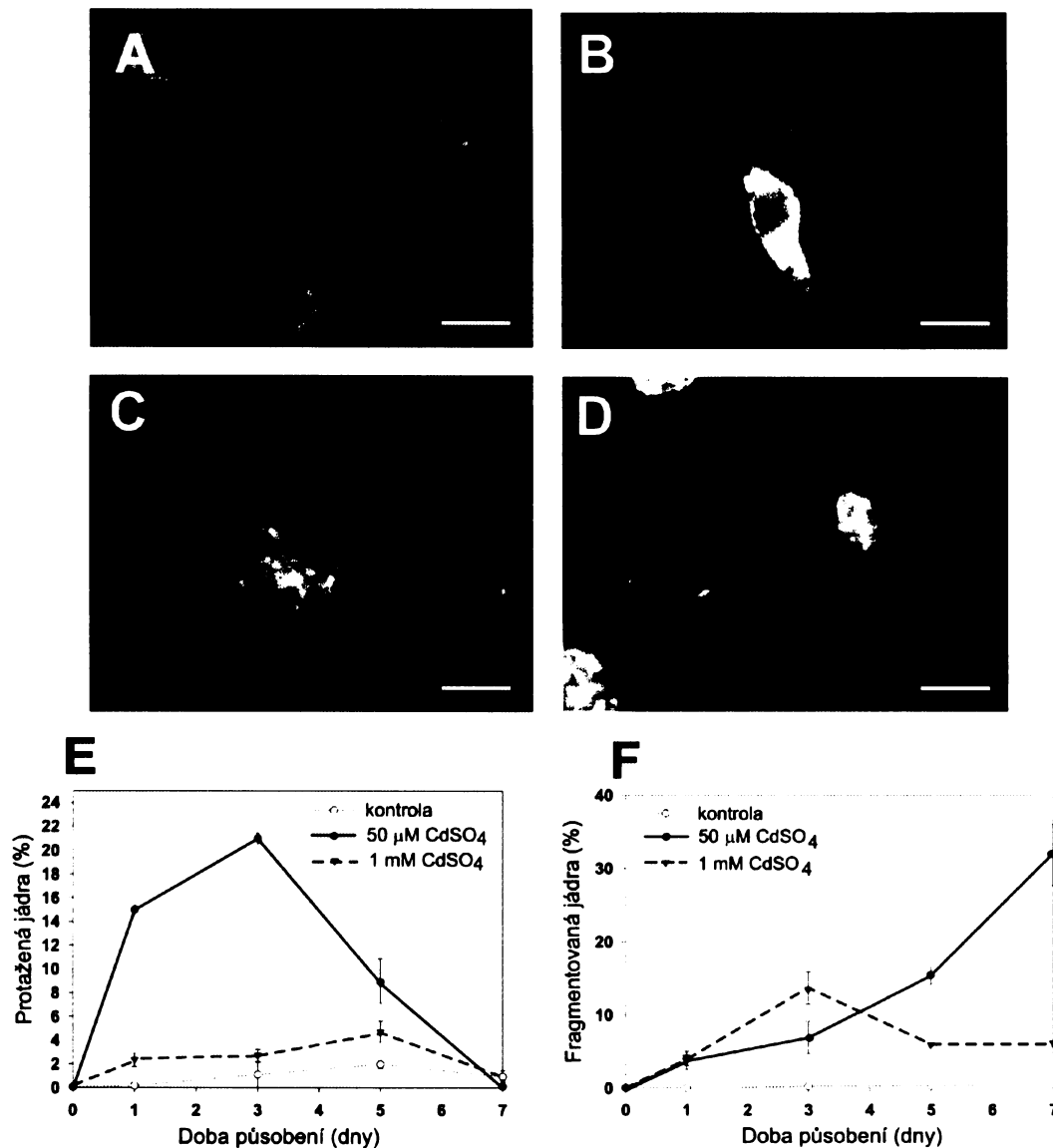
bs - buněčná stěna, c - cytoplazma, m - mitochondrie, pm - plazmatická membrána, v - vakuola

5.1.2.2.6. Morfologie jader

Velká kulatá jádra, která jsou typická pro kontrolní neovlivněné buňky (obr. 5.19 A), měla po působení 50 μ M kadmia tendenci se protahovat. Po 3 dnech působení bylo až 30 % všech jader extrémně protažených (obr. 5.19 B, E). Navíc v těchto jádrech byla pozorována „granulózní“ struktura chromatinu (obr. 5.19 B). Po delším časovém působení byla pozorována fragmentace jader do „mikrojader“, která se zvyšovala s dobou kultivace (na cca 30 % sedmý den kultivace, obr. 5.19 C, F). Velmi rychlé a drastické malformace jader byly navozeny po aplikaci 1mM kadmia. Tato koncentrace vyvolala tvorbu abnormálních filamentárních jader (obr. 5.19 D), která byla nalezena již po 1 hod kultivace až u 70 % všech

buněk (živých i mrtvých).

Třetí den kultivace buněk v médiu s $50\mu\text{M CdSO}_4$ byla také nalezena pomocí TEM různě tvarově pozměněná jádra. Proti víceméně kulatým jádrům kontrolních buněk (obr. 5.20 A, červeně, B) byla u těchto buněk pozorována lalokovitá jádra s častými hlubokými invaginacemi (obr. 5.20 A, černě C). Téměř všechna tato lalokovitá jádra byla degradována uprostřed buňky se zbytky cytoplazmy a organel (obr. 5.20 C, E).



Obr. 5.19. Změny v morfologii jader BY-2 po ovlivnění $50\mu\text{M}$ kadmíem

A - Typický kulatý tvar jader kontrolních neovlivněných buněk (3 dny staré).

B - Extrémně protažená jádra buněk po jednodenní kultivaci v médiu obohacené o $50\mu\text{M}$ kadmium.

C - Fragmentace interfázních jader do mnoha „mikrojader“ po třídenní kultivaci v médiu obohaceném o $50\mu\text{M}$ kadmium.

D - Filamentózní jádra po šestihodinovém působení 1mM kadmia.

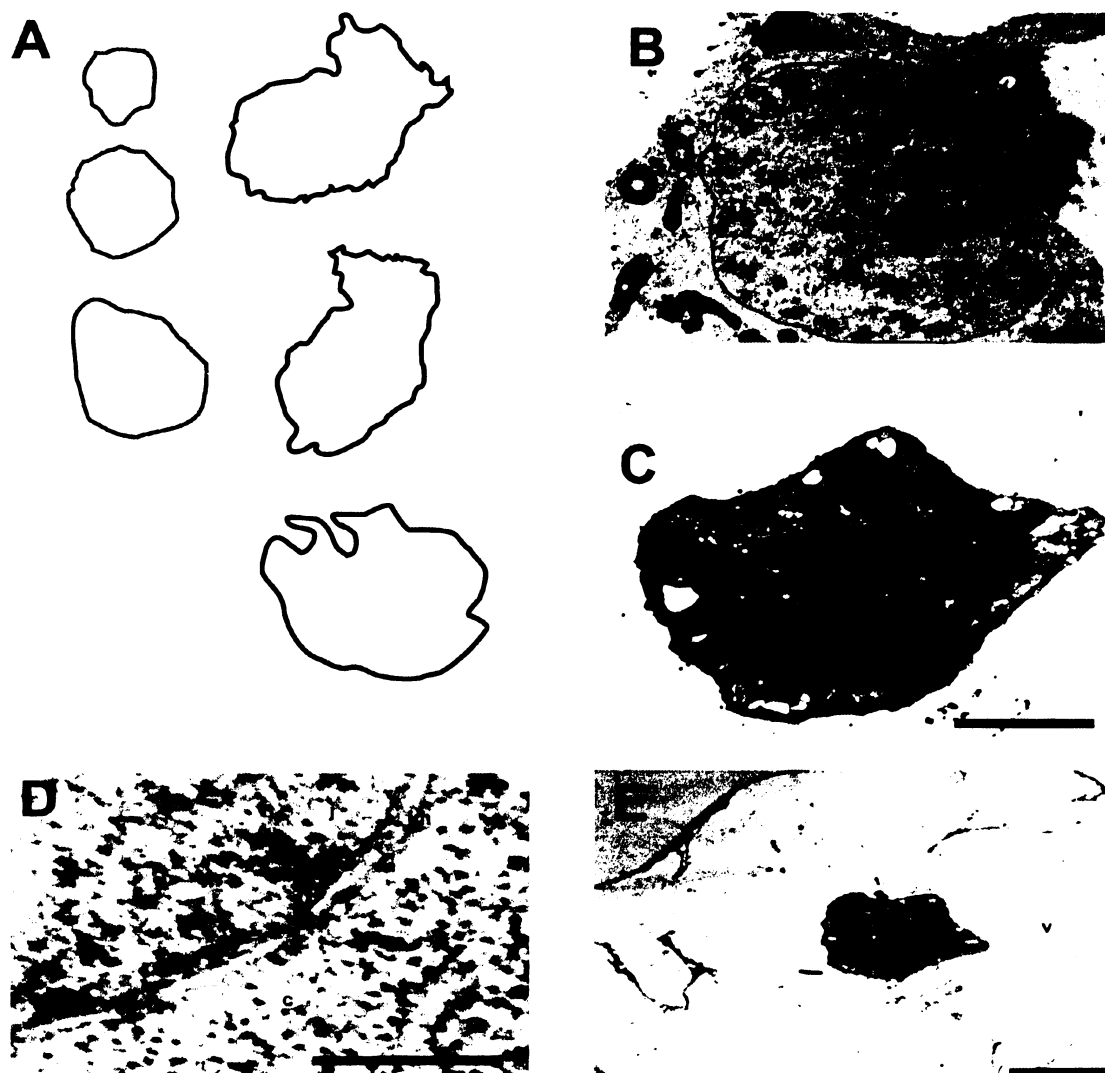
E - Graf množství elongovaných jader během sedmidenní kultivace v médiu obohaceném o $50\mu\text{M}$ kadmium.

Každý bod reprezentuje průměr ze tří nezávislých pokusů \pm SE.

F - Graf množství rozpadlých (fragmentovaných) jader během sedmidenní kultivace v médiu obohaceném o $50\mu\text{M}$ kadmium.

Každý bod reprezentuje průměr ze tří nezávislých pokusů \pm SE.

A - D - Jaderné barvení Hoechst 33258, měřítko = $25\mu\text{m}$



Obr. 5.20. Degradace jader buněk BY-2 po aplikaci kadmia

A - Různé tvary jader kontrolních neovlivněných buněk (červeně) a po třídenní aplikaci $CdSO_4$ (černě).

B - Kulatá jádra kontrolních, neovlivněných buněk, červeně obrys jaderné membrány.

Měřítko - 2 μm

C - Degradace jádra buněk BY-2 po třídenním působení kadmia, červeně obrys jaderné membrány.

Měřítko - 1 μm

D - Detail jaderné membrány s póry (šipka) kontrolních buněk BY-2.

Měřítko - 500 nm

E - Úplná degradace jádra a celého obsahu buňky uprostřed centrální vakuoly.

Měřítko - 10 μm

c - cytoplazma, j - jádro, jm - jaderná membrána, p - plastidy, š - škrobové zrno, v - vakuola

5.1.2.3. Fragmentace DNA

5.1.2.3.1. TUNEL reakce

V porovnání s kontrolními buňkami, u kterých bylo nalezeno pouze 1 % TUNEL-pozitivních jader po celou dobu sedmidenní kultivace (obr. 5.21 A - C, J), buňky ovlivněné 50 μM kadmíem vykazovaly až 10 % TUNEL-pozitivních jader již první den kultivace.

Toto procento se zvyšovalo s dobou působení až na cca 45 % sedmý den kultivace (obr. 5.21 D - F, J). 1mM koncentrace kadmia, která způsobila smrt buněk ihned, neindukovala specifickou fragmentaci DNA. Během celého kultivačního intervalu bylo nalezeno pouze 1–2 % TUNEL-pozitivních jader (obr. 5.21 G - I, J).

5.1.2.3.2. Elektroforetická detekce

Typický „apoptotický žebříček“ tvoření oligonukleosomálními fragmenty DNA nebyl detekován ani u kontrolních neovlivněných buněk (obr. 5.21 K), ani u buněk ovlivněných 1mM kadmii (data neuváděna, obr. 5.21 K). Naopak u buněk ovlivněných 50μM kadmii byla nalezena specifická degradace DNA na oligonukleozomální fragmenty pátý a sedmý den kultivace (obr. 5.21 K).

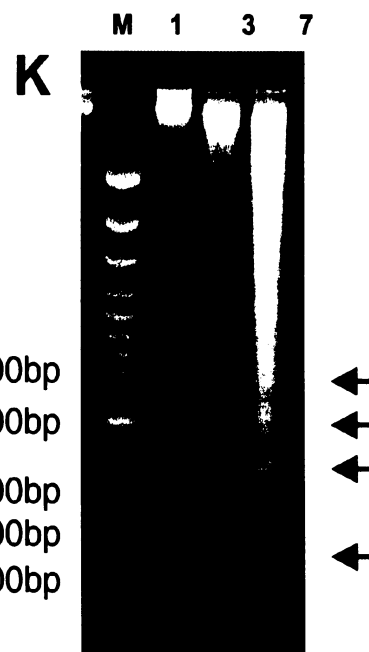
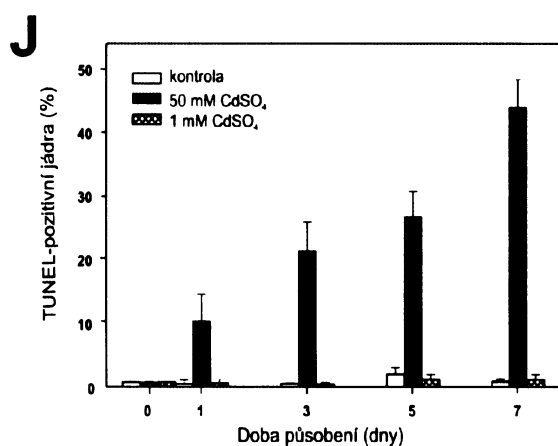
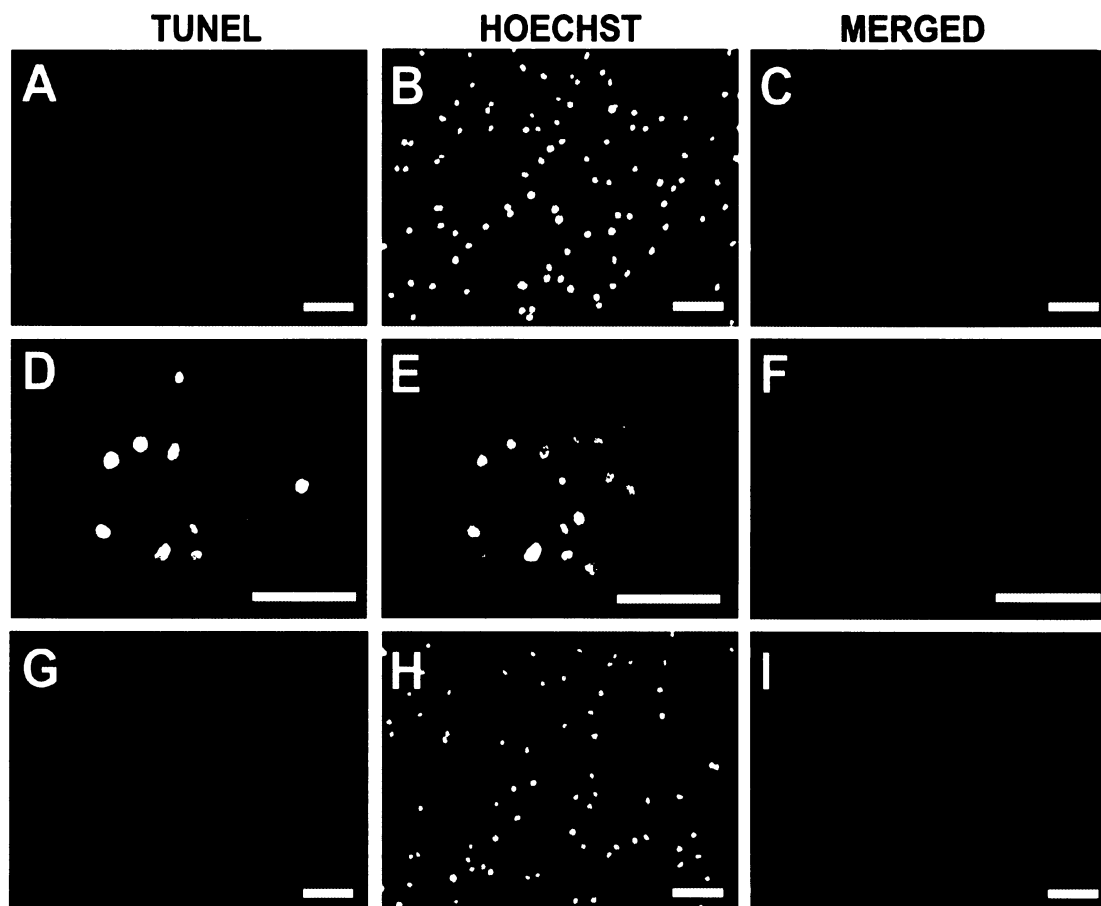
5.1.2.4. Cytoskelet

Vzhledem k úloze cytoskeletu (jak aktinového, tak mikrotubulárního) při změnách tvaru a struktury buněk byl jeho stav studován po ovlivnění buněk 50μM CdSO₄.

5.1.2.4.1. Aktinový cytoskelet

Aktinová filamenta byla zobrazena fluorescenčně pomocí značeného faloidinu (TRITC).

V interfázních kontrolních buňkách BY-2 v exponenciální fázi růstu je síť aktinových filament tvořena vlákny v cytoplazmatických provazcích a okolo jádra (obr. 5.22 B) a chaoticky uspořádanými jemnými a silnějšími vlákny v kortikální oblasti (obr. 5.22 A). Stav aktinového cytoskeletu se po ošetření lišil u protažených a neprotažených buněk. Po 24 hodinovém působení nebyly nalezeny změny v uspořádání aktinových filament u neprotažených buněk v žádném z obou sledovaných optických řezů (obr. 5.22 C, D). Podobně jako u kontrolních buněk zde byla nalezena síť jemných a silnějších vláken v kortikální oblasti buňky (obr. 5.22 C) a silná vlákna v oblasti kolem jádra a v cytoplazmatických provazcích spojujících perinukleární oblast s nástěnnou cytoplazmou (obr. 5.22 D). U extrémně protažených buněk se již od prvního dne síť aktinových filament změnila v obou sledovaných optických řezech. V kortikální oblasti cytoplazmy nebyla vůbec detekována, oproti tomu síť v perinukleární oblasti byla „zhuštěná“ a vytvářela tak jaderný košíček (obr. 5.22 G, H). V cytoplazmatických provazcích byla detekována silná aktinová vlákna (obr. 5.22 G, H). Toto uspořádání aktinových filament bylo pozorováno až do třetího dne kultivace buněk v 50μM kadmii. Po delší době kultivace, kdy většina buněk byla již mrtvá, byl detekován pouze difúzní signál aktinových filament (data neuváděna).



Obr. 5.21. Detekce fragmentace DNA po působení 50 μM kadmia

A - J - In situ detekce fragmentace DNA.

A - C - Neovlivněné kontrolní buňky (1 den staré).

D - F - Buňky vystavené působení 50 μM kadmia po dobu 24 hod.

G - I - Buňky vystavené působení 1 mM kadmia po dobu 24 hod.

A, D, G - TUNEL-pozitivní jádra.

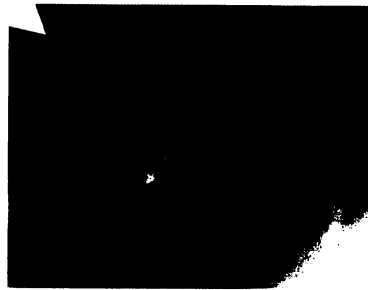
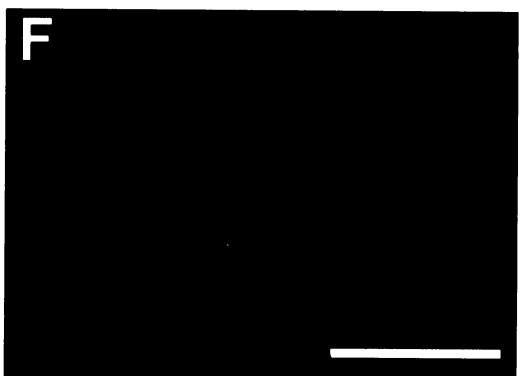
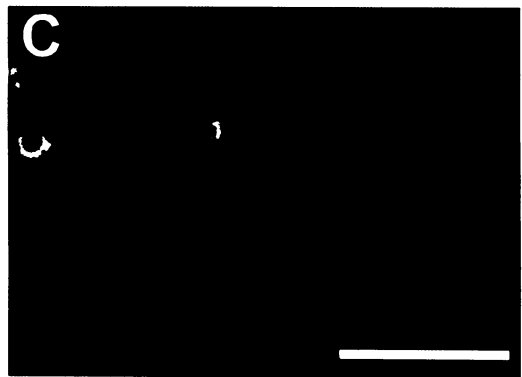
B, E, H - Hoechst 33258.

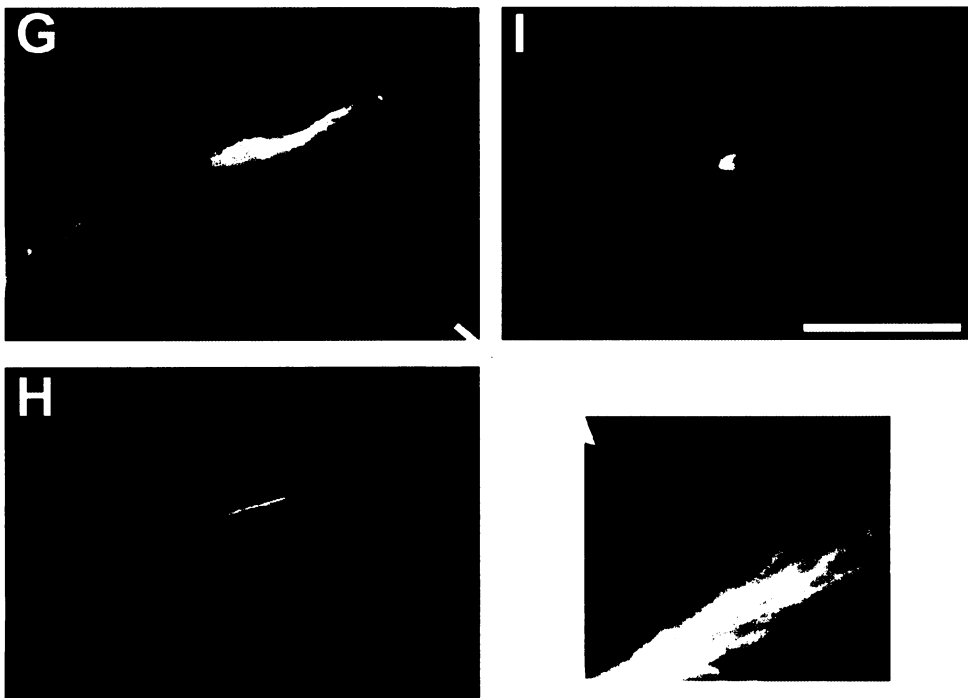
C, F, I - Složený obrázek.

J - Graf množství TUNEL-pozitivních jader během 7denní kultivace v médiu obohaceném o 50 μM kadmium.

Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů ± SE.

K - Fragmentace DNA. M - marker molekulárních vah, 1 - buňky ovlivněné 50 μM kadmium 1 den, 3 - buňky ovlivněné 50 μM kadmium 3 dny, 7 - buňky ovlivněné 50 μM kadmium 7 dní, specifická degradace DNA do oligomleozomálních fragmentů (šipky). Měřítka - 50 μm





Obr. 5.22. Stav aktinového cytoskeletu po aplikaci 50μM kadmia

A-C - Kontrolní buňky BY-2 v exponenciální fázi růstu (3 dny).

A - Síť jemných () a silnějších (→) vláken v kortikální oblasti buněk.

B - Silná vlákna v oblasti kolem jádra a v cytoplazmatických provazcích u buněk.

C - Kulatá jádra buněk.

D-F - Buňky vystavené působení 50μM kadmia po dobu 24 hod.

D - Síť jemných () a silnějších (→) vláken v kortikální oblasti buněk.

E - Silná vlákna v oblasti kolem jádra a v cytoplazmatických provazcích buněk.

F - Oválná jádra buněk.

G-I - Buňky vystavené působení 50μM kadmia po dobu 3 dnů.

G, H - Síť silných vláken vytvářejících košíček kolem prodloužených jader a hustá síť v cytoplazmatických provazcích (→).

I - Prodloužená jádra buněk.

A, B, D, E, G, H - TRITC-faloidin; C, F, I - jaderné barvivo Hoechst 33258; Měřítka = 50 μm

5.1.2.4.2. Mikrotubulární cytoskelet

K vizualizaci tubulinového cytoskeletu byla použita modifikovaná metoda nepřímé imunofluorescence.

Kortikální mikrotubuly jsou v interfázních buňkách BY-2 uspořádány transverzálně k ose růstu buněk (obr. 5.23 A). Mikrotubulární síť nebyla detekována ani v cytoplazmatických provazcích a ani v oblasti kolem jádra. Po jednodenní aplikaci 50μM kadmia nebyla kortikální síť mikrotubulů narušena a ani jejich orientace nebyla pozměněna (obr. 5.23 C). Stejně výsledky byly nalezeny i po třídenním působení, žádné změny v uspořádání kortikálních mikrotubulů nebyly nalezeny ani u buněk s fragmentovanými jádry (obr. 5.23 E, šipka). Po delší době kultivace byl podobně jako v případě aktinového cytoskeletu detekován pouze difúzní signál (data neuvěděna).

Nepřítomnost výraznějších změn v uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu byla potvrzena i použitím buněk transgenní linie BY-2/GT-16 s *in vivo* značenými mikrotubuly pomocí GFP (Kumagaki *et al.* 2001). Během 3 dnů jejich kultivace v médiu s přidavkem 50 μ M kadmia nebyly nalezeny žádné rozdíly v uspořádání kortikálních mikrotubulů v kontrolních neovlivněných buňkách (obr. 5.23 G, H).

Obr. 5.23. Stav mikrotubulárního cytoskeletu po inkubaci buněk BY-2 v médiu obohaceném o 50 μ M kadmium

A - B - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly u kontrolních neovlivněných buněk (1 den staré).

C - D - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly u buněk vystavených působení 50 μ M kadmia po 24 hod.

E - F - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly u buněk vystavených působení 50 μ M kadmia po 3 dny.

Fragmentovaná jádra (šipka).

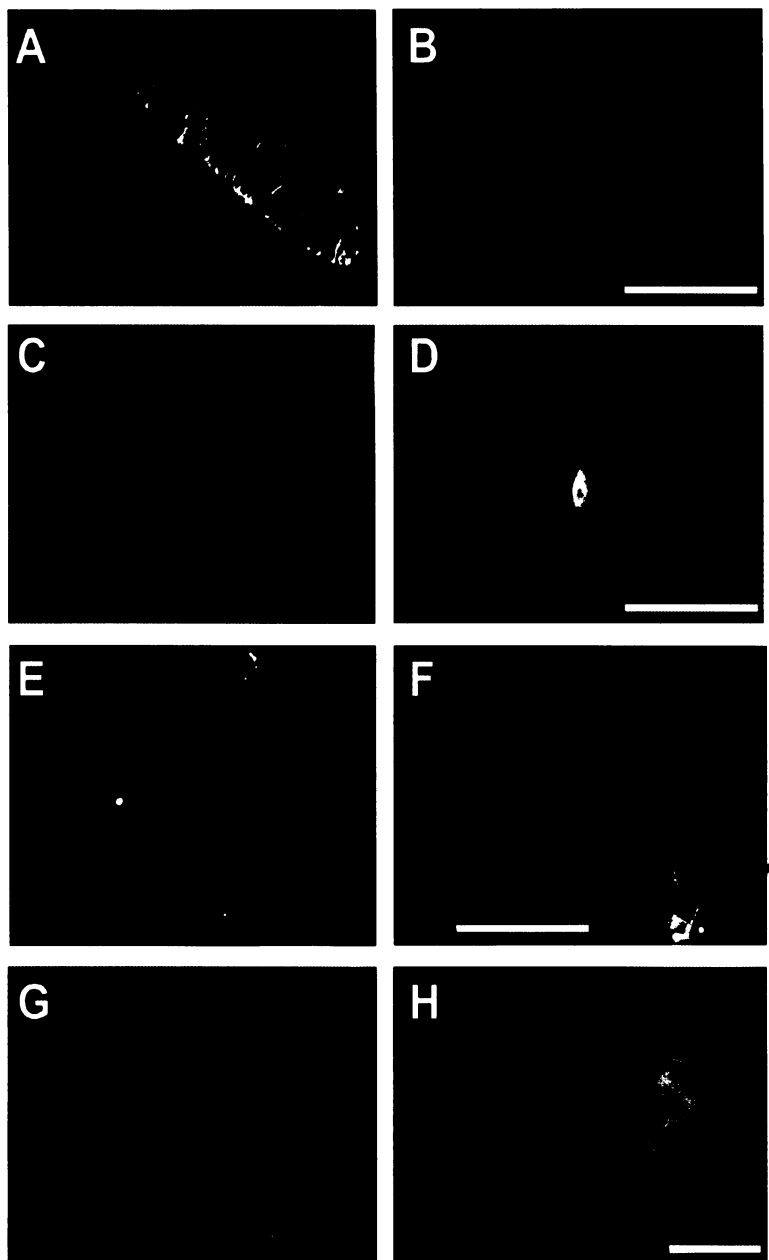
G - H - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly u transgenních buněk BY-2/GT-16 vystavených působení 50 μ M kadmia po 3 dny.

A, C, E - Imunofluorescenční značení mikrotubulů pomocí anti- α tubulinové protilátky.

B, D, F - Jaderné značení Hoechst 33258.

G - H - Transgenní linie BY-2/GT-16.

Měřítko = 50 μ m



5.2. Rychlá buněčná smrt

Při pokusech zaměřených na studium doby potřebné k indukci PCD při chladovém stresu a při ošetření kadmíem se ukázalo, že ke specifické fragmentaci DNA na oligonukleosomální jednotky dochází nejen při uvedených ošetřeních, ale i po rychlém zamražení a rozmražení neovlivněných buněk. Další část práce se tedy zaměřila na studium relevance internukleosomální fragmentace DNA coby indikátoru programované buněčné smrti.

5.2.1. Fragmentace DNA

5.2.1.1. Elektroforetická detekce

Specifická fragmentace DNA, která byla izolována z buněk ovlivňovaných 50 μ M CdSO₄, byla nalezena po pěti a sedmi dnech kultivace, tedy v době, kdy všechny buňky byly již mrtvé (obr. 5.6, obr. 5.21 K a obr. 5.24 B). Po izolaci DNA z kontrolních neovlivněných buněk nebyla fragmentace DNA nikdy nalezena (obr. 5.24 A). Aplikace 1 μ M CdSO₄ vyvolávala téměř okamžitou smrt buněk (obr. 5.6), v nichž však zůstala DNA během jejich následné sedmidenní kultivace bez známek výraznější degradace (obr. 5.21 K, obr. 5.24 C).

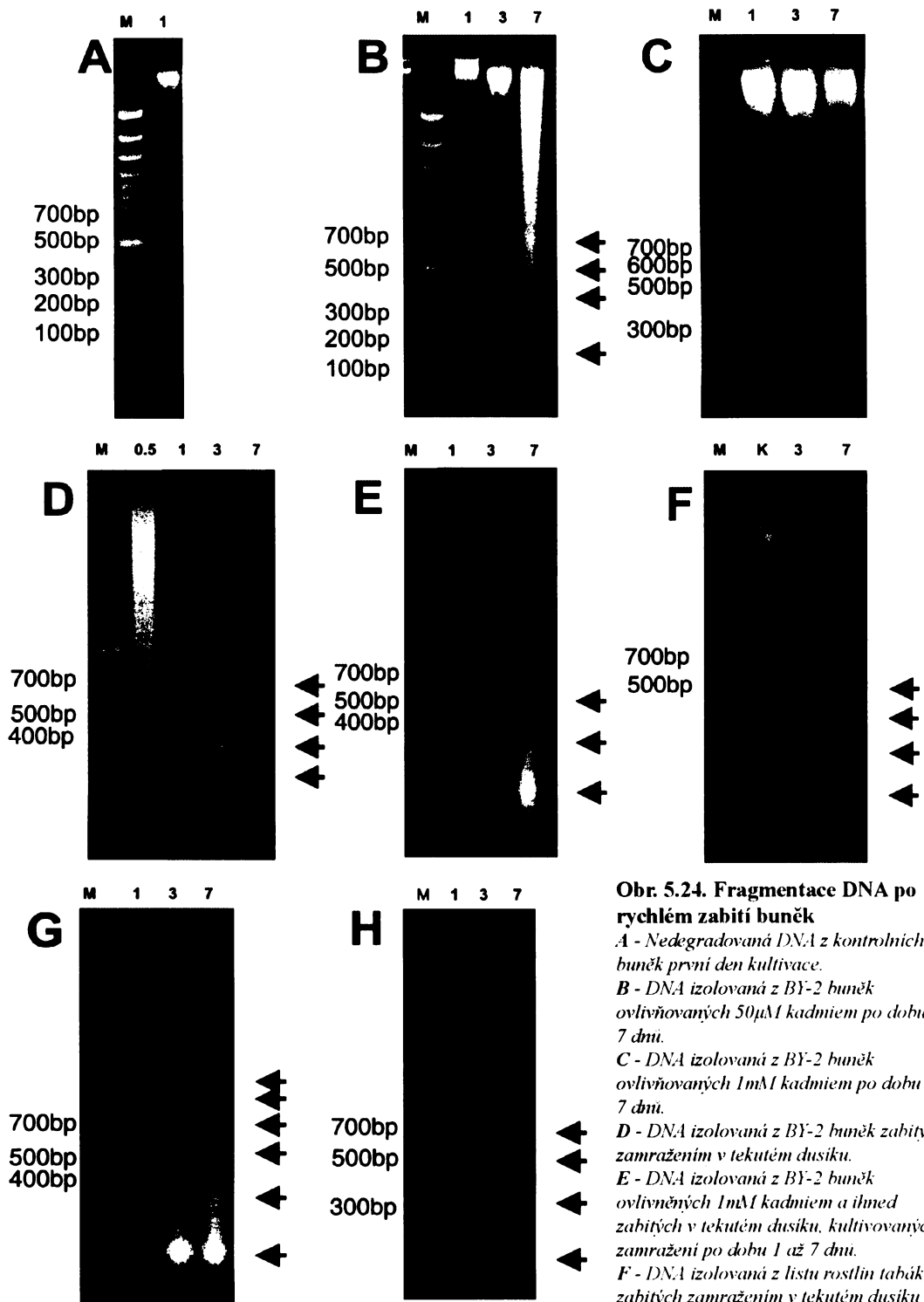
Pokud však byly buňky „rychle zabity“ zamražením v tekutém dusíku a po rozmražení tyto mrtvé buňky dále kultivovány v 26°C 1-7 dnů, byl DNA žebříček detekován již první den kultivace (obr. 5.24 D). DNA fragmentace byla zjištěna i u buněk, které byly zamrazeny v tekutém dusíku ihned po přidání 1mM kadmia (obr. 5.24 E). Jako kontrola k buněčným kulturám byly použity listy ze šestitýdenních rostlin tabáku. I u nich byla po zamražení v tekutém dusíku pozorována degradace DNA třetí a sedmý den po rozmražení (obr. 5.24 F).

Obdobných výsledků jako po zabíjení buněk linie BY-2 v tekutém dusíku bylo dosaženo také u buněk zabíjených mechanicky drcením v kulovém mlýnku, které byly dále kultivovány 7 dnů. DNA žebříček byl po tomto ošetření detekován již první den kultivace po rozdrcení buněk (obr. 5.24 G). Fragmentace DNA byla zjištěna také po izolaci DNA z buněk kultivovaných za přítomnosti detergentu (5% Tritonem X-100, obr. 5.24 H).

5.2.1.2. TUNEL reakce

TUNEL reakce byla použita jako paralelní metoda detekce fragmentace DNA k elektroforetické analýze. Při kultivaci buněk za přítomnosti 50 μ M CdSO₄ bylo pozorováno až 40 % TUNEL-pozitivních jader sedmý den kultivace (obr. 5.21 J a obr. 5.25 D). Buňky zabité rychle zamražením v tekutém dusíku měly až 60 % jader s fragmentovanou DNA sedmý den kultivace po rozmražení (obr. 5.25 A – D). Až 80 % všech TUNEL-pozitivních jader bylo malformovaných (obr. 5.25 A – C). Téměř žádná TUNEL-pozitivní jádra nebyla

detekována u neovlivněné kontroly (obr. 5.25 D) a buněk ovlivněných 1mM CdSO₄ (obr. 5.21 J a obr. 5.25 D).



Obr. 5.24. Fragmentace DNA po rychlém zabíjení buněk

A - Nedegradovaná DNA z kontrolních BY-2 buněk první den kultivace.

B - DNA izolovaná z BY-2 buněk ovlivňovaných 50μM kadmíem po dobu 1 až 7 dní.

C - DNA izolovaná z BY-2 buněk ovlivňovaných 1mM kadmíem po dobu 1 až 7 dní.

D - DNA izolovaná z BY-2 buněk zabíjících zamražením v tekutém dusíku.

E - DNA izolovaná z BY-2 buněk ovlivněných 1mM kadmíem a ihned zabíjících v tekutém dusíku, kultivovaných po zamražení po dobu 1 až 7 dní.

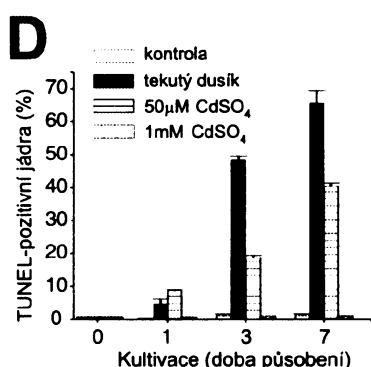
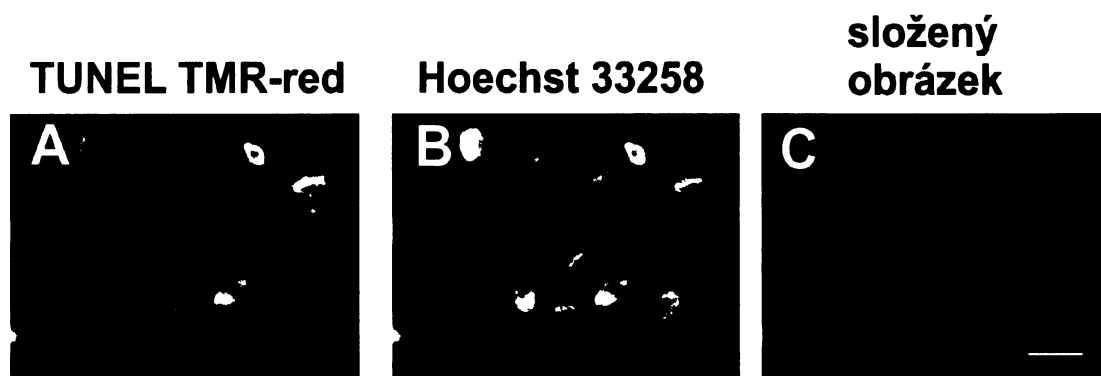
F - DNA izolovaná z listu rostlin tabáku, zabíjících zamražením v tekutém dusíku a kultivovaných po zamražení po dobu 1 až 7

dnů.

G - DNA izolovaná z BY-2 buněk zabíjících homogenizací v kulovém mlýnku a kultivovaných poté po dobu 1 až 7 dní.

H - DNA izolovaná z BY-2 buněk zabíjících pomocí 5% Tritonu X-100 a kultivovaných po dobu 1 až 7 dní.

M - marker molekulárních vah, K - kontrola, 0.5 - 12hodin kultivace, 1 - 1den kultivace, 2 - 3dny kultivace, 3 - 7dnu kultivace, šipky ukazují fragmentaci DNA do oligonukleozomálních fragmentů



Obr. 5.25. Detekce fragmentace DNA in situ (TUNEL reakce)

A - D - rychlé zabíjení buněk BY-2 zamražením v tekutém dusíku.

A - TUNEL-pozitivní jádra.

B - Hoechst 33258.

C - Složený obrázek.

D - Graf TUNEL-pozitivních jader u buněk zabíjených v tekutém dusíku.

Každá hodnota reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů ± SE.

Měřítka = 20 µm

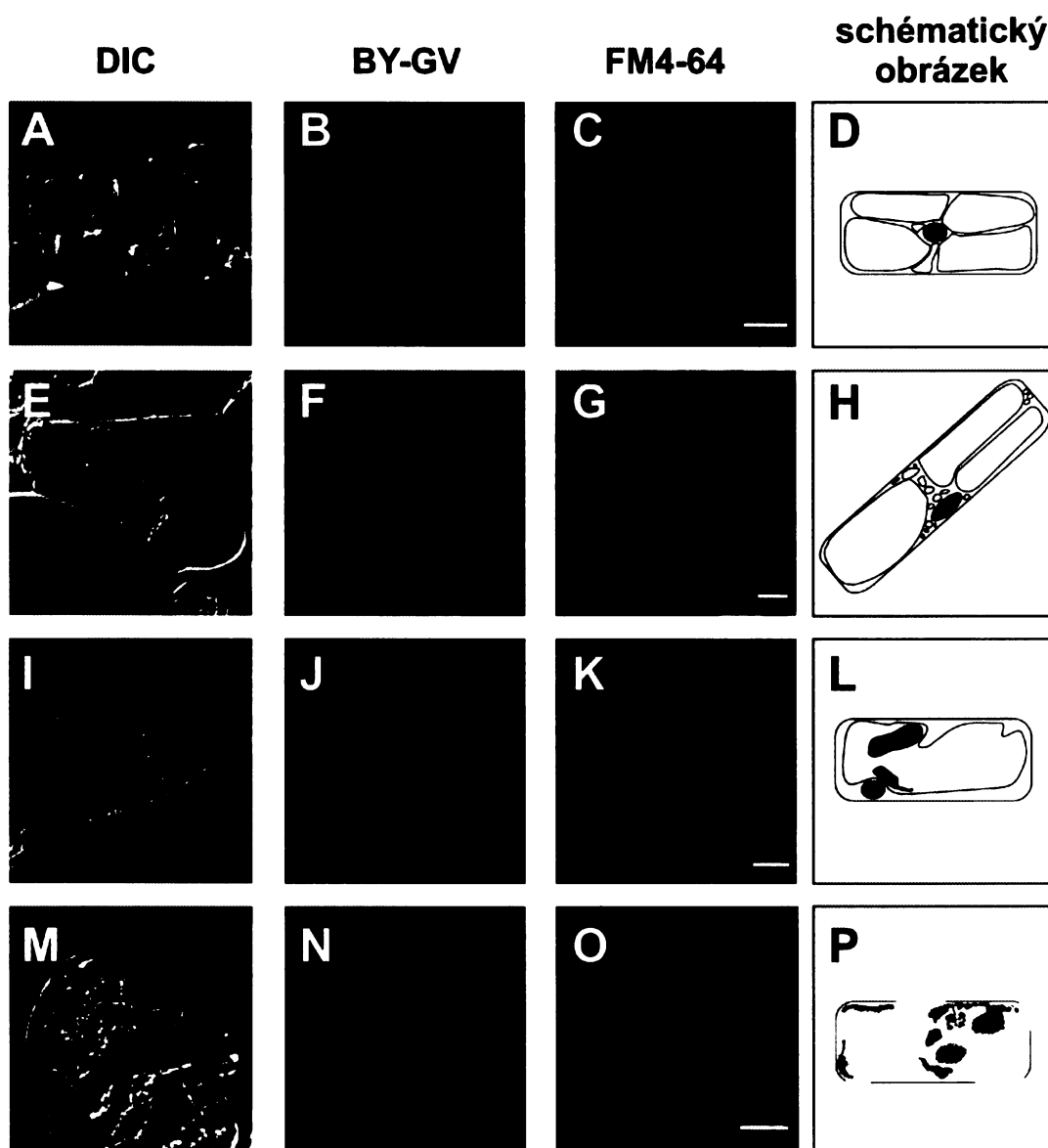
5.2.2. Morfologie umírajících / mrtvých buněk

Současně s analýzami fragmentace DNA byla provedena cytologická charakteristika různě ovlivněných kultur. Pozornost byla věnována zejména integritě membrán (zejména pak vakuolu). Buněčná struktura byla sledována po obarvení buněk membránovou sondou FM4-64 a pomocí Nomarského diferenciálního kontrastu (DIC). Specifita membránového barvení buněk BY-2 sondou FM4-64 byla ověřena pomocí transgenní linie BY/GV7 s GFP-AtVam3p fúzním proteinem lokalizovaným na tonoplastu (Kutsuna a Hasezawa 2002).

Výsledky této série pokusů s aplikací kadmennatých iontů odpovídaly dřívějším poznatkům, uvedeným v kap. 5.1.1.2.2. Menší téměř izodiametrické neovlivněné buňky BY-2 v exponenciální fázi se vyznačovaly jádrem uprostřed buňky a četnými cytoplazmatickými provazci procházejícími mezi několika menšími vakuolami (obr. 5.26 A – D). Po aplikaci 50µM CdSO₄ docházelo k protahování buněk (obr. 5.7 B, D, E; obr. 5.26 E – H), U elongovaných buněk byly nalezeny jednak velké vakuoly a jednak větší množství drobných kulatých vakuol zejména v oblasti cytoplazmatických provazců (obr. 5.12 E – F a J; obr. 5.26 E – H). Delší působení vyvolalo postupný pokles integrity buněk, rozpad endomembránového systému. Po aplikaci 1mM CdSO₄ byla vnitřní architektura buněk částečně zachována, tedy pokud se jednalo o vakuolární membrány, plazmatickou membránu a buněčnou stěnu, i když tyto buňky podléhaly plazmolýze (obr. 5.26 I – L).

Buňky zabité rychle např. zamražením v tekutém dusíku ztrácely integritu membrán

bezprostředně při jejich zabíjení, pozorováno bylo narušení tonoplastu a buněčné stěny a „zduření“ membrán (obr. 5.26 M – P). Při použití vakuolárního barviva FM4-64 byl pozorován pouze difúzní signál, stejně jako v případě GFP signálu transgenních BY/GV7 buněk (obr. 5.26 N, O). K rychlé desintegraci vnitřní architektury buněk došlo i při zabíjení buněk mechanicky homogenizací v kulovém mlýnku nebo po aplikaci 5% Tritonu X-100 (data neuvedena).



Obr. 5.26. Integrita buněk po rychlém zabíjení

A - C - Kontrolní neovlivněné buňky, jeden den kultivace.

D - E - Buňky ovlivňované 50 μM kadmiem po jeden den.

G - J - Buňky ovlivňované 1mM kadmiem po jeden den.

I - L - Buňky zabité zamražením v tekutém dusíku a kultivované po rozmražení 1 den.

A, E, I, M - Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

B, F, J, N - Transgenní linie BY-GV.

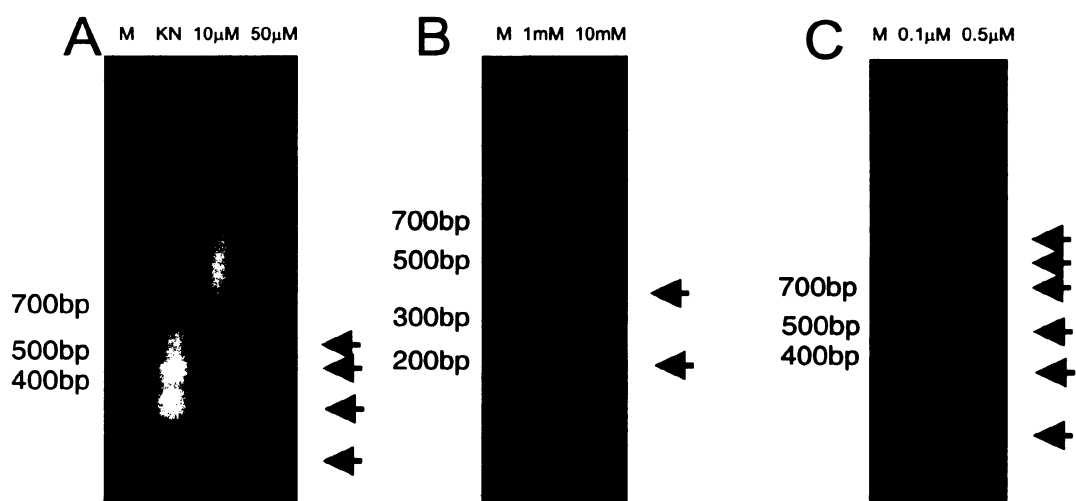
C, G, K, O - Vakuolární barvivo FM4-64.

D, H, L, P - Schématický obrázek integrity buněk, zejména vakuolárních membrán.

Měřítka - 10 μm

5.2.3. Inhibitory proteáz

Důležitou roli při aktivaci nukleáz zodpovědných za internukleozomální fragmentaci DNA při PCD hrají proteolytické enzymy. Pomocí specifických inhibitorů proteáz byla studována role různých proteáz při internukleozomální fragmentaci DNA jak u buněk rychle zabitých, tak u buněk podléhajících PCD. Širokospektrý inhibitor cysteinových proteáz E-64c silně potlačil fragmentaci DNA a jeho účinek byl koncentračně závislý (obr. 5.27 A). Naopak aprotinin, který inhibuje převážně serinové proteázy, a PMSF inhibující jak serinové proteázy, tak při použité vysoké koncentraci cysteinové proteázy (Reiner *et al.* 2004), blokovaly pouze minimálně fragmentaci DNA u buněk BY-2 zabitých v tekutém dusíku, v přítomnosti aprotininu (resp., obr. 5.27 B, C). Použitá rozpouštědla (metanol a DMSO) žádný vliv na fragmentaci DNA neměla (data neuvedena).



Obr. 5.27. Efekt inhibitorů proteáz na fragmentaci DNA

A - C - Buňky zabity zamražením v tekutém dusíku kultivované jeden den po rozmražení v přítomnosti:

A - inhibitoru cysteinových proteáz E-64c v koncentraci 10 a 50 μM.

B - inhibitoru serinových a částečně cysteinových proteáz PMSF v koncentraci 1 a 10 mM.

C - inhibitoru serinových proteáz aprotininu v koncentraci 0.1 a 0.5 μM.

M - marker molekulárních vah, KN - kontrola (buňky zamražené v tekutém dusíku). Šipky ukazují oligonukleozomální fragmentaci DNA.

5.3. Buněčný cyklus a programovaná buněčná smrt

Přestože linie BY-2 představuje extrémně homogenní rostlinnou buněčnou linii s velmi vyrovnaným fenotypem, nebyla reakce jednotlivých buněk kultury na ošetření kadmíem i působení chladového stresu z hlediska indukce programované buněčné smrti homogenní. Jelikož četné studie, prováděné zejména na živočišných modelech, ukazují souvislost indukce PCD s buněčným cyklem, jednou z příčin této nejednotné odezvy jednotlivých buněk kultury by mohla být aktuální fáze buněčného cyklu, v níž se ovlivněné buňky právě nacházely. K ověření platnosti této hypotézy a zároveň k obecnějšímu posouzení úlohy buněčného cyklu v indukci PCD u rostlinných buněk byla proto použita synchronizovaná buněčná kultura BY-2, kde 50 μ M CdSO₄ bylo přidáno v různých fázích buněčného cyklu.

5.3.1. Citlivost dílčích fází buněčného cyklu

5.3.1.1. Účinky synchronizačních látek

5.3.1.1.1. Průběh synchronizace

Standardní protokol pro synchronizaci buněk BY-2 je založen na kombinaci aphidicolinu (APC), inhibitoru DNA polymerázy α , a mikrotubulární drogy propyzamidu (Nagata *et al.* 1992). Vzhledem k relativní finanční náročnosti APC a hlavně jeho vlastnímu pozitivnímu efektu na indukci PCD (Matthew *et al.* 2007) byla použita alternativní replikativní látka, hydroxymočovina (HU), která je známým inhibitorem ribonukleotid reduktázy (obr. 5.28 A, Adams a Lindsay 1967).

Jejich synchronizační účinek na kultury se mírně lišil. Po aplikaci jak HU, tak APC bylo pozorováno nejvyšší množství buněk v mitóze 7 hod po jejich vymytí. Hodnota tohoto maxima byla cca 40 % při použití HU a cca 55 % při použití APC (obr. 5.28 B).

Hustota buněk počítaná před (v čase 2 hod po vymytí antireplikativa) a po rozdělení buněk (v čase 12 hod po vymytí antireplikativa) prokázala, že se během uvedeného intervalu musely prakticky všechny buňky rozdělit (obr. 5.34 A). Neovlivněné (nesynchronizované) buňky vykazovaly kolísání hodnoty mitotického indexu během celého sledovaného intervalu.

I když byl efekt HU i APC na synchronizaci téměř podobný, byla délka mitóz u jednotlivých buněk mnohem delší po použití APC (bližší diskuze, kap.6.4.1). Díky všem těmto poznatkům je možné předpokládat, že použití 4mM HU pro synchronizaci buněk BY-2 je mnohem méně invazivní než použití APC. A tudíž je vhodnější ji používat pro synchronizaci buněčných populací.

Během optimalizace synchronizačního protokolu byly také testovány různé koncentrace HU (1 - 4mM). 4mM HU zablokuje buněčný cyklus po 24h působení. 2mM koncentrace HU, tedy poloviční, než byla používána k synchronizaci buněk BY-2, přirozeně

synchronizovala buňky bez následného vymytí po 28hod působení. Poslední použitá koncentrace HU (1mM) neměla bez následného vymytí po 28hod působení žádný efekt na zastavení buněčného cyklu (data neuvedena).

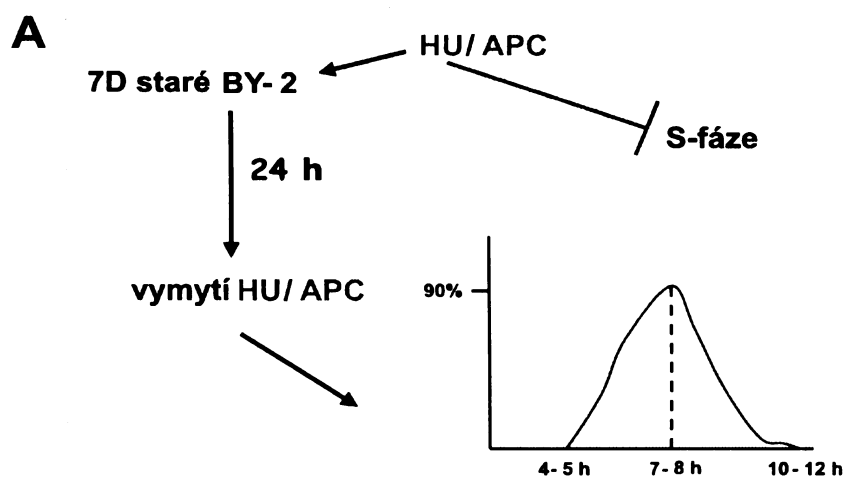
Aplikací antireplikativ nebyla negativně ovlivněna viabilita buněk (cca 95-98 %, obr. 5.29). Jako vedlejší účinek však vyvolávala antireplikativa protahování buněčných jader, které bylo pozorováno až u 50% buněk 4 až 5 hodin po vymytí zmíněných drog. Jelikož podobné protahování bylo dříve pozorováno i po aplikaci kadmia, byl tento fenomén a jeho možná souvislost s indukcí PCD studován detailněji a je mu věnována samostatná kapitola (kap. 5.1.2.2.1 a 5.4).

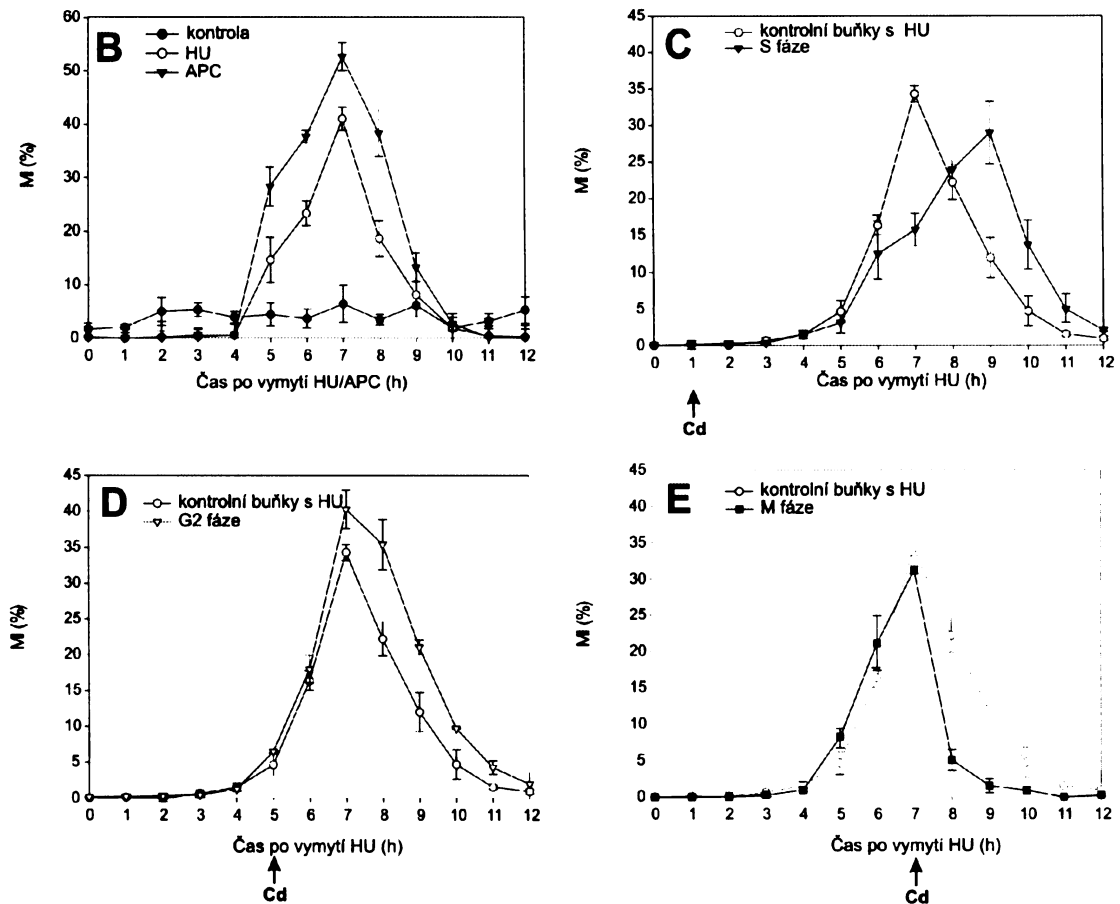
5.3.1.2. Účinek iontů kadmia na dynamiku buněčného cyklu

Dynamika buněčného cyklu byla studována po aplikaci 50 μ M CdSO₄ k buňkám hydroxymočovinou synchronizované kultury v jednotlivých fázích buněčného cyklu; tedy v čase 1, 5, 7 a 10.5 hodin po vymytí hydroxymočoviny, tedy v S, pozdní G₂, M a časně G₁ fázi buněčného cyklu, podle Świątek *et al.* 2002, obr. 5.28 C, D, E).

Po přidání kadmia v S fázi buněčného cyklu docházelo ve srovnání s kontrolními synchronizovanými buňkami ke zpoždění maximálního dosaženého mitotického indexu o 2 hod (obr. 5.28 C). Naopak buňky ovlivněné v G₂ fázi (obr. 5.28 D) nevykazovaly žádný posun maxima mitotického indexu, ale byl u nich zjištěn nejvyšší mitotický index (cca 40%). Což ukazuje na prodloužení doby trvání mitóz u jednotlivých buněk. Nejrychleji na aplikaci kadmia odpovídaly buňky v průběhu M fáze (obr. 5.28 E). Byl u nich detekován výrazný pokles mitotické aktivity téměř až na 0 % ihned po aplikaci induktoru PCD.

Možný dlouhodobý efekt kadmia byl studován až po 30hod působení po vymytí HU. Oproti kontrolním buňkám s HU, kde druhý vrchol mitotické aktivity dosahoval cca 10%, byl mitotický index všech buněk ovlivněných kadmíem téměř 0% (max. 2%, data neuvedena).





Obr. 5.28. Synchronizace buněčné linie BY-2

A - Schéma synchronizačního procesu 7 denních buněk BY-2 podle Nagata et al. 1992 využívající antireplikativní látky (APC nebo HU), měřeno jako mitotický index.

B - Graf synchronizace kontrolních buněk BY-2 pomocí APC nebo HU.

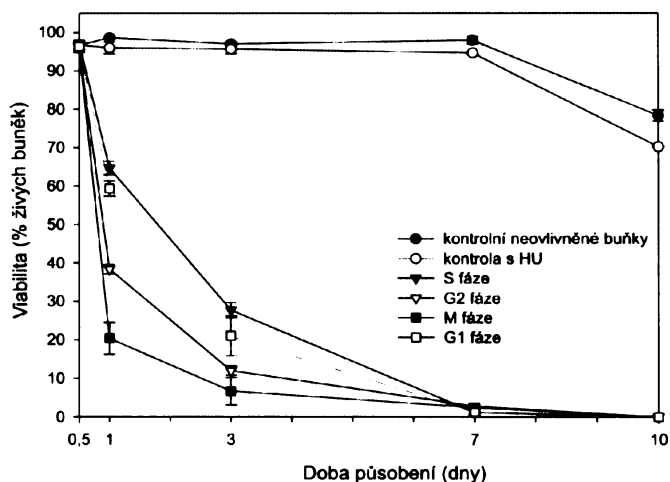
C-E - Efekt 50 μ M kadmia na mitotického indexu u buněk BY-2 po vymytí HU. Kadmium bylo přidáno v různých fázích buněčného cyklu, v S fázi (v čase 1 po vymytí HU, C), v pozdní G2 fázi (v čase 5 po vymytí HU, D) a v M fázi (v čase 7 po vymytí HU, E).

Každý bod reprezentuje průměr ze tří nezávislých pokusů \pm SE.

5.3.1.2.1. Viabilita

Jak u kontrolních neovlivněných buněk, tak i u kontrolních buněk synchronizovaných HU byla viabilita po celou dobu desetidenního kultivačního vysoká (cca 98 %, obr. 5.29). Aplikace 50 μ M koncentrace kadmia v M fázi buněčného cyklu vyvolala výrazný pokles viability buněk během prvních 24 hod kultivace až o 80 %. Naopak aplikace kadmia v S a G1 fázi měla v průběhu 24 hodin mírný až žádný efekt na viabilitu buněk (obr. 5.29). Následná dlouhodobá kultivace všech synchronizovaných buněk v médiu obohaceném o kadmium ukazovala snížení viability buněk ke konci desetidenního kultivačního intervalu (cca 0 % sedmý den kultivace). Sama aplikace kadmia k nesynchronizovaným buňkám vyvolala pokles viability na cca 60 % během prvních dnů působení (obr. 5.6).

Obr. 5.29. Viabilita buněk ovlivněných ionty kadmia v určitých fázích buněčného cyklu
 Graf viability buněk BY-2 po indukci programované buněčné smrti v různých fázích buněčného cyklu.
 Každý bod reprezentuje průměr ze tří nezávislých pokusů \pm SE.



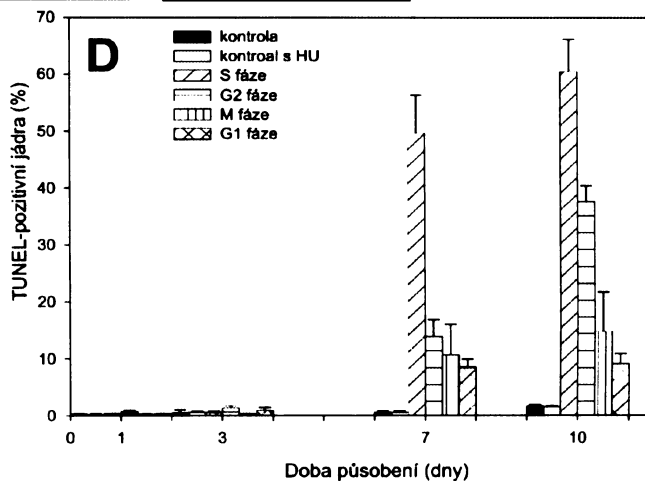
5.3.1.2.2. Fragmentace DNA

5.3.1.2.2.1. TUNEL reakce

Procento TUNEL-pozitivních jader (buněk s fragmentovanou DNA) bylo sledováno během desetidenního kultivačního intervalu (obr. 5.30 D). Obě kontroly (kontrola s HU i bez HU) vykazovaly maximálně 1 % jader obarvených TUNEL reakcí po celou dobu kultivace. Větší množství TUNEL-pozitivních jader bylo zjištěno až ke konci kultivačního intervalu (7. a 10. den), a to pouze u variant, kde bylo kadmium přidáno v S a G2 fázi (40-60 %, obr. 5.30 D). U dalších dvou variant (s přidaným CdSO₄ v M a G1 fázi) bylo množství jader s fragmentovanou DNA minimální, cca 10-15 % jader (obr. 5.30 D).

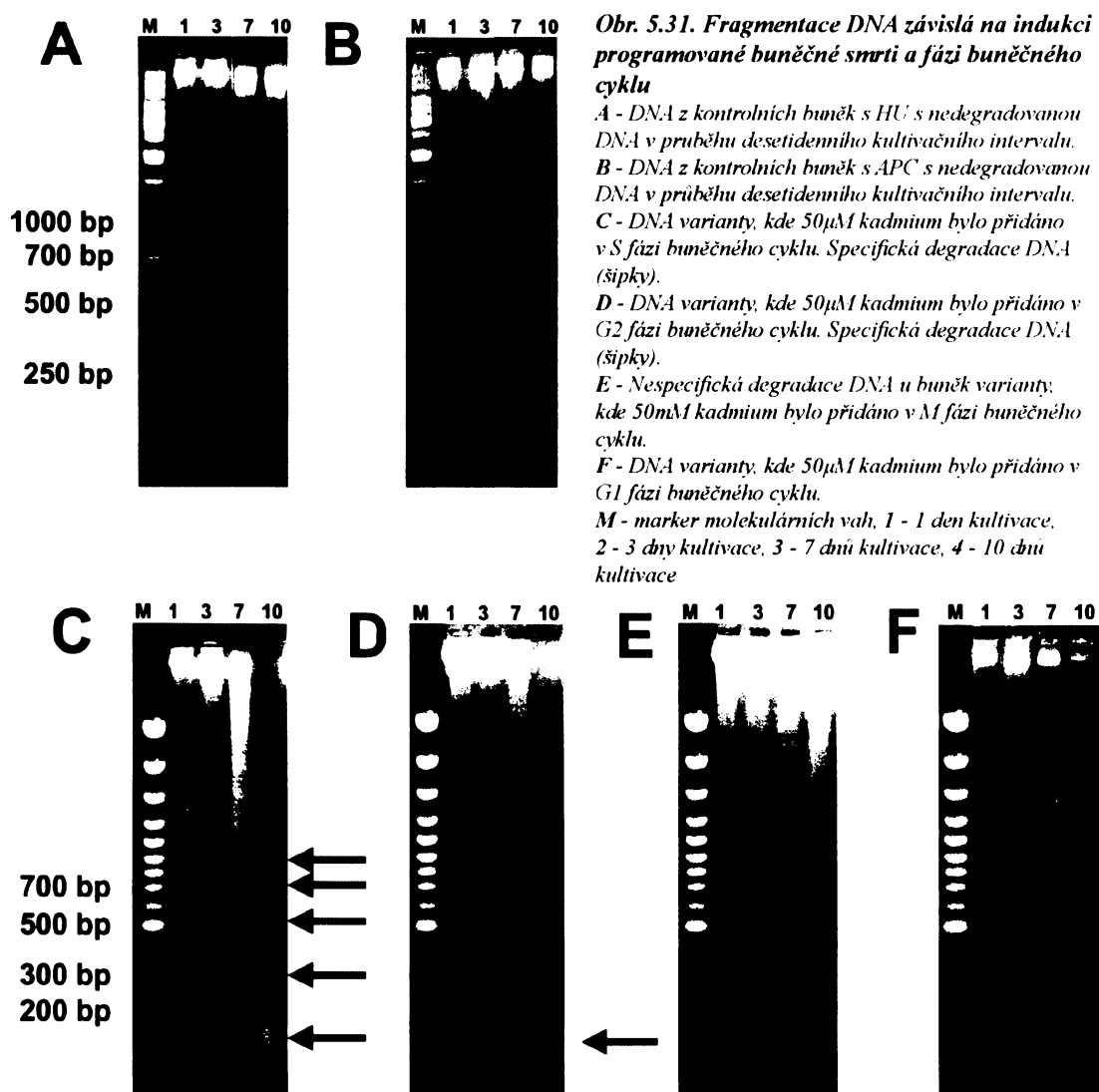


Obr. 5.30. Detekce fragmentace DNA in situ (TUNEL reakce)
 A - D - 50μM kadmium přidáno v S fázi buněčného cyklu, 7 dní po indukci programované buněčné smrti.
 A - TUNEL-pozitivní jádra.
 B - Hoechst 33258.
 C - Složený obrázek.
 D - Graf TUNEL-pozitivních jader v závislosti na indukci programované buněčné smrti na fázi buněčného cyklu. Každá hodnota reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů \pm SE.
 Měřítko = 20 μm



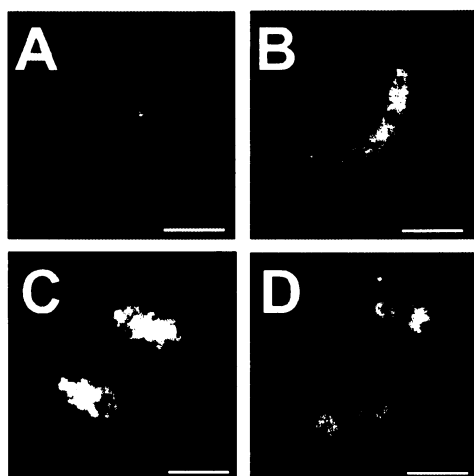
5.3.1.2.2.2. Elektroforetická detekce

U variant, kde bylo kadmium aplikováno v S a G2 fázi, docházelo ke specifické degradaci DNA na oligonukleozomální fragmenty (obr. 5.31 C, D). Tato degradace byla dobře patrná 7. a 10. den kultivace, kdy bylo rovněž detekováno vyšší procento TUNEL-pozitivních jader a viabilita byla nulová (obr. 5.29, 30 a 5.31 C, D). Žádná degradace DNA nebyla pozorována u obou kontrolních buněk s HU nebo APC (obr. 5.31 A, B). Podobně jako u kontrolních buněk nebyla u variant s kadmiiem aplikovaným v M fázi a G1 fázi buněčného cyklu výraznější degradace DNA pozorována během celého sledovaného intervalu (obr. 5.31 E, F).



5.3.1.2.3. Změny v morfologii jader

Fragmentace interfázních jader do mikrojader byla pozorována po delším působení 50 μ M koncentrace kadmia na nesynchronizovanou populaci buněk (během 7 dnů, až 30 % rozpadlých jader). I toto chování bylo zřejmě podmíněno citlivostí buněk k aplikaci síranu kademnatého v určitých fázích buněčného cyklu. Po přidání 50 μ M kadmia k buňkám v M fázi buněčného cyklu docházelo téměř ihned k rychlému rozpadu pozdně telofázních jader (až 94 % 3 hod po aplikaci kadmia, obr. 5.32 D). Nicméně tento rozpad jádra vycházející z narušení mitotických struktur se dá velmi těžko odlišit od typické fragmentace interfázních jader. Po přidání 50 μ M kadmia v S fázi buněčného cyklu docházelo nejprve k protahování jader, pozorovanému po třídenní kultivaci až u 25 % buněk (obr. 5.32 B) a pak následoval jejich rozpad. Až 35 % rozpadlých jader bylo pozorováno sedmý den kultivace buněk po vymytí HU.



Obr. 5.32. Morfologické změny jader u buněk BY-2 během synchronizace

A - Jádra kontrolních neovlivněných buněk.

B - Protážená jádra buněk varianty S fáze.

C - Telofázní jádra kontrolních buněk.

D - Rozpadlá pozdně telofázní jádra buněk varianty M fáze.

A - D - Jaderné barvivo Hoechst 33258.

Měřítko = 10 μ m

5.4. Prodlužování jader

Vedle již zmíněné fragmentace interfázních jader, případně rozpadu mitotických figur bylo po aplikaci nejen některých stresorů (kadmium, obr. 5.19), ale také antireplikačních látek (HU a APC, obr. 5.32) u buněk linie BY-2 pozorováno výrazné prodlužování interfázních jader. Tento fenomén byl proto blíže studován s cílem osvětlit jeho mechanismus na systému velmi rychlé indukce tvorby těchto jader po aplikaci HU.





5.4.1. Prodlužování jader po aplikaci HU a APC

Během celého procesu synchronizace bylo pozorováno větší množství jader do různé míry prodloužených (cca 40% u obou použitých antireplikativních látek, obr. 5.33). V okamžiku jejich vymytí bylo detekováno cca 3-5 % prodloužených jader (obr. 5.34 A), ale dále se jejich četnost zvyšovala až do 4. a 5. hodiny až na 40-50 % (obr. 5.34 A). Počet protažených jader tedy narůstal do doby, kdy byl detekován nástup dělení buněk. Hustota buněk počítaná před (v čase 2 hod po vymytí antireplikativa) a po rozdělení buněk (v čase 12 hod po vymytí antireplikativa) prokázala, že prakticky všechny buňky, tedy i buňky s protaženými jádry, se musely během mitózy rozdělit (obr. 5.34 A).

Pomocí časosběrné mikroskopie využívající Nomarského diferenciálního kontrastu bylo zjištěno, že prodloužená interfázní jádra buněk ovlivněných HU byla schopna se smrštít do běžného kulatého tvaru během probíhající metafáze (obr. 5.36). Na základě tohoto pozorování bylo vytvořeno schéma předpokládaných kroků protahování jader buněk BY-2 a jejich dalšího osudu po synchronizaci s HU nebo APC (obr. 5.32 B).

Další experimenty se zaměřily na studium mechanismu protahování jader. V této souvislosti byla zkoumána zejména úloha buněčné stěny, cytoskeletu a jaderného skeletu.

Obr. 5.33. Protahování jader u buněk BY-2 během synchronizace
Tabulka frekvence výskytu jednotlivých stádií elongovaných jader po použití synchronizačních látek HU nebo APC během synchronizace buněk (0-12h po vymytí HU / APC, kontrolní buňky s HU nebo APC).
Jaderné barvivo Hoechst 33258.

				
APC	22,8%	26,3%	23,7%	27,1%
HU	21,4%	36,1%	22,7%	20,3%
kontrola	97,0%	3%	0%	0%

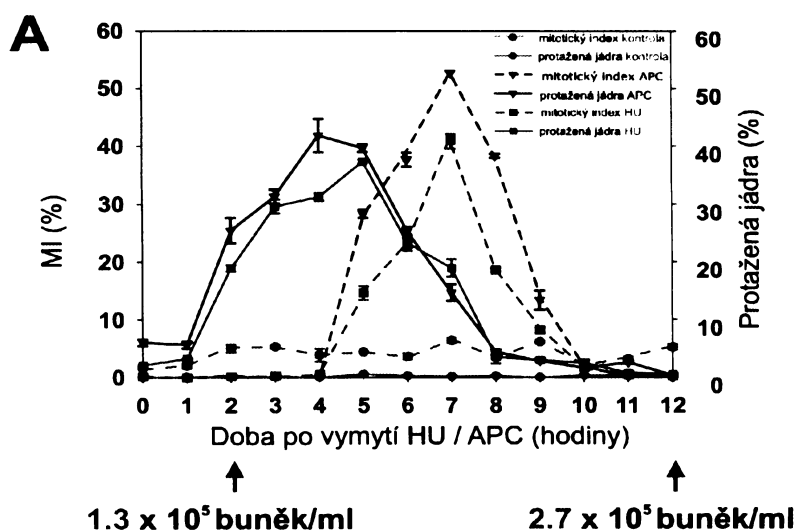
5.4.1.1. Vliv buněčné stěny

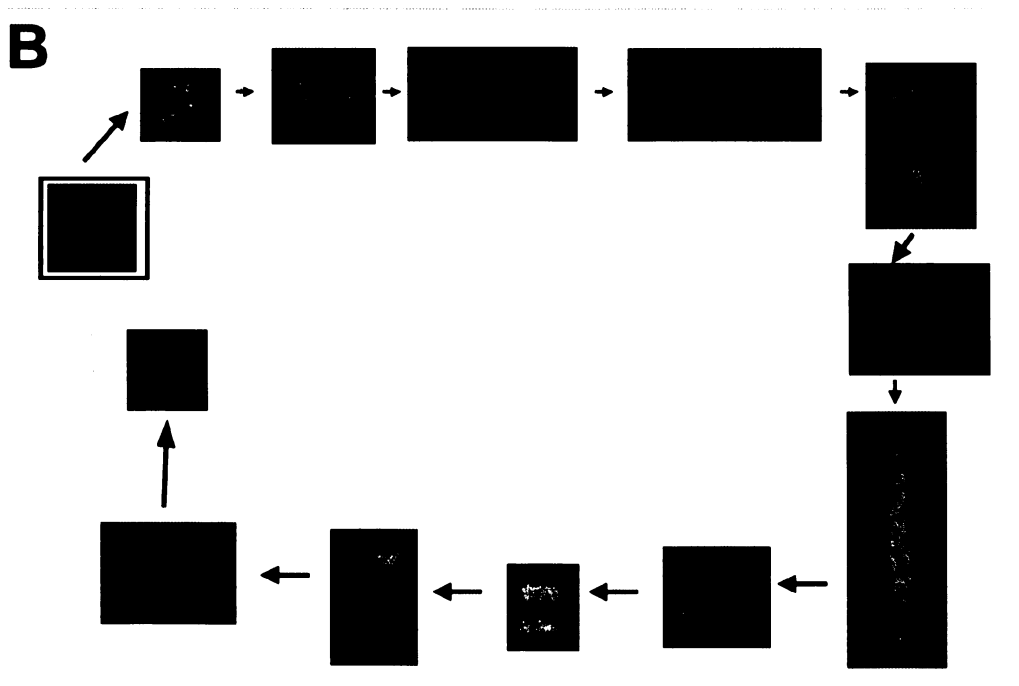
Význam buněčné stěny při protahování jader byl studován z hlediska její úlohy při protahování a z hlediska její role při udržování protáhlého tvaru jader.

Při enzymatickém odstraňování buněčné stěny z buněk synchronizované kultury BY-2

(obr. 5.37 A - P) bylo po třech až čtyřech hodinách až 90 % všech buněk sférických. V pozorovaných protoplastech se vyskytovaly stejné granule jako u velkých protažených jader (obr. 5.35). Protoplasty se podle pozorované vnitřní struktury daly rozdělit do dvou skupin. První skupinou byly protoplasty, u nichž bylo možno jasně rozlišit jednotlivé buněčné kompartmenty (zejména jádro a cytoplazmatické provazce, obr. 5.37 A - D). Protoplasty druhé skupiny byly v téměř celém svém objemu vyplněny granulovitou hmotou (obr. 5.37 E - H), která byla barvitelná viabilním jaderným barvivem SYTO 12 (preferenčně se váže na DNA), a tudíž lze tuto hmotu definovat jako rozpad jader. Podobné obarvené struktury byly pozorovány jak ihned po izolaci protoplastů, tak i po 24 hodinách inkubace protoplastů (obr. 5.37 M, N, O, P). V protoplastech se zachovanými kompartmenty byla pozorována jádra s pozměněným tvarem, ale nikdy klasická elongovaná jádra v neprotoplastovaných buňkách (obr. 5.37 I-P). Tvorba protoplastů je relativně zdoluhavý proces (vytvoření protoplastu trvá podle aktuálního stavu kultury cca 3-5 hod) a mohlo by tedy eventuálně dojít i k rozdělení jader během této doby. Proto byly protoplasty vytvořeny také z buněk, kde se protažená jádra teprve začínala objevovat (cca 2-3 hod po vymytí HU). A ani v tomto případě však nebyla pozorována žádná protažená jádra.

Pro posouzení role buněčné stěny při vlastním protahování byly vytvořeny protoplasty z neošetřených (stacionárních) buněk, a tyto protoplasty byly ošetřeny 4mM HU jako při synchronizaci intaktních buněk. K protoplastům byl navíc přidán isoxaben (inhibitor syntézy celulózy), aby se zabránilo obnovení buněčné stěny. Po šestém vymytí HU nebyla ani v tomto případě nalezena žádná oválná nebo či extrémně protažená jádra po obarvení červeným fluorescenčním viabilním jaderným barvivem SYTO 64 v čase 1, 3 a 5 hod po vymytí HU, kdy je v případě synchronizace intaktních buněk pozorováno až 40 % protažených jader (obr. 5.38).



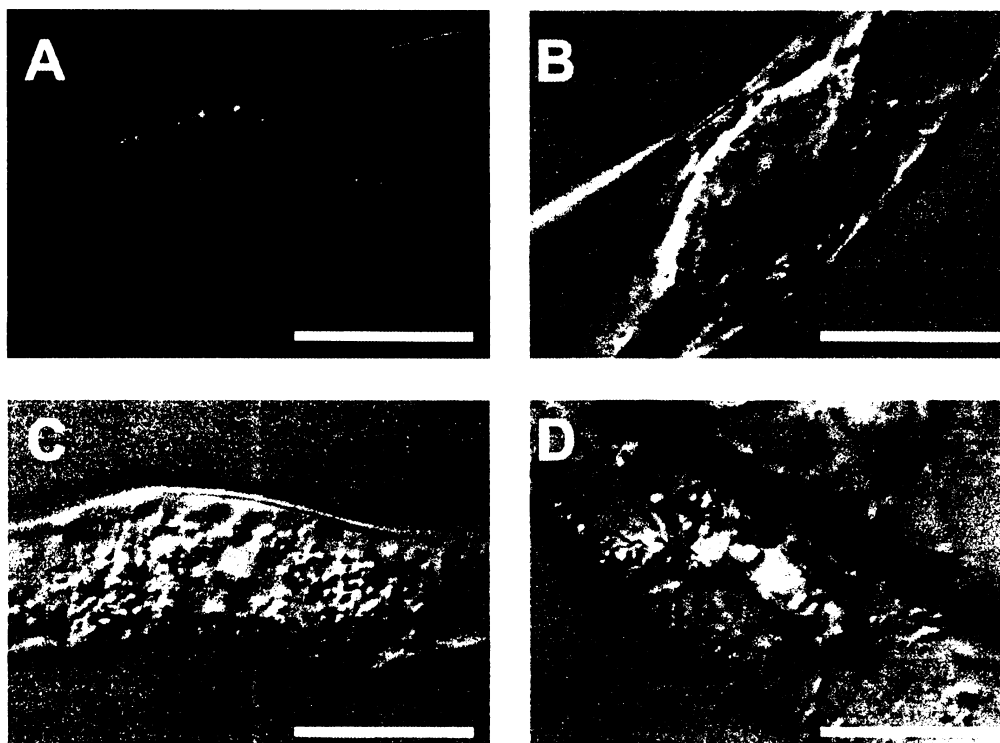


Obr. 5.34. Protahování jader během synchronizace buněk BY-2.

A - Graf množství protažených jader po synchronizaci pomocí HU nebo APC a mitotický index těchto buněk. Počet buněk/ml byl počítán před dělením a po dělení buněk (šipka).

Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů \pm SE.

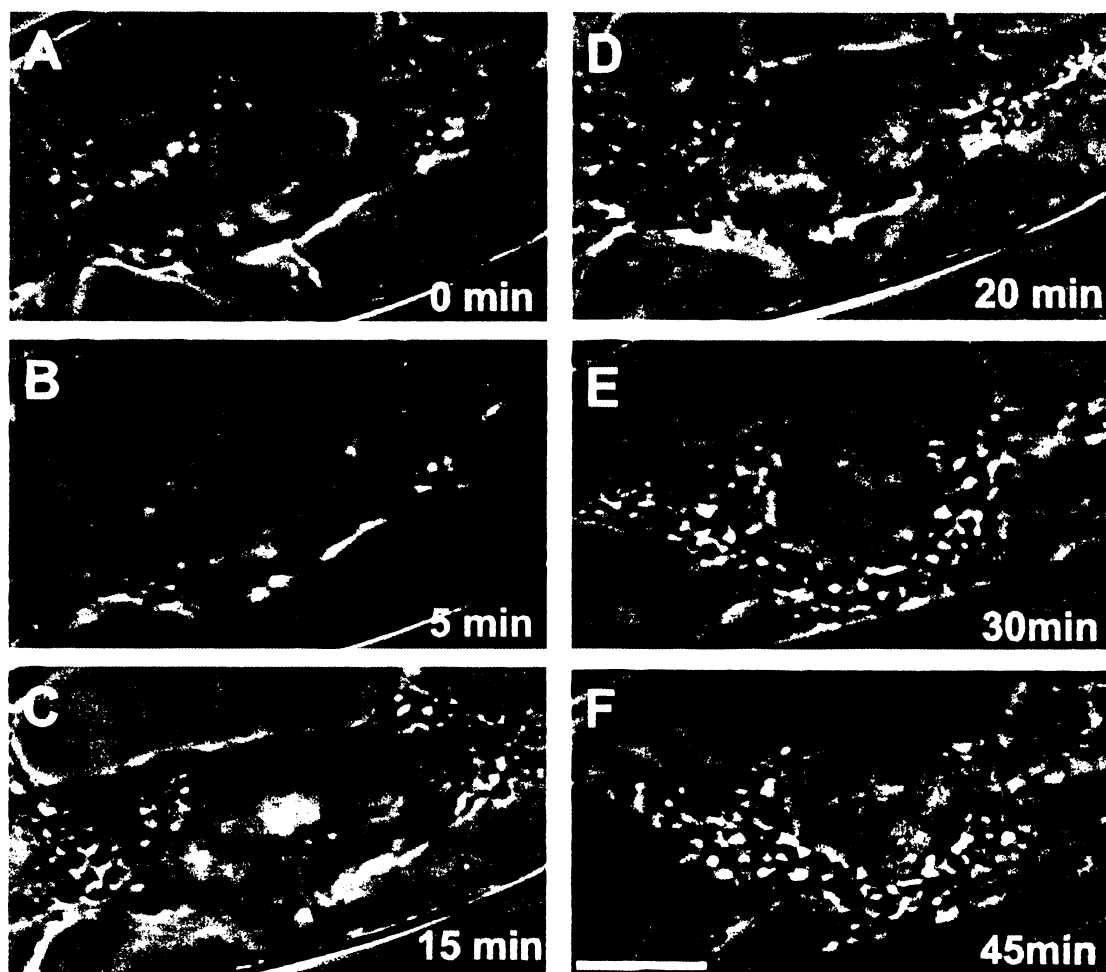
B - Schéma možného procesu elongace jader po použití synchronizačních látek (HU nebo APC).



Obr. 5.35. Velká protažená jádra s granulovitou hmotou

A-D - Velká extrémě protažená jádra s vysoce granulovitou hmotou po celé oblasti jádra a v přilehlé perimikleární oblasti.

Nomarského diferenciální kontrast (DIC), měřítko = 50 μ m



Obr. 36. Dělení elongovaných jader buněk BY-2

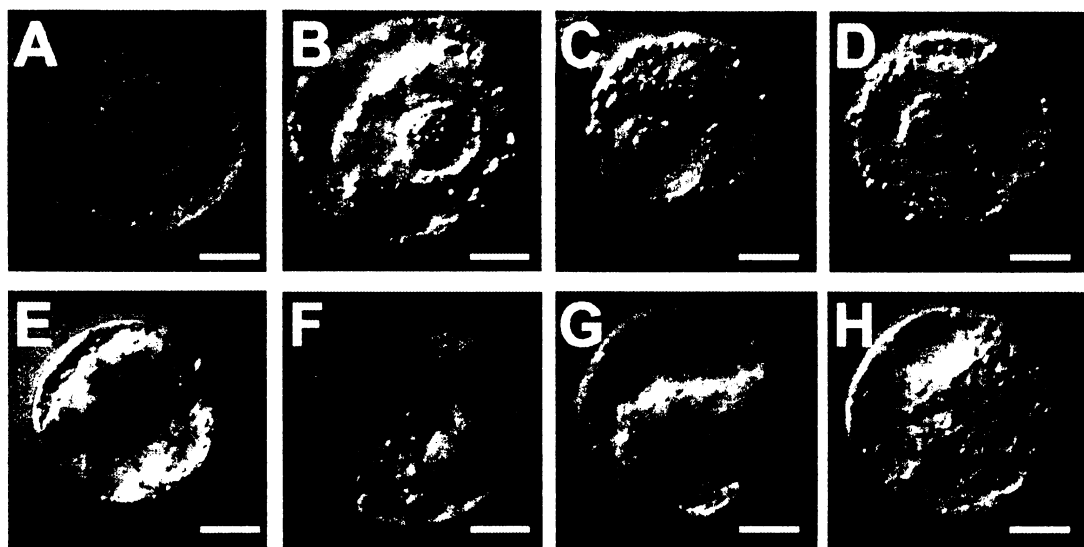
A, B - Prodloužená interfázni jádra po aplikaci HU.

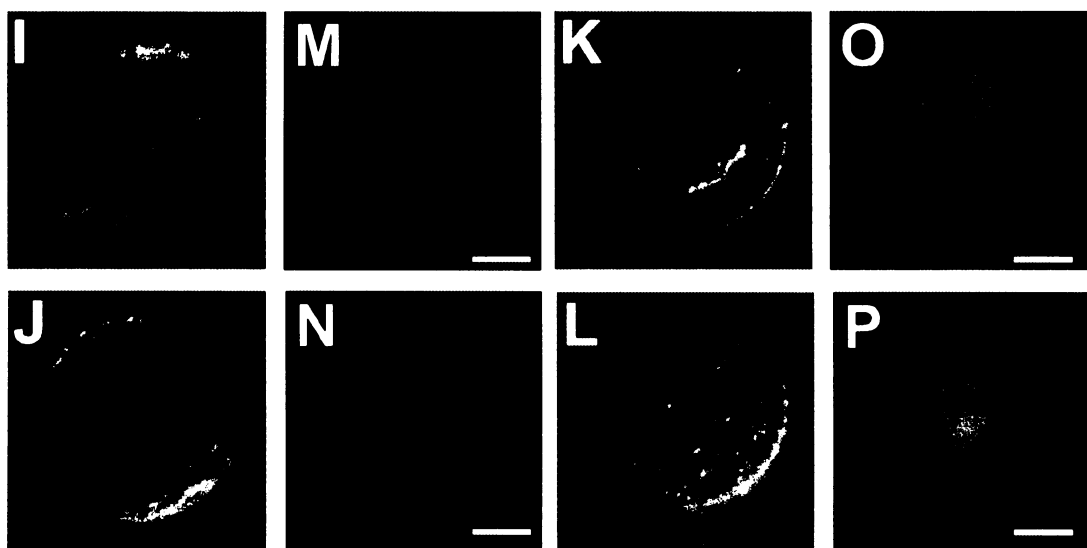
C, D - Spiralizované chromozomy profázních protažených jader.

E, F - Metafázni chromozomy v ekvatoriální rovině kulatých jader (šipka).

Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

Měřitko = 25 μ m





Obr. 5.37. Protoplasty vytvořené z buněk kultury synchronizované za pomoci HU

A-D - Protoplasty s rozeznatelnou vnitřní strukturou.

E-F - Protoplasty s vysoce granulovitou hmotou.

I, M - Protoplasty s fragmentovaným jádrem.

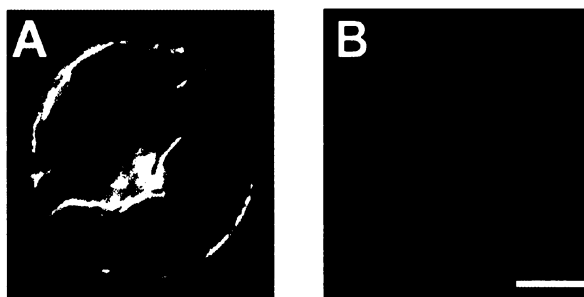
J, N - Protoplasty s difúzním signálem SYTO 12.

K, O, L, P - Protoplasty s malformovanými jádry.

A-L - Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

M-P - Viabilní jaderné barvivo SYTO 12.

Měřítka = 25 µm



Obr. 5.38. Protoplasty vytvořené ze sedmidenních stacionárních buněk

A - B - Protoplasty z kontrolních neovlivněných buněk.

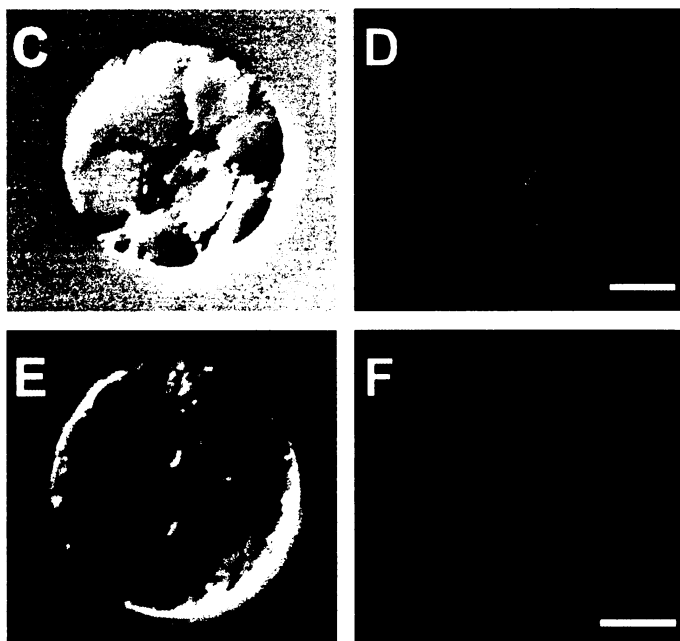
C - D - Protoplasty ovlivněné hydroxymocovinou a isoxabenem po 24h.

E - F - Protoplasty ovlivněné hydroxymocovinou po 24hod.

A, C, E - Nomarského diferenciální kontrast (DIC).

B, D, F - Viabilní jaderné barvivo SYTO 64.

Měřítka = 25 µm



5.4.1.2. Vliv cytoskeletu

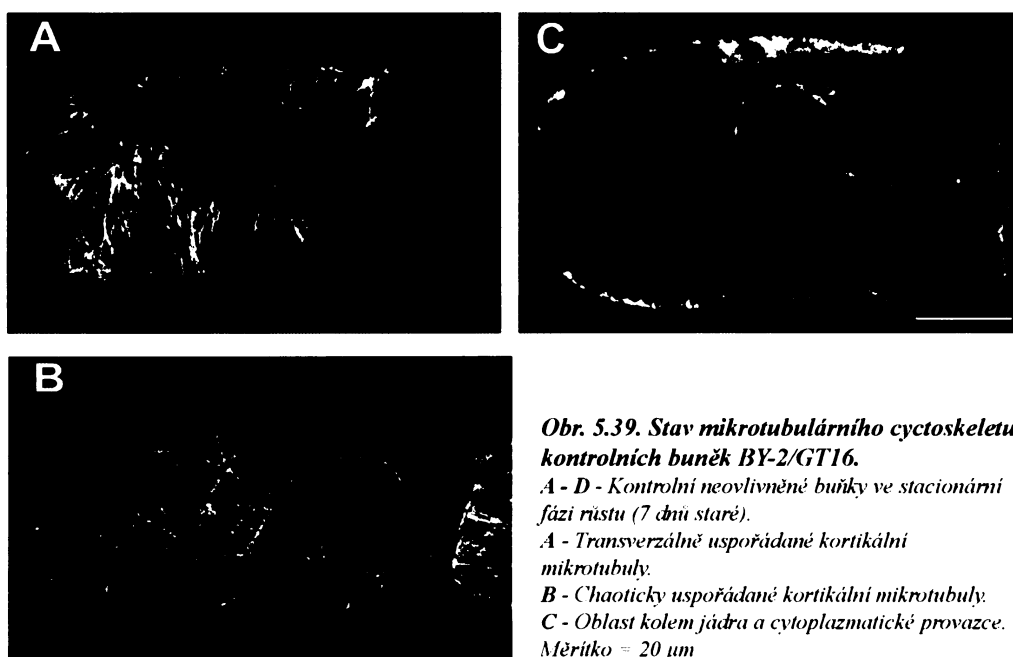
Pro posouzení úlohy cytoskeletu v procesu protahování jader byl sledován účinek aplikace cytoskeletárních drog na

protahování jader a sledovány změny v uspořádání mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu v souvislosti s protahováním jader pomocí transgenních linií BY-2/GT16 a BY-2/TGFP3.

5.4.1.2.1. Mikrotubulární cytoskelet

Pomocí stabilní transgenní linie BY-2/GT16 exprimující GFP značený tubulin byly sledovány změny v uspořádání mikrotubulárního cytoskeletu u buněk s protaženými jádry. V interfázních buňkách BY-2/GT16 ve stacionární fázi růstu byly kortikální mikrotubuly uspořádané jak transverzálně k ose růstu buňky (obr. 5.39 A), tak chaoticky (obr. 5.39 B). V centrální oblasti byl signál detekován okolo jádra a v cytoplazmatických provazcích (obr. 5.39 C). U synchronizovaných buněk pomocí HU nebyla 4 hod po vymytí antireplikativa (v čase s největším procentem protažených jader) kortikální síť mikrotubulů nijak pozměněna (obr. 5.40 A - C). Až v 60% všech pozorovaných buněk s elongovanými jádry byly pozorovány invaginace cytoplazmy s mikrotubulárním signálem (obr. 5.40 D - F, šipka) nebo možné kanály procházející skrz jádro taktéž s mikrotubulárním signálem (obr. 5.43 G - I, šipka, příloha -video).

Dále byl vliv mikrotubulů na protahování interfázních jader zkoumán pomocí mikrotubulární drogy oryzalinu, způsobující depolymeraci mikrotubulů, který v použité koncentraci 20 μ M výrazně snížil viabilitu buněk po celý sledovaný interval (7 dní). Rozpad mikrotubulární sítě byl pozorován již po 12hod (data neuvedena). Proto byl oryzalin přidán k buňkám ovlivňovaným HU uprostřed 24 hodinové inkubace (tedy po 12hod). Během dalších 12hod společného působení HU a oryzalinu, ani během 5 hodin po vymytí HU a po znovupřidání oryzalinu nebyla pozorována žádná protažená jádra. Naopak, téměř ihned po vymytí HU bylo pozorováno až 90 % všech jader s vysoce kondenzovaným chromatinem. Tato jádra připomínala rozpadající se jádra.



Obr. 5.39. Stav mikrotubulárního cytoskeletu kontrolních buněk BY-2/GT16.

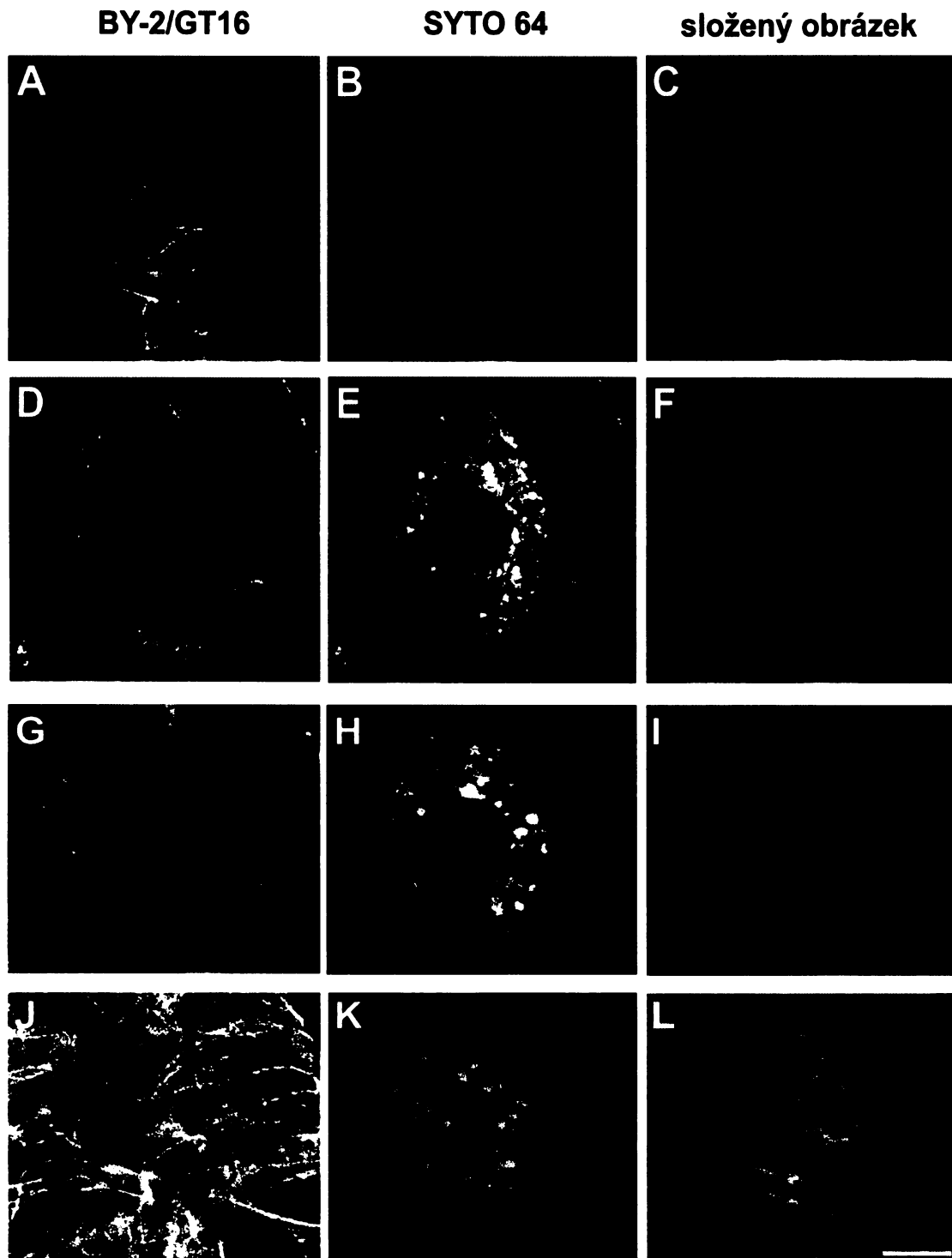
A - D - Kontrolní neovlivněné buňky ve stacionární fázi růstu (7 dní staré).

A - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly.

B - Chaoticky uspořádané kortikální mikrotubuly.

C - Oblast kolem jádra a cytoplazmatické provazce.

Měřítko = 20 μ m



Obr. 5.40. Stav mikrotubulárního cytoskeletu u kultury BY-2/GT16 synchronizované pomocí HU, 4 hodiny po vymytí antireplikativa.

A - C - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly.

D - I - Mikrotubuly v oblasti okolo jádra a v cytoplazmatických provazcích. Pozorováno časté protínání jader mikrotubulárními vlákny (D - F, šipka) nebo invaginace do jader (G - I, šipka).

J - L - Složené jednotlivé optické řezy.

A, D, G, J - transgemi linie BY-2/GT-16

B, E, H, K - jaderné barvivo SYTO 64

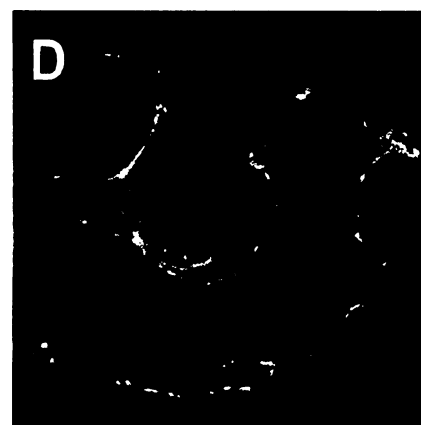
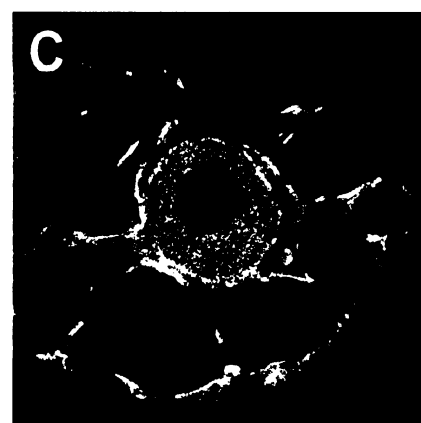
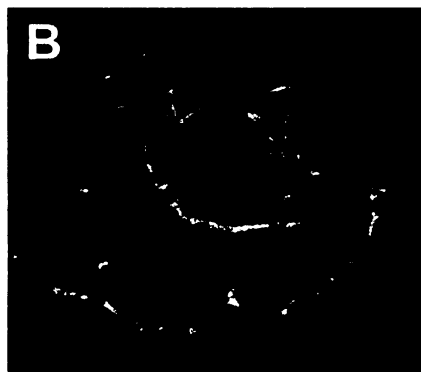
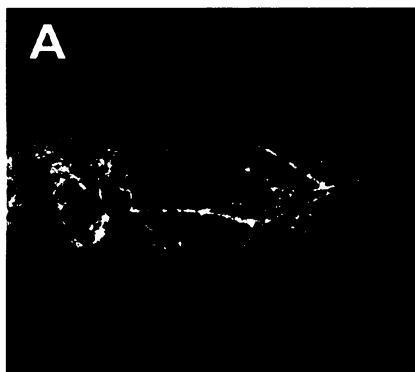
C, F, I, L - složený obrázek

Měřítko - 7 μm

Obr. 5.41. Stav aktinového cytoskeletu u kontrolních buněk BY-2/TGFP3

A - Chaoticky uspořádaná aktinová vlákna v kortikální oblasti buňky.

B - E - Různé optické řezy buněk BY-2/GT16 v oblasti kolem jádra a cytoplazmatických provazců. Aktinový košíček kolem jádra. Měřítka = 20 μ m

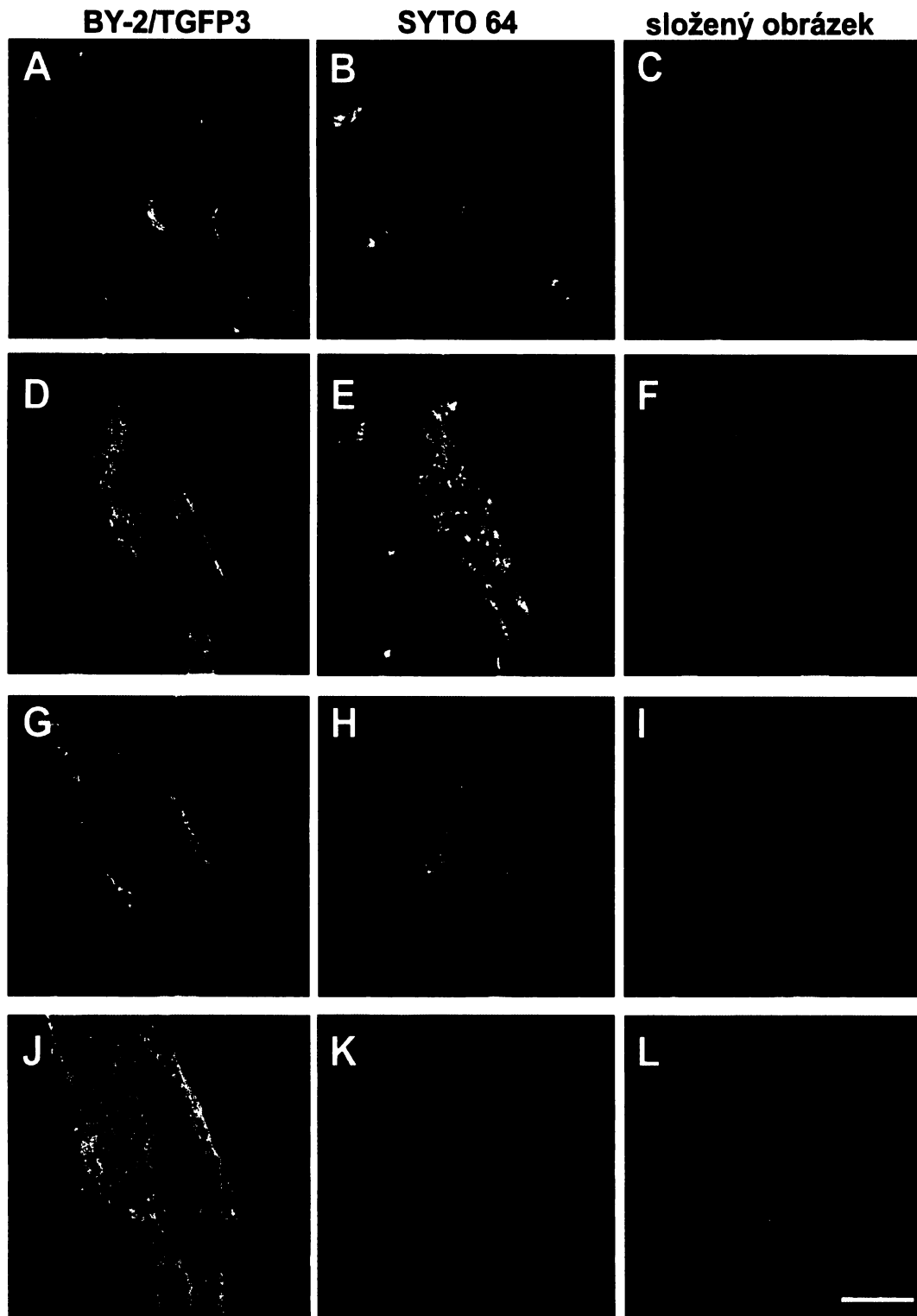


5.4.1.2.2. Aktinová filamenta

Obdobně jako při studiu změn mikrotubulárního cytoskeletu u buněk s protaženými jádry byla i při sledování změn aktinového cytoskeletu použita transgenní linie s *in vivo* fluorescenčně značenými mikrofilamenty (linie BY-2/TGFP3 nese fúzní protein GFP s talinem). Kontrolní neovlivněné buňky měly zachovanou chaoticky uspořádanou aktinovou síť v kortikální oblasti tvořenou silnými aktinovými vlákny (obr. 5.41 A). V optických řezech kolem jádra byl pozorován tzv. aktinový košíček z velkého množství jemných vláken a dále byla pozorována silná vlákna v oblasti cytoplazmatických provazců (obr. 5.41 B - E).

Buňky ovlivněné HU neměly zachovanou aktinovou síť v kortikální oblasti buňky (obr. 5.42 A - C), jaderný košíček kolem elongovaných jader byl tvořen jemnými aktinovými vlákny (obr. 5.42 D - L) a často bylo pozorováno protínání jader silnějšími aktinovými vlákny (45 % všech pozorovaných buněk s pozměněnými jádry, obr. 5.42 G - I, šipka).

Obdobně jako při zkoumání vlivu mikrotubulárního cytoskeletu na protahování jader bylo při zjišťování vlivu aktinového cytoskeletu použito tzv. aktinové drogy latrunkulinu B, který



Obr. 5.42. Stav aktinového cytoskeletu u kultury BY-2/TGFP3 synchronizované pomocí HU, 4 hodiny po vymytí antireplikativa

A - C - Kortikální vrstva.

D - I - Aktinová filamenta v oblasti okolo jádra a v cytoplazmatických provazcích. Jaderný košiček z jemných aktinových vláken. Protínání jader silnými aktinovými vlákny (šipka).

J - L - Složené jednotlivé optické řezy.

A, D, G, J - transgenní linie BY-2/TGFP3

B, E, H, K - jaderné barvivo SYTO 64

C, F, I, L - složený obrázek

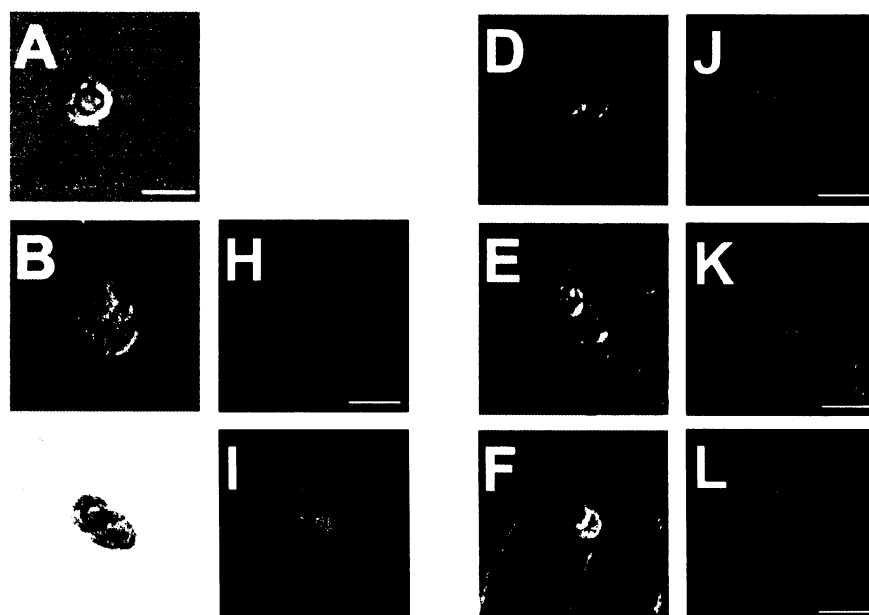
Měřítko 11 μm

brání polymeraci aktinu. 500nM koncentrace latrunkulinu B navodila rozpad aktinové sítě, ale nevyvolala snížení viability buněk během 7 denního kultivačního intervalu. Po 12 hodinovém působení HU byl latrunkulin B přidán k buňkám a po dalším 12hod společném působení HU a latrunkulinu B po následném vymytí HU a znovupřidání latrunkulinu B nebyla nalezena žádná elongovaná jádra.

5.4.1.2.3. Jaderný cytoskelet - intermediální filamenta

Možnost funkce hypotetického vnitrojaderného cytoskeletu v těchto změnách jaderného tvaru naznačil výsledek pokusu, v němž byla, po rychlém rozbití buněk s protaženými jádry (sonikací), pozorována uvolněná protažená jádra, která si udržela svůj tvar po celou sledovanou dobu 6 hodin (obr. 5.43 B - L).

Možná přítomnost proteinům podobných živočišných intermediálním filamentům a jejich vlivu na protahování jader byla studována po aplikaci širokospektrého inhibitoru živočišných intermediálních filament akrylamidu. 10mM akrylamid během 12hod působení nesnižoval výrazně viabilitu buněk (data neuvedena). Uspořádání pokusu bylo totožné s působením mikrotubulárních a aktinových drog. Po 12hod působení HU byl akrylamid přidán k buňkám a po dalším 12hod společném působení HU a akrylamidu a následném vymytí HU a znovu přidání akrylamidu nebyla ani v tomto případě nalezena žádná protažená jádra. Navíc nebyl u těchto buněk pozměněn ani mikrotubulární a ani aktinový cytoskelet.



Obr. 5.43. Izolace extrémě protažených jader u buněk BY-2 po synchronizaci pomocí HU nebo APC

A - F - Nomarského diferenciální kontrast.

G - L - Jaderné barvivo Hoechst 33258.

Měřítko - 10 μm

6. DISKUZE

6.1. Buněčná smrt u tabákové linie BY-2

Mechanismy programované buněčné smrti byly nejprve studovány na živočišných modelech, zejména se jednalo o studium chování buněk v intaktních tkání a orgánech či studium tkáňových kultur. Z prací týmů Prof. Kerra nebo Prof. Lockshina (např. Kerr *et al.* 1972, Lockshin a Zakeri 2004) byly odvozeny základní morfologické charakteristiky procesu apoptózy, coby jednoho z klíčových typů PCD (kondenzace chromatinu, fragmentace jader a vznik apoptotických měchýřků). Teprve po rozvoji biochemických a molekulárně biologických technik bylo možné k nim přiřadit nové charakteristiky: detekci aktivity proteáz (včetně kaspáz), specifickou fragmentaci DNA pomocí DNA elektroforézy, TUNEL reakci a anexinový test.

Zpřesnila se tak detekce nejrůznějších typů programované buněčné smrti, čímž se však naopak výrazně zkomplikovala její původní klasifikace. Na přijetí jednotného typu členění se v současné době neshodují ani týmy pracující jak s živočišnými, tak rostlinnými buňkami. Jako jeden z více nedávno navržených systémů lze uvést kategorizaci PCD podle Leist a Jäättälä (2001) nebo Bröker *et al.* (2005). Poměrně recentní je i návrh názvoslovné komise NCCD (z anglického The Nomenclature Committee on Cell Death), doporučující použití určitých typů PCD pouze za přesně stanovených podmínek (blíže kap. 3.1, Kroemer *et al.* 2005). Několik obdobných pokusů o kategorizaci různých typů PCD bylo učiněno i v případě rostlin (Jones 2001, van Doorn a Woltering 2005).

Autoři van Doorn a Woltering (2005) ve svém členění kombinují morfologické znaky (kondenzace jader nebo vakuolární kolaps) se znaky biochemicko molekulárními (aktivita kaspáz, internukleozomální fragmentace DNA a TUNEL reakce). Jak v jejich pracech (jako model používají buněčnou supenzní kulturu rajčete), tak v pracích dalších autorů je však cytologická charakteristika buněčné smrti minimální, čímž tak snižují výpovědní hodnotu svých závěrů. Důvodem může být zejména nevhodný heterogenní pokusný model nebo přejímání pro popis chování rostlinných buněk obecné terminologie popisu živočišných PCD.

Jedním z prvních cílů předkládané práce bylo proto využít unikátní vlastnosti modelu buněčné linie BY-2 pro získání spolehlivé cytologické charakterizace specifických odpovědí na různé faktory indukující PCD. Metodické možnosti této práce byly výrazně rozšířeny i tím, že kromě standardní linie BY-2 bylo možno použít i různé její GFP transgenní linie. To dovolovalo sledovat rané reakce různých buněčných struktur/organel *in vivo* (endoplazmatického retikula, vakuomu, mikrotubulů a aktinových filament) a srovnávat

tak výsledky přímého pozorování buněk pomocí světelné, fluorescenční a konfokální mikroskopie s výsledky z TEM.

Tato detailní cytologická charakteristika spolu s biochemickým a molekulárně biologickým přístupem by měla na modelu BY-2 od sebe odlišit základní typy PCD, jejich četnost a eventuelně i biologický význam.

6.1.1. Viabilita buněk - buňky živé, mrtvé nebo něco mezi tím

Většina prací studujících problematiku PCD u rostlin kombinuje hodnocení molekulárních resp. biochemických znaků pouze se stanovením počtu živých či mrtvých buněk pomocí trypanové modři nebo FDA testu. Je ovšem třeba si uvědomit, že žádný z těchto testů není se zárukou a míra jejich spolehlivosti je dána zejména paralelní kontrolou intaktosti buněčných struktur (právě pomocí zmíněných cytologických charakteristik). Hodnocení viability buněk, nejen pomocí FDA testu, je často velmi subjektivní. Pozitivní reakci mohou dávat i zcela mrtvé buňky s přetrvávající esterázovou aktivitou (Zelená 2000).

Vynikajícím nástrojem studia samozřejmě jsou linie značené GFP, u nichž bylo možno vedle celkového kolapsu buňky hodnotit i dílčí poškození jednotlivých GFP značených struktur (a tím i funkce).

Z výše uvedených běžně používaných cytologických markerů živočišné apoptózy (Kerr *et al.* 1972) jsou pouze jen některé použitelné pro hodnocení chování rostlinných buněk. Pevná celulózní buněčná stěna nedovoluje hodnotit bobtnání plazmalemy. Proto je tedy nutné hodnotit změny vnitřní architektury buněk, avšak s přesným vymezením jejich terminologie.

6.2. Abiotický stres jako induktor PCD u buněk BY-2

6.2.1. Koncentrační závislost stresové odpovědi na působení kadmia

PCD byla ve většině pokusů navozena dvěma již známými induktory PCD u rostlinných buněk; chladovým stresem (kultivací ve 4°C, Koukalová *et al.* 1997) a síranem kademnatým (Fojtová a Kovařík 2001). V obou případech byla buněčná smrt doprovázená internukleozomální fragmentací DNA, jak dokumentují uvedené práce, avšak jednotlivé procesy vedoucí k degradaci buněčného obsahu nebyly, zejména na cytologické úrovni, ve zmiňovaných pracích téměř vůbec popsány. Vzhledem k pomalé odezvě buněk BY-2 kultivovaných při nízké teplotě byly průvodní jevy a mechanismus indukce PCD detailněji studovány po aplikaci iontů kadmia. Výsledky získané po ovlivnění buněk chladovým stresem (zejména rychlost umírání buněk, rychlost fragmentace DNA a rozpad interfázních jader) jsou použity jako srovnávací.

Účinek iontů kadmia byl koncentračně závislý. Vyšší koncentrace kadmia (1mM) zabila buňky téměř ihned (po cca 6-12hod), 50μM koncentrace CdSO₄ způsobila postupnou degradaci a ztrátu cytoplazmatických provazců, doprovázenou významnými změnami vnitřní struktury buněk. Obdobné změny byly již dříve popsány u jiné tabákové linie VBI-0 ovlivněné různými koncentracemi iontů kadmia, která je charakterem velmi podobná linii BY-2 (Domažlická a Opatrný 1989). Výsledky pokusů s linií BY-2 umožnily studovat jejich dynamiku a posoudit souvislost s různými typy odpovědi buněk na PCD induktory na úrovni molekulárních, resp. biochemických znaků.

6.2.2. Cytologické hodnocení

6.2.2.1. Zastavení mitotické aktivity buněk

Obecnou reakcí živých, opakovaně dělicích se buněk na aplikaci určitých stresorů je dočasné či trvalé zastavení tohoto procesu. Pokud je narušeno samotné dělení jader, vstupuje buňka do stavu tzv. mitotické smrti. Při zastavení mitotické aktivity buněk je taková změna provázena tendencí uchovat si „nukleocytoplasmatický“ poměr objemovým růstem buňky (rychlým prodloužením buněk). Pokud není nadále narušena syntéza DNA, zvětšují se také interfázni jádra, která mění i svůj tvar. V našich pokusech bylo takové chování buněk BY-2 za určitých podmínek opakovaně pozorováno a blíže charakterizováno.

6.2.2.2. Prodlužování buněk

Prodlužování buněk linie BY-2 během prvních dnů působení 50μM CdSO₄ (obr. 5.7) s největší pravděpodobností souvisí se zablokováním mitotické aktivity buněk nebo navozenou buněčnou smrtí. Tedy obecnou, nespecifickou reakcí na podmínky, v nichž

mají buňky dostatek živin, avšak stresové působení CdSO_4 nedovoluje realizovat buněčné dělení.

Prodlužování však může být indukováno i specificky, např. rozvolněním buněčné stěny v důsledku masivní syntézy reaktivních forem kyslíku (ROS), kterou nepřímým způsobem vyvolává působení kadmia prostřednictvím Fentonovy reakce (Sanità di Toppi a Gabrielli 1999, Olmos *et al.* 2003). ROS jsou takto schopné indukovat rozvolnění buněčné stěny u koleoptile kukuřice a trav a také v listech kukuřice (Rodriguez *et al.* 2002). Mechanismus působení ROS na buněčnou stěnu dosud není zcela znám. Hydroxylové radikály pravděpodobně rozvolňují buněčnou stěnu tím, že štěpí dlouhé řetězce polysacharidů, a to zejména pektinů nebo xyloglukanů (Fry *et al.* 2001). Navíc by snížená rigidita buněčné stěny mohla být způsobena zvýšeným množstvím nerozpustných konjugátů polyaminů, které bylo pozorováno u buněk BY-2 po aplikaci $50\mu\text{M}$ CdSO_4 během prvních 12 hod působení (Kuthanová *et al.* 2004). Interakce putrescinu a spermidinu s komponenty buněčné stěny totiž může vést k jejímu rozvolnění (Berta *et al.* 1997).

Tyto výsledky prozatím nedovolují považovat rychlé dloužení buněk BY-2 po aplikaci $50\mu\text{M}$ CdSO_4 za projev přímo související s nástupem PCD, spíše za obecnou stresovou reakci nebo projev dočasného zablokování mitotické aktivity buněk. Prodloužování buněk pravděpodobně souvisí i s prodlužováním jader (blíže kap. 6.5).

6.2.2.3. Granulace cytoplazmy

Ve srovnání s neošetřenou kontrolou byly u buněk vystavených působení $50\mu\text{M}$ CdSO_4 pozorovány již od prvního dne působení granule neznámého typu. TEM analýza odhalila kromě drobných vakuol (viz níže) pouze četné amyloplasty s jedním nebo více škrobovými zrny (obr. 5.10 B - E, J, K) a číškovité plastidy (obr. 5.10 F -I) s jedním nebo více dutinami ve stromatu plastidů vyplněnými základní cytoplazmou. Pozorované granule jsou tedy zřejmě plastidového původu, přestože přítomnost škrobu (detekovatelná pomocí HPLC) v nich byla prokázána na základě barvení Lugolovým roztokem a pozorování v polarizovaném světle jen částečně.

Rozlišitelnost limitovaná světelnou mikroskopií však může vést např. k záměně takovýchto granulí s drobnými vakuolami. Možná proto, v rozporu s našim pozorováním, popisují Moriyasu a Oshumi (1996) podobné granule jako autolyzozómy, jejichž tvorba se indukovala téměř ihned u buněk BY-2 vystavených sacharóзовému hladovění v perinukleární cytoplazmě (Moriyasu a Oshumi 1996, Takatsuka *et al.* 2004). Autolyzozómy jsou definovány jako organely se dvěma membránami obklopené částí cytoplazmy, které posléze splývají s vakuolou nebo lysozómem. Zda se v obou případech jednalo o stejný

typ buněčných struktur, není však jasné. Tvorba číškovitých plastidů, v jejichž stromatu by mohlo docházet i k hydrolyze bílkovin (Newcomb 1967) a mohly by tedy funkčně odpovídat výše zmiňovaným autolyzozómům, by však mohla být obecnou reakcí buněk na stresové působení. Číškovité plastidy totiž byly často pozorovány při indukovaném stárnutí (Hudák *et al.* 1983, Lux a Hudák 1987) a obdobné útvary byly rovněž nalezeny i u buněk kultivovaných v chladu při 4°C (obr. 5.1 D, E, F).

6.2.2.4. Vakuolizace cytoplazmy

Jak u buněk ovlivněných nízkou teplotou (obr. 5.1 C), tak u buněk kultivovaných v 50μM koncentraci kadmia (obr. 5.8 C, D, 12 a 11 A) byly nalezeny v perinukleární oblasti i v cytoplazmatických provazcích drobné vezikuly barvitelné FDA i FM4-64. Podle pozorování Kutsuny a Hasezawy (2002) se tato fluorescenční sonda specificky váže po 24hod barvení na tonoplast buněk BY-2. Tato zvýšená vakuolizace (vznik drobných vakuol / vezikul) by mohla znamenat předzvěst tzv. vakuolárního kolapsu, který je jedním z typických rysů programované buněčné smrti u rostlin (Jones 2001). Vznik drobných vakuol, které postupně splývají s těmi již existujícími v jednu velkou centrální vakuolu, byl u rostlinných buněk podléhajících buněčné smrti popsán již dříve u buněk BY-2 po působení H₂O₂ (Houot *et al.* 2001), při umírání suspenzorových buněk smrku ztepilého (Filonova *et al.* 2000), při přeměně mezofylových buněk *Zinnia elegans* na tracheální elementy (Groover *et al.* 1997) anebo při tzv. kortikální buněčné smrti kořenů obilovin (Liljeroth a Bryngelsson 2001). Ve velké centrální vakuole se pak akumulují hydrolytické enzymy, které se vylévají do buňky po prasknutí tonoplastu a degradují celý buněčný obsah (Hatsugai *et al.* 2006).

Kromě zvýšené vakuolizace buněk ovlivněných nízkou teplotou nebo 50μM CdSO₄ byla navíc pozorována tvorba jednoduchých membránových měchýřků v místě oddělování plazmalemy od buněčné stěny (obr. 5.17). Podobné útvary byly popsány i při buněčné smrti v buňkách primární kůry kukuřice (Gunawardena *et al.* 2001, Lenochová 2004) nebo při hypersenzitivní reakci u rostlin tabáku (Mittler *et al.* 1997). Lee a Chen (2002) popisují podobné útvary nalezené v senescentních listech rýže jako plazmalemazómy. Díky těmto všem poznatkům lze předpokládat, že v našich pokusech vznik drobných vakuol/vezikul, splývání s již existujícími velkými vakuolami a jejich následný rozpad hrají důležitou a pravděpodobně i klíčovou roli při programovaném umírání buněk BY-2.

6.2.2.5. Změny v architektuře endoplazmatického retikula

U buněk ovlivněných 50μM CdSO₄ byla pozorována změna v typickém uspořádání sítě endoplazmatického retikula. Kromě obvyklé jemné tubulární sítě endoplazmatického

retikula (obr. 5.14 C, D) byly v kortikální cytoplazmě buněk linie BY-2/HDEL s GFP značeným endoplazmatickým retikulem pozorovány také velké, víceméně kulovité útvary (obr. 5.15). V dělohách transgenické linie *Arabidopsis thaliana*, s vneseným konstruktem kódujícím fúzní protein s GFP retenčním signálem v endoplazmatickém retikulu, byly podobné útvary popsány jako možné leukoplasty nebo proplastidy (Haseloff *et al.* 1997). Gunning (1998) však stejné útvary popisuje jako tzv. „tajemné organely“ a za pomoci elektronové mikroskopie zjistil, že se jedná o cisterny endoplazmatického retikula, které však mají od známých cisteren endoplazmatického retikula odlišný tvar, mají vnitřní vláknitou strukturu a jsou obklopeny ribozómy, což napovídá o tom, že vznikly právě z endoplazmatického retikula (Matsushima *et al.* 2003). Tyto cisterny endoplazmatického retikula byly pozorovány pomocí BY-2/HDEL u rostlin *Arabidopsis thaliana* a buněk listů tabáku (Boevink *et al.* 1999, Hawes *et al.* 2001). Navíc byla tato tělíska pozorována také u semenáčků *Arabidopsis thaliana* vystavených vysoké koncentraci soli, po poranění nebo u buněk podléhajících buněčné smrti (Hayashi *et al.* 2001). Proto by zmíněné zvláštní útvary endoplazmatického retikula, pozorované v našem případě u buněk stresovaných ionty kadmia, mohly představovat obdobné cisterny endoplazmatického retikula aktivované stresovým působením.

Většina vakuolárních proteinů rostlinných buněk je transportována z endoplazmatického retikula do vakuol přes Golgiho komplex, kde dochází k jejich modifikacím. Některé proteiny však opouštějí Golgiho komplex a jsou zpět transportovány do endoplazmatického retikula. U epidermálních buněk *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že tyto cisterny endoplazmatického retikula neakumulují proteiny z Golgiho komplexu (Mitsunashi *et al.* 2000, Hayashi *et al.* 2001). U semenáčků *Arabidopsis thaliana*, které byly vystaveny vysoké koncentraci soli, tato tělíska endoplazmatického retikula spolu fúzovala a následně fúzovala také s vakuolou v závislosti na pokročilosti buněčné smrti. Tyto cisterny endoplazmatického retikula tak zřejmě představují zcela nový, velmi sofistikovaný mechanismus, jakým jsou proteiny z endoplazmatického retikula ukládány přímo do vakuol při indukci programované smrti. Tomu by nasvědčovalo i zjištění, že byly v těchto cisternách nalezeny inaktivní prekurzory hydrolytických enzymů (RD21 a γ VPE), které mohou být takto dopravovány do lytických vakuol a následně použity k degradaci buněčného obsahu při vakuolárním kolapsu (Hayashi *et al.* 2001). Lze se domnívat, že obdobný mechanismus funguje i v raných fázích PCD vyvolané aplikací iontů kadmia na buňky linie BY-2.

6.2.2.6. Morfologie jader

Fragmentace interfázních jader do mikrojadér je jedním ze základních znaků apoptotické programované smrti u živočišných buněk (Kerr *et al.* 1972). Té však předcházejí

změny v uspořádání chromatinu. Nejprve dochází ke kondenzaci jaderného chromatinu při jaderném okraji, který je následován bobtnáním jaderné membrány (ale také bobtnáním všech membrán v buňce) a končí fragmentací zbylých jaderných částí do jednotlivých, membránou spojených apoptotických tělísek (Kerr *et al.* 1972). Obdobná kondenzace chromatinu byla pozorována u buněk ovlivněných 50 μ M koncentrací iontů kadmia (obr. 5.19 B, C). U rostlinných buněk podléhajících různým formám programované buněčné smrti byla kondenzace jaderného chromatinu několikrát popsána, např. při senescenci listů *Nicotiana plumbaginifolia* nebo *Eucommia ulmoides* (O'Brien *et al.* 1998, Cao *et al.* 2003), při napadení rostlin ječmene různými virovými, bakteriálními či houbovými patogeny (Yao *et al.* 2002), při buněčné smrti protoplastů z listů *Brassica napus* (Watanabe *et al.* 2002) nebo u suspenzních buněk BY-2 podléhajících různým stresovým působením (NO, Clarke *et al.* 2000; (β -D-galaktosyl)³ Yariv reagent, Chaves *et al.* 2002; ROS, Houot *et al.* 2001).

Morfologie jader s kondenzovaným chromatinem se však liší u jednotlivých typů programované buněčné smrti u rostlinných buněk. Kromě typicky fragmentovaných jader byla pozorována také prodloužená jádra, kromě našich experimentů např. i u rostlin tabáku podléhajících hypersenzitivní reakci po infekci virem mozaiky tabáku (Mittler *et al.* 1997), dále při umírání buněk kortexu kořenů několika obilovin (Liljeroth a Bryngelsson 2001), při senescenci listů *Eucommia ulmoides* (Cao *et al.* 2003) nebo u tabákových buněk BY-2 ovlivněných peroxidem vodíku (Houot *et al.* 2001). U buněk ovlivněných 50 μ M CdSO₄ byla extrémně protažená jádra pozorována již od prvního dne působení (obr. 5.19 B, E). Na základě našich pozorování však nelze spolehlivě říci, zda tato malformace jádra, která pravděpodobně předcházela jadernému rozpadu (obr. 5.19 C E) souvisí s programovaným umíráním buněk, neboť se jedná pouze o nepřímé důkazy (frekvence protažených a rozpadlých jader vztahovaných na jednotku času). Danon a Gallois (1998) předpokládají tuto souvislost u protoplastů *Arabidopsis thaliana* vystavených působení UV-C záření, u nichž pozorovali tři typy jader: a) kulatá jádra, b) srpkovitě prodloužená jádra a konečně c) fragmentovaná jádra, jejichž výskyt a přeměna zřejmě souvisely s řízeným procesem neodvratitelné buněčné smrti.

Naše výsledky zaměřené na studium prodlužování jader v důsledku aplikace hydroxymočoviny jasně ukazují, že prodloužení jader nemusí být nutně následováno jejich fragmentací. Světelná videomikroskopie dokumentuje schopnost protáhlých jader vstoupit do mitózy a znovu se smrštít na kulatá jádra během metafáze mitózy (obr. 5.36). Také grafy protažených a rozpadlých jader po aplikaci 50 μ M CdSO₄ (obr. 5.19 E, F) naznačují, že oba procesy spolu nemusí nutně spolu souviset.

Rozpad jader po aplikaci kadmia tedy zřejmě neodpovídá výše zmíněnému schématu

klasické apoptózy, ale souvisí s vakuolárním kolapsem buněk. Kondenzace jader, rozpad jaderné membrány a následné smísení obsahu jader s vakuolou po jejím rozpadu bylo popsáno například u kortikálních buněk *Sagittaria lancifolia* (Schussler a Longstreth 2000). Obdobné fragmentace jader byly v našich pokusech pozorovány i u buněk BY-2 podléhajících PCD po ovlivnění nízkou teplotou (obr. 5.2 D - M). V tomto případě byl pozorován jednak rozpad mitotických struktur (obr. 5.2 J) a jednak malformace interfázních jader, které také mohly vést až k jejich postupnému rozpadu (obr. 5.2 J - M). Avšak rozpad mitotických struktur je u živočišných buněk často spojován s tzv. mitotickou katastrofou (typem programované buněčné smrti, Castedo *et al.* 2004). V našich pokusech s indukci různých buněčných smrtí po aplikaci síranu kadmenného v určitých fázích buněčného cyklu tento rozpad souvisel pouze s rychlým a tedy neprogramovaným umíráním buněk v M fázi buněčného cyklu. V tomto kontextu je tedy vysoce pravděpodobné, že výše popsaná protažená jádra nalezená po aplikaci iontů kadmia souvisejí s aktivací PCD v určité fázi buněčného cyklu (bližší kap. 6.4).

6.2.2.7. Souhrn cytologických pozorování

Většina pokusů, zejména srovnávací studie faktorů vyvolávající PCD byla provedena s mladými, dělicími se buňkami nacházejícími se v exponenciální fázi růstu. Cytologickou klasifikaci (vezikulace / vakuolizace cytoplazmy, rozpad cytoplazmatické sítě nebo změny v uspořádání endoplazmatického retikula) lze tak využít pouze pro ně. V případě presenescentních stacionárních buněk s jedinou velkou centrální vakuolou toto samozřejmě neplatí. Srovnávací cytologická hodnocení exponenciálních a stacionárních buněk provedena nebyla. Nelze tedy zatím říci, zda se jejich PCD odpovídá v tomto kontextu liší dynamikou. Tyto výsledky prozatím jen zčásti ilustrují úlohu různých buněčných struktur v raných fázích buněčné smrti. Nelze proto pomocí těchto cytologických analýz jednoznačně odlišit smrt programovanou od neprogramované, ale ani dostatečně určit charakter této smrti. Nutným vodítkem je jejich konfrontace s výskytem molekulárních markerů, zejména změny integrity DNA.

6.2.3. Fragmentace DNA

Internukleozomální fragmentace DNA detekovaná pomocí DNA elektroforézy je u živočišných buněk považována za symptom a často také indikátor programované buněčné smrti, zejména apoptotického typu (Wyllie *et al.* 1998). Specifická fragmentace DNA byla však v našich pokusech u buněk linie BY-2 ovlivněných 50 μ M CdSO₄ či kultivací při 4°C nalezena po čtrnácti dnech kultivace, kdy už byly téměř všechny buňky mrtvé (obr. 5.21 K

a 5.3 K), jak je doloženo již v pracích Fojtové a Kovaříka (2001) a Koukalové *et al.* (1997). V našich pokusech bylo ve stejné době detekováno i největší množství fragmentace DNA u jednotlivých buněk *in situ* pomocí tzv. TUNEL reakce (obr. 5.21 A - J a 5.3 A - J, Gavrieli *et al.* 1992), s jejíž pomocí však nelze rozlišit, zda jde o specifickou internukleozomální fragmentaci DNA nebo nespecifickou náhodnou fragmentaci DNA. Kromě uvedených ošetření byla specifická fragmentace DNA na stejném modelovém materiálu (buněkách BY-2) a se stejným časováním popsána po teplotním šoku (Vacca *et al.* 2004) nebo po aplikaci (β -D-galaktosyl)³ Yariv reagentu (Chaves *et al.* 2002).

Narozdíl od uvedených pozorování byla v případě buněk rajčatové suspenzní kultury ošetřené známými induktory PCD u živočišných buněk (camptothecin, staurosporin a fumonisin B1) detekována fragmentace DNA již v době, kdy bylo téměř 30-40 % buněk ještě živých (De Jong *et al.* 2000). Při použití stejných induktorů PCD v našich pokusech na buněkách BY-2, ale nikdy nebyla fragmentace DNA pozorována (data neuvedena), podobně jako po ošetření různými elicitory (např. elicitor harpin, Andi *et al.* 2001, Ichinose *et al.* 2001; elicitor kryptogein Kadota *et al.* 2004a, b, Kadota a Kuchitsu 2006). Příčinou rozdílných výsledků z hlediska detekce internukleozomální fragmentace DNA je zřejmě odlišná reakce rostlinných buněk na různé induktory smrti, ale nelze vyloučit ani rozdílnou reakci různých rostlinných buněk na stejná ošetření či rozdíly dané experimentálním upořádáním a způsobem detekce fragmentace.

V neposlední řadě však srovnání výsledků vlastních i jiných autorů vedlo k sérii pokusů ověřujících, zda vůbec lze výskyt internukleozomální fragmentace DNA u určitého materiálu považovat za spolehlivý marker PCD u rostlin.

6.3. Rychlé zabití buněk

Fragmentace DNA do oligonukleozomálních jednotek byla poprvé popsána u apoptoticky umírajících živočišných buněk (Wyllie *et al.* 1980). U rostlinných buněk byla specifická fragmentace DNA mj. popsána u buněk BY-2 kultivovaných při nízké teplotě (4°C, Koukalová *et al.* 1997) nebo u buněk ovlivněných síranem kademnatým (50µM CdSO₄, Fojtová a Kovařík 2000). Ačkoliv elektroforetická detekce fragmentace DNA je považována za jeden z typických projevů a současně indikátorů programované buněčné smrti, bylo ukázáno, že k této fragmentaci může docházet i u živočišných buněk, které umírají neprogramovaně (Dong *et al.* 1997, obr. 5.24).

U rostlinných buněk tento fenomén nikdy nebyl popsán. Výsledky našich pokusů však ukázaly, že fragmentace DNA do oligonukleozomálních jednotek je detekovatelná u třech odlišných typů rychlého zabití buněk (zamražením v tekutém dusíku, mechanicky zabíjením v kulovém mlýnku a 5% Tritonen X-100, obr. 5.24 D, G, H). Oproti tomu v případě buněk relativně rychle zabíjených po aplikaci 1mM CdSO₄ fragmentace pozorována nebyla (Fojtová a Kovařík 2001, obr. 5.24 C). Vzhledem ke skutečnosti, že 1mM CdSO₄ významně neinhiboval fragmentaci DNA u buněk zabíjených zamražením v tekutém dusíku (obr. 5.24 E), nebyla zřejmě nepřítomnost fragmentace po přímé aplikaci 1mM kadmia důsledkem přímé inhibice enzymatických aktivit relevantních exekučních enzymů vysokou koncentrací iontů kadmia. Proto byla studována i morfologie umírajících buněk.

Cytologická analýza materiálu ukázala, že ve všech třech případech, kde byly buňky zabity rychlým zamražením, mechanicky nebo pomocí detergentu docházelo téměř okamžitě ke ztrátě integrity membrán, zejména tonoplastu (obr. 5.26), bylo zřetelně pozorovatelné pomocí konfokálního mikroskopu jak po obarvení buněk standardní linie BY-2 specifickou lipidickou sondou FM4-64 (Kutsuna a Hasezawa 2002, obr. 5.26 C, G, K, O), tak po použití transgenní linie BY/GV7 kódující fúzní protein s GFP lokalizovaným do tonoplastu (Kutsuna a Hasezawa 2002, obr. 5.26 B, F, J, N).

Na rozdíl od buněk zabíjených mechanicky či působením detergentu měly buňky, které zemřely po několika hodinách působení 1mM CdSO₄, víceméně zachovanou vakuolární síť (obr. 5.26 I - L), což koresponduje s faktem, že v tomto případě nebyla pozorována fragmentace DNA. Velké změny v uspořádání vakuolárního systému (splývání vakuol) doprovázené postupnou indukcí programované buněčné smrti byly naopak pozorovány u buněk ovlivněných 50µM CdSO₄ (obr. 5.26 E - H). Podobně jako ztráta integrity tonoplastu, tak internukleozomální fragmentace DNA byly u těchto buněk pozorovány až v pozdních fázích umírání buněk. Všechny tyto morfologické změny ukazují na to, že internukleozomální fragmentace DNA zřejmě souvisí se ztrátou integrity membrán, zejména tonoplastu.

Důležitou roli při programované buněčné smrti hraje u většiny rostlinných buněk vakuolární kolaps, při němž dochází k uvolnění hydrolytických enzymů ven z vakuol (Jones 2001). Regulovaný vakuolární kolaps doprovázený vylitím hydroláz byl poprvé popsán při vývoji tracheálních elementů (Groover a Jones 1999). Zvýšená vakuolizace buněk byla také popsána při umírání buněk aleuronové vrstvy (Bethke *et al.* 1999), při somatické embryogenezi (Filonova *et al.* 2000) nebo při hypersenzitivní reakci (Hatsugai *et al.* 2004). Výsledky našich pokusů ukazují, že exekuční fáze programované buněčné smrti, která je za normálních okolností spouštěna programovaným vakuolárním kolapsem, může být navozena i u neošetřených buněk rychlým rozbitím vakuoly. Při něm se zřejmě z vakuoly uvolňují přímo aktivní DNázy nebo aktivující proteázy, které způsobují degradaci buněčného obsahu.

V experimentálním systému kultury izolovaných mezofylových buněk, kde je diferenciace TE indukována fytohormony, byla identifikována ZEN I nukleáza, jejíž aktivita korelovala s autolýzou během vývoje TE (Ito a Fukuda 2002). ZEN I, která nezpůsobuje specifickou internukleosomální fragmentaci DNA, je transportována v aktivní formě do vakuoly až během diferenciace TE a za normálních okolností zde není přítomná (Kuriyama 1999, Groover a Jones 1999, Ito a Fukuda 2002). U živočišných buněk podléhajících programované buněčné smrti apoptotického typu dochází k aktivaci specifických nukleáz (CAD, Enari *et al.* 1998; DNase I., Oliveri *et al.* 2001 a DNase II, Barry a Eastman 1993) pomocí cysteinových proteáz, kaspáz. Specifické nukleázy však mohou být aktivovány také alternativní cestou, která je na kaspázách nezávislá. U živočišných buněk byla zjištěna aktivace nukleázy L-DNázy II pomocí serinových proteáz (Torrighia *et al.* 1999). U rostlinných buněk mechanismus aktivace nukleáz zodpovědných za specifickou fragmentaci DNA není doposud příliš znám. Fragmentace DNA indukovaná toxinem viktorinem u buněk ovsa byla závislá na cysteinových proteázách (Kusaka *et al.* 2004). Avšak typické živočišné cysteinové proteázy kaspázy nebyly u rostlin identifikovány (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Jejich roli zde mohou zastávat jiné cysteinové proteázy, VPE (z anglického *vacuolar processing enzymes*), jak bylo ukázáno při programované buněčné smrti vyvolané infekcí virem mozaiky tabáku (Hatsugai *et al.* 2004, Kuroyanai *et al.* 2005). I v našich pokusech se zjevně na aktivaci nukleáz podílely cysteinové proteázy, neboť byla fragmentace DNA zdárně potlačena pomocí inhibitoru cysteinových proteáz E-64c (obr. 27 A). Jelikož byla fragmentace navíc doprovázena rozpadem vakuolárních membrán (obr. 26), jsou VPE vhodným kandidátem pro aktivaci DNáz u rychle zabitých buněk, byť nukleázy aktivované pomocí VPE po infekci virem mozaiky tabáku způsobovaly pouze nespecifickou degradaci DNA (Hatsugai *et al.* 2004). Z našich výsledků lze navíc usuzovat, že nukleázy

zodpovědné za internukleozomální fragmentaci DNA jak u rychle zabitých buněk, tak u buněk umírajících pomalu (programovaně), jsou zřejmě aktivovány stejnými proteolytickými enzymy. Naproti tomu u živočišných buněk, kde je apoptotická fragmentace DNA (aktivace nukleáz) zprostředkována zejména cysteinovými proteázami, byla fragmentace DNA u nekroticky umírajících buněk aktivována serinovými proteázami (Dong *et al.* 1997).

Vzhledem k téměř okamžité neprogramované degradaci DNA (a patrně i dalších buněčných komponent) při desintegraci intaktních buněk se zdá, že rostlinné buňky jsou pravděpodobně předurčeny k velmi rychlé autolýze v případě závažnějšího mechanického poškození. Jejich enzymatický aparát je připraven k aktivaci specifické fragmentace DNA, která může být realizována nejen při programovaném vakuolárním kolapsu, ale i po rychlém zabití buněk. Otázkou však zůstává, co je důvodem takovéto predispozice buněk? Jelikož mechanické poškození rostlinných pletiv je relativně častým jevem a může být spojeno s průnikem nejrůznějších patogenů do rostliny, může rychlá autolýza poškozených buněk představovat obranný mechanismus rostliny, obdobný např. hypersenzitivní reakci.

Z našich pozorování vyplývá, že na základě přítomnosti internukleozomální fragmentace nelze zcela spolehlivě rozlišit mezi programovanou a neprogramovanou smrtí buněk. Proto je nutné, hlavně u buněk, které byly zabity velmi rychle, vždy hodnotit i morfologické změny po studovaném ošetření, zejména pak změny integrity tonoplastu. Z tohoto důvodu byla vytvořena tabulka, která by mohla sloužit jako klíč k určení relevantnosti DNA žebříčku při buněčné smrti u tabákové linie BY-2 (tab. 6.1).

Tab. 6.1. Prukaznost internukleozomální fragmentace DNA u tabákové linie BY-2

Rychlost zabití	DNA žebříček	Integrita buněk	PCD	Příklad
pomalá (několik dnů) živé	NE	ANO	ANO	50 μ M CdSO ₄
	NE	ANO	NE	neovlivněná kontrola
ihned (min) rychlá (h)	ANO	NE	NE	rychlé zabití buněk
	NE	ANO	NE	1mM CdSO ₄

6.4. Buněčný cyklus

Programovaná buněčná smrt indukovaná jak ionty kadmia, tak chladovým působením na buňky BY-2 vyvolala vždy odpověď jen části populace buněk. Předpokládali jsme proto mj., že reagují jen ty buňky, které jsou při ovlivnění v určité fázi buněčného cyklu. Studium indukce PCD pomocí síranu kademnatého v závislosti na fázi buněčného cyklu vyžaduje zvládnutí účinné synchronizace buněk BY-2, proto byl nejprve studován pouze účinek samotných antireplikativních látek, aby se minimalizovalo možné vzájemné ovlivnění s působením síranu kademnatého.

6.4.1. Účinná a jemná synchronizace buněk BY-2 pomocí hydroxymočoviny

Obě použité látky aphidicolin (APC) i hydroxymočovina (HU) blokují buněčný cyklus na přechodu G1/S fáze, ale liší se mechanismem svého účinku. APC blokuje syntézu DNA tím, že inhibuje aktivitu DNA polymerázy α (Sala *et al.* 1980, Bryant *et al.* 1992). HU je zase velmi účinným inhibitorem ribonukleotid reduktázy, klíčového enzymu syntézy dNTP (Adams a Lindsay 1967).

Účinnost synchronizace buněk BY-2 pomocí HU byla stejná jako synchronizace buněk pomocí běžně používaného APC, prakticky všechny buňky se rozdělily během mitózy trvající přibližně 5-6 hodin (obr. 5.28 B). Vyššího maxima mitotického indexu (MI) bylo dosaženo po použití látky APC (např. Nagata *et al.* 1992, Samuels *et al.* 1998), což by mohlo být chybně považováno za účinnější synchronizaci dělení buněk. Jelikož trvání mitózy jednotlivých buněk BY-2 je za normálních podmínek kolem 2,5 hod (Świątek *et al.* 2002), vyšší a širší křivka MI po aplikaci APC ukazuje na prodloužení trvání mitózy u jednotlivých buněk (za situace, kdy se v případě obou ošetření rozdělily v daném intervalu všechny buňky). Vyšší maximum mitóz pak odráží častější překryvy (počáteční fáze) časných a (koncových fází) pozdních mitóz v populaci synchronizovaných buněk.

Prodloužení normálního trvání mitózy může často ukazovat na poškození buněk, které pak vede k následnému zastavení v postupu buněčným cyklem (Paulovich *et al.* 1997). Což pravděpodobně souvisí také se zvýšenou indukcí buněčné smrti po zablokování buněčného cyklu pomocí APC u lidských rakovinných buněk (Matthew *et al.* 2007). Navíc, tvar a výška křivky MI po synchronizaci buněk pomocí APC je podobná křivce MI po aplikaci kadmia v G2 fázi (při synchronizaci HU, pro porovnání obr. 5.28 B, D). Efekt kadmia by při použití APC nemusel být odlišitelný od působení samotného antireplikativa. Z uvedených důvodů se HU ve 4mM koncentraci ukazuje jako velmi vhodná látka pro spolehlivou a účinnou synchronizaci buněk BY-2.

6.4.2. Kadmium způsobuje různé typy buněčné smrti při aplikaci v různých fázích buněčného cyklu

Přidání 50 μ M CdSO₄ ve všech fázích buněčného cyklu vyvolalo masivní umírání buněk. Charakter buněčné smrti přímo souvisel s pozicí buněk v buněčném cyklu, ve kterém bylo přidáno kadmium. Programovaná buněčná smrt indukovaná u buněk s kadmiiem přidaným v S a G2 fázi buněčného cyklu byla podobná živočišné apoptóze („apoptosis-like PCD“) tím, že vykazovala typickou internukleozomální fragmentaci DNA. Pozorováno bylo i vysoké procento TUNEL-pozitivních jader. Smrt buněk indukovaná kadmiiem v M a G1 fázi nebyla fragmentací DNA doprovázena. Cytologická analýza buněk v těchto pokusech byla pouze orientační, chování vakuomu nebylo detailně sledováno, jako v pokusech s rychlým zabitím buněk (viz kap. 5.2). Jelikož nebyla fragmentace DNA, která je důsledkem vyplavení nebo aktivace hydrolytických enzymů, pozorována v případě pomalé buněčné smrti indukované ionty kadmia v G1 fázi, zřejmě k buněčné lyzi nedocházelo. Tento druh smrti je tedy dále zkráceně nazýván nelytická G1 buněčná smrt („non-lytic G1 cell death“). Kadmium přidané k buňkám v M fázi buněčného cyklu indukovalo odlišný typ velmi rychlé buněčné smrti, tzv. mitotickou smrt („mitotic cell death“), která byla charakteristická rychlým rozpadem mitotického aparátu (fragmentací pozdně telofázních jader). Lze se domnívat, že buňky vstupující do mitózy, během níž je rozpuštěn jaderný obal, asi dočasně a výrazně snižují agresivitu hydrolytických enzymů, a tedy riziko nechtěné sebevražedné reakce. Absence specifické fragmentace DNA u těchto buněk by této představě odpovídala.

Odezva buněk BY-2 na kadmium byla podobně jako odezva na bakteriální elicitor kryptogein závislá na pozici buněk v buněčném cyklu v okamžiku aplikace látky. Kryptogein indukoval aktivaci obranných genů a buněčnou smrt jen v S a G1 fázi buněčného cyklu, přičemž tato odpověď byla potlačena během G2 a M fáze (Kadota *et al.* 2004b). Rozdílné působení iontů kadmia a elicitoru kryptogeinu je pravděpodobně závislé na cílovém místě jejich působení. Účinek kryptogeinu je vysoce specifický, naopak účinek obecného stresoru kadmia je silně pleiotropní. Kadmium ovlivňuje mnoho metabolických procesů nezávisle na buněčném cyklu: způsobuje oxidativní stres (Sandalio *et al.* 2001, Olmos *et al.* 2003), inhibuje aktivitu mnoha antioxidantních enzymů (Piqueras *et al.* 1999, Olmos *et al.* 2003), anebo způsobuje změny ve funkčnosti membrán tím, že peroxiduje lipidy (Skorzynska-Polyt a Krupa 2003). Kadmium způsobuje také genotoxické změny, zejména bodové mutace a chromozomální aberace (Zhang a Xiao 1998), které pravděpodobně souvisejí s nahrazením iontů kadmia za ionty zinku například v proteinech s motivem zinkového prstu (Predki a Sakar 1992), účastnících se mj. reparace DNA (Hartwig *et al.* 2002). Rychlé poškození DNA bylo dokumentováno také pomocí kometového testu u *in vitro* pěstovaných rostlin tabáku a

bramboru (Gichner *et al.* 2006).

I když je efekt kadmia velmi pleiotropní, charakter buněčné smrti indukované přidáním kadmia k buňkám v S a M fázi mohl být poměrně specifický – v S fázi ionty kadmia zřejmě narušily replikaci DNA, v M-fázi zřejmě navodily rychlý rozpad mitotického aparátu. Velmi zajímavé je zejména srovnání pomalé programované buněčné smrti podobné apotóze (indukované v G2 fázi) s pomalou nelytickou smrtí indukovanou v G1.

Výsledky pokusů sledujících indukci fragmentace DNA po rychlém zabití buněk (viz kap. 5.2) ukazují, že neovlivněné buňky BY-2 jsou predisponovány k rychlé indukci internukleozomální fragmentace DNA. Ta byla detekovaná již první den po rychlém mechanickém zabití buněk, při němž nebylo možné aktivovat pochody vedoucí až k PCD. Naproti tomu, fragmentace DNA, bezprostředně související s PCD podobné živočišné apotóze, je doprovázena pomalým umíráním buněk, u nichž posléze dochází k tzv. vakuolárnímu kolapsu – uvolnění hydrolytických enzymů z vakuoly (Groover a Jones 1999). Vzhledem k uvedeným poznatkům předpokládáme, že absence fragmentace DNA po aplikaci kadmia v M a G1 fázi je důsledkem (řízeného) potlačení autolýzy (tedy vyplavení či aktivace hydrolytických enzymů). Jelikož různé typy rostlinné PCD spojuje jeden společný znak, a to rozpad vakuol a následné vyplavení hydrolytických enzymů vedoucí až k autolýze buněk (Jones 2001), domníváme se, že mitotická smrt a nelytická G1 smrt nemají charakter programované buněčné smrti.

Charakter jednotlivých typů buněčné smrti po aplikaci kadmia zřejmě souvisel s přechodem přes kontrolní body buněčného cyklu, které obecně směřují buňku v závislosti na míře poškození buď k reparaci, nebo k nezvratným procesům vedoucím až k programované sebevraždě. Existují tři základní body buněčného cyklu, ve kterých je kontrolováno poškození buněk: jde o přechod mezi G1 a S fázi, o samotnou S fázi a konečně pak přechod mezi G2 a M fázi buněčného cyklu (Paulovich *et al.* 1997). Integrita DNA, narušená po ovlivnění buněk kadmíem (Zhang a Xiao 1998, Gichner *et al.* 2006), je předmětem kontroly před vstupem do S a M fáze buněčného cyklu (Sobkowiak a Deckert 2004). S ohledem na zmíněné kontrolní body buněčného cyklu by mohlo k indukci specifické (apotóze podobné) buněčné smrti u buněk BY-2 docházet na přechodu G2/M, neboť přidání síranu kademnatého v předchozích fázích (tzn. S a G2) způsobuje smrt doprovázenou internukleozomální fragmentací DNA.

Charakter umírání buněk v závislosti na přidání kadmia v G1 a G2 fázi (tedy u nelytické, pomalé buněčné smrti a apotóze podobné PCD) je silně v rozporu s efektem kryptogeinu, který vyvolal umírání buněk v G1 fázi, zatímco v G2 fázi byla indukce smrti potlačena (Kadota *et al.* 2004b). Kadota a Kochitsu (2006) předpokládají, že indukce jak obranných mechanismů, tak PCD může být potlačena u dělících se buněk. Naopak

diferencované nedělící se buňky (např. mezofylové buňky listů nacházející se v G0 nebo G1 fázi buněčného cyklu) jsou přirozeným cílem elicitorů, které v nich indukují hypersenzitivní reakci, která slouží k potlačení šíření patogenů z místa infekce.

Kadmium a pravděpodobně i jiné abiotické stresory působí na různé buněčné procesy a většinou poškozuji buňky v celé rostlině. Proto musí být odezva rostlin na jejich působení naprosto odlišná od lokalizované hypersenzitivní reakce buněk indukované infekcí patogenů. Jestliže by všechny poškozené buňky odpovídaly na působení kadmia (abiotického stresoru) hypersenzitivním způsobem, tedy indukcí masivní PCD, pak by to znamenalo rychlou smrt celé rostliny. Indukce PCD tedy může být u diferencovaných nedělících se buněk potlačena, jak naznačuje charakter umírání buněk v G1 fázi (nelytická G1 buněčná smrt), tak aby bylo možné aktivovat reparační procesy. Pomalé umírání těchto buněk a absence fragmentace DNA ukazuje na neprogramovanou buněčnou smrt, pravděpodobně způsobenou postupnou akumulací různých poškození buňky.

Na druhou stranu však rostliny potřebují udržet genetickou integritu meristematických buněk, která je nezbytná pro další růst a reprodukci rostlin. Poškozené buňky musí být tedy účinně odstraňovány, což se zřejmě děje programovanou buněčnou smrtí, jak ukazují apoptotické rysy buněčné smrti indukované kadmiiem aplikovaným v S a G2 fázi buněčného cyklu.

6.5. Protahování jader

6.5.1. Tvar interfázních jader

Tvar interfázních jader rostlinných buněk je ovlivněn různými faktory: typem buněk nebo pletiv, stářím buněk, fází buněčného cyklu, ve kterém se buňka právě nachází. V rostlinných buňkách jsou nejčastěji pozorována jádra kulatá, někdy se v interfázi objevují jádra čočkovitá. V některých případech však jádra do značné míry kopírují tvar buněk a výsledný tvar jádra je pak dán charakterem příslušného pletiva nebo buňky. Například protažená jádra byla pozorována u dlouhých protáhlých buněk v prodlužovací zóně kořene, zatímco činkovitá jádra zase do jisté míry kopírují tvar svěřacích buněk průduchů trav (Pazourek a Votrubová 1997, <http://kfrserver.natur.cuni.cz/kfrserver/studium/prednasky/anatomie/index.html>). Prodloužená jádra byla také nalezena ve specializovaných buňkách kořenových vlásků (Chytilová *et al.* 1999) a pylových láček (Laitinen *et al.* 2002). Přestože, je tento jev pozorován téměř od začátku oboru anatomie a fyziologie rostlin, není zatím známo, proč se jádra v těchto buňkách protahují.

Co je však příčinou protahování jader u nesespecializovaných buněk buněčných suspenzních kultur, u nichž lze mj. vyloučit účinek externích mechanických tlaků? Je v těchto buňkách dán protažený tvar jader stářím buňky?

Pro buňky linie BY-2 je typický kulovitý jaderný tvar. Pouze jen jádra velmi starých buněk jsou víceméně oválná v důsledku tlaku centrální vakuoly na zbylou povrchovou vrstvu cytoplazmy, v níž se jádro nachází. Jelikož byla protažená jádra v buněčné kultuře BY-2 prvně pozorována po aplikaci známých induktorů živočišné PCD (camptothecin, data neuvedena) a síranu kademnatého (obr. 5.19), jedna z výchozích hypotéz předpokládala, že by protahování jader mohlo být průvodním jevem či předzvěstí PCD. Takováto jádra byla navíc několikrát popsána při nejrůznějším programovaném umírání rostlinných buněk i v literatuře (např. Mittler *et al.* 1997, Liljeroth a Bringelsson 2001, Hout *et al.* 2001). U protoplastů *Arabidopsis thaliana* vystavených působení UV-C záření byla protažená jádra považována za možný předstupeň fragmentace jader (Danon a Gallois 1998). Naše pozorování tuto souvislost pouze nepřímo naznačují – nástup rozpadlých jader vlivem delšího působení 50 μ M CdSO₄ časově odpovídá poklesu množství protažených jader (obr. 5.19). Za určitých podmínek (např. dlouhodobé stresové působení) je tedy možné, že elongovaná jádra podléhají rozpadu a následně odumírají spolu s celou buňkou. Přímý důkaz, tedy nasnímaní rozpadu protažených jader pomocí časosběrné videomikroskopie, lze získat jen velmi obtížně, zejména kvůli velmi pomalému rozpadu jader, jehož přesné časové rozpětí není u rostlinných buněk známo.

Protahování jader však bylo u buněk BY-2 pozorováno i v situacích, kdy PCD

nalezena nebyla, např. při synchronizaci buněk pomocí HU nebo APC, a proto tento jev nelze považovat za symptom specifický pro PCD. Při synchronizaci pomocí HU, kdy je po vymytí antireplikativa pozorováno až cca 40% protažených jader, bylo počítáním hustoty buněk před a po proběhlé mitóze zjištěno, že všechny buňky, tedy i ty, které měly protažená jádra, se musely rozdělit. Osud protaženého jádra byl posléze i přímo dokumentován pomocí časosběrné videomikroskopie zachycující smrštění protaženého jádra během počátečních fází mitózy (obr. 5.36). Protažená jádra tedy mohou kromě zmiňovaného rozpadu na mikrojádra (při probíhající PCD) rovněž vstoupit do mitózy a rozdělit se.

6.5.2. Mechanismus protahování interfázních jader

Jaký je mechanismus protahování interfázních jader a co je příčinou protahování jader? Tvarové změny interfázních jader mohou být důsledkem ovlivňování různých buněčných struktur, s nimiž může být jádro propojeno.

6.5.2.1. Úloha buněčné stěny

Buněčná stěna je spoluzodpovědná za tvar buňky, a tedy by se mohla podílet i na tvarování jader. Naše výsledky s protoplasty ukázaly, že intaktní buněčná stěna (pravděpodobně přes zprostředkovanou interakci) je v případě ošetření HU nutná pro vznik protažených jader. Protažená jádra se nevyskytovala ani v protoplastech izolovaných z buněk původně obsahujících tato jádra (a to až v cca 40%), ani nebyla pozorována v protoplastech dodatečně ovlivněných HU (koncentrací navozující protahování jader v buňkách při synchronizaci, obr. 5.38). Naopak u protoplastů *Arabidopsis thaliana* byla pozorována protažená jádra po působení UV-C záření vyvolávající PCD (Danon a Gallois 1998), což naznačuje možný rozdílný mechanismus protahování jader souvisejícího s PCD.

6.5.2.2. Úloha cytoskeletu

Působení buněčné stěny na tvar jader by mohlo být do jisté míry zprostředkováno přes cytoskeletální proteiny (aktinová filamenta a mirotubuly) ukotvené jedním koncem v plazmatické membráně nebo buněčné stěně a druhým koncem na jaderné membráně. Tímto způsobem zřejmě rostlinná buňka zajišťuje pozici jádra během interfáze, případně řídí jeho usměrněné pohyby.

Aktivní úlohu cytoskeletu v protahování naznačuje i pozorování Chytilové *et al.* (1999), kteří pozorovali pomocí GFPs jaderným lokaličním signálem změny tvaru a pohyby jader v kořenových vláscích *Arabidopsis thaliana* (Chytilová *et al.* 2000, Śliwińska *et al.* 2002). Role cytoskeletu v protahování jader byla studována aplikací jak mikrotubulárních,

tak aktinových drog. Jelikož pohyby a protahování jader bylo možné zablokovat pomocí aktinových drog (latrunkulinu B a cytochalazinu D) zatímco mikrotubulární drogy neměly na protahování jader žádný vliv, autoři předpokládají, že jak změny tvaru jader, tak jejich pohyb je způsoben aktinovými filamenti (Chytilová *et al.* 2000). Oproti tomu u kořenových vlásků *Medicago truncatula* bylo zjištěno, že za pozici jádra uvnitř buňky jsou zodpovědné pouze mikrotubuly (Sieberer *et al.* 2002). V našich pokusech s cytoskeletálními drogami (latrunkulinem B a oryzalinem) nebyla po jejich společném působení s HU nikdy nalezena žádná protažená jádra. Pravděpodobně jsou tedy obě složky cytoskeletu (aktinový i mikrotubulární cytoskelet) nutné pro protahování interfázních jader a jejich pohyb do středu buňky.

Pro posouzení úlohy cytoskeletu byl rovněž studován jeho stav v buňkách s protaženými jádry. Pomocí transgenní linie BY-2/GT-16 s GFP značenými mikrotubuly byl pozorován standardní stav tranverzálně uspořádaných mikrotubulárních vláken v kortikální oblasti. V oblasti kolem jádra a cytoplazmatických provazcích byla pozorována vlákna jdoucí od pólů jádra k okraji buňky (obr. 5.40). Tyto tzv. radiální mikrotubuly jsou typické pro S fázi buněčného cyklu (např. Kumagai a Hasezawa 2001). Výraznější účinek mělo ošetření HU na aktinový cytoskelet. Při protahování jader byl pozorován (pomocí transgenní linie BY-2/TGFP3 s GFP značenými aktinovými filamenti) rozpad kortikální sítě aktinových filament a tvorba „jaderného košíčku“ ze svazků vláken aktinových filament (obr. 5.42). Hustá síť aktinových vláken propojovala jaderné póly a oba konce buňky.

V buňkách ovlivněných synchronizačním agens HU byly pomocí konfokálního mikroskopu pozorovány na povrchu jader četné invaginace se signálem GFP značených mikrotubulů a aktinových filament a pravděpodobně i kanály protínající jádro (obr. 5.40 a 5.42). Podobné invaginace byly nalezeny jak u živočišných buněk - NIH-3T3 nebo HeLa buněk (Johnson *et al.* 2003, Lee *et al.* 2006), tak např. u rostlinných buněk cibule nebo tabáku NT-1 (Collings *et al.* 2000, Gupton *et al.* 2006). U živočišných buněk bylo pomocí TEM ukázáno, že tyto rýhy nebo invaginace mohou být značně hluboké a pravděpodobně vedou ke zvětšení povrchu jader. Takové rýhy mohou pravděpodobně vznikat invaginacemi obou jaderných membrán, z jaderných vakuol a membránami obalených inkluzí.

Rýhy, invaginace a možné transjaderné kanály by u prodloužených buněk mohly usnadnit signalizaci mezi jádrem a cytoplazmou při stresovém působení, jak bylo popsáno u živočišných i u rostlinných buněk (Lui *et al.* 1998a,b, Collings *et al.* 2000, Gupton *et al.* 2006). Ficker *et al.* (1997) předpokládají význam jaderných rýh zejména v exportu mRNA do cytoplazmy. Nami pozorovaná přítomnost mikrotubulů i aktinových filament v těchto rýhách by v souladu s uvedenými předpoklady mohla sloužit k signalizaci nebo transportu

látek do jádra nebo z něho při stresu. To by odpovídalo i pozorování Collingse *et al.* (2000), kteří u tabákových buněk NT-1 (charakterem podobných buňkám BY-2) našli svazky aktinových filament v jaderných rýhách, kde zřejmě podporovaly proudění cytoplazmy. Vzhledem k nutnosti přítomnosti intaktního cytoskeletu pro protahování jader by však invaginace mikrotubulů a aktinových filament mohly mít kromě signalizační funkce i funkci strukturní, podpůrnou, stabilizační.

Celkově z našich výsledků vyplývá, že protahování interfázních jader je zřejmě zprostředkováno interakcí buněčné stěny s cytoskeletálními proteiny, které by mohly způsobovat přímé natahování jader. Nemusí se však nutně jednat o proces specifický, ale samo protahování jader může být pouze projevem nespécifické reakce buněk na stresové působení v podmínkách prostředí, kdy mohou růst, ale nemohou se dělit.

6.5.2.3. Úloha jaderného skeletu

Tvar interfázního jádra nejen u rostlinných buněk je dán také vnitřní strukturou samotného jádra. Ten byl již potvrzen u živočišných buněk (Holaska *et al.* 2002), u rostlinných buněk se o karyoskeletu neví prakticky nic. Jaderný skelet je u živočišných buněk tvořen sítí proteinů, intermediálních filament, jejichž hlavní součástí jsou lamíny (lamín A, B a C). Jejich funkcí je stabilizace jaderného povrchu, přestavba během mitózy, ukotvení chromatinu nebo případně fragmentace jader (Broers *et al.* 2006). Avšak homology živočišných lamín u rostlin nebyly nalezeny (Meier *et al.* 2001).

Obecně přijímaná teorie sice říká, že u buněk s buněčnou stěnou (rostlinné buňky a kvasinky) není pravděpodobně z evolučního hlediska nutná strukturní ochrana jader (např. Galbraith 2004), ale přesto již byly nalezeny kandidátní coiled-coil proteiny pro tuto funkci i u rostlin: 1) laminům biochemicky podobný protein NMCP1 (z anglického nuclear matrix constituent protein 1) mrkve, celeru a *Arabidopsis thaliana* (Masuda *et al.* 1997). 2) Funkčním homologem živočišných lamín jsou považovány FPPs (z anglického long filament-like plant proteins) nalezené u rýže, rajčete a *Arabidopsis thaliana* (Gindullis *et al.* 2002). Mezi ně patří i MAF1 protein, lokalizovaný na periférii jader tabákových buněk (Gindullis *et al.* 1999, Gindullis a Meier 1999). 3) Typicky rostlinný, vysoce konzervativní strukturní jaderný protein NMP1 (z anglického nuclear matrix protein 1) byl nejprve nalezen u rajčete (Rose *et al.* 2003). 4) Dalšími laminům podobnými proteiny jsou myosinu a tropomyosinu podobné 65 a 60kDa proteiny (Blumenthal *et al.* 2004). 5) Ve vazbě na jadernou matrix byl identifikován MFPI (z anglického MAR binding filament-like protein 1), který má vazebné místo pro DNA (Meier *et al.* 1996). 6) V neposlední řadě do této skupiny patří i AHM1 protein (z anglického AT hook containing MAR binding protein 1), který se taktéž váže na

jadernou matrix (Morisawa *et al.* 2000).

Naše pokusy s rychlou izolací protažených jader pomocí sonikátoru z buněk ovlivněných HU v čase nejvyššího výskytu protažených jader (obr. 5.43), však ukazují, že takto izolovaná jádra jsou schopna po několik hodin udržet protažený tvar i bez přítomnosti buněčné stěny, plazmalemy a cytoskeletu. Buněčná stěna je tedy sice nutná pro vznik prodloužených jader (viz kap. 5.4), ale není nutná pro udržení tvaru již prodloužených jader. Není-li tvar jádra udržován pouhou „tvarovou pamětí chromatinu“, podílí se na něm velmi pravděpodobně struktura obecně označovaná jako jaderný skelet.

To by aspoň částečně naznačovaly i výsledky aplikace širokospektrého inhibitoru živočišných intermediálních filament akrylamidu, poníž bylo protahování jader (indukované HU) pozorováno. Ačkoliv je akrylamid inhibítorem zejména vimentinu (Arocena 2006), který není v rostlinách přítomen, je možné že u rostlinných buněk je schopen inhibovat i jiná strukturně podobná intermediální filamenta.

Z předložených výsledků však zatím nelze uzavřít, zda pozorovaný fenomén prodlužování interfázních jader buněk linie BY-2 bezprostředně souvisí s nástupem některého z typů PCD nebo nikoliv. Nejspíše se jedná o obecnou stresovou reakci do určité míry reversibilní. Zda později napomáhá např. procesu fragmentace jader nelze odhadnout.

7. SOUHRN

Použité stresory – nízká teplota (4 °C) i ionty kadmia – očekávaně vyvolávaly, v závislosti na použité koncentraci či délce působení stagnaci dělení, celkového příbytku biomasy a posléze i smrt buněk tabákové linie BY-2.

Tato smrt měla různou frekvenci i charakter. Nicméně však ani předpokládaně fyziologicky homogenní buněčná populace (kultury nacházející se v exponenciální fázi růstu) nereagovala vyrovnaně. Zřetelně se tedy ve stresově inhibiční a posléze i letální reakci buněk na daný faktor odrazil jejich aktuální fyziologický stav. V tomto kontextu byl podrobněji studován vliv postavení buněk v buněčném cyklu na frekvenci i charakter buněčné smrti.

K hodnocení typů buněčné smrti u buněčné kultury BY-2 byla použita celá řada molekulárních, biochemických i cytologických markerů. Výsledky potvrdily, že terminologii resp. fenomenologii standardně používanou pro studium buněk živočišných lze jen velmi obtížně použít pro charakterizaci chování rostlinných buněk. Různé příčiny může mít kolaps jader, obtížně hodnotitelné jsou změny plazmatické membrány, různý průběh (a tedy i mechanismus) může mít vakuolární kolaps. Hodnotící stupnici je tedy nutno standardizovat pro konkrétní pokusný model a v každém případě kombinovat více přístupů (molekulárních i cytologických).

Společným jmenovatelem reakce rostlinných buněk na všechna stresová působení je pravděpodobně zvýšená vakuolizace buněk a následný vakuolární kolaps, po němž dochází k rozpadu buněčných organel a následně k rychlé lyzi celé buňky. Po vyplavení hydrolytických enzymů z rozpadlých vakuol dochází k internukleozomální fragmentaci DNA. Při němž se pravděpodobně z vakuol uvolňují buď aktivní DNázy nebo aktivují proteázy způsobující degradaci buněk. V našich pokusech jsme však ukázali, že lyze buněk může být také navozena tzv. rychlým zabitím neošetřených buněk. Sám výskyt DNA žebříčku v rostlinném materiálu tedy ještě není zárukou toho, že buňky zahynuly programovaně.

8. ZÁVĚRY

1. Ionty kadmia a chlad spolehlivě navodily buněčnou smrt zejména programovaného typu

- Pomocí kultivace exponenciálních buněk BY-2 v médiu obohaceném o 50 μ M koncentraci síranu kademnatého a při nízké teplotě (4°C) byla spolehlivě navozena programovaná buněčná smrt (detekována jako internukleozomální fragmentace DNA pomocí DNA elektroforézy). Nelze však vyloučit i podíl neprogramované buněčné smrti na celkovém „úhynu“ kultur.

2. Programované umírání buněk bylo doprovázeno četnými morfologickými změnami, ale jen omezeně specifickými

- Obapoužité stresory vyvolaly nejrozličnější morfologické změny v buňkách (protahování buněk, malformace až rozpad interfázních jader, zvýšená vakuolizace buněk), které vedly až k jejich zániku. Některé z těchto změn byly klasifikovány jako průvodní jevy programovaného umírání buněk, jiné byly pravděpodobně jen nespecifickou reakcí buněk na stresové působení.

3. Výskyt internukleozomální fragmentace DNA do oligonukleozomálních jednotek není spolehlivým indikátorem procesu PCD

- Relevance DNA žebříčku (internukleozomální fragmentace DNA) jako průvodního jevu programované buněčné smrti byla potvrzena v případě pomalého (programovaného) umírání buněk. Naopak byla pozorována jako „artefakt“ při velmi rychlém zabití buněk. Tento jev souvisel s tzv. vakuolárním kolapsem, následným vyplavením hydrolytických enzymů způsobujících pak lyzi buněk.

4. Různé fáze buněčného cyklu jsou různě citlivé k působení 50 μ M CdSO₄

- Aplikace 50 μ M CdSO₄ v různých fázích buněčného cyklu u synchronizovaných buněk vyvolala rozdílné reakce buněk vedoucí k jejich rozdílnému umírání. Živočišné apoptóze podobná buněčná smrt byla detekována u buněk ovlivněných kadmiiem v S a G2 fázi buněčného cyklu. V M fázi byla detekována rychlá tzv. mitotická smrt a v G1 fázi buňky umíraly pomalu nelytickou buněčnou smrtí. Indukce programované buněčné smrti (apoptóze podobné) zřejmě primárně souvisela s přechodem buněk přes G2/M kontrolní bod.

5. Různé stresové vlivy vyvolaly tvarové malformace jader, které však pravděpodobně primárně nesouvisely s programovanou buněčnou smrtí buněk

- Působení nejrůznějších látek (induktorů PCD či synchronizačních agens) vyvolalo protahování jader. Mechanismus protahování jader a případný biologický význam byl naznačen po ovlivnění buněk hydroxymočovinou.

9. SEZNAM LITERATURY

- Adams, R.L.P., & Lindsay, J.G. (1967) Hydroxyurea – reversal of inhibitional use as a cell synchronizing agent. *Journal of Biological Chemistry* 242, 1314-1317.
- Ahn, J. W., Kim, M., Lim, J. H., Kim, G. T., & Pai, H. S. (2004). Phytoalexin controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. *Plant Journal* 38, 969-981.
- Amé (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882–893.
- Amé, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Murcia, J. M. D., & de Murcia, G. (1999). PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17860-17868.
- Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2001). Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 42, 446-449.
- Andreyev, A. & Fiskum, G. (1999). Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell Death and Differentiation* 6, 825-832.
- Antonsson, B. & Martinou, J. C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research* 256, 50-57.
- Aoyagi, S., Sugiyama, M., & Fukuda, H. (1998). BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Letters* 429, 134-138.
- Armitage, R. J. (1994). Tumor-necrosis-factor receptor superfamily members and their ligands. *Current Opinion in Immunology* 6, 407-413.
- Arocena, M. (2006). Effect of acrylamide on the cytoskeleton and apoptosis of bovine lens epithelial cells. *Cell Biology International* 30, 1007-1012.
- Aviv, D. H., Rusterucci, C., Holt, B. F., Dietrich, R. A., Parker, J. E., & Dangl, J. L. (2002). Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *Isd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant Journal* 29, 381-391.
- Bachrecke, E. H. (2003). Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 10, 940-945.
- Balk, J. & Leaver, C. J. (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *Plant Cell* 13, 1803-1818.
- Balk, J., Chew, S. K., Leaver, C. J., & McCabe, P. F. (2003). The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant Journal* 34, 573-583.
- Balk, J., Leaver, C. J., & McCabe, P. F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters* 463, 151-154.
- Barry, M. A. & Eastman, A. (1993). Identification of Deoxyribonuclease-II as an endonuclease involved in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300, 440-450.
- Baudouin, E., Charpentreau, M., Roby, D., Marco, Y., Ranjeva, R., & Ranty, B. (1997). Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase family - Esterase activity towards short-chain dinitrophenyl acylesters. *European Journal of Biochemistry* 248, 700-706.
- Beers, E. P. & Freeman, T. B. (1997). Proteinase activity during tracheary element differentiation in *Zinnia* mesophyll cultures. *Plant Physiology* 113, 873-880.
- Beers, E. P., Woffenden, B. J., & Zhao, C. S. (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* 44, 399-415.
- Bell, P. R. (1996). Megaspore abortion: A consequence of selective apoptosis? *International Journal of Plant Sciences* 157, 1-7.
- Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M., & Verbruggen, N. (2004). A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* 569, 140-148.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., & Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 511, 145-178.
- Berta, G., Altamura, M. M., Fusconi, A., Cerruti, F., Capitani, F., & Bagni, N. (1997). The plant cell wall is altered by inhibition of polyamine biosynthesis. *New Phytologist* 137, 569-577.
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: Cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell* 14, 159-169.
- Bethke, P. C. & Jones, R. L. (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant Journal* 25, 19-29.
- Bethke, P. C., Lonsdale, J. E., Fath, A., & Jones, R. L. (1999). Hormonally regulated programmed cell death in

- barley aleurone cells. *Plant Cell* 11, 1033-1045.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194.
- Blumenthal, S. S. D., Clark, G. B., & Roux, S. J. (2004). Biochemical and immunological characterization of pea nuclear intermediate filament proteins. *Planta* 218, 965-975.
- Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A., & Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant Journal* 15, 441-447.
- Bolduc, N., Ouellet, M., Pitre, F., & Brisson, L. F. (2003). Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 216, 377-386.
- Boudolf, V., Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). What if higher plants lack a CDC25 phosphatase. *Trends in Plant Science* 11, 474-479.
- Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, J., Kammer, P., Marin, E., Feller, U., & Martinoia, E. (2003). Transcript levels of AtMRPs after cadmium treatment: induction of AtMRP3. *Plant Cell and Environment* 26, 371-381.
- Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., Suarez, M. F., Helmersson, A., Smertenko, A. P., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2004). VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation* 11, 175-182.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jorgensen, L. B., Brown, R. E., & Mundy, J. (2002). Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes & Development* 16, 490-502.
- Broers, J. L. V., Ramaekers, F. C. S., Bonne, G., Ben Yaou, R., & Hutchison, C. J. (2006). Nuclear lamins: Laminopathies and their role in premature ageing. *Physiological Reviews* 86, 967-1008.
- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research* 11, 3155-3162.
- Bryant, J. A., Fitchett, P. N., Hughes, S. G., & Sibson, D. R. (1992). DNA polymerase-alpha in pea is part of a large multiprotein complex. *Journal of Experimental Botany* 43, 31-40.
- Buendia, B., Courvalin, J. C., & Collas, P. (2001). Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1781-1789.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2002). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Bursch W., Ellinger A., Gerner C., & Schulte-Hermann R. (2004). Caspase-independent and autophagic programmed cell death, *When cells die II*, edited by Lockshin R.A. & Zakeri Z., pp. 275-309. New Jersey: Wiley-Liss.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 8, 569-581.
- Calderon, F. & Kim, H. Y. (2008). Detection of intracellular phosphatidylserine in living cells. *Journal of Neurochemistry* 104, 1271-1279.
- Cao, J., He, X. Q., Wang, Y. Q., Sodmergen, & Ciu, K. M. (2003). Programmed cell death during secondary xylem differentiation in *Eucommia ulmoides*. *Acta Botanica Sinica* 45, 1465-1474.
- Carafoli, E. & Molinari, M. (1998). Calpain: A protease in search of a function? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 193-203.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumie, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.
- Clarke, P. G. H. (1990). *Developmental Cell-Death - Morphological Diversity and Multiple Mechanisms*. *Anatomy and Embryology* 181, 195-213.
- Cobbett, C. S. & Goldsbrough, P. B. (2000). Mechanisms of metal resistance: Phytochelatins and metallothioneins. *Phytoremediation of Toxic Metals* 247-269.
- Coen, N., Mothersill, C., Kadhim, M., & Wright, E. G. (2001). Heavy metals of relevance to human health induce genomic instability. *Journal of Pathology* 195, 293-299.
- Collings, D. A., Carter, C. N., Rink, J. C., Scott, A. C., Wyatt, S. E., & Allen, N. S. (2000). Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* 12, 2425-2439.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Crompton, M. (2000). Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 414-419.

- Crompton, M., Virji, S., & Ward, J. M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European Journal of Biochemistry* 258, 729-735.
- Dangl, J. (2000). Mechanisms of specific disease resistance: Current understanding and future challenges. *Biology of Plant-Microbe Interactions*, 2, 1-12.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., & Richberg, M. H. (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Danon, A. & Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 131-136.
- Danon, A., Rotari, V. I., Gordon, A., Mailhac, N., & Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *Journal of Biological Chemistry* 279, 779-787.
- de Jong, A. J., Hoeberichts, F. A., Yakimova, E. T., Maximova, E., & Woltering, E. J. (2000). Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211, 656-662.
- de Jong, A. J., Yakimova, E. T., Kapchina, V. M., & Woltering, E. J. (2002). A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214, 537-545.
- de Murcia, J. M. N., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J. C., Dierich, A., LeMeur, M., Sabatier, L., Chambon, P., & de Murcia, G. (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO Journal* 22, 2255-2263.
- De Schutter, K., Joubes, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiyshuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inzé, D., & De Veylder, L. (2007). *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* 19, 211-225.
- Delledonne, M., Xia, Y. J., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Delong, A., Calderonurrea, A., & Dellaporta, S. L. (1993). Sex determination gene tasselseed2 of maize encodes a short-chain alcohol-dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* 74, 757-768.
- Delorme, V. G. R., McCabe, P. F., Kim, D. J., & Leaver, C. J. (2000). A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology* 123, 917-927.
- Demura, T. & Fukuda, H. (1993). Molecular-cloning and characterization of cDNAs associated with tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Physiology* 103, 815-821.
- Demura, T. & Fukuda, H. (1994). Novel vascular cell-specific genes whose expression is regulated temporally and spatially during vascular system-development. *Plant Cell* 6, 967-981.
- Demura, T., Okazawa, T., Igarashi, M., & Fukuda, H. (1997). Expression and function of TED3 gene, tracheary element precursor cell-specific gene. *Plant Physiology* 114, 1630.
- Denault, J. B. & Salvesen, G. S. (2002). Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews* 102, 4489-4499.
- Desagher, S. & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10, 369-377.
- Deveraux, Q. L. & Reed, T. C. (1999). IAP family proteins - suppressors of apoptosis. *Genes & Development* 13, 239-252.
- Dewitte, W. & Murray, J. A. H. (2003). The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54, 235-264.
- di Toppi, L. S. & Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Dietrich, R. A., Delaney, T. P., Uknes, S. J., Ward, E. R., Ryals, J. A., & Dangl, J. L. (1994). *Arabidopsis* Mutants Simulating Disease Resistance Response. *Cell* 77, 565-577.
- Dietrich, R. A., Richberg, M. H., Schmidt, R., Dean, C., & Dangl, J. L. (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88, 685-694.
- Domažlická, E. & Opatrný, Z. (1989). The effect of cadmium on tobacco cell-culture and the selection of potentially Cd-resistant cell-lines. *Biologia Plantarum* 31, 19-27.
- Dominguez, F., Moreno, J., & Cejudo, F. J. (2001). The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta* 213, 352-360.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage

- triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death - Involvement of serine but not cysteine proteases. *American Journal of Pathology* 151, 1205-1213.
- Drew, M. C., He, C. J., & Morgan, P. W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* 5, 123-127.
- Duan, G. L., Zhou, Y., Tong, Y. P., Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., & Zhu, Y. G. (2007). A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytologist* 174, 311-321.
- Durner, J. & Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, 2 inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11312-11316.
- Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 337-343.
- Elbaz, M., Avni, A., & Weil, M. (2002). Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Cell Death and Differentiation* 9, 726-733.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Endo, S., Demura, T., & Fukuda, H. (2001). Inhibition of proteasome activity by the TED4 protein in extracellular space: A novel mechanism for protection of living cells from injury caused by dying cells. *Plant and Cell Physiology* 42, 9-19.
- Epple, P., Mack, A. A., Morris, V. R. F., & Dangl, J. L. (2003). Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6831-6836.
- Eskelinen, E. L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* 1, 1-10.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., & Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and Cellular Biology* 20, 929-935.
- Evans, D. E. (2004). Programmed cell death in response to abiotic stress edited by J. Gray, pp. 194-212. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R., & Prives, C. (1992). Wild-type p53 activates transcription *in vitro*. *Nature* 358, 83-86.
- Fath, A., Bethke, P. C., & Jones, R. L. (1999). Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant Journal* 20, 305-315.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., & Jones, R. (2000). Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Molecular Biology* 44, 255-266.
- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., Brukhin, V. B., Daniel, G., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113, 4399-4411.
- Fojtová, M. & Kovařík, A. (2000). Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant Cell and Environment* 23, 531-537.
- Fricke, M., Hollinshead, M., White, N., & Vaux, D. (1997). Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology* 136, 531-544.
- Fukuda, H. & Komamine, A. (1980a). Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 65, 57-60.
- Fukuda, H. & Komamine, A. (1980b). Direct evidence for cytodifferentiation to tracheary elements without intervening mitosis in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 65, 61-64.
- Fukuda, H. (1996). Xylogenesis: Initiation, progression, and cell death. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 299-325.
- Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9, 1147-1156.
- Fukuda, H. (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44, 245-253.
- Fussenegger, M., Bailey, J. E., & Varner, J. (2000). A mathematical model of caspase function in apoptosis. *Nature Biotechnology* 18, 768-774.
- Gaido, M. L. & Cidlowski, J. A. (1991). Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (Nuc18) from apoptotic rat thymocytes - Nuc18 is not histone H2B. *Journal of Biological Chemistry* 266, 18580-18585.
- Galbraith, D. W. (2004). Nuclear dynamics in higher plants, *The nuclear envelope*, edited by D. E. Evans, C. J. Hutchinson, & J. A. Bryant, pp. 217-228. New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Bensasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via

- specific labeling of nuclear-DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119, 493-501.
- Gietl, C. & Schmid, M. (2001). Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften* 88, 49-58.
- Giehner, T., Patková, Z., Szaková, J., & Demnerová, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 559, 49-57.
- Giehner, T., Patková, Z., Szaková, J., & Demnerová, K. (2006). Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 420-426.
- Gindullis, F. & Meier, I. (1999). Matrix attachment region binding protein MFP1 is localized in discrete domains at the nuclear envelope. *Plant Cell* 11, 1117-1128.
- Gindullis, F., Rose, A., Patel, S., & Meier, I. (2002). Four signature motifs define the first class of structurally related large coiled-coil proteins in plants. *BMC Genomics* 3, 9.
- Gindullis, P., Peffer, N. J., & Meier, I. (1999). MAF1, a novel plant protein interacting with matrix attachment region binding protein MFP1, is located at the nuclear envelope. *Plant Cell* 11, 1755-1767.
- Giuliani, C., Consonni, G., Gavazzi, G., Colombo, M., & Dolfini, S. (2002). Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Annals of Botany* 90, 287-292.
- Gopalan, S., Wei, W., & He, S. Y. (1996). hrp gene-dependent induction of hin1: A plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal. *Plant Journal* 10, 591-600.
- Gorzycza, W., Bruno, S., Darzynkiewicz, R. J., Gong, J. P., & Darzynkiewicz, Z. (1992). DNA strand breaks occurring during apoptosis - their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International Journal of Oncology* 1, 639-648.
- Gotow, T., Shibata, M., Kanamori, S., Tokuno, O., Ohsawa, Y., Sato, N., Isahara, K., Yayoi, Y., Watanabe, T., Leterrier, J. F., Linden, M., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (2000). Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. *Cell Death and Differentiation* 7, 666-674.
- Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.
- Graham, J. S., Xiong, J., & Gillikin, J. W. (1991). Purification and developmental analysis of a metalloendoproteinase from the leaves of *Glycine-max*. *Plant Physiology* 97, 786-792.
- Gray, J., Close, P. S., McElver, J., Hantke, S. S., Briggs, S. P., & Johal, G. S. (1997). Isolation of IIs1, a novel suppressor of cell death in plants. *Plant Physiology* 114, 121.
- Gray, J., Janick-Buckner, D., Buckner, B., Close, P. S., & Johal, G. S. (2002). Light-dependent death of maize IIs1 cells is mediated by mature chloroplasts. *Plant Physiology* 130, 1894-1907.
- Green, D. R. & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Greenberg, J. T., Guo, A. L., Klessig, D. F., & Ausubel, F. M. (1994). Programmed cell-death in plants - a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77, 551-563.
- Groover, A. & Jones, A. M. (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* 119, 375-384.
- Groover, A., DeWitt, N., Heidel, A., & Jones, A. (1997). Programmed cell death of plant tracheary elements: Differentiating *in vitro*. *Protoplasma* 196, 197-211.
- Gunawardena, A. H. L. A., Greenwood, J. S., & Dengler, N. G. (2004). Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. *Plant Cell* 16, 60-73.
- Gunawardena, A. H. L. A., Pearce, D. M. E., Jackson, M. B., Hawes, C. R., & Evans, D. E. (2001). Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant Cell and Environment* 24, 1369-1375.
- Gunawardena, A. H. L. A., Sault, K., Donnelly, P., Greenwood, J. S., & Dengler, N. G. (2005). Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua* (Araceae). *Planta* 221, 607-618.
- Gunning, B. E. S. (1998). The identity of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP. *Trends in Plant Science* 3, 417.
- Gupton, S. L., Collings, D. A., & Allen, N. S. (2006). Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 95-105.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., & del Pozo, J. C. (2002). G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 480-486.

- Haag-Kerwer, A., Schafer, H. J., Heiss, S., Walter, C., & Rausch, T. (1999). Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 50, 1827-1835.
- Hall, P. A. (1999). Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocrine-Related Cancer* 6, 3-8.
- Halperin, T., Ostersetzer, O., & Adam, Z. (2001a). ATP-dependent association between subunits of Clp protease in pea chloroplasts. *Planta* 213, 614-619.
- Halperin, T., Zheng, B., Itzhaki, H., Clarke, A. K., & Adam, Z. (2001b). Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent Clp protease. *Plant Molecular Biology* 45, 461-468.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Nakaune, S., & Nishimura, M. (2005). A VPE system regulates programmed cell death in plants. *Plant and Cell Physiology* 46, S18.
- Hara-Nishimura, I., Inoue, K., & Nishimura, M. (1991). A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS Letters* 294, 89-93.
- Hartwig, A. & Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters* 127, 47-54.
- Haseloff, J., Siemerling, K. R., Prasher, D. C., & Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2122-2127.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2006). A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis* 11, 905-911.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.
- Havel, L. & Durzan, D. J. (1996). Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway spruce. *International Journal of Plant Sciences* 157, 8-16.
- Hawes, C., Boevink, P., Roberts, A., & Brandizzi, F. (2001). GFP enlightens the study of endomembrane dynamics in plant cells. *Plant Biosystems* 135, 3-12.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N. K., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2001). A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 42, 894-899.
- Hegedüs, A., Erdei, S., & Horvath, G. (2001). Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* 160, 1085-1093.
- Helt, C. E., Rancourt, R. C., Stavarsky, R. J., & O'Reilly, M. A. (2001). p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity. *Toxicological Sciences* 63, 214-222.
- Hennet, T., Bertoni, G., Richter, C., & Peterhans, E. (1993). Expression of Bcl-2 Protein enhances the survival of mouse fibrosarcoma cells in tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Cancer Research* 53, 1456-1460.
- Herbert, R. J., Vilhar, B., Evett, C., Orchard, C. B., Rogers, H. J., Davies, M. S., & Francis, D. (2001). Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBV-2 cell line. *Journal of Experimental Botany* 52, 1615-1623.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* 1, 3-11.
- Hicks, S. W. & Machamer, C. E. (2002). The NH2-terminal domain of golgin-160 contains both Golgi and nuclear targeting information. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35833-35839.
- Higashi, K., Takasawa, R., Yoshimori, A., Goh, T., Tanuma, S., & Kuchitsu, K. (2005). Identification of a novel gene family, paralogs of inhibitor of apoptosis proteins present in plants, fungi, and animals. *Apoptosis* 10, 471-480.
- Hiraiwa, N., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (1999). Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Letters* 447, 213-216.
- Hoeberichts, F. A. & Woltering, E. J. (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25, 47-57.
- Hoeberichts, F. A., ten Have, A., & Woltering, E. J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217, 517-522.
- Holaska, J. M., Wilson, K. L., & Mansharamani, M. (2002). The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 357-364.
- Holwerda, B. C. & Rogers, J. C. (1992). Purification and characterization of aleurain - A plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin-H. *Plant Physiology* 99, 848-855.
- Holwerda, B. C., Galvin, N. J., Baranski, T. J., & Rogers, J. C. (1990). In vitro processing of aleurain, a barley

- vacuolar thiol protease. *Plant Cell* 2, 1091-1106.
- Houot, V., Etienne, P., Petitot, A. S., Barbier, S., Blein, J. P., & Suty, L. (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* 52, 1721-1730.
- Hoyer-Hansen, M. & Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death and Differentiation* 14, 1576-1582.
- Hu, G. S., Yalpani, N., Briggs, S. P., & Johal, G. S. (1998). A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell* 10, 1095-1105.
- Huang, D. C. S. & Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins - Essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.
- Hückelhoven, R. (2004). BAX inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9, 299-307.
- Hudák J., Herich R., & Bobák M. (1983). *Plastidy*. Bratislava: Veda, vydavateľ'stvo slovenske akademie vied.
- Hussain, S. G. & Ramaiah, K. V. A. (2007). Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *Current Science* 93, 1684-1696.
- Chai, J. J., Du, C. Y., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. D., & Shi, Y. G. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Chaves, I., Regalado, A. P., Chen, M., Ricardo, C. P., & Showalter, A. M. (2002). Programmed cell death induced by (beta-D-galactosyl)(3) Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* 116, 548-553.
- Chen, F. & Foolad, M. R. (1999). Nucellar-cell-specific expression of a lipid transfer protein gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Reports* 18, 445-450.
- Chen, J. J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W., & Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of CDK kinase and PCNA. *Nature* 374, 386-388.
- Cheng, P. C., Greyson, R. I., & Walden, D. B. (1983). Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *American Journal of Botany* 70, 450-462.
- Chin, R., Novikov, L., Mukherjee, S., & Shields, D. (2002). A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *Journal of Cell Biology* 159, 637-648.
- Chytilová, E., Macas, J., & Galbraith, D. W. (1999). Green fluorescent protein targeted to the nucleus, a transgenic phenotype useful for studies in plant biology. *Annals of Botany* 83, 645-654.
- Chytilová, E., Macas, J., Šliwińska, E., Rafelski, S. M., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2000). Nuclear dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2733-2741.
- Ichinose, Y., Andi, S., Doi, R., Tanaka, R., Taguchi, F., Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Yamada, T. (2001). Generation of hydrogen peroxide is not required for harpin-induced apoptotic cell death in tobacco BY-2 cell suspension culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 771-776.
- Inada, N., Sakai, A., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (1998). Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles - Investigations by fluorescence microscopy and electron microscopy. *Planta* 206, 585-597.
- Inada, N., Sakai, A., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (1999). Senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) leaves: analysis of the blade of the second leaf at the tissue and cellular levels. *Protoplasma* 207, 222-232.
- Ingvarsdson, C. & Veierskov, B. (2001). Ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis in plants. *Physiologia Plantarum* 112, 451-459.
- Inzé, D. & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 40, 77-105.
- Ishikawa, H. A. (1996). Ultrastructural features of chilling injury: Injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *American Journal of Botany* 83, 825-835.
- Ito, J. & Fukuda, H. (2002). ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell* 14, 3201-3211.
- Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* 57, 231-245.
- Janzik, I., Macheroux, P., Amrhein, N., & Schaller, A. (2000). LeSBT1, a subtilase from tomato plants - Overexpression in insect cells, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5193-5199.
- Jemmerson, R., LaPlante, B., & Treefull, A. (2002). Release of intact, monomeric cytochrome c from apoptotic and necrotic cells. *Cell Death and Differentiation* 9, 538-548.
- Johnson, N., Krebs, M., Boudreau, R., Giorgi, G., LeGros, M., & Larabell, C. (2003). Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation* 71, 414-424.

- Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* 136, 3276-3283.
- Jones, A. (2000). Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Science* 5, 225-230.
- Jones, A. M. (2001). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125, 94-97.
- Jones, A.M., Coimbra, S., Fath, A., Sottomayor, M., & Thomas, H. (2001) Programmed cell death assays for plants. *Methods in Cell Biology* 66, 437-451.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. J., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y. M., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., & Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Kadota Y. & Kuchitsu, K. (2006). Regulation of elicitor-induced defense responses by Ca²⁺ channels and the cell cycle in tobacco BY-2 Cells, *Tobacco BY-2 cells: From cellular dynamics to omics*, edited by Nagata T., Matsuoka K., & Inzé D., pp. 207-221. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kadota, Y., Furuichi, T., Sano, T., Kaya, H., Gunji, W., Murakami, Y., Muto, S., Hasezawa, S., & Kuchitsu, K. (2005a). Cell-cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca²⁺ permeable channels NtTPC1A/B in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 1259-1267.
- Kadota, Y., Goh, T., Tomatsu, H., Tamauchi, R., Higashi, K., Muto, S., & Kuchitsu, K. (2004a). Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: Pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca²⁺ transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant and Cell Physiology* 45, 160-170.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S., & Kuchitsu, K. (2004b). Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant Journal* 40, 131-142.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Maeda, Y., Ohno, R., Higashi, K., Sano, T., Muto, S., Hasezawa, S., & Kuchitsu, K. (2005b). Cell cycle dependence of elicitor-induced signal transduction in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 46, 156-165.
- Kawai, M. & Uchimiya, H. (2000). Coleoptile senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* 86, 405-414.
- Kawai-Yamada, M., Jin, L. H., Yoshinaga, K., Hirata, A., & Uchimiya, H. (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12295-12300.
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* 21, 829-837.
- Kelekar, A. & Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 8, 324-330.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-&.
- Kickhoefer, V. A., Siva, A. C., Kedersha, N. L., Inman, E. M., Ruland, C., Streuli, M., & Rome, L. H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel Poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Cell Biology* 146, 917-928.
- Kincaid, M. M. & Cooper, A. A. (2007). ERADicate ER stress or die trying. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 2373-2387.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., & Haranishimura, I. (1995). Homologs of a vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29, 81-89.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant Journal* 19, 43-53.
- Klosterman, S. J., Choi, J. J., & Hadwiger, L. A. (2000). Programmed cell death is not mediated by a p53 homolog in *Pisum sativum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 197-206.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y. H., Matsuoka, Y., Zhang, L. L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skouitchi, A. I., & Tsujimoto, Y. (2003). Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 114, 673-688.
- Korthout, H. A. A. J., Berecki, G., Bruin, W., van Duijn, B., & Wang, M. (2000). The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Letters* 475, 139-144.
- Korthout, H. A. A. J., Caspers, M. P. M., Kottenhagen, M. J., Helmer, Q., & Wang, M. (2002). A tormentor in the quest for plant p53-like proteins. *FEBS Letters* 526, 53-57.

- Kost, B., Spielhofer, P., & Chua, N. H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant Journal* 16, 393-401.
- Koukalová, B., Kovařík, A., Fajkus, J., & Šíroky, J. (1997). Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters* 414, 289-292.
- Kroemer, G., El Deiry, W., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovskiy, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., & Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 12, 1463-1467.
- Kumagai, F. & Hasezawa, S. (2001). Dynamic organization of microtubules and microfilaments during cell cycle progression in higher plant cells. *Plant Biology* 3, 4-16.
- Kumagai, F., Yoneda, A., Tomida, T., Sano, T., Nagata, T., & Hasezawa, S. (2001). Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: Time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant and Cell Physiology* 42, 723-732.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 14, 32-43.
- Kuo, A. L., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodriguez, M., & Bush, D. S. (1996). Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 8, 259-269.
- Kuriyama, H. (1999). Loss of tonoplast integrity programmed in tracheary element differentiation. *Plant Physiology* 121, 763-774.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). VPE has enzymatic properties similar to those of caspase-1. *Plant and Cell Physiology* 46, S200.
- Kusaka, K., Tada, Y., Shigemi, T., Sakamoto, M., Nakayashiki, H., Tosa, Y., & Mayama, S. (2004). Coordinate involvement of cysteine protease and nuclease in the executive phase of plant apoptosis. *FEBS Letters* 578, 363-367.
- Kuthanová, A., Fischer, L., Nick, P., & Opatrný, Z. (2008). Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. *zasláno do Plant Cell and Environment*.
- Kuthanová, A., Gemperlová, L., Zelenková, S., Eder, J., Macháček, I., Opatrný, Z., & Cvikrová, M. (2004). Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 149-156.
- Kutsuna, N. & Hasezawa, S. (2002). Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 43, 965-973.
- Kuwana, T. & Newmeyer, D. D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 691-699.
- Kuwana, T. & Newmeyer, D. D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 691-699.
- Lacomme, C. & Cruz, S. S. (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7956-7961.
- Lam, E. & del Pozo, O. (2000). Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Molecular Biology* 44, 417-428.
- Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., & Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation* 9, 358-361.
- Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grun, S., & Sandermann, H. (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 567-575.
- Larsson, E. H., Bornman, J. F., & Asp, H. (1998). Influence of UV-B radiation and Cd²⁺ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany* 49, 1031-1039.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis - an introduction. *Bioessays* 25, 888-896.
- Lee, R. H. & Chen, S. C. G. (2002). Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. *New Phytologist* 155, 25-32.
- Lee, R. K. Y., Lui, P. P. Y., Ngan, F. K. S., Lui, J. C. K., Suen, Y. K., Chan, F., & Kong, S. K. (2006). The nuclear tubular invaginations are dynamic structures inside the nucleus of HeLa cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84, 477-486.
- Leist, M. & Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 589-598.
- Lenochová, Z. (2004). Programovaná buněčná smrt v kořenech kukuřice seté *Zea mays* L. v průběhu vývoje

aerenchymu. Praha: diplomová práce.

- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li, L. Y., Luo, L., & Wang, X. D. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Liljeroth, E. & Bryngelsson, T. (2001). DNA fragmentation in cereal roots indicative of programmed root cortical cell death. *Physiologia Plantarum* 111, 365-372.
- Lindahl, M., Tabak, S., Cseke, L., Pichersky, E., Andersson, B., & Adam, Z. (1996). Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsI protease in chloroplasts of higher plants. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29329-29334.
- Lindholm, P., Kuittinen, T., Sorri, O., Guo, D. Y., Merits, A., Tormakangas, K., & Runeberg-Roos, P. (2000). Glycosylation of phytepsin and expression of dad1, dad2 and ost1 during onset of cell death in germinating barley scutella. *Mechanisms of Development* 93, 169-173.
- Liu, F. T., Goff, L. K., Hao, J. H., Newland, A. C., & Jia, L. (2004). Increase in the ratio of mitochondrial Bax/Bcl-XL induces Bax activation in human leukemic K562 cell line. *Apoptosis* 9, 377-384.
- Lockshin R.A. & Zakeri Z. (2004). Introduction, When cells die II, edited by Lockshin R.A. & Zakeri Z., pp. 3-23. New Jersey: Wiley-Liss.
- Loukides, C. A., Broadwater, A. H., & Bedinger, P. A. (1995). 2 new male-sterile mutants of *Zeamays* (Poaceae) with abnormal tapetal cell morphology. *American Journal of Botany* 82, 1017-1023.
- Lui, P. P. Y., Kong, S. K., Fung, K. P., & Lee, C. Y. (1998a). The rise of nuclear and cytosolic Ca²⁺ can be uncoupled in HeLa cells. *European Journal of Physiology* 436, 371-376.
- Lui, P. P. Y., Kong, S. K., Kwok, T. T., & Lee, C. Y. (1998b). The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca²⁺ signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 88-93.
- Lux, A. & Hudák, J. (1987). Plastid dimorphism in leaves of the terrestrial orchid, *Ophrys sphegodes* Miller. *New Phytologist* 107, 47-51.
- Machamer, C. E. (2003). Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect? *Trends in Cell Biology* 13, 279-281.
- Malhotra, J. D. & Kaufman, R. J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18, 716-731.
- Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. A., Casciola-Rosen, L. A., & Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 149, 603-612.
- Margis, R. & Margis-Pinheiro, M. (2003). Phytocalpains: orthologous calcium-dependent cysteine proteinases. *Trends in Plant Science* 8, 58-62.
- Masuda, K., Xu, Z. J., Takahashi, S., Ito, A., Ono, M., Nomura, K., & Inoue, M. (1997). Peripheral framework of carrot cell nucleus contains a novel protein predicted to exhibit a long alpha-helical domain. *Experimental Cell Research* 232, 173-181.
- Matarasso, N., Schuster, S., & Avni, A. (2005). A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid synthase gene expression. *Plant Cell* 17, 1205-1216.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., & Terauchi, R. (2003). Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant Journal* 33, 425-434.
- Matsushima, R., Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2003). The ER body, a novel endoplasmic reticulum-derived structure in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 44, 661-666.
- Matthew, E. M., Yen, T. J., Dieker, D. T., Dorsey, J. F., Yang, W. S., Navaraj, A., & El-Deiry, W. S. (2007). Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells. *Cell Cycle* 6, 2571-2578.
- Mccabe, P. F., Levine, A., Meijer, P. J., Tapon, N. A., & Pennell, R. I. (1997). A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant Journal* 12, 267-280.
- McCarthy, I., Romero-Puertas, M. C., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Gomez, M., & del Rio, L. A. (2001). Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell and Environment* 24, 1065-1073.
- McClure, B. (2006). New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 639-646.
- Meier, I. (2001). The plant nuclear envelope. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1774-1780.
- Meier, I., Phelan, T., Gruissem, W., Spiker, S., & Schneider, D. (1996). MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. *Plant Cell* 8, 2105-2115.
- Mills, R. F., Krijger, G. C., Baccarini, P. J., Hall, J. L., & Williams, L. E. (2003). Functional expression of

- AtHMA4, a P-1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant Journal* 35, 164-176.
- Minami, A. & Fukuda, H. (1995). Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase associated with autolysis during differentiation of *Zinnia* mesophyll cells into tracheary elements. *Plant and Cell Physiology* 36, 1599-1606.
- Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 41, 993-1001.
- Mittler, R. & Lam, E. (1995). Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity-induced upon hypersensitive response cell-death. *Plant Cell* 7, 1951-1962.
- Mittler, R. & Rizhsky, L. (2000). Transgene-induced lesion mimic. *Plant Molecular Biology* 44, 335-344.
- Mittler, R., Herr, E. H., Orvar, B. L., Van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., & Ellis, B. E. (1999). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14165-14170.
- Mittler, R., Shulaev, V., & Lam, E. (1995). Coordinated activation of programmed cell-death and defense-mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* 7, 29-42.
- Mittler, R., Simon, L., & Lam, E. (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Journal of Cell Science* 110, 1333-1344.
- Mlejnek, P. & Procházka, S. (2002). Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215, 158-166.
- Morgan P.W. & Drew M.C. (2004). *Plant cell death and cell differentiation, plant cell death processes*, edited by Noodén L.D., pp. 19-36. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Morisawa, G., Han-yama, A., Moda, I., Tamai, A., Iwabuchi, M., & Meshi, T. (2000). AHM1, a novel type of nuclear matrix-localized, MAR binding protein with a single AT hook and a J domain-homologous region. *Plant Cell* 12, 1903-1916.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., & Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis - Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry* 277, 34287-34294.
- Moriyasu, Y. & Ohsumi, Y. (1996). Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiology* 111, 1233-1241.
- Mundle, S. D., Gao, X. Z., Khan, S., Gregory, S. A., Preisler, H. D., & Raza, A. (1995). Two *in situ* labeling techniques reveal different patterns of DNA fragmentation during spontaneous apoptosis *in vivo* and induced apoptosis *in vitro*. *Anticancer Research* 15, 1895-1904.
- Muramoto, Y., Watanabe, A., Nakamura, T., & Takabe, T. (1999). Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene* 234, 315-321.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nagata T. (2004). When I encountered tobacco BY-2 cells!, *Tobacco BY-2 cells*, edited by Nagata T., S. Hasezawa, & D. Inzé, pp. 1-6. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 Cell-line as the HeLa cell in the cell biology of Higher-Plants. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology* 132, 1-30.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., & Sekine, M. (2006). *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters* 580, 336-340.
- Nakamura, S., Ogawa, K., & Kuroiwa, T. (1987). Survey of Ca²⁺-dependent nuclease in green plants. *Plant and Cell Physiology* 28, 545-548.
- Nakashima, J., Takabe, K., Fujita, M., & Fukuda, H. (2000). Autolysis during *in vitro* tracheary element differentiation: Formation and location of the perforation. *Plant and Cell Physiology* 41, 1267-1271.
- Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). A vacuolar processing enzyme, delta VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* 17, 876-887.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H., & Youle, R. J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 153, 1265-1276.
- Newcomb, E. H. (1967). Fine structure of protein-storing plastids in bean root tips. *Journal of Cell Biology* 33, 143-&.
- Ning, S. B., Song, Y. C., & van Damme, P. (2002a). Characterization of the early stages of programmed cell death in maize root cells by using comet assay and the combination of cell electrophoresis with annexin binding. *Electrophoresis* 23, 2096-2102.

- Noodén & L.D. (2004). Introduction, Plant cell death processes, edited by Noodén L.D., pp. 1-18. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Nurnberger, T. & Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6, 372-379.
- Obara, K. & Fukuda, H. (2004). Programmed cell death in xylem differentiation. *Programmed Cell Death in Plants* 131-154.
- Obara, K., Kuriyama, H., & Fukuda, H. (2001). Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiology* 125, 615-626.
- Okamoto, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., & Minamikawa, T. (2003). C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiology* 132, 1892-1900.
- Okamoto, T., Toyooka, K., & Minamikawa, T. (2001). Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole. *Journal of Biological Chemistry* 276, 742-751.
- Oliveri, M., Daga, A., Cantoni, C., Lunardi, C., Millo, R., & Puccetti, A. (2001). DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 31, 743-751.
- Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A., & Hellin, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany* 54, 291-301.
- Orzaez, D. & Granell, A. (1997). The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Letters* 404, 275-278.
- Orzaez, D. & Granell, A. (2004). Programmed cell death in plant senescence, *Programmed cell death in plants*, edited by J. Gray, pp. 155-193. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Orzaez, D., de Jong, A. J., & Woltering, E. J. (2001). A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* 46, 459-468.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., & Kangasjarvi, J. (2000). Ozone-sensitive *Arabidopsis* red1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12, 1849-1862.
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., & del Rio, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 521-530.
- Panavas, T., Pikula, A., Reid, P. D., Rubinstein, B., & Walker, E. L. (1999). Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Molecular Biology* 40, 237-248.
- Park, H., Yamanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, I., & Kobayashi, H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64, 931-939.
- Parrott, D., Yang, L., Shama, L., & Fischer, A. M. (2005). Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* 222, 989-1000.
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Della Torre, G., & Ferranti, F. (2003). Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133, 1122-1134.
- Paul, A. L. & Ferl, R. J. (1999). Higher-order chromatin structure: looping long molecules. *Plant Molecular Biology* 41, 713-720.
- Paulovich, A. G., Toczycki, D. P., & Hartwell, L. H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
- Pazourek J. & Votrubová O. (1997). *Atlas of Plant Anatomy*. Praha: Peres Publishers.
- Pellinen, R. I., Korhonen, M. S., Tauriainen, A. A., Palva, E. T., & Kangasjarvi, J. (2002). Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiology* 130, 549-560.
- Perez-Amador, M. A., Abler, M. L., De Rocher, E. J., Thompson, D. M., van Hoof, A., LeBrasseur, N. D., Lers, A., & Green, P. J. (2000). Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122, 169-179.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., & Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant Journal* 32, 539-548.
- Petrasek, J., Cerna, A., Schwarzerova, K., Elekner, M., Morris, D. A., & Zazimalova, E. (2003). Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiology* 131, 254-263.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., & Hellin, E. (1999). Cd-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cells: Time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research* 31, S33-S38.

- Pokorna, J., Schwarzerova, K., Zelenkova, S., Petrasek, J., Janotova, I., Capkova, V., & Opatrny, Z. (2004). Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells. *Plant Cell and Environment* 27, 641-653.
- Pontier, D., Gan, S. S., Amasino, R. M., Roby, D., & Lam, E. (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology* 39, 1243-1255.
- Pontier, D., Mittler, R., & Lam, E. (2002). Mechanism of cell death and disease resistance induction by transgenic expression of bacterio-opsin. *Plant Journal* 30, 499-509.
- Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E., & Roby, D. (1998). Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 544-554.
- Predki, P. F. & Sarkar, B. (1992). Effect of replacement of zinc finger zinc on estrogen-receptor DNA interactions. *Journal of Biological Chemistry* 267, 5842-5846.
- Predki, P. F. & Sarkar, B. (1994). Metal Replacement in zinc-finger and its effect on DNA-binding. *Environmental Health Perspectives* 102, 195-198.
- Quirino, B. F., Noh, Y. S., Himelblau, E., & Amasino, R. M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5, 278-282.
- Rao, M. V. & Davis, K. R. (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213, 682-690.
- Rao, M. V., Koch, J. R., & Davis, K. R. (2000). Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* 44, 345-358.
- Rao, R. V., Ellerby, H. M., & Bredesen, D. E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death and Differentiation* 11, 372-380.
- Rate, D. N., Cuenca, J. V., Bowman, G. R., Guttman, D. S., & Greenberg, J. T. (1999). The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11, 1695-1708.
- Reichheld, J. P., Vernoux, T., Lardon, F., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1999). Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant Journal* 17, 647-656.
- Richter, S. & Lamppa, G. K. (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7463-7468.
- Roberts, A. W. & Haigler, C. H. (1992). Methylxanthines reversibly inhibit tracheary-element differentiation in suspension-cultures of *Zinnia elegans* L. *Planta* 186, 586-592.
- Robson, C. A. & Vanlerberghe, G. C. (2002). Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiology* 129, 1908-1920.
- Rodriguez, A. A., Grunberg, K. A., & Taleisnik, E. L. (2002). Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology* 129, 1627-1632.
- Rojo, E., Martin, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S. Q., Plotnikova, J., Jin, H. L., Paneque, M., Sanchez-Serrano, J. J., Baker, B., Ausubel, F. M., & Raikhel, N. V. (2004). VPE gamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology* 14, 1897-1906.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S. Q., Klessig, D. F., Hirt, H., & Jones, J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273-287.
- Romero-Puertas, M. C., Palma, J. M., Gomez, M., del Rio, L. A., & Sandalio, L. M. (2002). Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment* 25, 677-686.
- Rose, A., Gindullis, F., & Meier, I. (2003). A novel alpha-helical protein, specific to and highly conserved in plants, is associated with the nuclear matrix fraction. *Journal of Experimental Botany* 54, 1133-1141.
- Rosin, F. M., Watanabe, N., & Lam, E. (2005). Moonlighting vacuolar protease: multiple jobs for a busy protein. *Trends in Plant Science* 10, 516-518.
- Rossi, V. & Varotto, S. (2002). Insights into the G1/S transition in plants. *Planta* 215, 345-356.
- Rudner, J., Jendrossek, V., & Belka, C. (2002). New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. *Apoptosis* 7, 441-447.
- Ruppenthal, S. L., Noll, A., Gotz, C., & Montenarh, M. (2007). Interference between p53 and cdc25C in cell cycle regulation. *International Journal of Oncology* 31, 345-352.
- Russell, S. D., Strout, G. W., Stramski, A. K., Mislan, T. W., Thompson, R. A., & Schoemann, L. M. (1996). Microgametogenesis in *Plumbago zeylanica* (*Plumbaginaceae*). I. Descriptive cytology and three-dimensional organization. *American Journal of Botany* 83, 1435-1453.
- Sabelli, P. A., Dante, R. A., Leiva-Neto, J. T., Jung, R., Gordon-Kamm, W. J., & Larkins, B. A. (2005). RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 13005-13012.
- Saido, T. C., Sorimachi, H., & Suzuki, K. (1994). Calpain - new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB Journal* 8, 814-822.
- Sala, F., Parisi, B., Burrioni, D., Amileni, A. R., Pedralinoy, G., & Spadari, S. (1980). Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the alpha-like DNA-polymerase of plant cells. *FEBS Letters* 117, 93-98.
- Samuels, A. L., Meehl, J., Lipe, M., & Staehelin, L. A. (1998). Optimizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization - Rapid communication. *Protoplasma* 202, 232-236.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., & del Rio, L. A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 2115-2126.
- Sanchez, P., Zabala, M. D., & Grant, M. (2000). AtBI-1, a plant homologue of Bax Inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant Journal* 21, 393-399.
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S. J., Iwama, N., Boise, L. H., Thompson, C. B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H. G., & Reed, J. C. (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast 2-hybrid system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9238-9242.
- Saviani, E. E., Orsi, C. H., Oliveira, J. F. P., Pinto-Maglio, C. A. F., & Salgado, I. (2002). Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Letters* 510, 136-140.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., & Korsmeyer, S. J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: A control point for apoptosis. *Science* 300, 135-139.
- Seago, J. L., Marsh, L. C., Stevens, K. J., Soukup, A., Votrubova, O., & Enstone, D. E. (2005). A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. *Annals of Botany* 96, 565-579.
- Shah, J., Kachroo, P., & Klessig, D. F. (1999). The *Arabidopsis* *ssil* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11, 191-206.
- Shen, W. H. (2002). The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends in Plant Science* 7, 505-511.
- Shindo, T. & Van Der Hooft, R. A. L. (2008). Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Molecular Plant Pathology* 9, 119-125.
- Shinohara, N., Demura, T., & Fukuda, H. (2000). Isolation of a vascular cell wall-specific monoclonal antibody recognizing a cell polarity by using a phage display subtraction method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2585-2590.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9, 261-270.
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183-197.
- Schmid, M., Simpson, D., & Gietl, C. (1999). Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14159-14164.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G., & Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214, 821-828.
- Schreiber, V., Ame, J. C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., & de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *Journal of Biological Chemistry* 277, 23028-23036.
- Schussler, E. E. & Longstreth, D. J. (2000). Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (*Alismataceae*). *American Journal of Botany* 87, 12-19.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., & Polle, A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology* 127, 887-898.
- Schwarzerová, K., Zelenková, S., Nick, P., & Opatrný, Z. (2002). Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant and Cell Physiology* 43, 207-216.

- Sieberer, B. J., Timmers, A. C. J., Lhuissier, F. G. P., & Emons, A. M. C. (2002). Endoplasmic Microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiology* 130, 977-988.
- Simeonova, E., Sikora, A., Charzynska, M., & Mostowska, A. (2000). Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 214, 93-101.
- Skorzynska-Polit, E. & Krupa, Z. (2003). The activity of lipoxygenase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh - a preliminary study. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8, 279-284.
- Śliwińska, E., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2002). Factors affecting nuclear dynamics and green fluorescent protein targeting to the nucleus in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Science* 163, 425-430.
- Smertenko, A., Dráber, P., Viklický, V., & Opatrný, Z. (1997). Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell and Environment* 20, 1534-1542.
- Smetana O. (2006). Mechanizmy smrti v buněčných liniích tabáku s geneticky modifikovanou citlivostí vůči PCD indukujícím faktorům. Praha: diplomová práce.
- Smith, S. (2001). The world according to PARP. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 174-179.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., & de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- Sobkowiak, R. & Deckert, J. (2004). The effect of cadmium on cell cycle control in suspension culture cells of soybean. *Acta Physiologiae Plantarum* 26, 335-344.
- Soldani, C. & Scovassi, A. I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis* 7, 321-328.
- Sperandio, S., de Belle, I., & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14376-14381.
- Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* 69, 217-245.
- Sugiyama, M., Ito, J., Aoyagi, S., & Fukuda, H. (2000). Endonucleases. *Plant Molecular Biology* 44, 387-397.
- Sun, Y. L., Zhao, Y., Hong, X., & Zhai, Z. H. (1999). Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters* 462, 317-321.
- Świątek, A., Lenjou, M., Van Bockstaele, D., Inzé, D., & Van Onckelen, H. (2002). Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology* 128, 201-211.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K., & Moriyasu, Y. (2004). 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant and Cell Physiology* 45, 265-274.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., & Machida, Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* 128, 4681-4689.
- Teichmanov, M., Mašková, P., Vojvodová, P., Krekule, J., Francis, D., & Lipavská, H. (2007). The fission yeast mitotic activator *cdc25* and sucrose induce early flowering synergistically in the day-neutral *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. *New Phytologist* 176, 804-812.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Sequence and analysis of the genome of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Medical Genetics* 37, S31.
- Thomas, H., Ougham, H. J., Wagstaff, C., & Stead, A. D. (2003). Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany* 54, 1127-1132.
- Thomas, M., Groover, A., & Jones, A. M. (1999). Programmed cell death of tracheary elements is regulated by a 'trigger' protease. *Molecular Biology of the Cell* 10, 352A.
- Thomine, S., Wang, R. C., Ward, J. M., Crawford, N. M., & Schroeder, J. I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4991-4996.
- Tian, R. H., Zhang, G. Y., Yan, C. H., & Dai, Y. R. (2000). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Letters* 474, 11-15.
- Torriglia, A., Perani, P., & Courtois, Y. (1999). I-DNase II: a new link in apoptotic pathways. *M S-Medecine Sciences* 15, 253-259.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death and Differentiation* 7, 1174-1181.
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*

- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with the t(14-18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.
- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V., & Dixit, V. M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell* 6, 961-967.
- Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., & De Gara, L. (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright Yellow 2 cells. *Plant Physiology* 134, 1100-1112.
- Vacca, R. A., Valenti, D., Bobba, A., de Pinto, M. C., Merafina, R. S., De Gara, L., Passarella, S., & Marra, E. (2007). Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco Bright Yellow 2 cells. *FEBS Letters* 581, 917-922.
- van Buuren, M. L., Guidi, L., Fornale, S., Ghetti, F., Franceschetti, M., Soldatini, G. F., & Bagni, N. (2002). Ozone-response mechanisms in tobacco: implications of polyamine metabolism. *New Phytologist* 156, 389-398.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1998). H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3, 330-334.
- Van Cruuchten, S. & Van den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C* 31, 214-223.
- van Doorn, W. G. & Woltering, E. J. (2004). Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *Journal of Experimental Botany* 55, 2147-2153.
- van Doorn, W. G. & Woltering, E. J. (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* 10, 117-122.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death and Differentiation* 9, 20-26.
- Vida, T. A. & Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *Journal of Cell Biology* 128, 779-792.
- Villa, P., Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (1997). Caspases and caspase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 388-393.
- Víteček, J., Wünschová, A., Petřek, J., Adam, V., Kizek, R., & Havel, I. (2007). Cell death induced by sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in tobacco BY-2 cell suspension. *Biologia Plantarum* 51, 472-479.
- Vogelilange, R. & Wagner, G. J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves - implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiology* 92, 1086-1093.
- Voigt, G., Biehl, B., Heinrichs, H., & Voigt, J. (1997). Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *Phytochemistry* 44, 389-392.
- Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, G. E. M., Oppedijk, B. J., van der Heijden, M. W., de Priester, W., & Schilperoort, R. A. (1999). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology* 39, 489-501.
- Wang, M., Oppedijk, B. J., Lu, X., VanDuijn, B., & Schilperoort, R. A. (1996a). Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 32, 1125-1134.
- Wang, S. M., Lue, W. L., Eimert, K., & Chen, J. C. (1996b). Phytohormone-regulated beta-amylase gene expression in rice. *Plant Molecular Biology* 31, 975-982.
- Wang, X. D. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 15, 2922-2933.
- Wang, X. Q., Stanbridge, E. J., Lao, X. Y., Cai, Q., Fan, S. T., & Redpath, J. L. (2007). p53-dependent Chk1 phosphorylation is required for maintenance of prolonged G2 arrest. *Radiation Research* 168, 706-715.
- Watanabe, M., Setoguchi, D., Uehara, K., Ohtsuka, W., & Watanabe, Y. (2002). Apoptosis-like cell death of *Brassica napus* leaf protoplasts. *New Phytologist* 156, 417-426.
- Watanabe, N. & Lam, E. (2005). Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 280, 14691-14699.

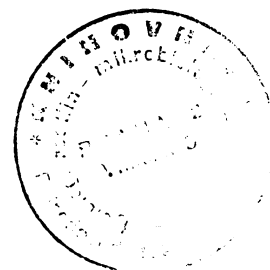
- Watanabe, N. & Lam, E. (2006). *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant Journal* 45, 884-894.
- Weaver, L. M., Gan, S. S., Quirino, B., & Amasino, R. M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37, 455-469.
- Wei, C. X., Lan, S. Y., & Xu, Z. X. (2002). Ultrastructural features of nucleus degradation during programmed cell death of starchy endosperm cells in rice. *Acta Botanica Sinica* 44, 1396-1402.
- Wesierska-Gadek, J., Gueorguieva, M., Wojciechowski, J., & Tudzarova-Trajkovska, S. (2004). In vivo activated caspase-3 cleaves PARP-1 in rat liver after administration of the hepatocarcinogen N-nitrosomorpholine (NNM) generating the 85 kDa fragment. *Journal of Cellular Biochemistry* 93, 774-787.
- Whittle, C. A., Beardmore, T., & Johnston, M. O. (2001). Is G1 arrest in plant seeds induced by a p53-related pathway? *Trends in Plant Science* 6, 248-251.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 139, 1281-1292.
- Woltering, E. J. (2004). Death proteases come alive. *Trends in Plant Science* 9, 469-472.
- Wu, F. B., Zhang, G. P., & Yu, J. S. (2003a). Genotypic differences in effect of Cd on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 1272-1281.
- Wu, F. B., Zhang, G. P., & Dominy, P. (2003b). Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* 50, 67-78.
- Wu, X. L., Simone, J., Hewgill, D., Siegel, R., Lipsky, P. E., & He, L. S. (2006a). Measurement of two caspase activities simultaneously in living cells by a novel dual FRET fluorescent indicator probe. *Cytometry Part A* 69A, 477-486.
- Wu, Y. C., Stanfield, G. M., & Horvitz, H. R. (2000). NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes & Development* 14, 536-548.
- Wu, Y. X., Xing, D., Luo, S. M., Tang, Y. H., & Chen, Q. (2006b). Detection of caspase-3 activation in single cells by fluorescence resonance energy transfer during photodynamic therapy induced apoptosis. *Cancer Letters* 235, 239-247.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Xu, Q. L. & Reed, J. C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular Cell* 1, 337-346.
- Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2001). A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 127, 1626-1634.
- Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiologia Plantarum* 123, 369-375.
- Yamada, T., Marubashi, W., & Niwa, M. (2000). Apoptotic cell death induces temperature-sensitive lethality in hybrid seedlings and calli derived from the cross of *Nicotiana suaveolens* x *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211, 614-622.
- Yang, B., Johnson, T. S., Thomas, G. L., Watson, P. F., Wagner, B., Furness, P. N., & El Nahas, A. M. (2002). A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney International* 62, 1301-1313.
- Yang, K. Y., Liu, Y. D., & Zhang, S. Q. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 741-746.
- Yang, Y. L. & Li, X. M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Research* 10, 169-177.
- Yano, A., Suzuki, K., & Shinshi, H. (1999). A signaling pathway, independent of the oxidative burst, that leads to hypersensitive cell death in cultured tobacco cells includes a serine protease. *Plant Journal* 18, 105-109.
- Yao, N., Imai, S., Tada, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Park, P., & Mayama, S. (2002). Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 1000-1007.
- Ye, Z. H. & Varner, J. E. (1996). Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology* 30, 1233-1246.

- Yeh, C. M., Hsiao, L. J., & Huang, H. J. (2004). Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant and Cell Physiology* 45, 1306-1312.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J. D. G., & Doke, N. (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91(phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15, 706-718.
- Young, T. E. & Gallie, D. R. (1999). Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Molecular Biology* 39, 915-926.
- Young, T. E. & Gallie, D. R. (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 42, 397-414.
- Young, T. E., Gallie, D. R., & DeMason, D. A. (1997). Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunken2* genotypes. *Plant Physiology* 115, 737-751.
- Yu, L. H., Kawai-Yamada, M., Naito, M., Watanabe, K., Reed, J. C., & Uchimiyu, H. (2002). Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor. *FEBS Letters* 512, 308-312.
- Yuan, J. Y., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell-death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Yun, J. G., Hayashi, T., Yazawa, S., Katoh, T., & Yasuda, Y. (1996). Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by a rapid temperature drop. *Journal of Plant Research* 109, 339-342.
- Zaina, G., Morassutti, C., De Amicis, F., Fogher, C., & Marchetti, S. (2003). Endonuclease genes up-regulated in tissues undergoing programmed cell death are expressed during male gametogenesis in barley. *Gene* 315, 43-50.
- Zelená, A. (2000). Fyziologické aspekty synchronizace dělení buněčných linií tabáku. Praha: diplomová práce.
- Zha, H. B., AimeSempe, C., Sato, T., & Reed, J. C. (1996a). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bel-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BN3) distinct from BH1 and BH2. *Journal of Biological Chemistry* 271, 7440-7444.
- Zha, H. B., Fisk, H. A., Yalfe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., & Reed, J. C. (1996b). Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 16, 6494-6508.
- Zhang, Y. X. & Xiao, H. (1998). Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 420, 1-6.
- Zhao, C. S., Johnson, B. J., Kositsup, B., & Beers, E. P. (2000). Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiology* 123, 1185-1196.
- Zhao, Y., Jiang, Z. F., Sun, Y. L., & Zhai, Z. H. (1999). Apoptosis of mouse liver nuclei induced in the cytosol of carrot cells. *FEBS Letters* 448, 197-200.

URL-adresy:

<http://www.biologie-lhk.cz/index.php?node=48>

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/kfrserver/studium/prednasky/anatomie/index.html>



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ROSTLIN**

**INDUKCE A DETEKCE PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI (PCD)
V BUNĚČNÝCH LINIÍCH TABÁKU**

ANDREA KUTHANOVÁ

SHRNUTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE



PRAHA 2008

OBSAH

1. Úvod a cíle práce	2
2. Materiál a metody	4
2.1. Materiál	4
2.2. Metody	4
3. Výsledky a diskuze	5
3.1. Účinek chladu a kadmia na buňky BY-2	5
3.2. Internukleozomální fragmentace DNA	8
3.3. Souvislost indukce PCD vyvolané kadmíem a buněčného cyklu	12
3.4. Mechanismus a příčiny protahování jader	15
4. Závěry	21
5. Curriculum vitae	22
6. Publikace	25
7. Seznam použité literatury	27

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří hlavně mému školiteli Prof. Zdeňku Opatrnému a konzultantovi Dr. Lukáši Fischerovi za podnětné diskuze.

Dále mým kolegům z laboratoře, především Lence Dvořákové, Janě Krtkové, Evě Nocarové, Janu Petráškoví, Kateřině Schwarzerové a Ondřeji Smetanovi. Speciální poděkování patří mému manželovi Braňovi.

Práce byla vypracována za finanční podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (VS 96145, LN00A081, MSM1131000003 a MSM0021620858) a programem COST (OC 844.20).

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Programovaná buněčná smrt (PCD, z anglického programmed cell death) se uplatňuje jednak při vývoji rostlin v buněčné diferenciaci, utváření rostlinných orgánů a senescenci a jednak hraje významnou roli v obranných reakcích a odpovědích na nejrůznější stresové působení jak abiotických, tak i biotických stresorů. Mechanismus PCD umožňuje organizmu eliminovat staré či narušené buňky bez poškození okolních buněk / pletiva. Tento vysoce komplexní proces je oproti rostlinným buňkám velmi dobře prostudován u živočišných buněk, ve kterých existuje několik typů PCD: např. apoptotická, autofagická buněčná smrt, paraptóza či mitotická katastrofa (Bröker *et al.* 2005). Pouze některé znaky těchto živočišných PCD byly popsány u rostlinných buněk. Navíc některé typy PCD, jako mitotická katastrofa u rostlinných buněk, vykazují znaky neprogramovaného umírání. U rostlinných buněk, a zejména pak u buněčných kultur však pravděpodobně zcela nelze, i když se o to různí autoři stále snaží, striktně odlišit jednotlivé typy programovaného umírání buněk. V poslední době se ukazuje, že existuje pouze jeden faktor společný všem rostlinným PCD a to vakuolární kolaps (Groover *et al.* 1997, Groover a Jones 1999). Jde o rozpad vakuol a následně vyplavení hydrolytických enzymů ven z vakuol, vedoucí až k autolýze buněk (Jones 2001). Tato hypotéza vyplývá z faktu existence vakuol ve všech typech rostlinných buněk a znalosti jejich funkce nejen zásobní, ale zřejmě i cíleně lytické.

Studium mechanismu PCD v celých rostlinách je komplikované, zejména v důsledku toho, že se většinou vyskytuje jen v malém počtu často složitě přístupných buněk, které jsou obklopeny velkým množstvím buněk bez probíhající PCD. Ke studiu procesů PCD jsou proto často využívány buněčné kultury, které představují v mnoha případech použitelný zjednodušený model složitých fyziologických procesů probíhajících v celé rostlině *in vivo*. Studium PCD v buněčných kulturách *in vitro* je však nutné vždy srovnávat s mechanismem programovaného umírání buněk *in vivo*, kde je celá rostlina ovlivňována řadou různých faktorů. Nicméně v obou případech mají buňky pravděpodobně předem definovaný PCD program složený ze tří fází: iniciační, efektorové a exekuční fáze.

Existuje řada důvodů, proč jsou buněčné linie vhodným modelovým materiálem pro studium mechanismu PCD. Přednostně jde o vysoce uniformní populaci buněk. Díky intenzivnímu dělení buněk je velmi jednoduché získat velké množství materiálů v relativně krátkém čase pro pokusné účely. V neposlední řadě je nutné zdůraznit, že buněčné kultury jsou vlastně skupinou nediferencovaných buněk, což je vhodné pro studium základních odpovědí rostlinných buněk na PCD podněty.

Buněčné kultury různého typu, ať krátkodobé či dlouhodobé, je možné využívat ke studiu vývojových programů PCD (mj. studium embryogeneze - buněčné kultury smrku a jedle (Filonova

et al. 2000, Bozhkov *et al.* 2004), studium xylogeneze - buněčné kultury *Zinna elegans* (Fukuda a Komamine 1980) nebo umírání buněk aleuronové vrstvy - buněčné kultury ječmene (Fath *et al.* 2000). Ale jsou také velmi vhodným modelem PCD vyvolané stresem. Látky, které jsou schopné vyvolávat nebo inhibovat PCD, jsou jednoduše k buňkám přidány nebo naopak z média vymyty.

Zvláštní postavení mezi těmito pokusnými modely představují buněčné linie. Tedy buněčné kultury vyznačující se vysokou strukturální i funkční homogenitou dané buněčné populace a jejím standardním chováním v průběhu tzv. subkultivačního intervalu, do značné míry simulujícího různé fáze buněčné ontogeneze *in vivo* - fázi intenzivního dělení, fázi expanze, resp. růstu, fázi zrání až senescenční. Umožňují tak velmi detailní, přesnou a hlavně simultánní analýzu svého chování na úrovni molekulární, biochemické, cytologické, až morfologické.

Téma dizertační práce bylo zadáno v kontextu široké výzkumné problematiky týmu zaměřené na výzkum fyziologie stresu u rostlin (program „Rostlinná buňka a stres“). Z těchto důvodů se předložená dizertační práce zabývá programovanou buněčnou smrtí vyvolanou abiotickým stresem u buněk tabákové linie BY-2.

Hlavním cílem práce bylo pochopit mechanismy vedoucí k programovanému umírání buněk BY-2 po působení vybraných abiotických stresorů (síranu kademnatého a chladu – 4°C). Dílčími cíli pak byl jednak detailní popis účinku jednotlivých induktorů PCD jak na cytologické, tak molekulární úrovni. Jednak podrobné studium mechanismů indukce PCD v různých fázích buněčného cyklu.

V průběhu řešení se samozřejmě strukturovaly i další, původně neplánované, oblasti studia.

2. MATERIÁL A METODY

2.1. Materiál

Tabáková buněčná linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow, Nagata *et al.* 1992).

Tabáková buněčná linie BY-2/HDEL (transgenní linie s vneseným genovým konstruktem m-gfp5-ER, který kóduje zelený fluorescenční protein mGFP5 a lokalizačním signálem do endoplazmatického retikula; Haseloff *et al.* 1997, Petrášek *et al.* 2003).

Tabáková buněčná linie BY-2/GT16 (transgenní linie BY-GT16 s vneseným genovým konstruktem sGFP-TUA kódující fúzní protein sGFP a alfa podjednotky tubulinu; TUA3; Kumagaki *et al.* 2001).

Tabáková buněčná linie BY-2/TGFP3 (transgenní linie nesoucí konstrukt GFP-mTn, kódující fúzní protein GFP s doménou myšního talinu vázající F aktin; Kost *et al.* 1998, Srba nepublikováno).

Tabáková buněčná linie BY/GV7 (transgenní linie BY/GV7 s vneseným genovým konstruktem kódujícím fúzní protein GFP a AtVam3p lokalizovaný do tonoplastu, Kutsuna a Hasezawa 2002).

2.2. Metody

Světelná a fluorescenční (konfokální) mikroskopie:

- morfologické hodnocení, stanovení viability buněk a mitotického indexu
- vizualizace buněčných struktur (jader, vakuol, cytoskeletu) *in vivo*

Synchronizace buněk

Příprava protoplastů

Izolace jader

Transmisní elektronová mikroskopie - morfologické hodnocení

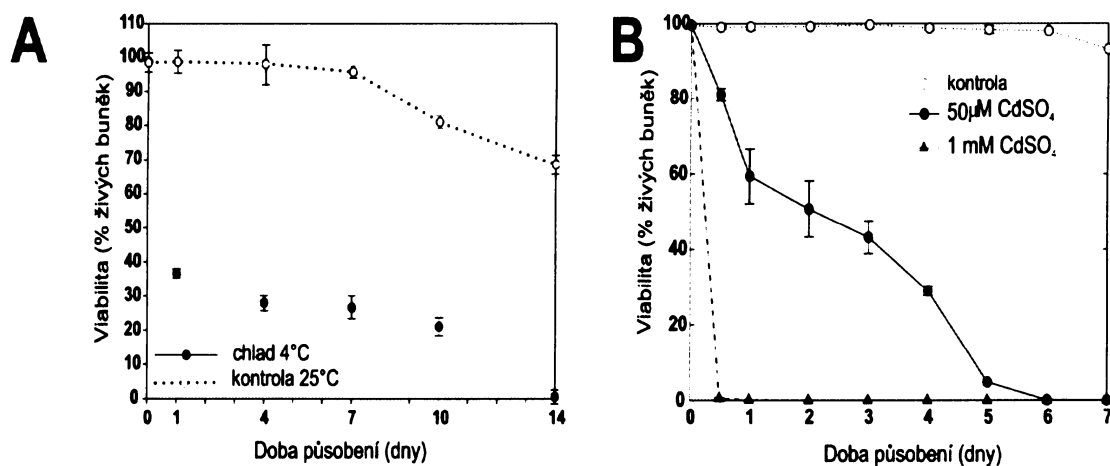
Analýzy integrity genomové DNA (izolace DNA, DNA elektroforéza, TUNEL reakce)

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Účinek chladu a kadmia na buňky BY-2

Kultivace buněk tabákové linie BY-2 v médiu s $50\mu\text{M CdSO}_4$ vyvolala snížení viability buněk již během prvních 24h působení (až na cca 60 %). Obdobně reagovaly buňky i na kultivaci při 4°C , kde byl pozorován pokles viability buněk na cca 40% první den kultivace. Následný pokles viability buněk byl při obou stresových působeních výrazně pomalejší (obr. 1) – rychlou smrtí pravděpodobně reagovala jen část populace buněk. Odlišná citlivost byla přitom zřejmě dána aktuální pozicí v buněčném cyklu v okamžiku aplikace stresu (blíže kapitola 3.3).

Změny ve viabilitě buněk byly doprovázeny morfologickými změnami (protahováním buněk, protahováním a rozpadem jader, zvýšenou vakuolizací buněk a granulací cytoplazmy). Protahování buněk během prvních dnů působení abiotických stresů pravděpodobně souviselo s obecnou, nespecifickou reakcí buněk na stresové podmínky, na které buňky reagovaly zablokováním své mitotické aktivity. V případě ovlivnění buněk $50\mu\text{M}$ koncentrací kadmia, však mohlo být takovéto prodlužování buněk způsobeno i specificky: rozvolněním buněčné stěny v důsledku masivní syntézy aktivních forem kyslíku, kterou nepřímým způsobem přes Fentonovu reakci vyvolávají kademnaté ionty (Sanitá de Toppi a Gabrielli 1999, Olmos *et al.* 2003, Fry *et al.* 2001).



Obr. 1. Viability buněk BY-2 po kultivaci ve 4°C a po aplikaci $50\mu\text{M}$ kadmia

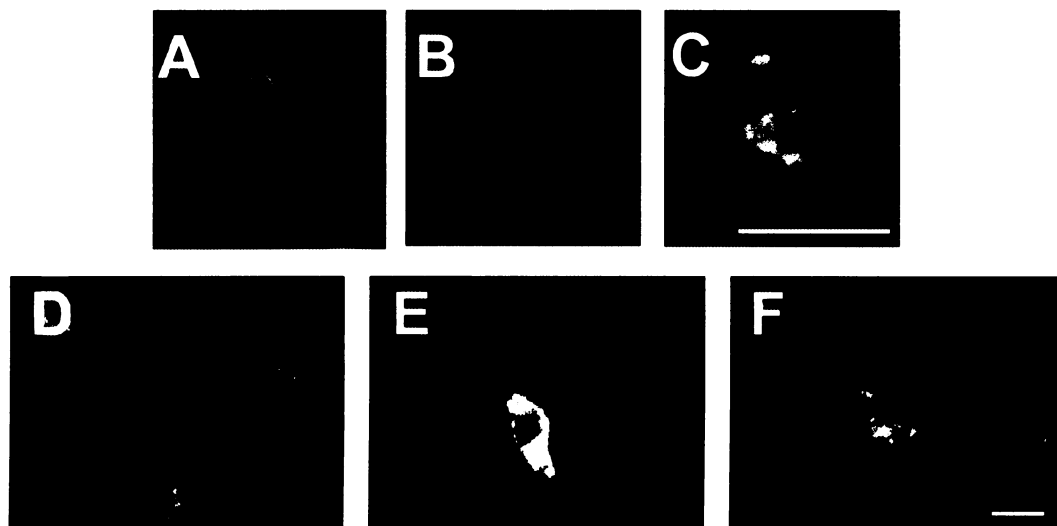
A - Graf viability buněk BY-2 během 14denní kultivace ve 4°C .

B - Graf viability buněk po aplikaci $50\mu\text{M}$ kadmia.

Každý bod reprezentuje průměr 3 nezávislých pokusů \pm SE.

Při stresovém působení (jak nízké teploty, tak síranu kademnatého) docházelo ke změnám morfologie jader: rozpadlé mitotické struktury, zvláštní tvary jader (lalokovitá jádra) po chladovém působení, protažená jádra po ovlivnění buněk kadmiiem (které zřejmě souviselo s prodlužováním buněk - blíže kapitola 3.4). Po delším působení obou stresorů byla navíc nalezena fragmentovaná

interfázni jádra, typická pro apoptoticky umírající buňky (Kerr *et al.* 1972, obr. 2). U protoplastů *Arabidopsis thaliana* vystavených UV-C záření byl vysloven předpoklad, založený na pozorování třech tvarových typů jader (kulatých, srpkovitě prodloužených a fragmentovaných), že všechny tyto typy jader v sebe během PCD přecházejí (Danon a Gallois 1998). Což ukazuje na možnou účast protažených jader v časných fázích PCD.



Obr. 2. Malformace jader buněk BY-2 po chladovém působení (4°C) a po aplikaci 50µM CdSO₄

A - C - Malformace jader po kultivaci buněk ve 4°C
D - F - Protahování a rozpad jader po aplikaci 50µM CdSO₄
A, D - Kontrolní neovlivněné buňky, 3 dny staré.
B - Lalokovitá jádra pozorovaná po 4 dnech kultivace buněk ve 4°C.
C - Rozpad mitotických struktur po 7 dnech kultivace ve 4°C.
E - Protážená jádra po jednodenní kultivaci v médiu obohaceném o 50µM kadmium.
F - Rozpadlá jádra po třech dnech kultivace buněk v médiu obohaceném o 50µM kadmium.

Jaderné barvení Hoechst 33258.
Měřitko = 25 µm

Rozpadu jader v našich pokusech pravděpodobně předcházela tzv. vakuolární kolaps. Při obou stresových působeních byla nalezena zvýšená vakuolizace buněk. Drobné vakuoly/vezikuly byly pozorovány po chladovém působení v oblasti kolem jádra a po působení kadmia také v cytoplazmatických provazcích (obr. 3).

Vakuolární kolaps je považován za jeden z hlavních znaků PCD u rostlin (Jones 2001). Vznik drobných vakuol, které postupně splývají s těmi již existujícími v jednu velkou centrální vakuolu, byl u rostlinných buněk podléhajících buněčné smrti popsán již dříve: u buněk BY-2 po působení H₂O₂ (Houot *et al.* 2001), při umírání suspenzorových buněk smrku ztepilého (Filonova *et al.* 2000), při přeměně mezofylových buněk *Zinnia elegans* na tracheální elementy (Groover *et al.* 1997) anebo při tzv. kortikální buněčné smrti kořenů obilovin (Liljeroth a Bryngelsson 2001). Ve velké centrální vakuole dochází k akumulaci hydrolytických enzymů, které se po prasknutí tonoplastu vylévají do buňky a degradují celý buněčný obsah (Jones 2001).

U buněk ovlivněných kadmiiem byla ještě navíc pozorována zvláštní, víceméně kulatá

tělíska endoplazmatického retikula, která byla pozorována jak *in vivo* pomocí transgenní linie BY/HDEL, tak pod Nomarského diferenciálního kontrastem. U buněk *Arabidopsis thaliana* byly v podobných cisternách endoplazmatického retikula (Mitsubishi *et al.* 2000, Hayashi *et al.* 2001) nalezeny inaktivní prekurzory hydrolytických enzymů (RD21 a γ VPE), které mohou být takto dopravovány do lytických vakuol a následně použity k programované degradaci buněčného obsahu při vakuolárním kolapsu (Hayashi *et al.* 2001). Lze se domnívat, že obdobný mechanismus funguje (vzhledem k přítomnosti uvedených struktur) i v buňkách BY-2 při raných fázích PCD vyvolané aplikací iontů kadmia.



Obr. 3. Vizualizace vakuolárního systému u buněk BY-2 pomocí barviva FM4-64 po aplikaci 50 μ M kadmia

A, B - Buňky BY-2 po 1 denním ovlivnění 50 μ M kadmíem s četnými drobnými vakuolami v cytoplazmatických provazcích (šipky).

Barvivo FM4-64.

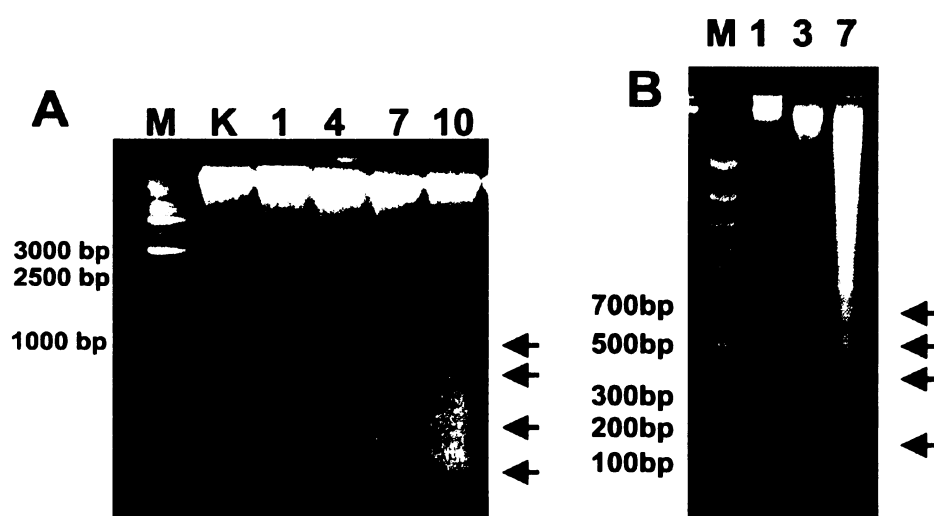
Měřítka = 25 μ m

Programovaný charakter umírání buněk po aplikaci 50 μ M CdSO₄ a po ovlivnění buněk chladem naznačuje i přítomnost specifické internukleozomální

fragmentace DNA (Koukalová *et al.* 1997, Fojtová a Kovařík 2000, obr. 4). Ztráta integrity DNA byla také potvrzena u významné části buněk *in situ*, TUNEL reakcí. Internukleozomální fragmentace DNA byla pozorována až ke konci kultivace buněk (7-14 dní), v době, kdy byly prakticky všechny buňky již mrtvé. Kromě uvedených ošetření byla specifická fragmentace DNA s podobným časováním popsána i po teplotním šoku (Vacca *et al.* 2004) nebo po aplikaci (β -D-galaktosyl)₃ „Yariv reagents“ (Chaves *et al.* 2002). Oproti uvedeným pozorováním byla v případě buněk rajčatové suspenzní kultury ošetřené induktory PCD u živočišných buněk (camptothecinem, staurosporinem a fumonisinem B1) detekována fragmentace DNA již po 48 hodinách, v době, kdy bylo téměř 30-40 % buněk ještě živých (de Jong *et al.* 2000). Příčinou rozdílných výsledků může být odlišná reakce různých rostlinných buněk na různé induktory smrti - v našich experimentech s linií BY-2 např. ani jedna z uvedených látek specifickou fragmentací DNA nevyvolávala. Vzhledem k rychlosti fragmentace však nelze vyloučit ani možnost, že se jednalo o experimentální artefakt související s rychlým zabitím buněk (viz kapitola 3.2).

3.2. Internukleozomální fragmentace DNA

Internukleozomální fragmentace DNA je považována za jeden z typických projevů programované buněčné smrti apoptotického typu (Wyllie *et al.* 1998). U rostlin byla pozorována např. u výše zmíněného ošetření buněk BY-2 50 μ M CdSO₄ (Fojtová a Kovařík 2000, obr. 4, 5). Naše výsledky však ukazují, že podobná specifická fragmentace DNA může být navozena i u buněk umírajících neprogramovaně. Velmi „rychlé zabítí“ intaktních buněk BY-2 třemi rozdílnými způsoby (zamražením buněk v tekutém dusíku, homogenizací v kulovém mlýnku a detergentem 5% Tritonem X-100) vyvolalo specifickou fragmentaci DNA pozorovatelnou již po jednom dni kultivace mrtvých buněk (obr. 5). Podobná fragmentace byla pozorována i u DNA izolované ze zamražených (a po rozmražení dále kultivovaných) neošetřených listů tabáku. Naopak u buněk BY-2 ošetřených 1mM CdSO₄, který vyvolal okamžitou smrt téměř všech buněk, nebyla během následné sedmidenní kultivace fragmentace DNA nalezena (Fojtová a Kovařík 2000, obr. 5). Jelikož 1mM CdSO₄ významně neinhiboval fragmentaci DNA u buněk zabitých zamražením v tekutém dusíku, nebyla nepřítomnost fragmentované DNA pravděpodobně důsledkem inhibice enzymatické aktivity hydrolytických enzymů vysokou koncentrací iontů kadmia, ale jiným



Obr. 4. Fragmentace DNA u buněk BY-2 ovlivněných v 50 μ M kadmíem a nízkou teplotou

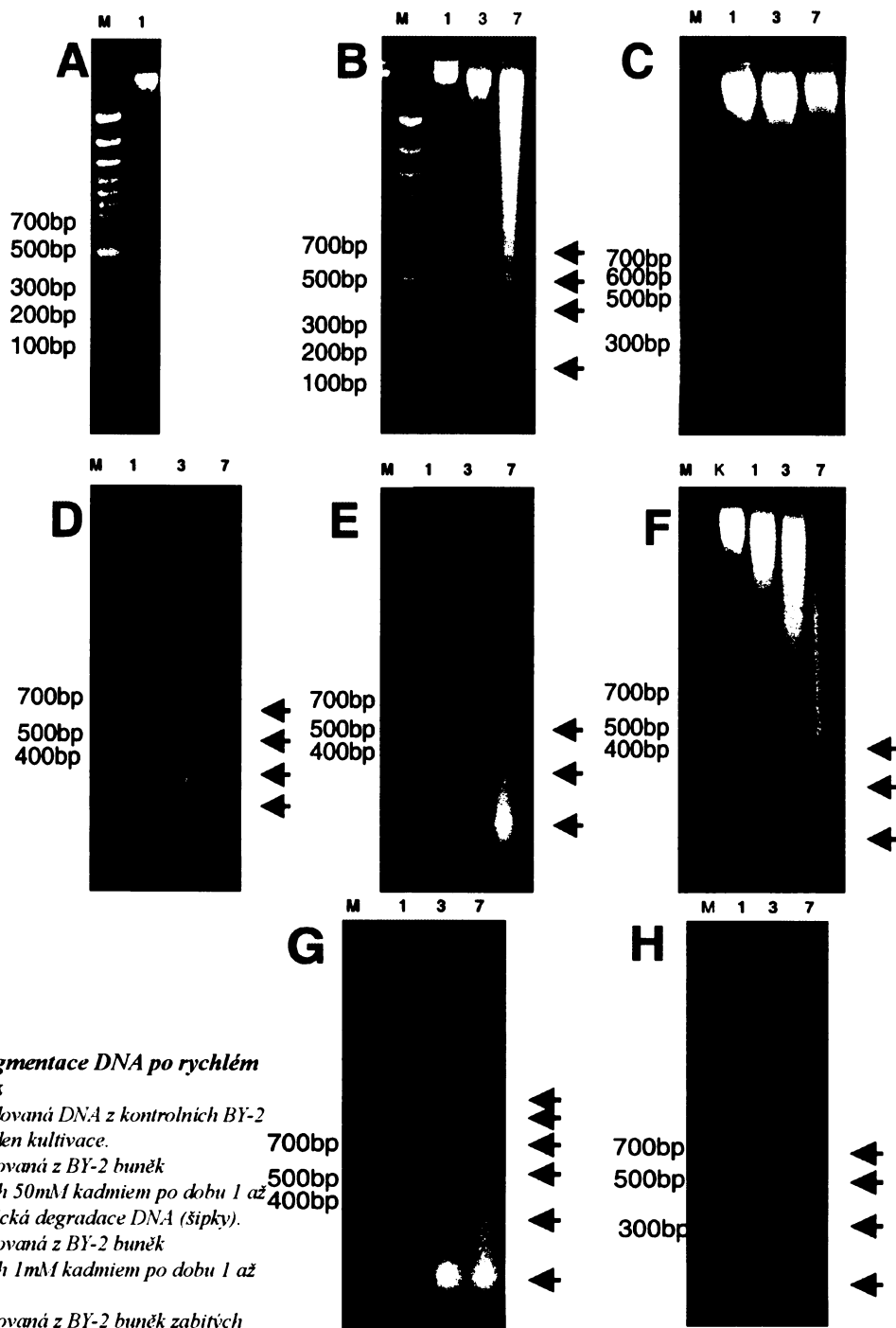
A - nízká teplota (4°C)

B - 50 μ M CdSO₄

M - marker molekulárních vah, K - kontrolní neovlivněné buňky, 1 - jeden den kultivace, 3 - 3 dny kultivace, 4 - 4 dny kultivace, 7 - 7 dní kultivace, 10 - 10 dní kultivace, šipky ukazují internukleozomální fragmentaci DNA

charakterem smrti (obr. 5).

Pro bližší charakterizaci a porovnání různých typů smrti navozené 50 μ M CdSO₄, 1mM CdSO₄ a mechanickou desintegrací byla provedena cytologická charakterizace takto ovlivněných kultur.



Obr. 5. Fragmentace DNA po rychlém zabití buněk

A - Nedegradovaná DNA z kontrolních BY-2 buněk první den kultivace.

B - DNA izolovaná z BY-2 buněk ovlivňovaných 50mM kadmíem po dobu 1 až 7 dnů. Specifická degradace DNA (šipky).

C - DNA izolovaná z BY-2 buněk ovlivňovaných 1mM kadmíem po dobu 1 až 7 dnů.

D - DNA izolovaná z BY-2 buněk zabitých zamražením v tekutém dusíku. Specifická degradace DNA (šipky).

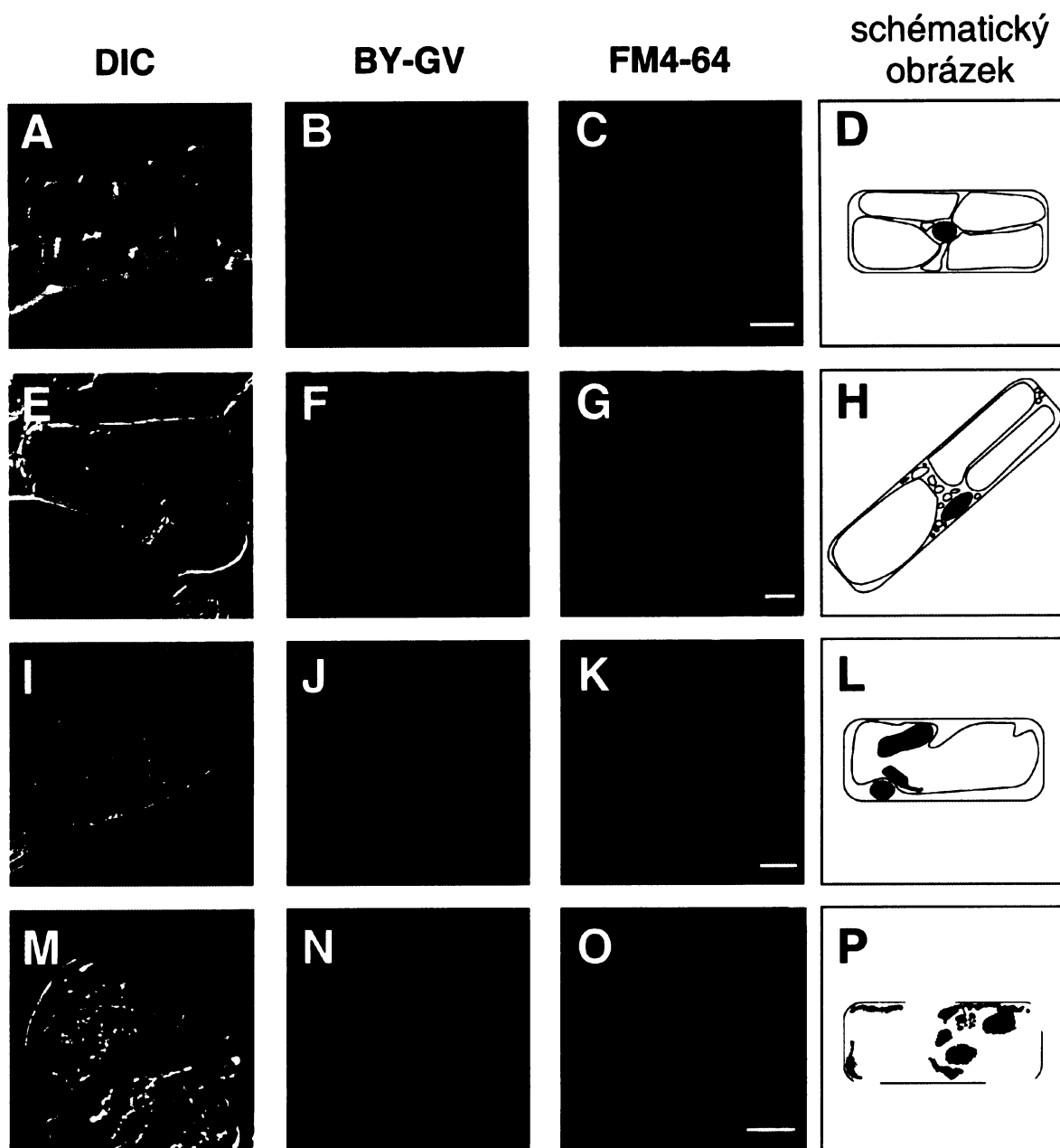
E - DNA izolovaná z BY-2 buněk ovlivněných 1mM kadmíem a ihned zabitých v tekutém dusíku, kultivovaných pozamražení po dobu 1 až 7 dnů.

F - DNA izolovaná z listů rostlin tabáku, zabitých zamražením v tekutém dusíku a kultivovaných po zamražení po dobu 1 až 7 dnů.

G - DNA izolovaná z BY-2 buněk zabitých homogenizací v kulovém mlýnku a kultivovaných poté po dobu 1 až 7 dnů.

H - DNA izolovaná z BY-2 buněk zabitých pomocí 5% tritonu X-100 a kultivovaných po dobu 1 až 7 dnů.

A-H - M - marker molekulárních vah, K - kontrola, 1 - 1den kultivace, 2 - 3dny kultivace, 3 - 7dnu kultivace, šipky ukazují fragmentaci DNA do oligonukleozomálních fragmentů



Obr. 6. Integrita buněk po rychlém zabíjení

A - C - Kontrolní neovlivněné buňky, jeden den kultivace.

D - E - Buňky ovlivňované 50 μM kadmiem po jeden den.

G - J - Buňky ovlivňované 1 mM kadmiem po jeden den.

I - L - Buňky zabité zamražením v tekutém dusíku a kultivované po rozmrazení 1 den.

A, E, I, M - Nomarského diferenciální kontrast

B, F, J, N - Transgenní linie BY-GV

C, G, K, O - Vakuolární barvivo FM4-64

D, H, L, P - Schématický obrázek integrity buněk, zejména vakuolárních membrán

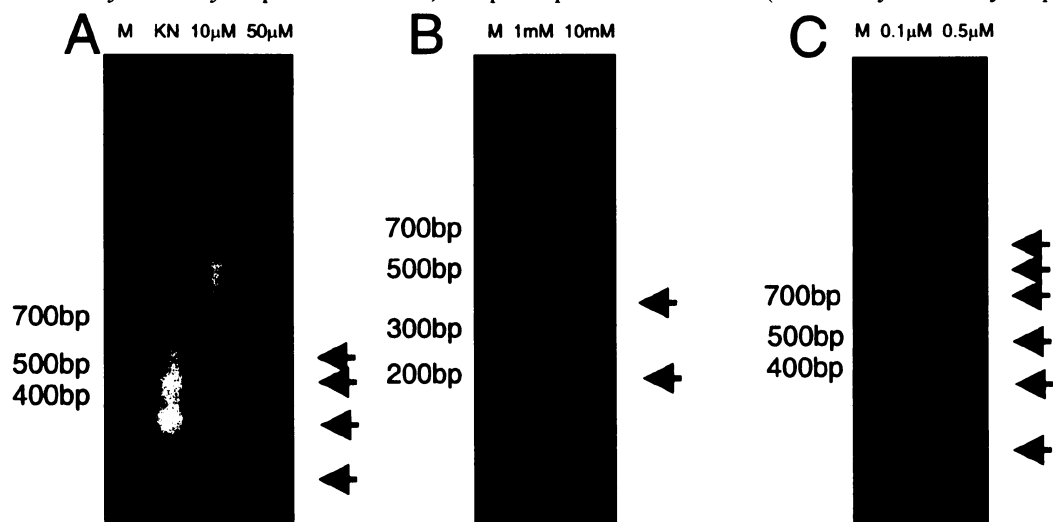
Měřítka = 10 μm

Pozornost byla vzhledem k předpokládané kompartmentaci lytických enzymů věnována integritě membrán (zejména pak vakuomu). Buněčné struktury a jejich integrita byla sledována pomocí Nomarského diferenciálního kontrastu (DIC), po obarvení buněk membránovou sondou FM4-64 a pomocí transgenní linie BY-GV7 s GFP-AtVam3p fúzním proteinem lokalizovaným v tonoplastu

(Kutsuna a Hasezawa 2002). Buňky zabitě rychle, např. zamražením v tekutém dusíku, ztrácely integritu membrán bezprostředně při jejich zabití (obr. 6). Naopak buňky zabitě (během několika hodin) po aplikaci 1mM CdSO₄ nevykazovaly žádnou výraznou změnu v integritě vakuolárních membrán, což koresponduje s faktem, že po tomto ovlivnění nebyla detekována fragmentace DNA. Změny v uspořádání vakuolárního systému, doprovázející programovanou buněčnou smrt, byly pozorovány u buněk ovlivněných 50μM CdSO₄ v pozdních fázích ovlivnění buněk a předcházely vakuolárnímu kolapsu a detekci fragmentace DNA (obr. 6). Na základě uvedených pozorování lze vyvodit, že internukleozomální fragmentace DNA zřejmě ve všech případech souvisela či byla podmíněna ztrátou integrity membrán, zejména tonoplastu.

Regulovaný vakuolární kolaps doprovázený vylitím hydroláz hraje klíčovou roli při spuštění exekuční fáze PCD u rostlin (Jones 2001). Naše výsledky ukazují, že tato fáze programované buněčné smrti může být navozena i u neošetřených buněk desintegrací buňky (vakuoly) – z vakuoly se přitom uvolňují buďto přímo aktivní exekuční lytické enzymy (vč. DNáz) nebo proteázy, které tyto enzymy aktivují. U živočichů hrají důležitou roli při aktivaci nukleáz zodpovědných za internukleozomální fragmentaci DNA cysteinové proteázy kaspázy, které však u rostlinných buněk chybí. Tam mohou jejich funkci zastávat jiné cysteinové proteázy, VPEs (z anglického vacuolar processing enzymes, Hatsugai *et al.* 2004, Kuroyanagi *et al.* 2005).

Fragmentace DNA, navozená v rychle zabitých buňkách, byla výrazně potlačena pomocí inhibitoru cysteinových proteáz E-64c, naopak aprotinin a PMSF (inhibitory serinových proteáz)



Obr. 7. Efekt inhibitorů proteáz na fragmentaci DNA

A - C - Buňky zabity zamražením v tekutém dusíku kultivované jeden den po rozmražení v přítomnosti:

A - inhibitoru cysteinových proteáz E-64c v koncentraci 10 a 50μM.

B - inhibitoru serinových a částečně cysteinových proteáz PMSF v koncentraci 1 a 10mM.

C - a inhibitoru serinových proteáz aprotininu v koncentraci 0.1 a 0.5μM.

A-C - M - marker molekulárních vah, KN - kontrola (buňky zamražené v tekutém dusíku). Šipky ukazují oligonukleozomální fragmentaci DNA.

blokovaly fragmentaci pouze minimálně (obr. 7). Jelikož byla fragmentace navíc doprovázena rozpadem vakuolárních membrán (obr. 6), jsou cysteinové proteázy VPEs vhodným kandidátem pro aktivaci DNáz u rychle zabitých buněk.

3.3. Souvislost indukce PCD vyvolané kadmii a buněčného cyklu

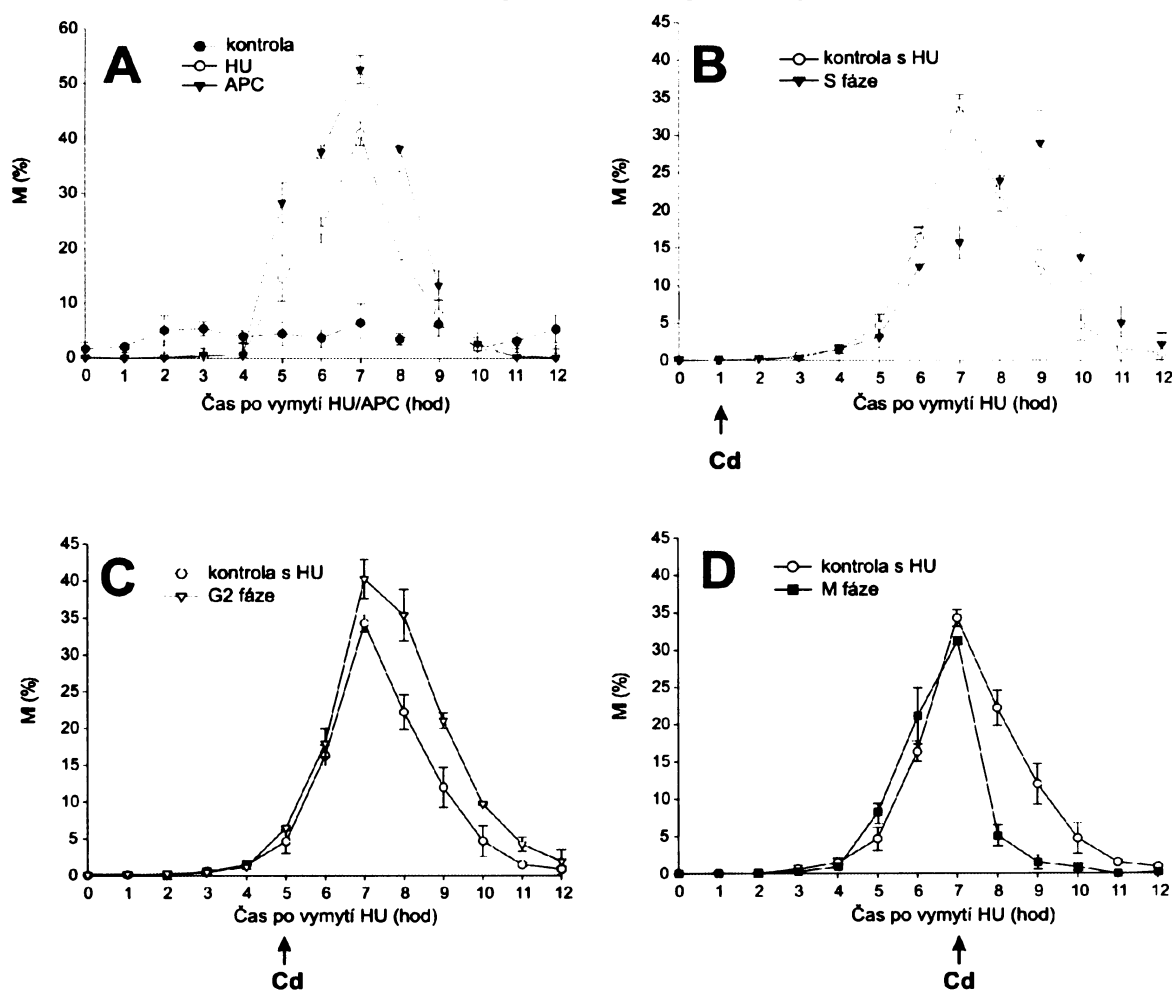
Charakter buněčné smrti se lišil u jednotlivých buněk (nesynchronizované kultury BY-2) vystavené působení síranu kademnatého či nízké teploty 4° C. Předpokládali jsme, že reakce buněk by mohla souviset s aktuální pozicí jednotlivých buněk v buněčného cyklu v okamžiku aplikace stresoru, a proto byla pro detailní studium indukce programované buněčné smrti pomocí síranu kademnatého použita synchronizovaná linie BY-2.

Standardní protokol pro synchronizaci buněk BY-2 je založen na kombinaci antireplikativa aphidicolinu (APC) a mitotické drogy propyzamidu (Nagata *et al.* 1992). Vzhledem k možnému přímému vlivu APC na indukci PCD (Matthew *et al.* 2007) byla testována i alternativní antireplikativní látka, hydroxymočovina (HU). Obě tyto uvedené látky zastavují buněčný cyklus na přechodu G1/S fáze, ale jejich synchronizační účinek se mírně lišil. Po aplikaci jak HU, tak APC bylo pozorováno nejvyšší množství buněk v mitóze 7 hod. po jejich vymytí. Hodnota tohoto maxima byla cca 40 % při použití HU a cca 55 % při použití APC (obr. 8), což však nevypovídá o lepší synchronizaci - během stejného časového intervalu 5-6 hodin, který je asi dvakrát delší než trvání mitózy individuální buňky, se při použití obou antireplikativ rozdělily prakticky všechny buňky. Důvodem pozorovaného rozdílu je zřejmě prodloužení trvání mitóz u jednotlivých buněk po použití APC - vyšší maximální mitotický index dosažený po aplikaci APC odráží častější překryvy časných a pozdních mitóz v rámci populace synchronizovaných buněk. Jelikož prodloužení normálního trvání mitózy často ukazuje na poškození buněk, které pak vede až k zastavení buněčného cyklu (Paulowich *et al.* 1997), mohl by účinek vlastního antireplikativa interferovat s účinkem kadmia. Navíc křivka mitotického indexu po synchronizaci APC byla podobná křivce mitotického indexu po aplikaci kadmia v G2 (při synchronizaci HU) a efekt kadmia by tak mohl být při použití APC maskován. Díky uvedeným poznatkům jsme usoudili, že použití 4mM HU pro synchronizaci buněk BY-2 je méně invazivní než použití APC, a tudíž i vhodnější pro synchronizaci buněk linie BY-2 za účelem studia indukce PCD.

Účinek 50μM CdSO₄ na hydroxymočovinou synchronizovanou kulturu byl studován po aplikaci v jednotlivých fázích buněčného cyklu (v čase 1, 5, 7 a 10.5 hodin po vymytí hydroxymočoviny, tedy v S, pozdní G2, M a časně G1 fázi buněčného cyklu, podle Świątek *et al.* 2002, obr. 8). Kadmium přidané k buňkám v S fázi buněčného cyklu vyvolalo zpoždění maxima mitotického indexu o 2 hodiny (obr. 8). Buňky ovlivněné v G2 fázi (obr. 8) nevykazovaly žádný posun maxima mitotického indexu, ale bylo u nich pozorováno celkové zvýšení mitotického indexu

(cca 40%), pravděpodobně díky prodloužení doby trvání mitóz jednotlivých buněk, podobně jako v případě APC.

U variant, kde bylo kadmium přidáno v S a G2 fázi, byla pozorována internukleozomální fragmentace DNA (obr. 9) sedmý a desátý den kultivace, kdy bylo detekováno také vyšší procento TUNEL-pozitivních jader a nulová viabilita. Nejrychlejší odezvu na přidání kadmia vykazovaly buňky v M fázi buněčného cyklu, kde téměř ihned po aplikaci kadmia klesl mitotický index na cca 0 % (obr. 8). Šlo o velmi rychlou zřejmě neprogramovanou smrt buněk, která byla doprovázená velmi rychlým rozpadem pozdně telofázních jader, což by se dalo přirovnat k tzv. mitotické katastrofě živočišných buněk, která je však smrtí programovanou (Castedo *et al.* 2004). Při rychlé smrti navozené aplikací kadmia v M fázi a rovněž při pomalé smrti indukované v G1 fázi buněčného cyklu nebyla detekována degradace DNA (podobně jako u kontrolních buněk s HU



Obr. 8. Synchronizace buněčné linie BY-2

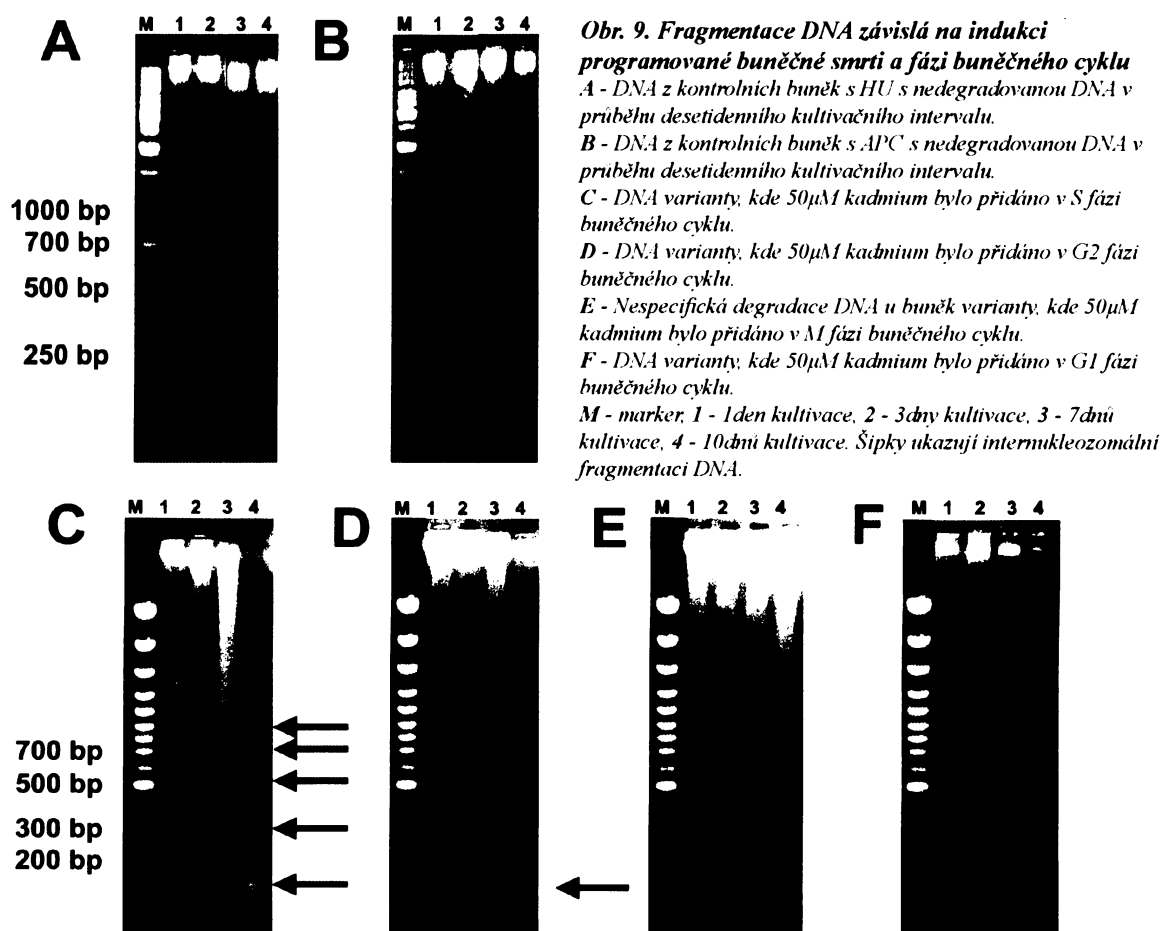
A - Graf synchronizace kontrolních buněk BY-2 pomocí APC nebo HU.

B - D - Efekt 50 μ M kadmia na mitotického indexu u buněk BY-2 po vymytí HU. Kadmium bylo přidáno v různých fázích buněčného cyklu, v S fázi (v čase 1 po vymytí HU, B), v pozdní G2 fázi (v čase 5 po vymytí HU, C) a v M fázi (v čase 7 po vymytí HU, D). Každý bod reprezentuje průměr ze tří nezávislých pokusů \pm SE.

nebo APC). Jelikož je fragmentace DNA způsobena vyplavením nebo aktivací hydrolytických enzymů, v uvedených fázích buněčného cyklu zřejmě k těmto pochodům souvisejícím s buněčnou lyzí nedocházelo, na rozdíl od výše zmíněné S a G2 fáze.

Na rozdíl od našich výsledků s kadmiiem byla při aplikaci bakteriálního elicitoru kryptogeinu pozorována aktivace obranných mechanismů a indukce buněčné smrti jen v S a G1 fázi buněčného cyklu, zatímco tato odpověď byla potlačena během G2 a M fáze (Kadota *et al.* 2004). Působení kadmia je však oproti specifickému účinku kryptogeinu vysoce pleiotropní (Zhang a Xiao 1998, Piqueras *et al.* 1999, Sandalo *et al.* 2001, Olmos *et al.* 2003) a tyto dva induktory PCD se liší i z hlediska cílových buněk in planta.

Vzhledem ke klíčové úloze vakuolárního kolapsu během programovaného umírání rostlinných buněk (blíže Jones 2001) lze předpokládat, že absence fragmentace DNA po aplikaci kadmia v M a G1 fázi je důsledkem řízeného potlačení vyplavení či aktivace hydrolytických



enzymů, o nichž víme, že jsou předpřipraveny i v intaktních neošetřených buňkách (viz kapitola 3.2). K indukci PCD (podobné apoptóze) by mohlo docházet na přechodu G2/M, neboť tento typ smrti způsobilo přidání síranu kademnatého jen v předcházejících fázích (tzn. S a G2).

Charakter umírání buněk v závislosti na přidání kadmia v G1 a G2 fázi je značně odlišný

s efektem kryptogeinu, který vyvolal umírání buněk v G1 fázi, zatímco v G2 fázi byla indukce smrti potlačena (Kadota *et al.* 2004). Kadota a Kochitsu (2006) předpokládají, že indukce PCD může být potlačena u dělicích buněk. Naproti tomu diferencované nedělicí se buňky nacházející se v G0 nebo G1 fázi buněčného cyklu jsou přirozeným cílem elicitorů, které v nich indukují hypersenzitivní reakci, která slouží k potlačení šíření patogenů z místa infekce. Kadmium i jiné abiotické stresory působí na různé buněčné procesy a většinou poškozují buňky v celé rostlině, což je odlišné od lokalizované hypersenzitivní reakce buněk.

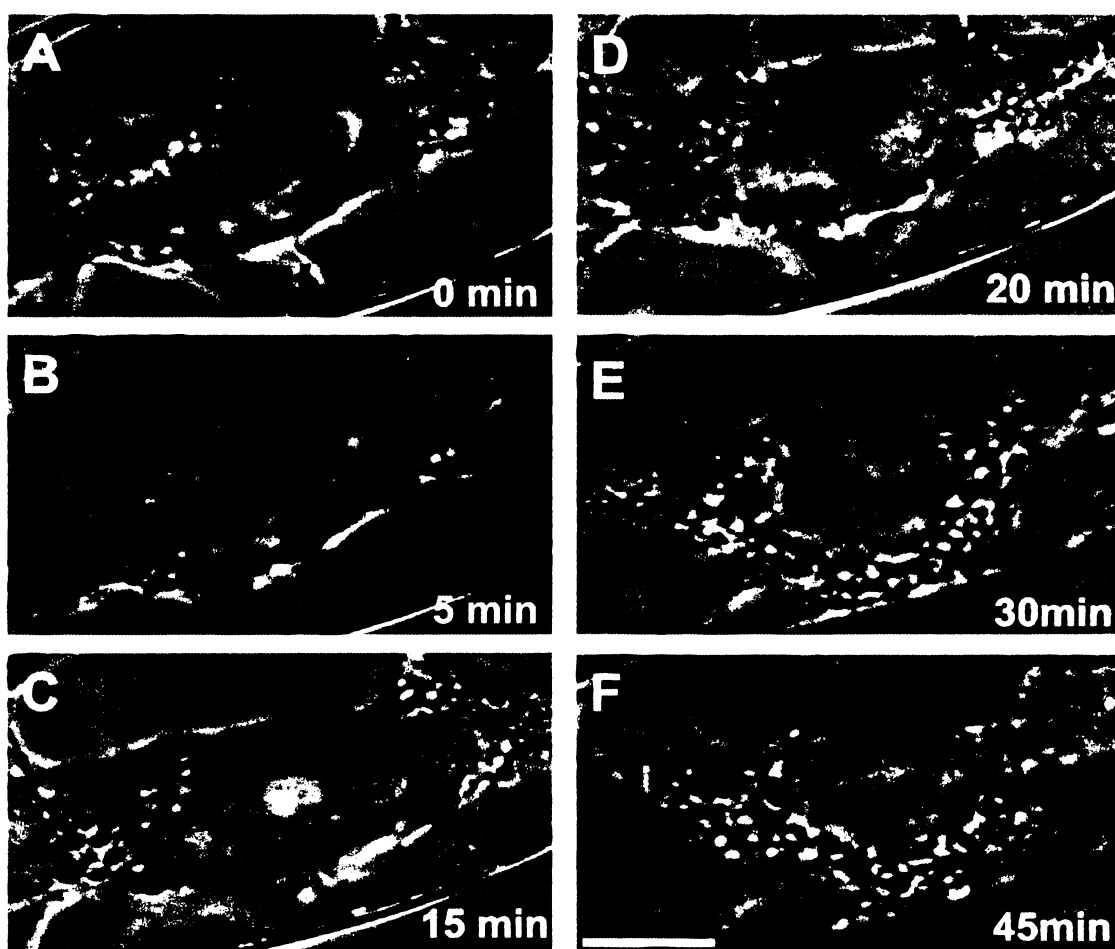
Pokud by buňky odpovídaly na působení kadmia hypersenzitivním způsobem, tedy indukcí masivní PCD, pak by to zřejmě znamenalo rychlou smrt celé rostliny. Indukce PCD tedy může být u diferencovaných nedělicích se buněk potlačena, jak naznačuje charakter umírání buněk v G1 fázi, čímž by bylo možné aktivovat reparační procesy. Rostliny ale potřebují udržet genetickou integritu meristemických buněk, která je nezbytná pro další růst a reprodukci rostlin. Poškozené buňky musí být tedy účinně odstraňovány, což se zřejmě děje programovanou buněčnou smrtí, jak dokládá pozorovaný internukleozomální DNA žebříček buněk ovlivněných kadmiiem v S a G2 fázi buněčného cyklu.

3.4. Mechanismus a příčiny protahování jader

Tvar interfázních jader rostlinných buněk je ovlivněn typem buněk nebo pletiv, stářím buněk nebo fází buněčného cyklu, ve kterém se buňka právě nachází. Kromě kulatých, někdy až čočkovitých jader se u rostlinných buněk můžeme setkat i s protaženými interfázními jádry, která do značné míry kopírují tvar buněk příslušného pletiva (viz Pazourek a Votrubová 1997). Prodloužená jádra byla také nalezena ve specializovaných buňkách kořenových vlásků (Chytilová *et al.* 1999) a pylových láček (Laitinen *et al.* 2002). Takováto jádra byla navíc několikrát popsána při nejrůznějším programovaném umírání rostlinných buněk (např. Mittler *et al.* 1997, Liljeroth a Bringelsson 2001, Hout *et al.* 2001), s tím, že u protoplastů *Arabidopsis thaliana* vystavených UV-C záření byl vysloven předpoklad, že prodloužení jader je předstupněm jejich fragmentace během PCD (Danon a Gallois 1998). Výrazné protahování interfázních jader jsme pozorovali také u buněk linie BY-2 jak po aplikaci některých stresorů vyvolávající PCD (kadmium a camptothecin), tak po působení antireplikativních látek (HU a APC), které buněčnou smrt nezpůsobovaly. Protahování tedy rozhodně není pouze průvodním jevem či předzvěstí PCD, což dobře ukazují i výsledky dokumentující další osud protažených jader po synchronizaci HU – jejich smrštění a následné rozdělení (obr. 10).

Tvarové změny interfázních jader mohou být důsledkem ovlivňování různých buněčných struktur, s nimiž může být jádro propojeno. Proto bylo studium mechanismu protahování interfázních jader zaměřeno zejména na úlohu buněčné stěny, cytoskeletu a jaderného skeletu.

Význam buněčné stěny při protahování jader byl studován jak z hlediska úlohy při samotném protahování jader, tak při udržení protaženého tvaru jader. Zatímco u protoplastů *Arabidopsis thaliana* byla pozorována protažená jádra po působení UV-C záření vyvolávající PCD (Danon a Gallois 1998), po enzymatickém odstranění buněčné stěny z buněk BY-2 synchronizovaných pomocí HU s největším procentem protažených jader nebyla nalezena žádná protažená jádra (obr. 11), což naznačuje možný rozdílný mechanismus protahování jader souvisejícího a nesouvisejícího s PCD. Intaktní buněčná stěna (pravděpodobně přes zprostředkovanou interakci) je tedy v případě ošetření HU nutná pro vznik protažených jader. Tato interakce jádra a buněčné stěny by mohla být



zprostředkována přes cytoskeletální proteiny (aktinová filamenta a mirotubuly) ukotvené jedním koncem na plazmalemě a druhým koncem na jaderné membráně. Aktivní úlohu cytoskeletu v protahování naznačuje

i pozorování Chytilové *et al.* (1999), kteří pozorovali změny tvaru a pohyby jader v kořenových vláscích *Arabidopsis thaliana* pomocí GFP s jaderným lokalizačním signálem (Chytilová *et*

Obr. 10. Dělení elongovaných jader buněk BY-2

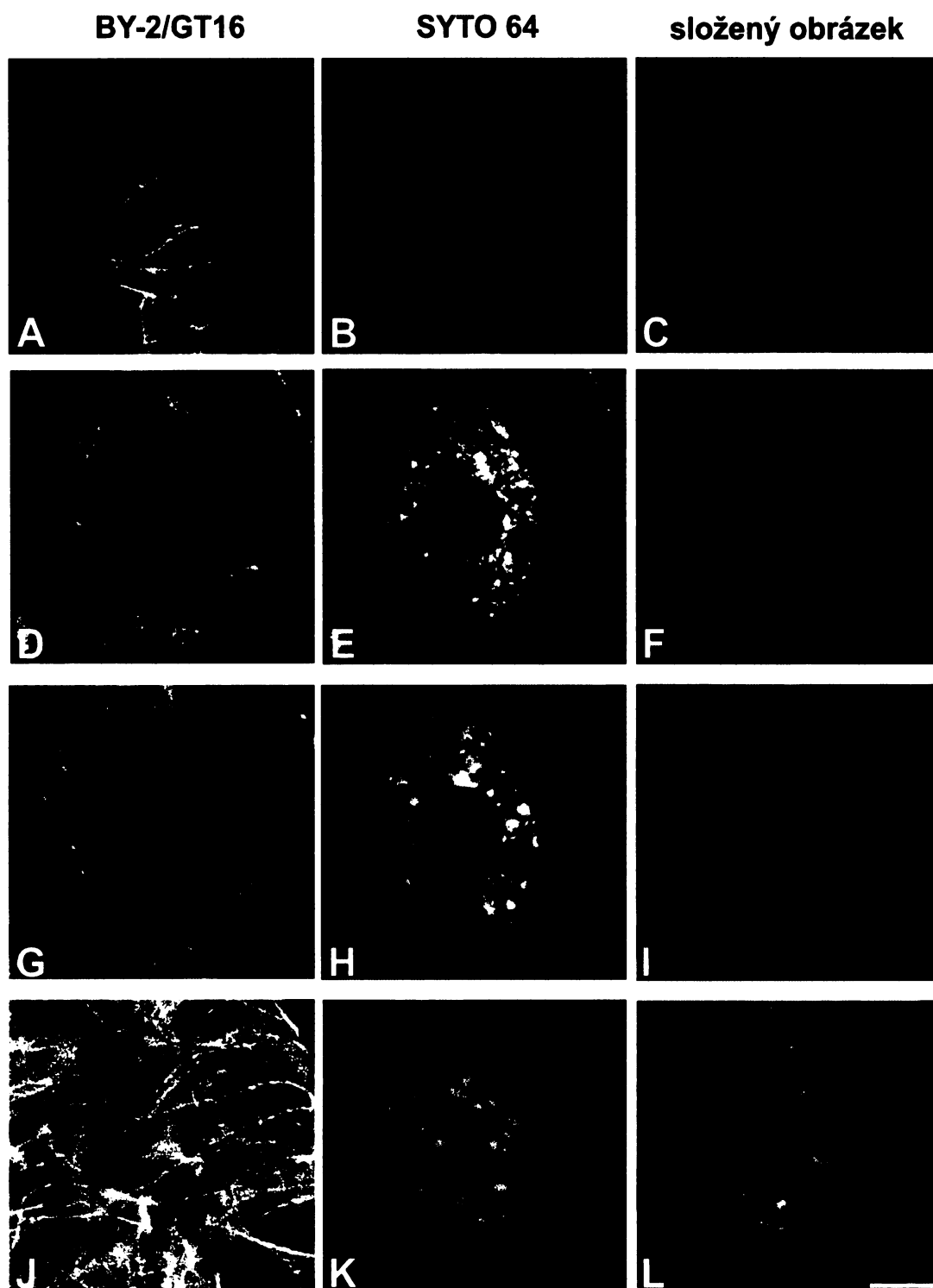
*A, B - Prodloužená interfázní jádra po aplikaci HU.
C, D - Spiralizované chromozomy profázních protažených jader.
E, F - Metafázní chromozómy v ekvatoriální rovině kulatých jader (šipka).*

*Nomarského diferenciální kontrast.
Měřítko = 25µm*

al. 2000, Śliwińska *et al.* 2002). Pomocí stabilní transgenní linie BY-2/GT16 exprimující GFP značený tubulin byly v našich pokusech pozorovány až u 60 % buněk s protaženými jádry četné invaginace jaderné membrány s mikrotubulárním signálem, které by mohly představovat možná místa ukotvení mikrotubulů (obr. 12). Pomocí mikrotubulární drogy oryzalinu v koncentraci 20 μ M, vyvolávající rozpad mikrotubulární sítě již po 12h působení, nebyla nalezena žádná protažená jádra po společném působení s HU. Podobně jako při studiu změn mikrotubulárního cytoskeletu u buněk s protaženými jádry byla i při sledování změn aktinového cytoskeletu použita transgenní linie dovolující sledování stavu cytoskeletu *in vivo* (BY-2/TGFP3 nesoucí fúzní protein GFP s talinem). U buněk ošetřených HU nebyla na rozdíl od kontrolních neošetřených buněk nalezena žádná síť kortikálních aktinových filament, zatímco aktinový košíček z jemných vláken kolem jader byl zachován. Až u 45 % buněk s protaženými jádry byly nalezeny invaginace jaderné membrány obsahující aktinový signál (obr. 13). Podobně jako po použití cytoskeletální drogy 20 μ M oryzalinu a ani po použití aktinové drogy 500nM latrunkulinu B nebyla nalezena žádná protažená jádra. Četné invaginace se signálem GFP značených mikrotubulů a aktinových filament a pravděpodobně i kanály protínající jádro pozorované po aplikaci HU byly dříve nalezeny jak u živočišných (Johnson *et al.* 2003, Lee *et al.* 2006), tak rostlinných buněk (Collings *et al.* 2000, Gupton *et al.* 2006) a pravděpodobně usnadňují signalizaci mezi jádrem a cytoplazmou při stresovém působení (Lui *et al.* 1998, Collings *et al.* 2000, Gupton *et al.* 2006). Námí pozorovaná přítomnost mikrotubulů i aktinových filament v těchto rýhách by v souladu s uvedenými předpoklady mohla sloužit k signalizaci nebo transportu látek při stresu do jádra nebo z něho. Vzhledem k nutnosti přítomnosti intaktního cytoskeletu pro protahování jader by však invaginace cytoskeletálních proteinů mohly mít kromě signalizační funkce i funkci strukturní, podpůrnou, stabilizační.

Při rychlé izolaci jader sonikací bylo zjištěno, že izolovaná prodloužená jádra jsou schopna si svůj tvar udržet po několik hodin. To naznačilo, že ani buněčná stěna ani cytoskelet nejsou nutné k udržování tvaru již protaženého jádra a současně to naznačilo možnou úlohu hypotetického jaderného skeletu při prodlužování jader. Na rozdíl od charakterizovaného karyoskeletu u živočišných buněk (Holaska *et al.* 2002), u rostlinných buněk ale jeho přítomnost někteří autoři nepředpokládají (Galbraith 2004), mj. proto, že nebyly v rostlinných genomech nalezeny homology živočišných laminů (Meier *et al.* 2001).

Není-li však tvar jádra udržován pouhou „tvarovou pamětí chromatinu“, pak by se dalo předpokládat účast hypotetického jaderného skeletu, což by naznačovalo i blokování protahování jader po aplikaci širokospektrého inhibitoru intermediálních filament akrylamidu (v koncentraci 10mM). Ačkoliv akrylamid inhibuje zejména vimentin (Arocena 2006), který také není v rostlinách přítomen, je možné, že u rostlinných buněk je schopen inhibovat i jiná strukturně podobná intermediální filamenta.



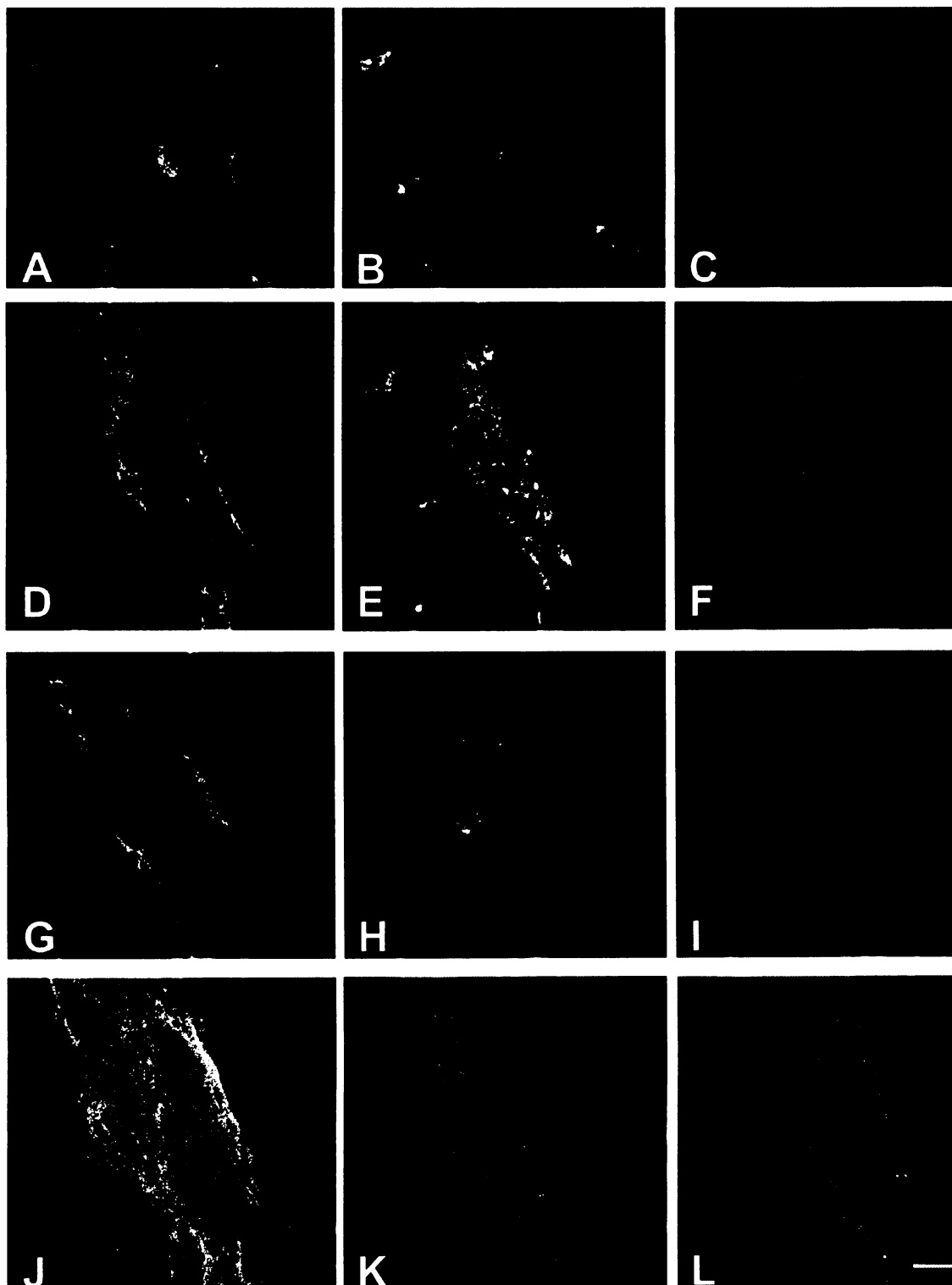
Obr. 11. Stav mikrotubulárního cytoskeletu u kultury BY-2/GT16 synchronizované pomocí HU, 4 hodiny po vymytí antireplikativa

A-C - Transverzálně uspořádané kortikální mikrotubuly.

D-I - Mikrotubuly v oblasti okolo jádra a v cytoplazmatických provazcích. Pozorováno časté protínání jader mikrotubulárními vlákny (*D-F*, šipka) nebo invaginace do jader (*G-I*, šipka).

J-L - Složené jednotlivé optické řezy.

A, D, G, J - BY-2/GT-16; *B, E, H, K* - SYTO 64; *C, F, I, L* - složený obrázek
Měřítko = 7 μ m



Obr. 12. Stav aktinového cytoskeletu u kultury BY-2/TGFP3 synchronizované pomocí HU, 4 hodiny po vymytí antireplikativa

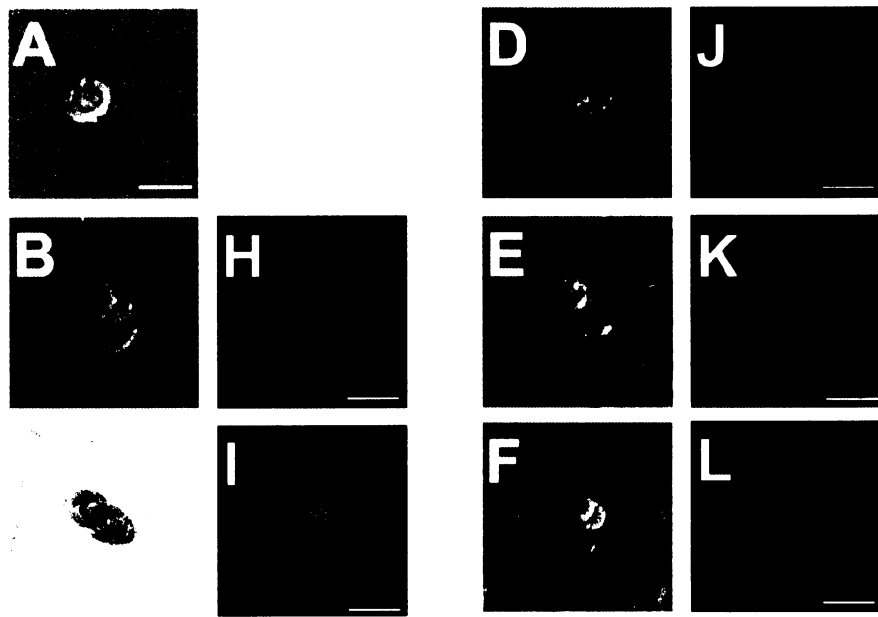
A-C - Kortikální vrstva.

D-I - Aktinová filamenta v oblasti okolo jádra a v cytoplasmatických provazcích. Jaderný košíček z jemných aktinových vláken. Protínání jader silnými aktinovými vlákny (šípky).

J-L - Složené jednotlivé optické řezy.

A, D, G, J - BY-2 TGFP3; B, E, H, K - SYTO 64; C, F, I, L - složený obrázek

Měřítka - 11 μ m



Obr. 13. Izolace extrémě protažených jader u buněk BY-2 po synchronizaci pomocí HU nebo APC

A - F - Nomarského diferenciální kontrast.

G - L - Jaderné barvivo Hoechst 33258.

Měřítko = 10 μm

4. ZÁVĚRY

- 1. Ionty kadmia a chlad spolehlivě navodily buněčnou smrt zejména programovaného typu**
- 2. Programované umírání buněk bylo doprovázeno četnými morfologickými změnami, ale jen omezeně specifickými**
- 3. Výskyt internukleozomální fragmentace DNA do oligonukleozomálních jednotek není spolehlivým indikátorem procesu PCD**
- 4. Různé fáze buněčného cyklu jsou různě citlivé k působení 50 μ M CdSO₄**
- 5. Různé stresové vlivy vyvolaly tvarové malformace jader, které však pravděpodobně primárně nesouvisely s programovanou buněčnou smrtí buněk**

5. CURRICULUM VITAE

RNDr. Andrea Kuthanová, rozená Zelená

Narozena: 2.12.1976, Praha, Česká republika

Adresa:

Katedra fyziologie rostlin
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Viničná 5
128 44 Praha 2
Tel: +420 221 951 707
Fax: +420 221 951 704
e-mail: azelena@natur.cuni.cz

Vzdělání:

1991-1995	Gymnázium, Zlín
1995	maturitní zkouška
1995-1998	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
1998	titul Bc.
1998-2000	Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta Katedra fyziologie rostlin
2000	titul Mgr. Téma diplomové práce: Fyziologické aspekty synchronizace dělení buněčných linií tabáku se zaměřením na cytologické charakteristiky tabákových linií BY-2 a VBI-0, synchronnost buněčného dělení, změny a dynamiku cytoskeletu.
2000-	doktorské studium Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie rostlin Téma dizertační práce: Indukce a detekce programované buněčné smrti (PCD) v buněčných liniích tabáku.
2005	titul RNDr.

Pracovní zkušenosti:

- 1997- laboratoř Prof. Opatrného (Laboratoř buněčné biologie a biotechnologie rostlin), analýzy buněčného cyklu, cytoskeletu a programované buněčné smrti v závislosti na indukci pomocí abiotického stresu
- 2000- zaměstnána na katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze jako vědecký pracovník
- 2001 měsíční pobyt v CREBS, Gabriel Lippmann Centre v Luxembourgu, laboratoř Dr. J.-F. Hausmanna
(studium molekulárních a fyziologických aspektů rostlinných buněk ovlivněných stresem)
- 2006-2007 zaměstnána v laboratoři Prof. Strnada (Laboratoř růstových regulátorů Ústavu experimentální botaniky a Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého Olomouc) jako vědecký pracovník

Pedagogická činnost:

- 2001-2006 Praktika k přednášce Rostlinná cytologie
- 2006- Praktika Rostlinná buňka
- Konzultace diplomových prací: Zuzana Lenočková (2004), Ondřej Smetana (2006)

Další vědecké aktivity:**Členství ve vědeckých organizacích:**

- 2004-2006 členství v European Cell Death Organization (ECDO)
- 2008- členství v České společnosti experimentální biologie rostlin (ČSEBR)

Vybrané odborné semináře:

- 22.5.-23.5.2001 metodický kurz Apoptóza, MZLU Brno
- 17.9.2004 I. training course on „concepts and methods of programmed cell death“, Chania, Řecko
- 1.10.2005 II. training course on concepts and methods of programmed cell death “genetic pathways and techniques for detection of cell death”, Budapešť, Maďarsko

Spoluúčast na grantech:

- 1996-2001 Program „250“ - „Posílení výzkumu na vysokých školách“(VS 96145) - Rostlinná buňka a stres
- 1998-2004 Výzkumný záměr (MSM 1131000003) – Regulace a signalizace v živých

	soustavách
2000-2004	Výzkumné centrum (LN00A081) - Signální dráhy u rostlin
2000-2005	COST (OC 844.20) - Úloha apoptózy v ontogenezi a stresových reakcí rostlinných buněk a orgánů
2007-	Výzkumný záměr (MSM 0021620858) - Signalizace a molekulární mechanismy buněčné odpovědi

6. PUBLIKACE

Články v impaktovaných časopisech:

Kuthanova A, Gemperlova L, Zelenkova S, Eder J, Machackova I, Opatrný Z & Cvikrova M (2004) Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**, 149-156.

Kuthanova A, Opatrný Z & Fischer L (2008) Is internucleosomal DNA fragmentation an indicator of programmed death in plant cells? (přijato v *Journal of Experimental Botany*).

Kuthanova A, Fischer L, Nick P & Opatrný Z Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. (zasláno do *Plant cell and Environment*).

Články v neimpaktovaných časopisech:

Lenochová Z, **Kuthanová A** & Votrubová O (2004) Sebevražda v zájmu celku, aneb programovaná buněčná smrt. *Živa*, 5: 194-197.

Přednášky:

Zelená A, Zelenková S & Opatrný Z (2003) Study of stress-induced programmed cell death in tobacco suspension culture BY-2. *Plant Physiology Conference of PhD. Students and Young Scientists*, Brno.

Kuthanová A (2006) Programovaná buněčná smrt u buněčné linie BY-2. *Seminář v Laboratoři růstových regulátorů*, Olomouc.

Vybraná plakátová sdělení:

Zelená A, Zelenková S, Fischer L & Opatrný Z (2001) Cytoskelet v apoptotických buňkách tabákové linie BY-2. Book of abstract. *IX. Cytoskeletální klub*, Vranovská Ves.

Zelená A (2001) Study of programmed cell death in tobacco cell line BY-2. *Plant Physiology Conference of PhD. Students and Young Scientists*, Praha.

Zelená A, Zelenková S, Fischer L & Opatrný Z (2001) Programovaná či neprogramovaná buněčná smrt u buněčné linie tabáku BY-2. Book of abstract. *XVI. Biologické dny – aktuální témata z buněčné a molekulární biologie*, Olomouc.

Zelenková S & **Zelená A** (2001) Physiological and biochemical effects of low temperature stress on tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *IX. Dny rostlinné fyziologie*, České Budějovice.

Zelená A, Grunt M & Zelenková S (2002) Changes in actin cytoskeleton during long-term cold stress in tobacco cells BY-2. Book of abstract. *X. Cytoskeletální klub*, Vranovská Ves.

Zelená A, Zelenková S & Opatrný Z (2003) Changes in actin cytoskeleton after treatment with

cadmium in tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *XI. Cytoskeletální klub*, Vranovská Ves.

Kuthanová A, Fischer L, Petrášek J & Opatrný Z (2004) Cell cycle-dependent programmed cell death in response to abiotic stress factors in synchronized tobacco BY-2 cell line. Book of abstract. *XII. Euroconference on apoptosis „Cell death next to the sea“*, Chania, Řecko. – získáno stipendium Marie Curie (Marie Curie Actions - Conferences and Training Courses).

Kuthanová A, Smetana O, Fischer L & Opatrný Z (2005) Early stages of cold stress-induced programmed cell death in tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *XIII. Euroconference on apoptosis „Survival on the Danube“*, Budapešť, Maďarsko. - získáno stipendium Marie Curie (Marie Curie Actions - Conferences and Training Courses).

Lenochová Z, **Kuthanová A**, Votrubová O, Opatrný Z & Soukup A (2006) Použití TUNEL reakce pro detekci PCD v rostlinných pletivech a buněčných kulturách. Book of abstract. 4. Metodické dny, Smí.

Kuthanová A, Opatrný Z & Fischer L (2007) Je internukleozomální fragmentace DNA opravdu projevem programované buněčné smrti? Book of abstract. 11. Dny fyziologie rostlin, Olomouc - získány ceny Dr. Márie Luxové a firmy Litolab za plakátovou prezentaci.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Arocena, M. (2006). Effect of acrylamide on the cytoskeleton and apoptosis of bovine lens epithelial cells. *Cell Biology International* 30, 1007-1012.
- Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., Suarez, M. F., Helmersson, A., Smertenko, A. P., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2004). VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation* 11, 175-182.
- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research* 11, 3155-3162.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumie, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.
- Collings, D. A., Carter, C. N., Rink, J. C., Scott, A. C., Wyatt, S. E., & Allen, N. S. (2000). Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* 12, 2425-2439.
- Danon, A. & Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 131-136.
- de Jong, A. J., Hoeberichts, F. A., Yakimova, E. T., Maximova, E., & Woltering, E. J. (2000). Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211, 656-662.
- di Toppi, L. S. & Gabrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., & Jones, R. (2000). Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Molecular Biology* 44, 255-266.
- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., Brukhin, V. B., Daniel, G., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113, 4399-4411.
- Fojtová, M. & Kovařík, A. (2000). Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant Cell and Environment* 23, 531-537.
- Fukuda, H. & Komamine, A. (1980). Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 65, 57-60.
- Galbraith, D. W. (2004). Nuclear dynamics in higher plants, The nuclear envelope, edited by D. E. Evans, C. J. Hutchinson, & J. A. Bryant, pp. 217-228. New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Groover, A. & Jones, A. M. (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* 119, 375-384.
- Groover, A., DeWitt, N., Heidel, A., & Jones, A. (1997). Programmed cell death of plant tracheary elements: Differentiating in vitro. *Protoplasma* 196, 197-211.
- Gupton, S. L., Collings, D. A., & Allen, N. S. (2006). Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 95-105.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., & Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2122-2127.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N. K., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2001). A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 42, 894-899.
- Holaska, J. M., Wilson, K. L., & Mansharamani, M. (2002). The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 357-364.
- Houot, V., Etienne, P., Petitot, A. S., Barbier, S., Blein, J. P., & Suty, L. (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* 52, 1721-1730.
- Chaves, I., Regalado, A. P., Chen, M., Ricardo, C. P., & Showalter, A. M. (2002). Programmed cell death induced by (beta-D-galactosyl)(3) Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* 116, 548-553.
- Chytilová, E., Macas, J., & Galbraith, D. W. (1999). Green fluorescent protein targeted to the nucleus, a transgenic phenotype useful for studies in plant biology. *Annals of Botany* 83, 645-654.
- Chytilova, E., Macas, J., Sliwinska, E., Rafelski, S. M., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2000). Nuclear dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2733-2741.
- Johnson, N., Krebs, M., Boudreau, R., Giorgi, G., LeGros, M., & Larabell, C. (2003). Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation* 71, 414-424.

- Jones, A. M. (2001). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125, 94-97.
- Kadota Y. & Kuchitsu, K. (2006). Regulation of elicitor-induced defense responses by Ca²⁺ channels and the cell cycle in tobacco BY-2 Cells. *Tobacco BY-2 cells: From cellular dynamics to omics*, edited by Nagata T., Matsuoka K., & Inzé D., pp. 207-221. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S., & Kuchitsu, K. (2004). Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant Journal* 40, 131-142.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-&.
- Kost, B., Spielhofer, P., & Chua, N. H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant Journal* 16, 393-401.
- Koukalová, B., Kovařík, A., Fajkus, J., & Šíroky, J. (1997). Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters* 414, 289-292.
- Kumagai, F., Yoneda, A., Tomida, T., Sano, T., Nagata, T., & Hasezawa, S. (2001). Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: Time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant and Cell Physiology* 42, 723-732.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). VPE has enzymatic properties similar to those of caspase-1. *Plant and Cell Physiology* 46, S200.
- Kutsuna, N. & Hasezawa, S. (2002). Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 43, 965-973.
- Lee, R. K. Y., Lui, P. P. Y., Ngan, E. K. S., Lui, J. C. K., Suen, Y. K., Chan, F., & Kong, S. K. (2006). The nuclear tubular invaginations are dynamic structures inside the nucleus of HeLa cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84, 477-486.
- Liljeroth, E. & Bryngelsson, T. (2001). DNA fragmentation in cereal roots indicative of programmed root cortical cell death. *Physiologia Plantarum* 111, 365-372.
- Lui, P. P. Y., Kong, S. K., Kwok, T. T., & Lee, C. Y. (1998). The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca²⁺ signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 88-93.
- Matthew, E. M., Yen, T. J., Dicker, D. T., Dorsey, J. F., Yang, W. S., Navaraj, A., & El-Deiry, W. S. (2007). Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells. *Cell Cycle* 6, 2571-2578.
- Meier, I. (2001). The plant nuclear envelope. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1774-1780.
- Mitsubishi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 41, 993-1001.
- Mittler, R., Simon, L., & Lam, E. (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Journal of Cell Science* 110, 1333-1344.
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 Cell-line as the HeLa cell in the cell biology of Higher-Plants. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology* 132, 1-30.
- Olmos, E., Martinez-Solano, J. R., Piqueras, A., & Hellin, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany* 54, 291-301.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., & Hartwell, L. H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
- Pazourek J. & Votrubová O. (1997). *Atlas of Plant Anatomy*. Praha: Peres Publishers.
- Petrášek, J., Čemá, A., Schwarzerová, K., Elckner, M., Morris, D. A., & Zažímalová, E. (2003). Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiology* 131, 254-263.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martinez-Solano, J. R., & Hellin, E. (1999). Cd-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cells: Time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research* 31, S33-S38.
- Śliwińska, E., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2002). Factors affecting nuclear dynamics and green fluorescent protein targeting to the nucleus in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Science* 163, 425-430.
- Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., & De Gara, L. (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright Yellow 2 cells. *Plant Physiology* 134, 1100-1112.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Zhang, Y. X. & Xiao, H. (1998). Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 420, 1-6.

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PLANT PHYSIOLOGY

**INDUCTION AND DETECTION OF PROGRAMMED CELL DEATH
(PCD) IN TOBACCO CELL LINES**

ANDREA KUTHANOVÁ

SUMMARY OF Ph.D. THESIS



PRAGUE 2008

SUMMARY

1. Introduction and aims	2
2. Material and methods	4
2.1. Material	4
2.2. Methods	4
3. Results and discussion	5
3.1. Effect of cold and cadmium ions on BY-2 cells	5
3.2. Internucleosomal DNA fragmentation	7
3.3. Connection between PCD induced by cadmium and cell cycle	12
3.4. Mechanism and the reasons of nuclear elongation	15
4. Conclusions	21
5. Curriculum vitae	22
6. Publications	25
7. References	27

Acknowledgements:

I would like to thank my supervisor Prof. Zdeněk Opatrný and my consultant Dr. Lukáš Fischer for inspiring discussion.

Many thanks also to my colleagues from Laboratory of Plant Cell Biology and Biotechnology: Lenka Dvořáková, Jana Krtková, Eva Nocarová, Jan Petrášek, Kateřina Schwarzerová and Ondřej Smetana. Finally special thanks belong to my husband Braňo.

This work was supported by the grants of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (VS 96145, LN00A081, MSM1131000003 and MSM0021620858) and COST (OC 844.20).

1. INTRODUCTION AND AIMS

Programmed cell death (PCD) is involved during the plant development in cell differentiation, in forming of plant organs and senescence and plays an important role during different stress conditions (biotic and abiotic ones) as well. The mechanisms of PCD allows organisms to eliminate old or disturbed cells without the damage of surrounding cells/tissue. This complex process is opposite to plant cells, well-studied in animal cells, in which several different types of PCD exist: e.g. apoptosis, autophagy, paraptosis or mitotic catastrophe (Bröker *et al.* 2005). However, only some features of these animal PCD types were described within plant cells. Moreover, some types of PCD, such as mitotic catastrophe, demonstrated features of unprogrammed cell death in plants. It is probably not possible to strictly distinguish between individual types of PCD in plant cells and in particular in cell cultures, however various authors strive after. Recently the existence of only one factor common to all plant PCD types was proved, namely the vacuolar collapse (Groover *et al.* 1997, Groover and Jones 1999). Vacuolar disintegration is concerned with subsequent release of hydrolytic enzymes from vacuoles leading to cell autolysis (Jones 2001).

The study of complex PCD mechanisms in whole plants is rather complicated, principally due to the fact that it appears only in a small amount of intricate spaces which are surrounded by a high amount of cells without PCD manifestation. Cell cultures are frequently used for PCD studies since they represent, in many cases, a simplified model of complex physiological processes in a whole plant *in vivo*. The study of PCD must always be compared with a mechanism of programmed cell death within cells *in vivo*, where many other elements exert influence on the whole plant body. Though cells possess their own predefined program in both cases, which is composed of initial, effector and executional phases.

There are various reasons why cell cultures apply as a suitable model for PCD studies. Cell cultures are primarily highly uniform. Due to the fact of intensive cell division, it is possible to gain an extent amount of experimental “material” in a relatively short period. It must be emphasized not least, that cell cultures in principle form a group of undifferentiated cells allowing to study basic responses to plant cells on PCD stimuli.

It is possible to utilize different cell line types, short- or long-term, for the evolution of PCD studies (i.a. for embryogenesis - cell cultures Norway spruce (Filonova *et al.* 2000), for xylogenesis - cell cultures *Zinnia elegans* (Fukuda and Komamine 1980) or cells dying within aleurone layer - cell cultures of barley (Fath *et al.* 2000). But they are a very suitable PCD model induced by stress. Substances responsible for invocation or inhibition of PCD are simply added to or removed from cells.

A specific position between these experimental models is represented by cell lines. These

are basically cell lines characterized by high structural and functional homogeneity in given cell cultures, specified by intrinsic behavior during so-called subcultivation period imitating different cell ontogenesis *in vivo* - phases of intensive division, expansion / growth, maturing and senescence. They enable quite detailed and accurate analysis of their behavior on molecular, biochemical, cytological and morphological level.

The subject of presented thesis is based on a wide range of research activities of our research team focused on plant physiology studies (research program “Plant cell and stress”). For this reasons this thesis deals with programmed cell death invoked by abiotic stress in tobacco BY-2 cell line.

The current thesis was aimed to explore decisive mechanisms leading to programmed cell death of BY-2 cells after CdSO₄ treatment and cold exposure (4° C).

The aim of the partial work was a detailed description of an effect of partial PCD inductors, on cytological and molecular levels as well. Further analogous study of PCD induction mechanisms during different cell cycle phases.

During work flow other research scopes implicitly crystallized.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Material

Tobacco cell line BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow, Nagata *et al.* 1992).

Tobacco cell line BY-2/HDEL (transgenic cell line with gene construct m-gfp5-ER (Haseloff *et al.* 1997), which codes green fluorescent protein mGFP5 and ER-localization signal, Petrášek *et al.* 2003).

Tobacco cell line BY-2/GT16 (transgenic cell line with gene construct sGFP-TUA, which codes fusion protein sGFP and alpha tubulin; TUA3; Kumagaki *et al.* 2001).

Tobacco cell line BY-2/TGFP3 (transgenic cell line with gene construct GFP-mTn, which codes GFP-mouse talin fusion protein labeling actine filament (Chua *et al.* 1998, Srba unpublished).

Tobacco cell line BY/GV7 (transgenic cell line BY/GV7 with gene construct, which codes fusion protein GFP and AtVam3p localising into tonoplast, Kutsuna a Hasezawa 2002).

2.2. Methods

Light and fluorescent (confocal) microscopy:

- evaluation of morphology, determination of cell viability and mitotic index
- visualization of different cell structures (nuclei, vacuoles, endoplasmic reticulum and cytoskeleton) *in vivo*

Synchronization of cells

Protoplast isolation

Isolation of nuclei

Transmission electron microscopy – morphological evaluation

Analysis of genomic DNA integrity (DNA isolation, DNA electrophoresis, TUNEL reaction)

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of cold and cadmium treatment on BY-2 cells

Cultivation of tobacco cells BY-2 in a medium with the presence of $50\mu\text{M CdSO}_4$ induced significant decrease of cell viability as early as first 24h of exposure (nearly to 60%). Cells cultivated in 4°C responded similarly and the decrease of cell viability was observed also during first day of cultivation to approximately 40%. Subsequent decrease of cell viability was markedly slower under both of these stress conditions (Fig. 1) – probably only a part of cell population responded to stress conditions by rapid cell dying. Different sensitivity was probably given by actual cell position in cell cycle during stress application (see Chapter 3.3).

Changes in cell viability were accompanied by morphological changes (cell elongation, elongation and fragmentation of nuclei, increased vacuolisation and vesiculation of cytoplasm). Elongation of cells during first days of exposure to abiotic stresses was probably related to general, non-specific reaction of cells to stress conditions, under which cells reacted by blocking their mitotic activity. In case of cells affected by $50\mu\text{M}$ cadmium treatment, the elongation could be caused also specifically by cell wall attenuation as a result of massive synthesis of reactive oxygen species, which is evoked by cadmium ions through Fenton reaction (di Toppi and Gabbrielli 1999, Olmos *et al.* 2003, Fry *et al.* 2001).

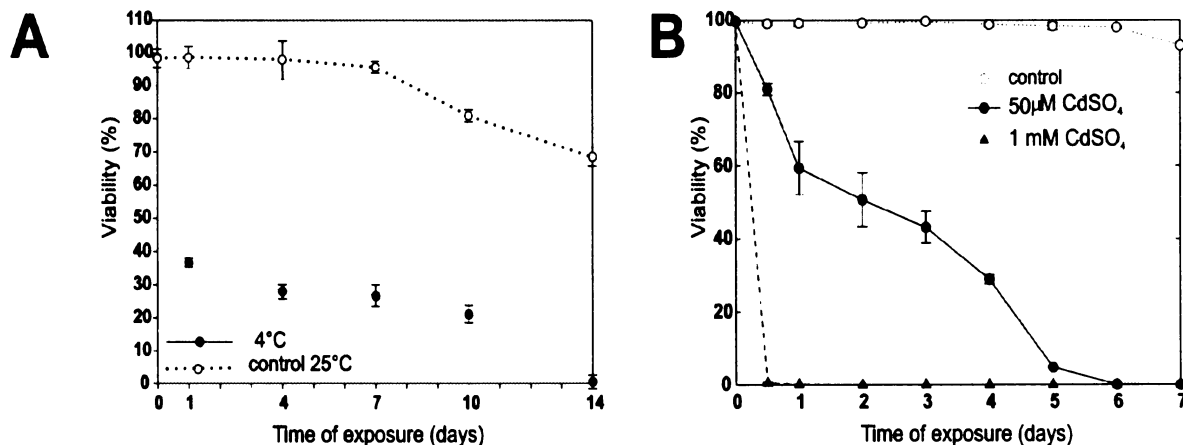


Fig. 1. Viability of BY-2 cells

A - Graph of BY-2 cell viability during 14 days cultivation in 4°C.

B - Graph of BY-2 cell viability during 7 days exposure to 50µM cadmia.

Each value represents the mean of three independent experiments ± SE.

During stress conditions (low temperature and cadmium ions) changes of nuclear morphology: disintegration of mitotic structures, special lobbed nuclei after cold stress and elongated nuclei after cadmium treatment (which is probably related to cell elongation – see Chapter 3.4.) were observed. After longer cultivation under stress conditions fragmented interphasic nuclei, as a typical feature for apoptotically dying cells, were observed (Kerr *et al.* 1972, Fig. 2). A hypothesis

has been expressed for protoplasts of *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to UV-C, based on the observation of three different nuclear shape types (rounded, crescently elongated and fragmented nuclei), that all these types during PCD merge each other (Danon and Gallois 1998). This could indicate a participation of elongated nuclei during early PCD phases.

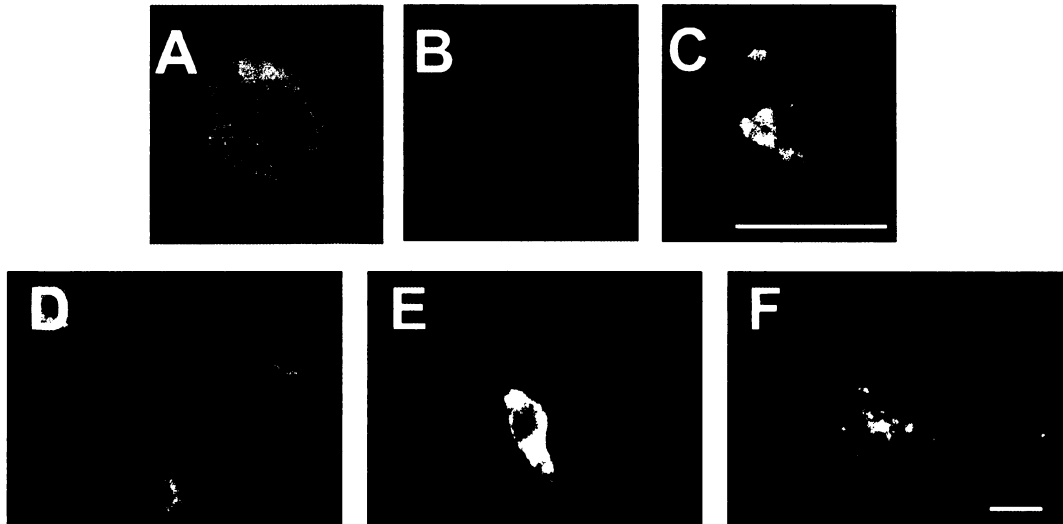


Fig. 2. Nuclear malformations

A - C - 4°C.

D - F - 50μM CdSO₄

A, D - Untreated control cells (3 days old).

B - Lobbed nuclei after 4 days cultivation in 4°C.

C - Mitotic structure fragmentation after 7 days cultivation in 4°C.

E - Elongated nuclei after 1 day exposure to 50μM CdSO₄.

F - Fragmented nuclei after 3 days exposure to 50μM CdSO₄.

Hoechst 33258.

Scale bar = 25 μm

Fragmentation of nuclei in our experiments was probably a consequence of vacuolar collapse. In case of both stress influences increase cell vacuolisation was observed. Small vacuoles/vesicles after cold stress were detected around nuclei, in case of cadmium treatment in cytoplasmic strands as well (Fig. 3). Vacuolar collapse is believed to one of the main feature of plant PCD (Jones

2001). Generation of small vacuoles, that are gradually fused with existing ones to one big central vacuole, was previously demonstrated by Houot *et al.* (2001) in BY-2 cells after H₂O₂ influence, by Filonova *et al.* (2000) during dying process of suspensor cells Norway spruce, during tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* (Groover *et al.* 1997), or during cortical cell death in cereal roots (Liljeroth and Bryngelsson 2001). The accumulation of hydrolytic enzymes turns up in a central vacuole and results in a degradation of cell contents after bursting released to cytoplasm (Jones 2001, Hatsugai *et al.* 2006).

Unusual endoplasmic reticulum bodies were observed during cadmium treatment both using BY-2/HDEL cell line and light microscopy using Nomarski differential contrast (DIC). In similar endoplasmic reticulum cisterns of *Arabidopsis thaliana* cells (Mitsuhashi *et al.* 2000, Hayashi *et*

al. 2001) inactive precursors of hydrolytic enzymes (RD21 a γ VPE) were found, which could be by this way transported into lytic vacuoles and subsequently used to programmed degradation of cell content in vacuolar collapse (Hayashi *et al.* 2001). It may be assumed that analogous mechanism, corresponding to the presence of mentioned structures, is found also in BY-2 cells during onset of PCD after application of cadmium.



Specific internucleosomal DNA fragmentation indicated a programmed character of cells dying both after treatment with 50 μ M CdSO₄ and cold influence (Koukalová *et al.* 1997, Fojtová and Kovařík 2000, Fig. 4).

Fig. 3. Vacuolar system of BY-2 cells treated with 50 μ M cadmium after FM4-64 staining.

A, B - Small vacuoles - vesicles in cytoplasmic strands treated with 50 μ M cadmium for 1 day (arrows).

*FM4-64 staining
Scale bar = 25 μ m*

The loss of DNA integrity was also confirmed in significant part of cell population by TUNEL reaction in situ. Internucleosomal DNA fragmentation was observed at the end of cultivation interval (7-14 days), in time, where nearly all cells were practically death. Compared to the treatment mentioned above, the specific DNA fragmentation with similar timing was described after temperature shock (Vacca *et al.* 2004) or after application of (β -D-galaktosyl)₃ „Yariv reagents“ (Chaves *et al.* 2002). Opposite to these observations, DNA fragmentation induced by camptothecin, staurosporin and fumonisin B1 in tomato suspension culture was detected already after 48h, in time, where nearly 30-40% cells were still alive (de Jong *et al.* 2000). The reason of such various results may be caused by different cell response to specific cell death inductors – none of mentioned substances induced DNA fragmentation using BY-2 cells in our experiments. With respect to fragmentation velocity, a possibility cannot be ruled out (excluding our experiments), that those results appearing as experimental artifacts were related to very fast cell killing (see Chapter 3.2).

3.2. Internucleosomal DNA fragmentation

DNA fragmentation into oligonucleosomal units is usually considered as a typical

symptom and indicator of apoptosis in animal cells (Wyllie *et al.*, 1980). In plant cells, progressive internucleosomal fragmentation was documented during programmed cell death (PCD) for instance in abiotically stressed tobacco BY-2 cell line treated with 50 μ M CdSO₄ (Fojtová and Kovařík, 2000, Fig. 4, 5). Our results show that similar specific DNA fragmentation could be induced in cells dying in an unprogrammed manner as well. Very “rapid cell killing” of intact BY-2 cells by three different processes (freezing in liquid nitrogen, mechanically in a homogenisator or with 5% Triton X-100 as a detergent) caused specific DNA fragmentation already after cultivation of death cells (Fig. 5). Similar fragmentation was observed also in DNA isolated from frozen (and further cultivated after thawing) untreated tobacco leaves. On the contrary, BY-2 cells treated with 1mM CdSO₄ induced immediate cell death and during subsequent 7days cultivation of internucleosomal DNA fragmentation was not observed (Fojtová and Kovařík 2000, Fig. 5). Since 1mM CdSO₄ significantly not suppressed DNA fragmentation in cells killed by freezing in liquid nitrogen, the absence of DNA fragmentation was probably not a consequence of the inhibition of hydrolytic enzymatic activity by high concentration of cadmium ions, but other cell death type (Fig. 5).

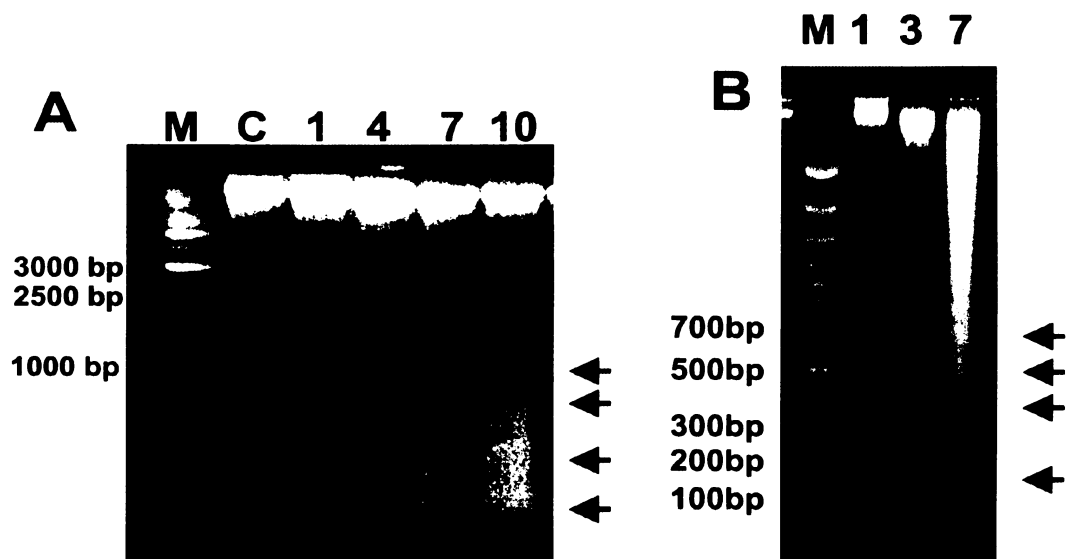


Fig. 4. DNA fragmentation.

A - 4°C

B - 50 μ M CdSO₄

Line markers: M - molecular mass marker, C - untreated control cells, 1, 3, 4, 7, 10 day(s) of culture (exposure in case of CdSO₄). Arrows indicate positions of oligonucleosomal fragments.

For detailed characterization and comparison of different cell death types induced by 50 μ M CdSO₄, 1mM CdSO₄ and mechanical disintegration, a cytological characterization of these treated cultures was performed. Regarding presumed compartmentation of lytic enzymes an attention was paid to the membrane integrity (particularly tonoplast). Cell structure and its integrity was detected using DIC, after staining with membrane probe FM4-64 and using tonoplast targeted GFP in the BY-GV7 transgenic line (Kutsuna and

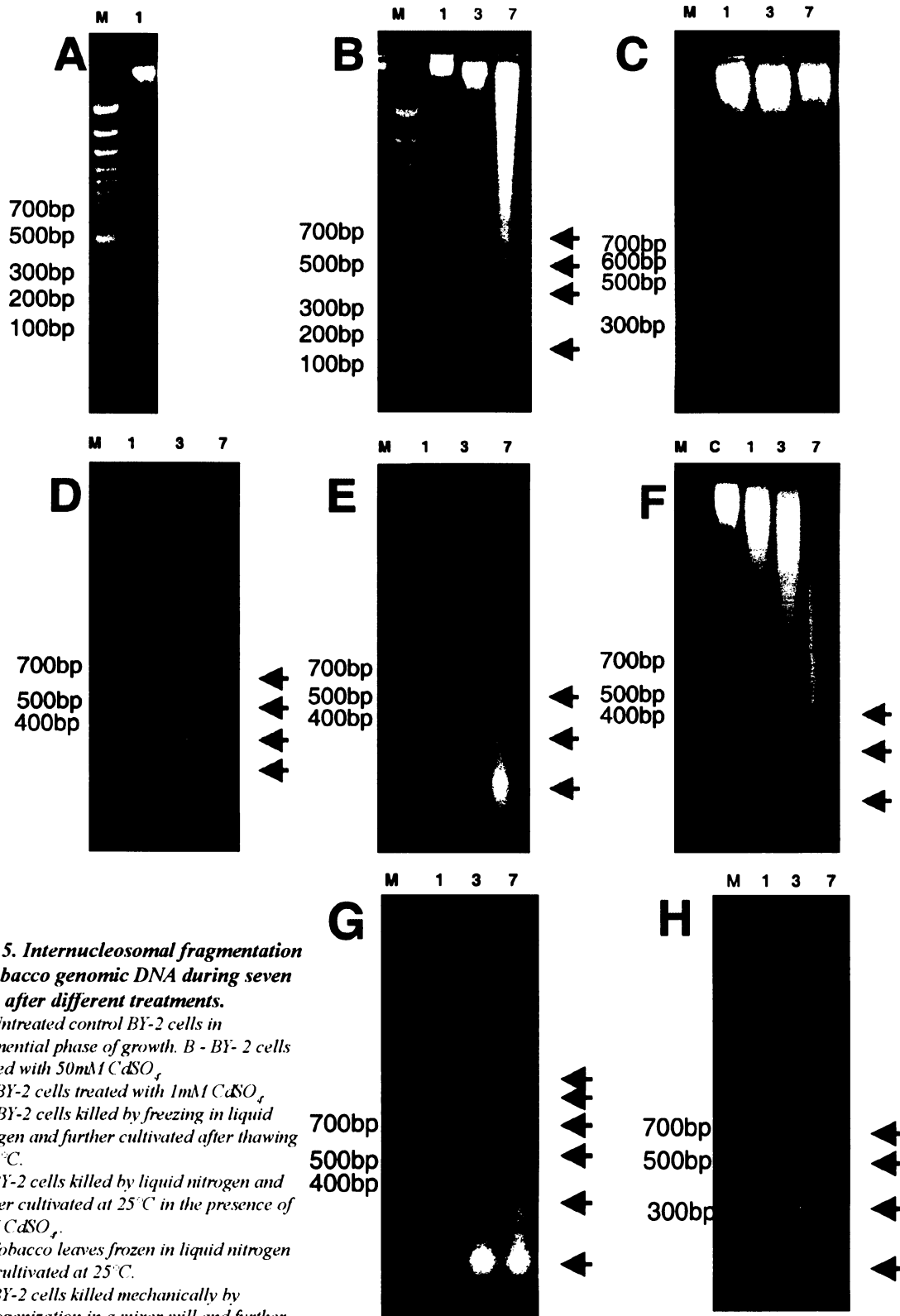


Fig. 5. Internucleosomal fragmentation of tobacco genomic DNA during seven days after different treatments.

A - Untreated control BY-2 cells in exponential phase of growth.

B - BY-2 cells treated with 50mM CdSO₄.

C - BY-2 cells treated with 1mM CdSO₄.

D - BY-2 cells killed by freezing in liquid nitrogen and further cultivated after thawing at 25°C.

E - BY-2 cells killed by liquid nitrogen and further cultivated at 25°C in the presence of 1mM CdSO₄.

F - Tobacco leaves frozen in liquid nitrogen and cultivated at 25°C.

G - BY-2 cells killed mechanically by homogenization in a mixer mill and further cultivated at 25°C.

H - BY-2 cells treated with 5% Triton.X-100. DNA isolated from the cells.

Line markers: M - molecular mass marker; C - untreated control leaves; 0.5, 1, 3, 7 day(s) of culture (exposure in case of CdSO₄ and Triton.X-100 treatments). Arrows indicate positions of oligonucleosomal fragments.

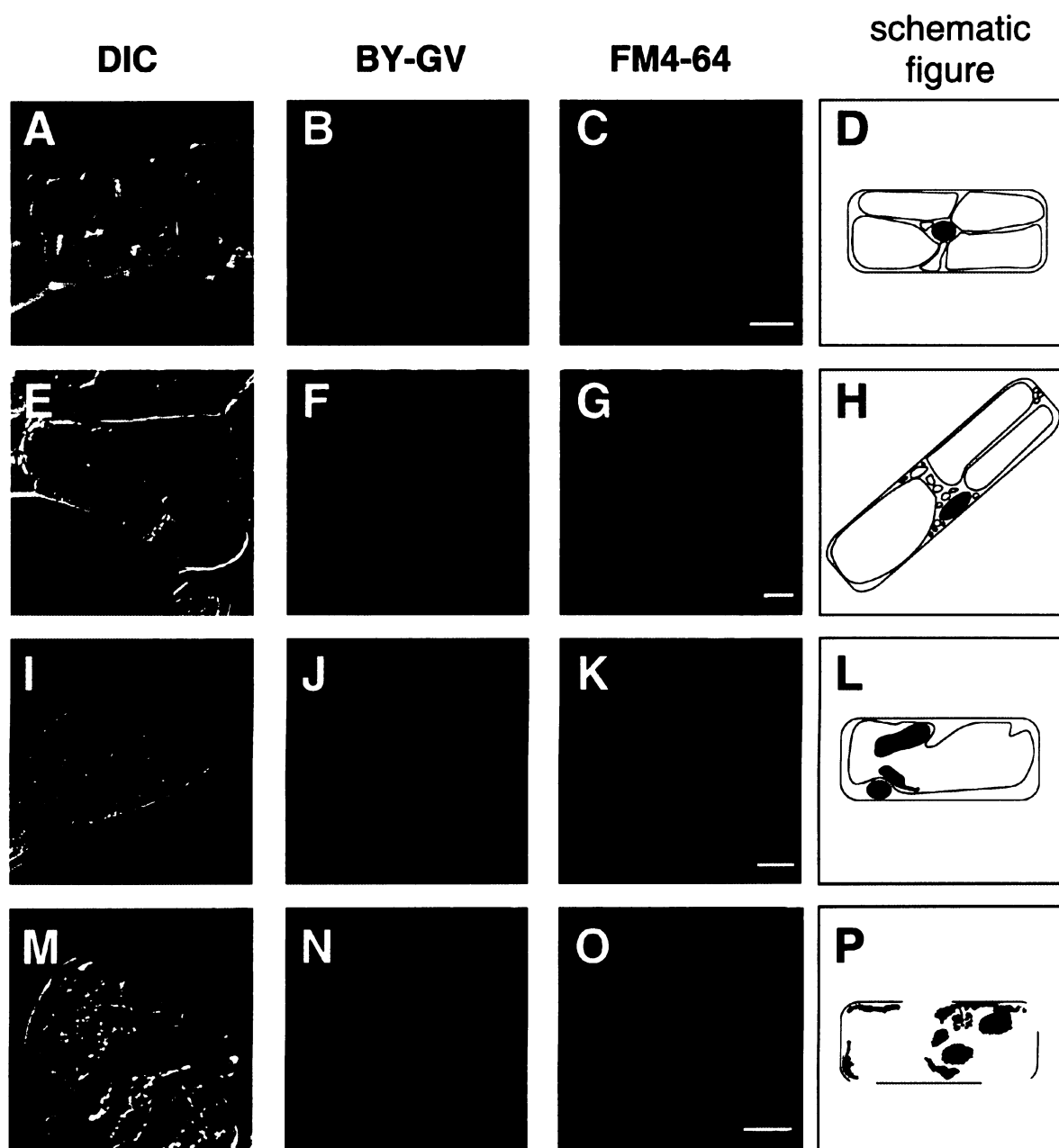


Fig. 6. Morphology of BY-GV7 cells on one day after different treatments.

A - D - Untreated cells.

E - H - Elongated cells in the presence of 50µM CdSO₄ with small rounded vacuoles.

I - L - Plasmolyzed dead cells in the presence of 1mM CdSO₄ with preserved vacuolar membranes.

M - P - Disintegrated cells with diffusional signal of tonoplast after freezing in liquid nitrogen.

A, E, I, M - Nomarski differential contrast (DIC)

B, F, J, N - tonoplast targeted GFP signal

C, G, K, O - staining with vacuolar membrane probe FM4-64

D, H, L, P - schematic figure of membrane system. Scale bars = 10 µm.

Hasezawa 2002). Cells killed rapidly for instance by freezing in liquid nitrogen exhibited a loss of integrity of the whole membrane system in particular tonoplast immediately after killing (Fig. 6). On the contrary, in cells treated with 1mM CdSO₄, killed within several hours, the tonoplast integrity seemed to be preserved demonstrating no DNA fragmentation. Intensive changes in

vacuolar system accompanied by a stepwise induction of PCD in cells treated with 50 μ M cadmium preceded the loss of cell integrity and internucleosomal fragmentation both observed during late phases of cell dying (Fig.6). Our results indicate that internucleosomal DNA fragmentation was probably related or determined by membrane disintegration, particularly tonoplast, in all cases.

Regulated vacuolar collapse accompanied by release of hydrolytic enzymes is essential for triggering executive phases of plant PCD (Jones 2001). Our results indicate that this phase of programmed cell death could be induced also in untreated cells by cell (vacuolar) disintegration – active executive lytic enzymes (including DNases) or proteases that activate these enzymes are releasing during from vacuole. In animal cells, cysteine protease caspases play an important role in activation of nucleases that are responsible for internucleosomal DNA fragmentation. Such protease caspases are not identified in plants. Their function could be substituted by different cysteine proteases called as vacuolar-processing enzymes (VPEs, Hatsugai *et al.* 2004, Kuroyanagi *et al.* 2005).

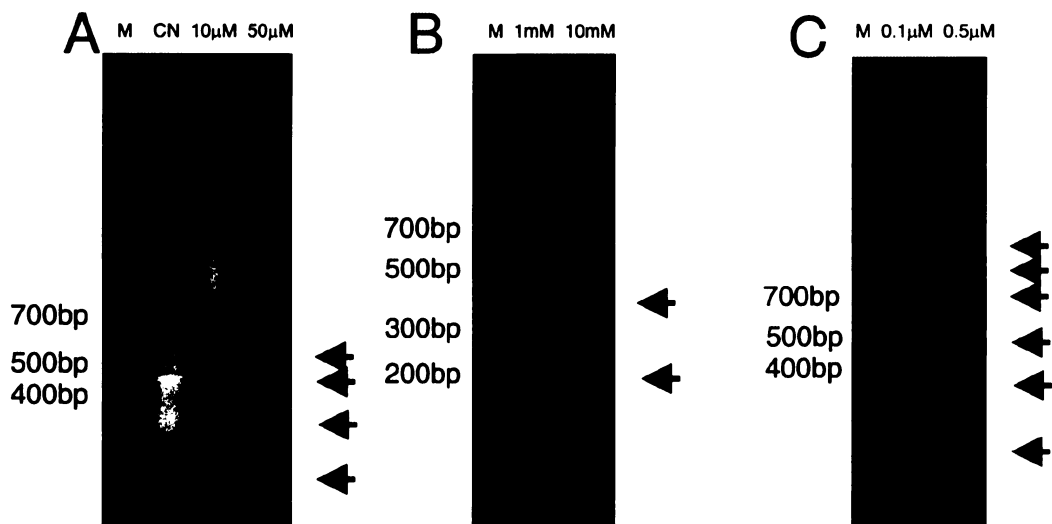


Fig. 7. Effect of protease inhibitors on DNA fragmentation in BY-2 cells frozen in liquid nitrogen and incubated for one day in the presence of:

A - Cysteine protease inhibitor E-64c (10 μ M, 50 μ M).

B - serine (partially also cysteine) protease inhibitor PMSF (1mM, 10mM).

C - serine protease inhibitor aprotinin (0.10 μ M, 0.5 μ M).

Line markers: M - molecular mass marker; CN - control cells (frozen and thawed in liquid nitrogen) with no inhibitor added. Arrows indicate positions of oligonucleosomal fragments.

DNA fragmentation, induced in rapidly killed cells, was markedly suppressed by cysteine proteases inhibitor E-64c compared to aprotinin and PMSF (serine proteases inhibitors), which blocked DNA fragmentation only partially (Fig. 7). Whereas specific fragmentation was accompanied by disintegration of vacuolar membranes (Fig. 6), cysteine protease VPEs are assumed as a suitable candidate for DNases activation in rapidly killed cells.

3.3. Connection between PCD induced by cadmium and cell cycle

The form of cell death was different in individual cells (unsynchronized BY-2 culture) exposed to cadmium or low temperature 4°C. We assumed that the reaction of cells could be related to actual position of individual cells during cell cycle phase, in time of the stressor application. Therefore, detailed studies of the PCD induction by cadmium ions using BY-2 cells was performed.

Standard protocol for synchronization of BY-2 cells is based on combination of antireplicative drug aphidicolin (APC) and mitotic drug propyzamid (Nagata *et al.* 1992). With respect to possible direct influence of APC on PCD induction (Matthew *et al.* 2007), an alternative antireplicative substance, hydroxyurea (HU) was tested. Both substances blocked cell cycle on the G1/S transition, but their synchronization effect was slightly different. After both HU and APC application the highest number of mitotic cells was observed after 7 hours of treatment. Peak of mitotic index reached approximately 40% in case of HU and to cca 55% in case of APC 7 hours after the removal of the inhibitor (Fig. 8), imply not the evidence of efficient synchronization – during equal time interval of 5-6h, twice as longer than normal mitotic time in individual cells, almost all cells divided after both antireplicative application. Prolongation of individual mitosis after APC treatment is probably the reason for the observed difference– the higher and broader maximal mitotic index peak after APC application reflects more frequent overlap of the final phases of first mitoses in the population with initial phases of the later ones. Prolonged duration of mitosis generally reflects troubles in cell cycle progression, which leads to cell cycle arrest (Paulovich *et al.* 1997), the effect of respective antireplicative could interfere with cadmium impact. Moreover, the curve of mitotic index after synchronization of APC was similar to mitotic index curve after application of cadmium in G2 (during HU synchronization) and the effect of cadmium could be masked using APC. We conclude from our results that HU is less invasive using of 4mM and preferable to BY-2 cell synchronization than APC for PCD studies

The effect of 50µM CdSO₄ on synchronized cell culture was studied after application in each phases of cell cycle (in time 1, 5, 7 and 10.5h after removal of HU, in S, G2, M and G1 phase of cell cycle respectively, according to Świątek *et al.* 2002, Fig. 8). Cadmium applied to cells in S phase of cell cycle induced about 2h delay of mitotic index peak (Fig. 8). Cells affected during G2 phase (Fig. 8) did not shift the time of the mitotic peak, but increased the total mitotic index integral - up to about 40 %, probably due to prolongation of mitotic time in individual cells, similarly as in case of APC.

In cases, where cadmium was applied in S and G2 phase the internucleosomal DNA fragmentation was observed (Fig. 9) seven and ten days of cultivation. In the same time, the higher percentage of TUNEL-positive nuclei and approximately 0% of cell viability was observed. The fastest response

to cadmium was detected in cells treated in M phase (Fig. 8), where this treatment resulted in rapid decrease of the mitotic index down to 5%. This very rapid probably unprogrammed cell death, reflecting quick disintegration of the mitotic structures late telophasis nuclei could be compared to mitotic catastrophe of animal cells, which is obviously programmed (Castedo *et al.* 2004). No DNA fragmentation was observed during rapid cell death induced by cadmium in M phase and also in slow cell death induced in G1 phase of cell cycle (similarly to both control cells with HU or APC. Since DNA fragmentation arises from hydrolytic enzymes release or their activation, in appropriate phases these processes related to cell lysis did not appear compared to above mentioned S and G2 phases.

Compared to our results with cadmium, the activation of defense mechanisms after application of bacterial elicitor cryptogein together with cell death induction in S and G1 phase of cell cycle was observed as well, while this response was suppressed during G2 and M phase

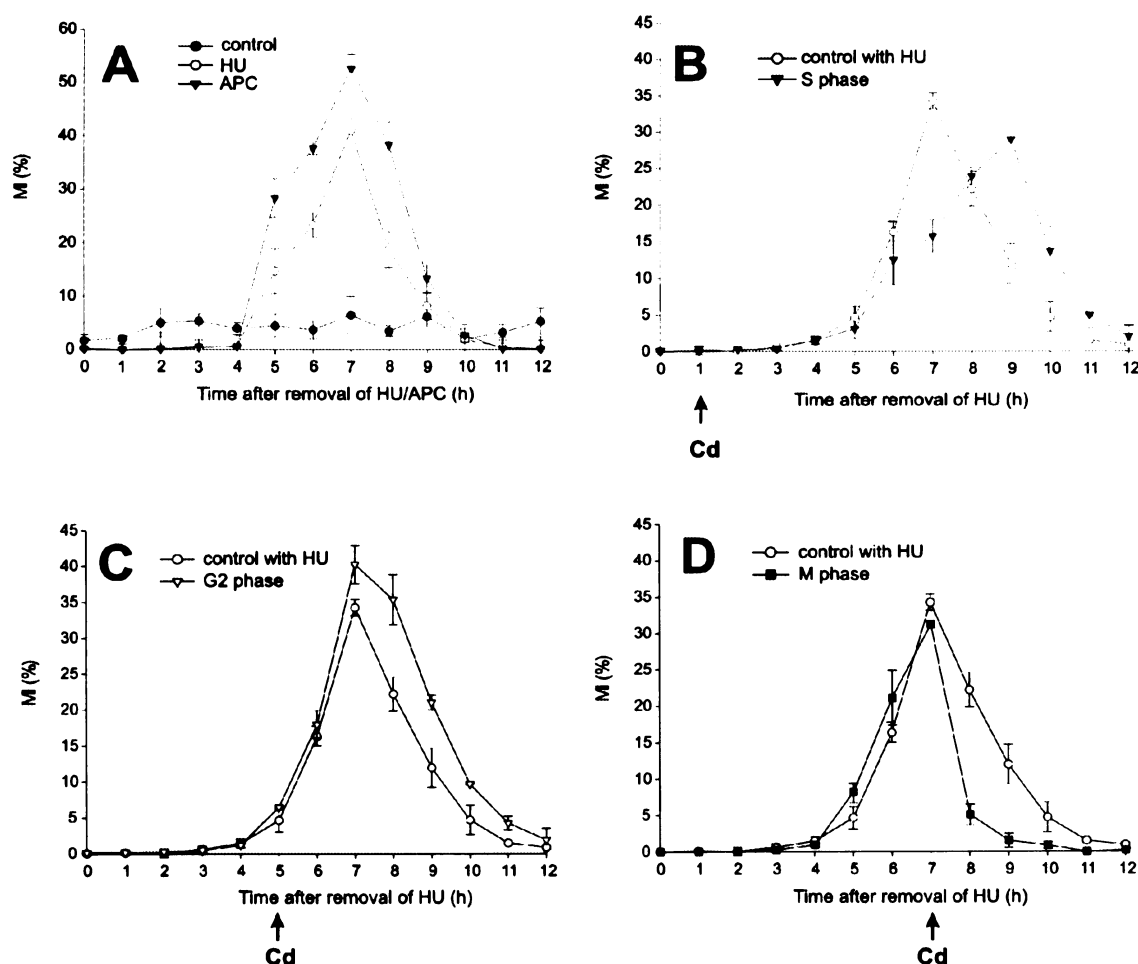


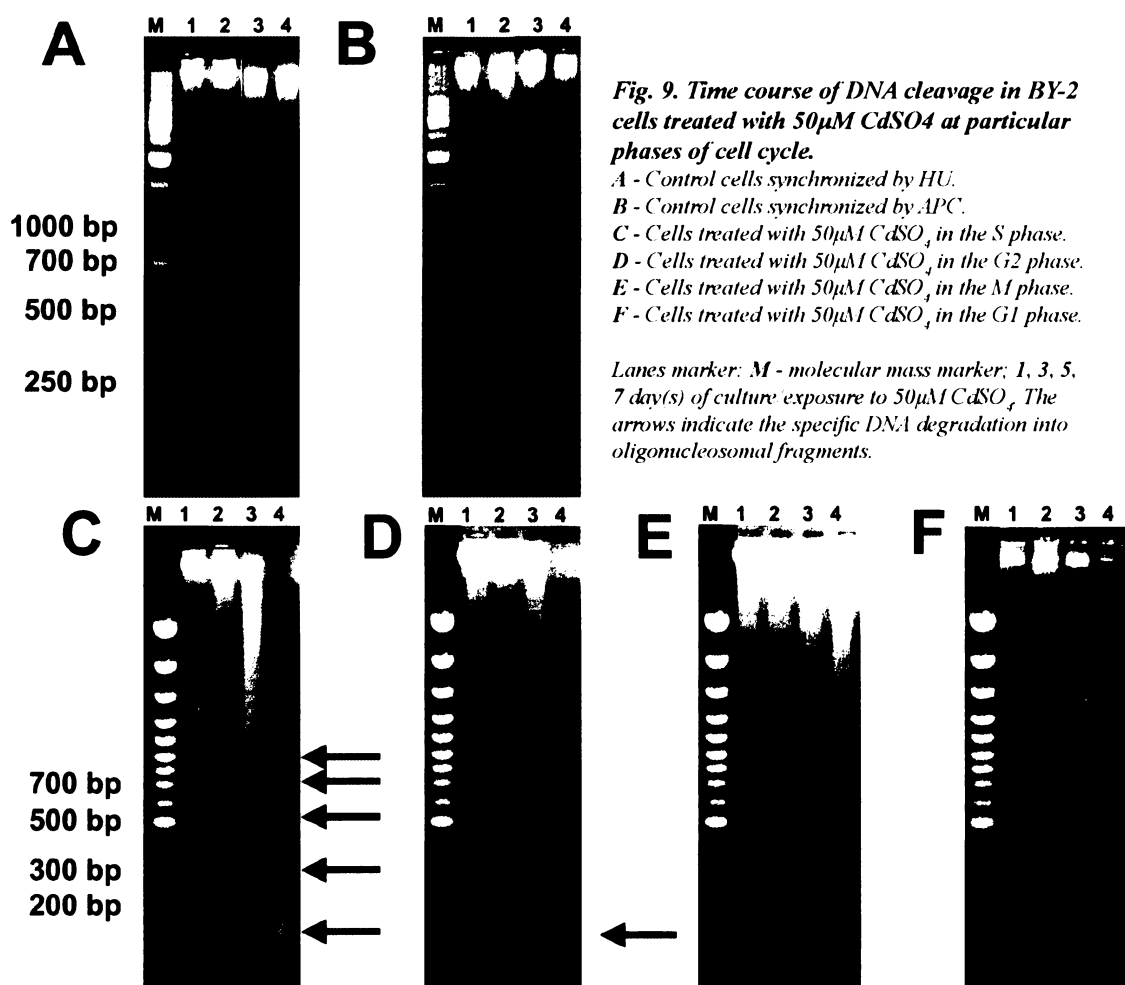
Fig. 8. Synchronization of BY-2 cells and the effect of 50µM CdSO₄ on mitotic index progression.

A - Synchronization with 4mM hydroxyurea (HU) and 15 µM aphidicolin (APC).

B - D - The affect of 50µM CdSO₄ on mitotic index progression compared to control cells (synchronized with HU); CdSO₄ was applied in S phase (1h after HU removal, B), in late G2 phase (5h after HU removal, C) and in M phase (7h after HU removal, D).

Each value represents the mean of three (cadmium treatments) independent experiments ± SE.

(Kadota *et al.* 2004). The specific effect of cryptogein compared to cadmium effect is highly pleiotropis (Zhang and Xiao 1998, Piqueras *et al.* 1999, Sandalo *et al.* 2001, Olmos *et al.* 2003) and these two PCD inductors also differ in targeted cells in planta. With regard to the key role of vacuolar collapse during plant programmed cell death (see Jones 2001) it could be assumed, that the absence of DNA fragmentation after application of cadmium in M and G1 phase is a consequence of controlled suppression of hydrolytic enzymes release or activation, we know that they are ready to use in intact untreated cells (see Chapter 3.2.). The G2/M transition appears to be the best candidate for the induction of specific apoptosis-like death of our BY-2 cells, since only



cells treated with cadmium in the preceding cell cycle phases (i.e. in S and G2) exhibited apoptotic DNA fragmentation.

The character of cell death responses induced by cadmium in G1 and G2 phases strongly differ from the effect of cryptogein, whose cell-death inducing effect was very strong in G1 and suppressed in G2 (Kadota *et al.* 2004). Kadota and Kuchitsu (2006) suggested that the defense and PCD-inducing responses to cryptogein might be suppressed in dividing cells. On the contrary,

differentiated cells, situated in G₀ or G₁ phase, are expected to strongly respond to the elicitors by induction of hypersensitive cell death, primarily serving to inhibit spreading of pathogens from out of infection site. Cadmium and also other abiotic stressors induce numerous cell processes, usually affect cells unselectively in a whole plant unlikely the localized hypersensitive cell reaction.

If all cells responded hypersensitively to cadmium treatment by induction of massive PCD, the whole plant body would probably quickly die. Induction of PCD could be suppressed in differentiated somatic cells, as suggested by a character of non-lytic G₁ cell death whereby repair processes could be activated.

Plant need to preserve its genetic integrity of meristematic cells, which is essential to further growth and reproduction. Impaired cells can be efficiently eliminated probably by PCD, as suggested from the internucleosomal DNA ladder of cells affected by cadmium in S and G₂ phase.

3.4. Mechanisms and causes of nuclear elongation

The shape of interphasic nuclei of plant cells is affected by cell type or tissue, cell age or phase of cell cycle, which a cell currently inheres in. Except of rounded, sometimes lenticular nuclei, elongated nuclei are also detected in plant cells, which significantly imitate cell shape of respective tissue (see Pazourek and Votrubová 1997). Elongated nuclei were also found in specialized cells of root hair (Chytilová *et al.* 1999) and pollen tube (Laitinen *et al.* 2002). These nuclei were also observed during different programmed cell death (e.g. Mittler *et al.* 1997, Liljeroth and Bringelsson 2001, Hout *et al.* 2001). In protoplast from *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to UV-C radiation it was hypothesized, that nuclear elongation is a precedent stage of their fragmentation during PCD (Danon and Gallois 1998). Distinct elongation of interphasic nuclei was observed also in BY-2 cell line both after an application of some stressor, which induced PCD (cadmium and camptothecin), and treatment with antireplicative drugs (HU and APC), without evoking cell death. Nuclear elongation is consequently not only an accompaniment phenomenon or precursor of PCD, which is demonstrated by results indicating the destiny of elongated nuclei after HU synchronization – their shrinkage and subsequent division (Fig. 10).

Changes in nuclear morphology of interphasic nuclei could be the consequence of an influence between different cell structures, in which nucleus could be connected. Therefore the study of mechanisms of interphasic nuclei elongation was focused on the role of cell wall, cytoskeleton and nuclear skeleton during this process. The significance of cell wall in nuclear elongation was studied both in term of functioning during nuclei elongation process and its maintenance. Whereas elongated nuclei were observed in protoplast of *Arabidopsis thaliana* after UV-C exposure inducing PCD (Danon and Gallois 1998), we did not see any elongated nuclei after enzymatic

elimination in BY-2 cells synchronized with HU (with the highest percentage of elongated nuclei, Fig. 11). This possibly indicates a different mechanism of nuclear elongation related and unrelated to PCD. Intact cell wall (probably by mediated interaction) is, in case of HU treatment, essential for elongated nuclei formation. This interaction between nuclei and cell wall could be mediated by cytoskeletal proteins (actin filaments and microtubules) anchored with one termination on plasma membrane and in nuclear membrane by second one. The observation of Chytilová *et al* (1999)

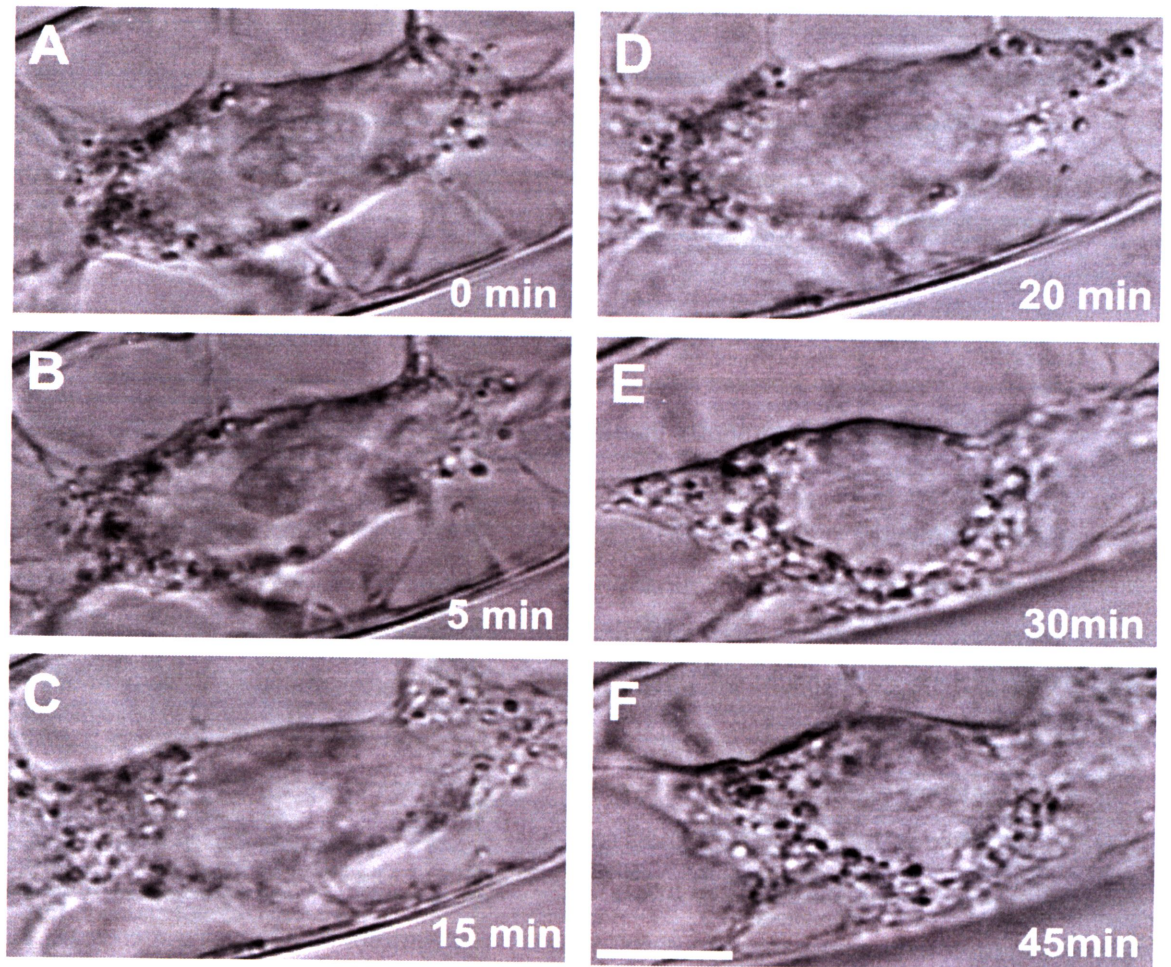


Fig. 10. Division of BY-2 cells.

A, B - Elongated interphasic nuclei after synchronization with HU.

C, D - Prophasic nuclei.

E, F - Metaphasic nuclei.

Nomarski differential contrast.

Scale bar = 25mm

indicate also an active role of cytoskeleton in nuclear elongation, who observed changes in nuclear shape and movement in root hairs *Arabidopsis thaliana* using GFP cell line with nuclear localization signal (Chytilová *et al.*

2000, Śliwińska *et al.* 2002). Using stabile transgenic cell line BY-2/GT16 expressing GFP labeled tubulin, in nearly 60% cells with elongated nuclei numerous invagination of nuclear membrane with microtubular signal were observed (Fig. 12). These invaginations could represent a possible position of microtubule anchoring. Using microtubule drug oryzalin in 20µM concentration,

which caused disintegration of microtubular network already after 12h of exposure, none elongation nuclei were found after common treatment together with HU. Similarly as in a study of microtubular cytoskeleton, a transgenic cell line BY-2/TGFP3 (with fusion protein GFP with talin) was used for observation of changes in cells with elongated nuclei. Opposite to untreated control cells any cortical actin filament were observed in cells treated with HU, while the actin basket from fine actin filaments around nuclei was preserved. Invaginations of nuclear membrane with actin signal were observed in approximately 45% cells with elongated nuclei (Fig. 13). As in the case of cytoskeletal drug application – oryzaline, the application of anti-actin drug 500mM latrunculin B did not induced any elongated nuclei. Numerous invaginations with GFP signal of labeled microtubules and actin filaments and probably also channels crossing nucleus, which were observed in cells after synchronization with HU, were previously detected in animal (Johnson *et al.* 2003, Lee *et al.* 2006) and plant cells (Collings *et al.* 2000, Gupton *et al.* 2006). They probably facilitate a signalization between nucleus and cytoplasm under stress conditions (Lui *et al.* 1998, Collings *et al.* 2000, Gupton *et al.* 2006). The presence of microtubules and actin filaments in these grooves detected in our experiments, could serve, with the view of presented presumptions, to signalization or transport of different substances from/or into nuclei during stress treatment. With respect to presence necessity of intact cytoskeleton for nuclear elongation, the invagination of cytoskeletal proteins could be of structural, supporting and stabilizing function besides functional one.

Elongated nuclei preserved their shape several hours after quick nuclear isolation by sonication. This indicates that neither cell wall nor the cytoskeleton are not essential to preserve nuclear shape of already elongated nuclei and this simultaneously it indicated a possible role of hypothetical nuclear skeleton during nuclear elongation. In contrast to the well characterized karyoskeleton of animal cells (Holaska *et al.* 2002), in plant cell studies some authors the presence of this structure do not assume (Galbraith 2004) i.a. therefore homologues of animal lamins were not been detected in plant genomes (Meier *et al.* 2001).

Unless the nuclear shape is not sustained purely by “a shape memory of chromatin”, a participation of hypothetical nucleus skeleton could be presumed, which would also signify blocking of nuclei elongation after the application of 1mM acrylamide - an broadwide inhibitor of intermedial filaments. As acrylamide inhibits especially vimentin (Arocena 2006), being absent in plant cells as well, it is probable to be able to inhibit other intermedial filaments of analogous structure.

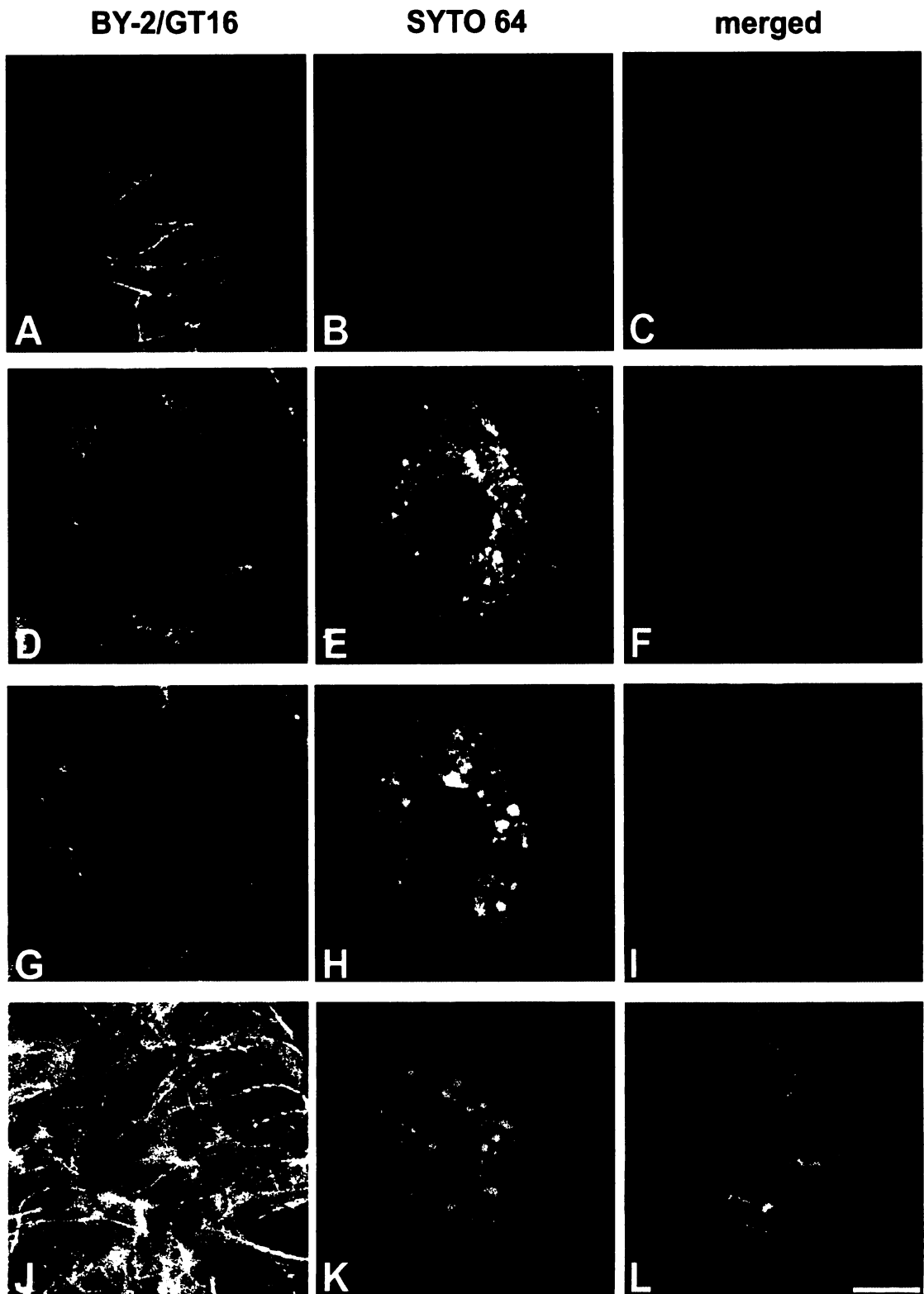


Fig. 11. Microtubular cytoskeleton 4h after HU removal in synchronized BY-2/GT-16 transgenic cell line.
A - C - Transversal microtubules in cortical layer.
D - I - Microtubules around nuclei and in cytoplasmic strands. Invagination(s) with microtubular signal (arrows).
J - L - Merged optical

A, D, G, J - BY-2/GT-16; B, E, H, K - SYTO 64; C, F, I, L - merged
Scale bar = 7 μm

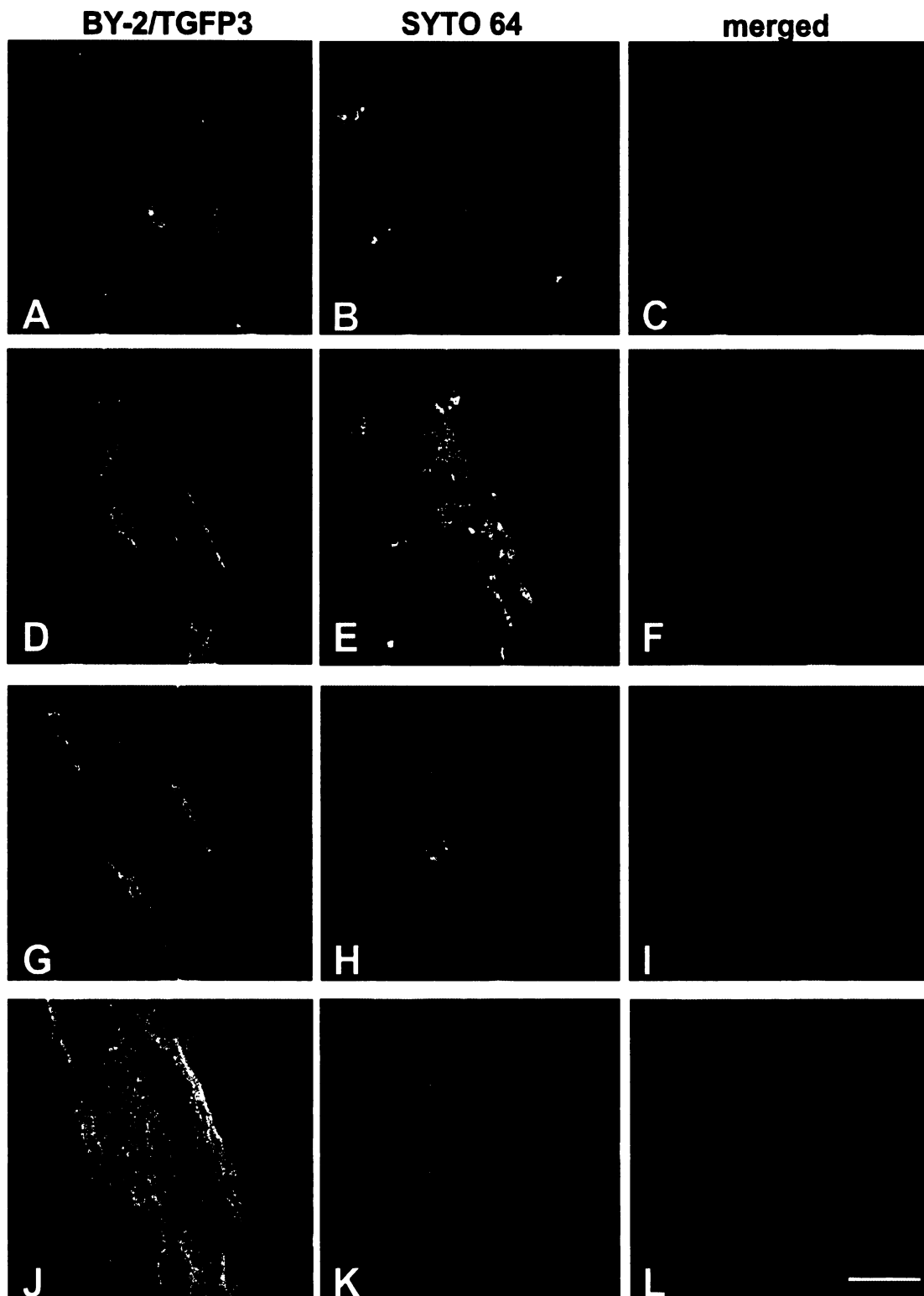


Fig. 12. Actin cytoskeleton 4h after HU removal in synchronized BY-2/TGFP3 transgenic cell line.
A - C - Cortical layer;
D - I - Nuclear basket from thin actin filaments. invagination(s) with microtubular signal (arrows);
J - L - Merged optical layers.

A, D, G, J - BY-2/TGFP3; B, E, H, K - SYTO 64; C, F, I, L - merged
 Scale bar = 11 μm

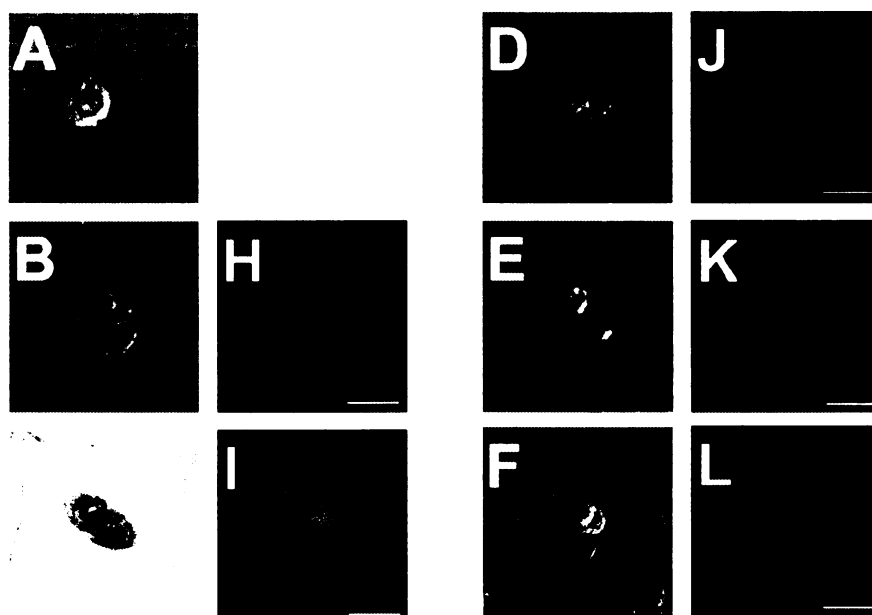


Fig. 13. Isolated elongated nuclei during synchronization with HU.
A - F - Nomarski differential contrast.
G - L - Hoechst 33258.
Scale bars = 10 μ m

4. CONCLUSIONS

- 1. Cadmium ions and cold stress reliably induced cell death, in particular programmed type**
- 2. Programmed cell death was accompanied only by several, but limited, specific morphological changes**
- 3. The occurrence of internucleosomal DNA fragmentation is not a reliable indicator of PCD**
- 4. Particular cell cycle phases yield to 50 μ M CdSO₄ treatment with a different intensity**
- 5. Different stress conditions induced nuclear malformations, which were however, probably not interrelated to PCD**

5. CURRICULUM VITAE

RNDr. Andrea Kuthanová, neé Zelená

Born: 2.12.1976, Prague, Czech Republic

Department of Plant Physiology

Address:

Faculty of Science
Charles University in Prague
Viničná 5
128 44 Prague 2
Tel: +420 221 951 707
Fax: +420 221 951 704
E-mail: azelena@natur.cuni.cz

Education:

1991-1996 Grammar school, Zlín

1996-1995 Graduation

1996-1998 Charles University in Prague, Faculty of Science

1999-1998 bachelor degree

1996-1999 Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Plant Physiology

2000 master degree

1996-2000 Diploma thesis: Physiological aspects of cell synchronization in tobacco cell lines, focused on cytological characterization of tobacco cell lines BY-2 and VBI-0, synchrony of cell division, changes and dynamic of cytoskeleton

2000-1999 Ph.D. study, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Plant Physiology

(Ph.D. thesis: Study of stress-induced programmed cell death in tobacco suspension culture BY-2)

2005 RNDr. degree

Work experience:

- 1997- Scientific work as researcher within Prof. Opatrný laboratory (Laboratory of Plant Cell Biology and Biotechnology), analysis of cell cycle, cytoskeleton and programmed cell death induced by abiotic
- 2000- Scientific work as researcher at the Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Plant Physiology
- 2001 Short period (1 month) stay in CREBS, Gabriel Lippmann Centre in Luxembourg, Dr. J.-F. Hausmann laboratory (study of molecular and physiological aspects of plant cells under stress conditions)
- 2006-2007 Work a co-researcher with Prof. Strnad laboratory (Laboratory of Growth Regulators) from the Institute of Experimental Botany Academy of Science of Czech republic and Faculty of Life Sciences Palacký University Olomouc

Teaching:

- 2001-2006 Practical course to lecture Plant Cytology
- 2007- Practical course Plant Cell
- Consultant of diploma thesis: Zuzana Lenochová (2004), Ondřej Smetana (2006)

Other scientific activities:

- 2004-2006 Member of European Cell Death Organization (ECDO)
- 2008- Member of Czech Society of Experimental Botany (ČSEBR)

Selected scientific seminary:

- 22.5.-23.5.2001 Methodical course Apoptosis, MZLU Brno
- 17.9.2004 I. training course on „Concepts and Methods of Programmed Cell Death“, Chania, Greece
- 1.10.2005 II. training course on concepts and methods of programmed cell death “Genetic Pathways and Techniques for Detection of Cell Death”, Budapest, Hungary

Participation on grants:

- 1996-2001 VS 96145 – Plant cell and stress
- 1998-2004 MSM 1131000003 – Regulation and signaling in living systems
- 2000-2004 LN00A081 – Signaling pathways in plants

- 2000-2005 OC 844.20 – The role of apoptosis in ontogenesis and in stress reactions in plant cells and tissues
- 2007- MSM 0021620858 – Signaling and molecular mechanisms of cell responses

6. PUBLICATIONS

Articles in journals with impact factors:

Kuthanova A, Gemperlova L, Zelenkova S, Eder J, Machackova I, Opatrny Z & Cvikrova M (2004) Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**, 149-156.

Kuthanova A, Opatrny Z & Fischer L (2008) Is internucleosomal DNA fragmentation an indicator of programmed death in plant cells? (accepted in *Journal of Experimental Botany*)

Kuthanova A, Fischer L, Nick P & Opatrny Z Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. (send to *Plant cell and Environment*).

Articles in journals without impact factors:

Lenochová Z, **Kuthanová A** & Votrubová O (2004) Sebevražda v zájmu celku, aneb programovaná buněčná smrt. *Živa*, **5**: 194-197.

Oral presentations:

Zelená A, Zelenková S & Opatrný Z (2003) Study of stress-induced programmed cell death in tobacco suspension culture BY-2. *Plant Physiology Conference of PhD. Students and Young Scientists*, Brno.

Kuthanová A (2006) Programed cell death in BY-2 cell line. *Seminary in Laboratory of Growth Regulators*, Olomouc.

Selected posters:

Zelená A, Zelenková S, Fischer L & Opatrný Z (2001) Cytoskeleton in apoptotical cells of tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *IX. Cytoskeleton Club*, Vranovská Ves.

Zelená A (2001) Study of programmed cell death in tobacco cell line BY-2. *Plant Physiology Conference of PhD. Students and Young Scientists*, Prague.

Zelená A, Zelenková S, Fischer L & Opatrný Z (2001) Programmed or unprogrammed cell death in tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *XVI. Biological Days -actual topics from cell and molecular biology*, Olomouc.

Zelenková S & **Zelená A** (2001) Physiological and biochemical effects of low temperature stress on tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *IX. Days of Plant Physiology*, České Budějovice.

Zelená A, Grunt M & Zelenková S (2002) Changes in actin cytoskeleton during long-term cold stress in tobacco cells BY-2. Book of abstract. *X. Cytoskeletal Club*, Vranovská Ves.

- Zelená A, Zelenková S & Opatrný Z (2003)** Changes in actin cytoskeleton after treatment with cadmium in tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *XI. Cytoskeletal Club*, Vranovská Ves.
- Kuthanová A, Fischer L, Petrášek J & Opatrný Z (2004)** Cell cycle-dependent programmed cell death in response to abiotic stress factors in synchronized tobacco BY-2 cell line. Book of abstract. *XII. Euroconference on Apoptosis „Cell Death Next to the Sea“*, Chania, Greece. – obtained Marie Curie stipendium (Marie Curie Actions - Conferences and Training Courses)
- Kuthanová A, Smetana O, Fischer L & Opatrný Z (2005)** Early stages of cold stress-induced programmed cell death in tobacco cell line BY-2. Book of abstract. *XIII. Euroconference on Apoptosis „Survival on the Danube“*, Budapešť, Maďarsko. - obtained Marie Curie stipendium (Marie Curie Actions - Conferences and Training Courses)
- Lenochová Z, **Kuthanová A**, Votrubová O, Opatrný Z & Soukup A (2006) Using TUNEL reaction for PCD detection in plant tissues and cell cultures. Book of abstract. *4. Methodical Days*, Srní.
- Kuthanová A, Opatrný Z & Fischer L (2007)** Is internucleosomal DNA fragmentation an indicator of programmed death in plant cells? Book of abstract. *11. Days of Plant Physiology*, Olomouc – received Dr. Mária Luxová and Litolab company prizes for poster presentation

7. PUBLICATIONS

- Arocena, M. (2006). Effect of acrylamide on the cytoskeleton and apoptosis of bovine lens epithelial cells. *Cell Biology International* 30, 1007-1012.
- Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., Suarez, M. F., Helmersson, A., Smertenko, A. P., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2004). VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation* 11, 175-182.
- Bröker, L. E., Kruyt, F. A. E., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research* 11, 3155-3162.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumie, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.
- Collings, D. A., Carter, C. N., Rink, J. C., Scott, A. C., Wyatt, S. E., & Allen, N. S. (2000). Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* 12, 2425-2439.
- Danon, A. & Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 131-136.
- de Jong, A. J., Hoeberichts, F. A., Yakimova, E. T., Maximova, E., & Woltering, E. J. (2000). Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211, 656-662.
- di Toppi, L. S. & Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., & Jones, R. (2000). Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Molecular Biology* 44, 255-266.
- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., Brukhin, V. B., Daniel, G., Zhivotovsky, B., & von Arnold, S. (2000). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113, 4399-4411.
- Fojtová, M. & Kovářik, A. (2000). Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant Cell and Environment* 23, 531-537.
- Fukuda, H. & Komamine, A. (1980). Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 65, 57-60.
- Galbraith, D. W. (2004). Nuclear dynamics in higher plants. The nuclear envelope, edited by D. E. Evans, C. J. Hutchinson, & J. A. Bryant, pp. 217-228. New York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Groover, A. & Jones, A. M. (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* 119, 375-384.
- Groover, A., DeWitt, N., Heidel, A., & Jones, A. (1997). Programmed cell death of plant tracheary elements: Differentiating in vitro. *Protoplasma* 196, 197-211.
- Gupton, S. L., Collings, D. A., & Allen, N. S. (2006). Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 95-105.
- Haseloff, J., Siemerling, K. R., Prasher, D. C., & Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2122-2127.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.
- Hayashi, Y., Yamada, K., Shimada, T., Matsushima, R., Nishizawa, N. K., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2001). A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 42, 894-899.
- Holaska, J. M., Wilson, K. L., & Mansharamani, M. (2002). The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 357-364.
- Houot, V., Etienne, P., Petitot, A. S., Barbier, S., Blein, J. P., & Suty, L. (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* 52, 1721-1730.
- Chaves, I., Regalado, A. P., Chen, M., Ricardo, C. P., & Showalter, A. M. (2002). Programmed cell death induced by (beta-D-galactosyl)₃ Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* 116, 548-553.
- Chytilová, E., Macas, J., & Galbraith, D. W. (1999). Green fluorescent protein targeted to the nucleus, a transgenic phenotype useful for studies in plant biology. *Annals of Botany* 83, 645-654.
- Chytilová, E., Macas, J., Sliwinska, E., Rafelski, S. M., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2000). Nuclear dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2733-2741.
- Johnson, N., Krebs, M., Boudreau, R., Giorgi, G., LeGros, M., & Larabell, C. (2003). Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation* 71, 414-424.

- Jones, A. M. (2001). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125, 94-97.
- Kadota Y. & Kuchitsu, K. (2006). Regulation of elicitor-induced defense responses by Ca²⁺ channels and the cell cycle in tobacco BY-2 Cells. *Tobacco BY-2 cells: From cellular dynamics to omics*, edited by Nagata T., Matsuoka K., & Inzé D., pp. 207-221. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S., & Kuchitsu, K. (2004). Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant Journal* 40, 131-142.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-&.
- Kost, B., Spielhofer, P., & Chua, N. H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant Journal* 16, 393-401.
- Koukalová, B., Kovařík, A., Fajkus, J., & Šíroky, J. (1997). Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters* 414, 289-292.
- Kumagai, F., Yoneda, A., Tomida, T., Sano, T., Nagata, T., & Hasezawa, S. (2001). Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: Time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant and Cell Physiology* 42, 723-732.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). VPE has enzymatic properties similar to those of caspase-1. *Plant and Cell Physiology* 46, S200.
- Kutsuna, N. & Hasezawa, S. (2002). Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 43, 965-973.
- Lee, R. K. Y., Lui, P. P. Y., Ngan, E. K. S., Lui, J. C. K., Suen, Y. K., Chan, F., & Kong, S. K. (2006). The nuclear tubular invaginations are dynamic structures inside the nucleus of HeLa cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84, 477-486.
- Liljeroth, E. & Bryngelsson, T. (2001). DNA fragmentation in cereal roots indicative of programmed root cortical cell death. *Physiologia Plantarum* 111, 365-372.
- Lui, P. P. Y., Kong, S. K., Kwok, T. T., & Lee, C. Y. (1998). The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca²⁺ signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 88-93.
- Matthew, E. M., Yen, T. J., Dicker, D. T., Dorsey, J. F., Yang, W. S., Navaraj, A., & El-Deiry, W. S. (2007). Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells. *Cell Cycle* 6, 2571-2578.
- Meier, I. (2001). The plant nuclear envelope. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 1774-1780.
- Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2000). Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 41, 993-1001.
- Mittler, R., Simon, L., & Lam, E. (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Journal of Cell Science* 110, 1333-1344.
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 Cell-line as the HeLa cell in the cell biology of Higher-Plants. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology* 132, 1-30.
- Olmos, E., Martinez-Solano, J. R., Piqueras, A., & Hellin, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany* 54, 291-301.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., & Hartwell, L. H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
- Pazourek J. & Votrubová O. (1997). *Atlas of Plant Anatomy*. Praha: Peres Publishers.
- Petráček, J., Čemá, A., Schwarzerová, K., Elckner, M., Morris, D. A., & Zažímalová, E. (2003). Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiology* 131, 254-263.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martinez-Solano, J. R., & Hellin, E. (1999). Cd-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cells: Time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research* 31, S33-S38.
- Śliwińska, E., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2002). Factors affecting nuclear dynamics and green fluorescent protein targeting to the nucleus in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Science* 163, 425-430.
- Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., & De Gara, L. (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright Yellow 2 cells. *Plant Physiology* 134, 1100-1112.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Zhang, Y. X. & Xiao, H. (1998). Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 420, 1-6.