

*Jak umírají živočišné
a rostlinné buňky*

Buněčná smrt

PETR MLEJNEK

Apoptóza, jedna z forem programované buněčné smrti, se u živočichů (obratlovců i bezobratlých) vyskytuje v průběhu ontogenetického vývoje. Do popředí zájmu molekulárních biologů se studium apoptózy dostalo teprve v posledním desetiletí. Nové poznatky ve výzkumu buněčné smrti umožnily pokrok v léčbě nádorů i některých neurodegenerativních onemocnění. Názory na buněčnou smrt se vyvíjejí už téměř 150 let a prošly řadou proměn. Zatímco v minulosti se studiem buněčné smrti téměř nikdo nezabýval, dnes toto téma zajímá nejen biologie a biochemiky, ale také lékaře a farmakology.

RNDr. Petr Mlejnek, PhD., (*1963)
vystudoval biochemii na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. V Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se zabývá mimo jiné studiem mechanismů, jimiž lze vyvolat apoptózu u nádorových buněk.

Apoptóza a nekróza

„Buněčná smrt je degenerativní proces vyvolaný například poraněním. Změny, jež tento proces provázejí, jsou podobné posmrtnému rozkladu probíhajícímu u uhynulých živočichů.“ Přibližně takto formuloval buněčnou smrt patolog R. Virchow v polovině 19. století. Není proto divu, že se o ni badatelé nijak zvlášť nezajímali. Až v polovině 20. století si všimli, že je buněčná smrt součástí normál-

ního vývoje živočišných embryí. Skutečnost, že by „přirozená“ buněčná smrt mohla být aktivní proces řízený samotnou odumírající buňkou, však byla přehlížena ještě dlouho. Teprve v sedmdesátých letech 20. století se začala buněčná smrt zkoumat systematicky, na základě morfologických znaků (zasloužil se o to australský patolog J. F. Kerr, viz např. Ilja Trebichavský: Apoptóza, Vesmír 73, 550, 1994/10). Tento přístup umožnil nejen společlivě zjistit, které buňky jsou mrtvé, ale také rozlišit dva základní typy buněčné smrti: apoptózu a nekrózu.

Apoptóza se vyznačuje charakteristickou kondenzací buňky i jádra. Představuje aktivní buněčnou smrt, na které se odumírající buňka podílí aktivací specifických genů. Výskyt apoptózy byl spojován s fyziologickými podmínkami a omezoval se spíše na jednotlivé buňky. Zjistilo se, že apoptotické buňky nezpůsobují zánět v okolní tkáni a jsou sousedními buňkami pohlcovány. Naproti tomu nekróza byla definována jako pasivní buněčná smrt, jež se vyskytuje za nefyziologických podmínek, například po působení toxinů (obr. 1). Charakteristickým morfologickým rysem nekrózy je bobtnání mitochondrií i celých buněk, jež končí rozpadem všech buněčných struktur a organel. Nekróza postihuje skupiny buněk a v okolní tkáni vyvolává zánět. Biochemické studie prokázaly, že charakteristické změny v morfologii jádra jsou u apoptotických buněk spjaty s aktivací endonukleáz,¹ jež štěpí jadernou DNA na fragmenty o definované velikosti.

V osmdesátých letech 20. století se výzkum zaměřil na studium mechanismů apoptózy, především na úlohu endonukleáz. I když bylo shromážděno velké množství experimentálních dat, dílčí procesy apoptózy na molekulární úrovni se podařilo odhalit až v letech devadesátých. Zásadou imunologů se zjistilo, že u apoptotických buněk probíhají na povrchu cytoplazmatické membrány změny, které umožňují „žravým buňkám“ – makrofágům – bezpečně rozpoznat odumírající buňky a pohltnout je. Za nejpodstatnější lze označit objevy v molekulární biologii. Skupině vědců vedené H. R. Horwitzem (viz Vesmír 82, 133, 2003/3) se podařilo identifikovat geny smrti u háďátka (*Caenorhabditis elegans*), jejich biochemické funkce však známy nebyly. Stejně tak nebylo zřejmé, nakolik jsou mechanismy buněčné smrti u háďátka platné pro ostatní živočichy.

Kresba
© Jan Tomaschoff



Přibližně v téže době studovali badatelé zabývající se zánětlivými reakcemi proteázu² odpovědnou za aktivaci cytokinu³ interleukinu-1 β . Všimli si, že tato proteáza a produkt genu smrti *ced-3* u háďátka jsou si podobné, a díky tomu pak byla objevena nová rodina savčích cysteinových proteáz, které dostaly název kaspázy. Brzy se podařilo prokázat, že naprosto odlišné podněty indukující buněčnou smrt směřují k společnému projevu, totiž k aktivaci kaspáz odpovědných za částečný proteolytický rozklad buněk, jenž se projevuje apoptózou. Tyto poznatky umožnily „smazat pomyslný rozdíl“ mezi apoptózou během ontogenetického vývoje a apoptózou indukovanou například chemickými činidly.

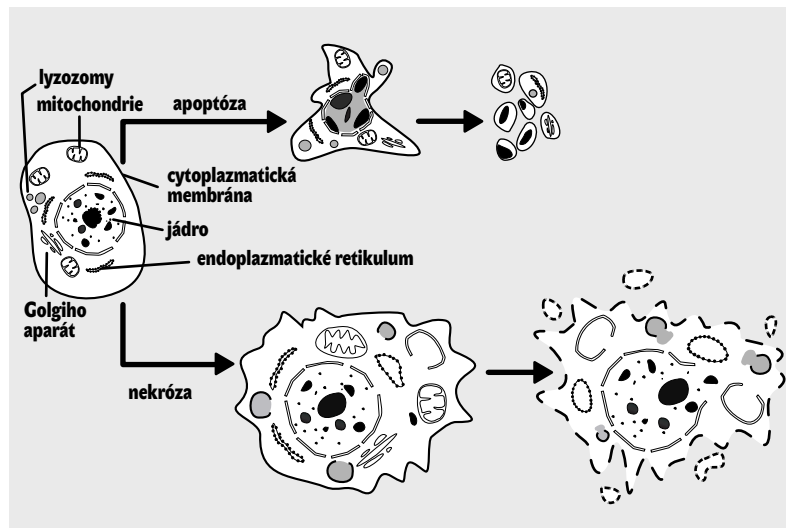
Apoptóza se obvykle dělí na tři fáze: nstartována je poškozením buňky, stresem nebo změnou v hladině hormonů, pak nastoupí regulační geny, které buď spustí opravné mechanismy, nebo aktivují kaspázové proteázy, a nakonec je buňka usmrcena, to znamená, že většina důležitých buněčných proteinů je kaspázami nevratně rozštěpena. Nevratně zničena (rozštěpena endonuklázami) je rovněž jaderná DNA.

Nekróza sice nebyla při výzkumu programované buněčné smrti hlavním předmětem zájmu, nicméně bylo prokázáno, že se na nekrotickém rozkladu buněk podílejí zejména kalpains (skupina cysteinových proteáz aktivovaných ionty vápníku) i jiné proteázy.

Koncem devadesátých let minulého století se zjistilo, že si některé výsledky navzájem odporují. Ukázalo se totiž, že existují druhy programované buněčné smrti, které mají morfologii spíše nekrotickou než apoptotickou, ačkoliv využívají aktivaci „apoptotických“ biochemických drah. Dále se zjistilo, že buněčná smrt není stoprocentně spojena s určitým typem kontrolního nebo prováděcího mechanismu, apoptotická morfologie může být také na aktivaci kaspázových proteáz nezávislá. Potlačení aktivity kaspáz nelze buněčnou smrti zabránit, ale lze ji pozměnit z apoptotické na nekrotickou. Z uvedených faktů vyplynulo, že apoptóza a nekróza představují spíše alternativy základního programu buněčné smrti než protiklady. Krom toho bylo již zřejmé, že kaspázové proteázy nejsou v procesu apoptózy jedinými proteolytickými činidly.

Tři možnosti programované buněčné smrti

Obecnější třídění programované buněčné smrti zavedl švýcarský embryolog J. Clark. Ačkoliv bylo formulováno už koncem osmdesátých let 20. století, širšího ohlasu dosáhlo teprve v posledních letech. Clark definoval tři základní morfologické typy programované buněčné smrti: apoptotickou, autofagickou⁴ a nelyzozomální. Jeho rozdělení odráží také různé mechanismy destrukce buněk podle účasti lyzozomů. Při heterofagii (apoptóze) se na destrukci buňky nepodílejí vlastní lyzozomy, její „zbytky“ pohltí lyzozomy okolních buněk (obr. 2). Pro autofagii je naopak charakteristické, že hlavní podíl na degra-



1. Morfologické a biochemické rozdíly mezi apoptózou a nekrózou. Při apoptóze se cytoplazma i jádro „scvrknou“ (kondenzují) a tvoří se váčky obalené membránou, které obsahují organely, části cytoplazmy a jádra. Cytoplazmatická membrána a ostatní organely zůstávají nezměněny, iontová homeostáze je zachována. Jako nejvýznamnější biochemický znak bývá uváděna aktivace nukleáz, jež rozloží jadernou DNA na drobné částičky. Proces apoptózy vyžaduje energii (adenozintrifosfát) a neprobíhá již při poklesu teploty na 4 °C. Při nekróze se iontová homeostáze poruší a mitochondrie, cytoplazmatická membrána i jádro bobtnají. Postupně se rozpadnou všechny organely a buněčné struktury, jaderná DNA je poškozena jen nepatrně. Proces nevyžaduje energii (adenozintrifosfát) a probíhá i při 4 °C. Schémata © Dr. Kateřina Studená

ci mají vlastní lyzozomy (obr. 3). Při nelyzozomální degradaci probíhá proteolýza přímo v cytoplasmě hynoucích buněk.

- Apoptóza je u živočichů nedílnou součástí embryogeneze, ontogenetického vývoje a diferenciace buněk. Slouží k udržování homeostáze ve tkáních, podílí se na obnově buněk, hraje nezastupitelnou roli při vývoji imunitního systému. Řada fyzikálních a chemických podnětů vyvolává programovanou buněčnou smrt, která se morfologicky i biochemicky projevuje jako apoptóza. Klíčovou roli v procesu apoptózy u živočichů hraje kaspázy – cysteinové proteázy, které štěpí cílovou sekvenci proteinu za kyselinou asparagovou.⁵ Jsou syntetizovány jako neaktivní proenzymy – aktivují se proteolytickým štěpením na velkou a malou podjednotku (aktivní enzym se pak skládá ze dvou podjednotek větších a dvou menších). Aktivace kaspáz je do značné míry prostudována u savčích buněk, kde rozeznáváme tři mechanismy: s přímou účastí mitochondrií, prostřednictvím extracelulárních receptorů a granzymem B.⁶ Proces apoptózy je regulován kaskádou genů a řada regulačních drah je již prostudována do detailů.

- Autofagie je na molekulární úrovni prostudována poměrně málo. Nejlépe je prozkoumána u kvasinek, kde už byly identifikovány některé geny, které se na tomto procesu podílejí. Je zřejmé, že autofagie je fylogeneticky zakonzervovaný proces, neboť neexistuje zásadní rozdíl mezi kvasinkami a živočišnými nebo rostlinnými buňkami. Při autofagii jsou nitrobuněčné struktury pohlcovány a rozkládány lyzozomálními enzymy. Za fyziologických podmínek udržuje tento proces

1) Endonukleázy jsou enzymy, jež hydrolyticky (tj. za účasti vody) štěpí vlákna DNA na menší fragmenty.

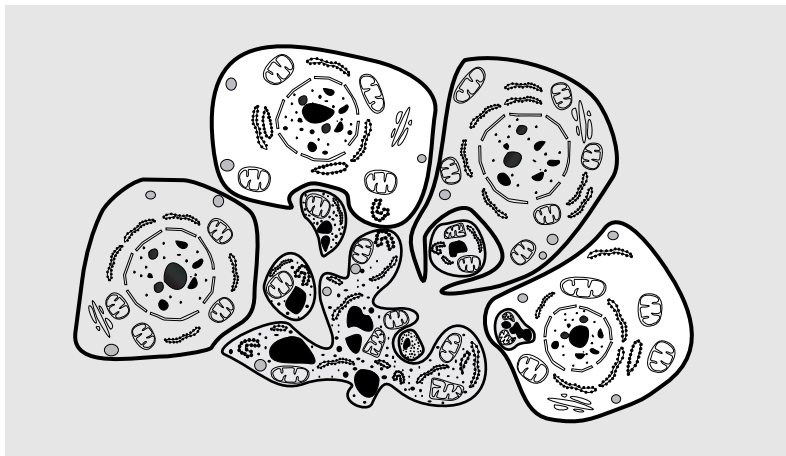
2) Proteázy jsou enzymy, jež hydrolyticky štěpí proteiny na menší fragmenty.

3) Cytokiny jsou regulační bílkovinné povahy, jež jsou produkovány buňkami a slouží k vzájemnému ovlivňování jejich činnosti.

4) Proces autofagie byl morfologicky a biochemicky popsán již v šedesátých až sedmdesátých letech minulého století.

5) Kyselina asparagová je jedna z aminokyselin, z nichž jsou vytvořeny proteiny.

6) Granzym B je serinová proteáza vylučovaná cytotoxickými T-lymfocyty.

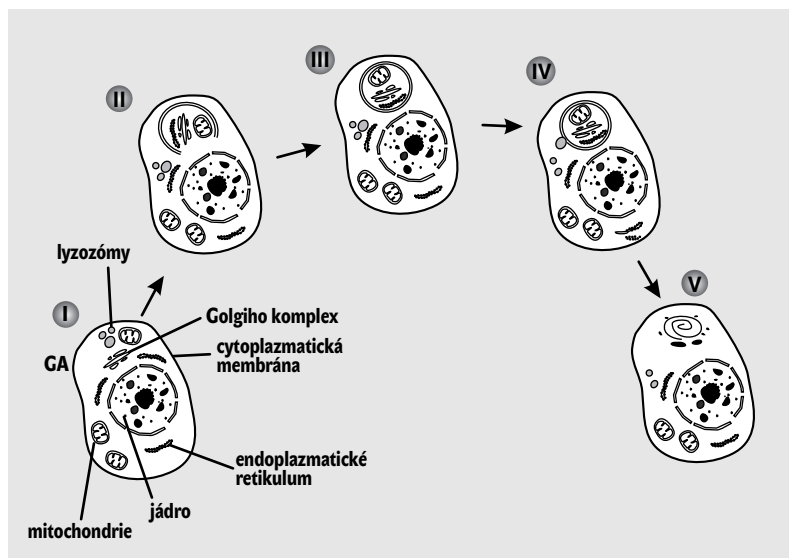


2. Heterofagie (ř. *heteros* – jiný; buňka je z větší části destruována v nevlastních lyzozomech). V procesu apoptózy je buňka částečně proteolyticky degradována, okolní buňky nebo makrofágy rozpoznají apoptotické váčky a pohltní je. Pohlčené váčky pak uvnitř buněk splnou s lyzozomem a pohlčený materiál rozloží.

dostatečné zásoby intracelulárních aminokyselin jednak pro syntézu proteinů, jednak pro glukoneogenezi.⁷ Autofagie se rovněž podílí na obnově organel. Patologické podmínky, například nedostatek kyslíku, toxický šok nebo hladovění, také iniciují autofagii, jež vede k úplné destrukci buňky. Hlavním proteolytickým činitelem autofagie u živočišných buněk jsou katepsiny – vesměs cysteinové proteázy, jež se hromadí v lyzozomech.

- Nelyzozomální degradace se vyskytuje ve srovnání s apoptózou a autofagií poměrně zřídka a je také nejméně prostudována. Navrženy byly tři teorie vysvětlující aktivaci cytoplazmatických proteáz, jež jsou odpovědné za degradaci buňky. První teorie předpokládá, že jsou proteázy uvolněny z lyzozomů, podle druhé pocházejí z endoplazmatického retikula (buněčné organely podílející se na tvorbě řady látek) a podle třetí jsou v neaktiv-

3. Autofagie (ř. *autos* – sám; destrukci provádějí vlastní lyzozomy buňky). Část cytoplazmy nebo organela určená k likvidaci je obalena dvojitou membránou. Po ukončení tohoto procesu vzniká váček, který se spojí s lyzozomem a uvolněné lyzozomální enzymy pohlčený obsah úplně rozloží. (Buňka ale není autofagií zlikvidována úplně, nepatrné zbytky jsou odstraněny heterofagií.)



ním stavu přítomny v cytoplazmě a aktivuje je zatím neznámý mechanismus.

Ani Clarkovo třídění programované buněčné smrti podle účasti lyzozomů však nelze akceptovat všeobecně. Zjistilo se totiž, že se katepsiny uvolněné z lyzozomů mohou podílet na aktivaci kaspázových proteáz.

Buněčné organely jako senzory buněčné smrti

Nejnovější přístup ke klasifikaci programované buněčné smrti odhlíží od morfologických znaků a klade důraz na mechanismy spouštějící tento proces. Ukazuje se, že je možné identifikovat jednotlivé buněčné organely, které přijímají prvotní signály buněčné smrti a podle intenzity signálu spouštějí buď „obranou“ reakci, jež směřuje k rovnovážnému stavu (homeostázi) buňky, nebo programovanou buněčnou smrt, při extrémním podnětu eventuálně i nekrózu.

Mezi nejdříve identifikované buněčné struktury vyvolávající apoptózu patří cytoplazmatická membrána a její „receptory smrti“.⁸ Organelově specifickou odpověď, která může vyústit v programovanou buněčnou smrt, vyvolává rovněž poškození jádra, respektive DNA. K mediátorům předávajícím signál z jádra dále patří některé proteinkinázy,⁹ protein p53¹⁰ a reaktivní kyslíkové radikály. Na zahájení apoptózy se podílí také endoplazmatické retikulum, které uvolňuje vázané ionty vápníku a ovlivňuje „skládání“ proteinů. V úvahu přichází rovněž Golgiho komplex, u kterého není jednoznačně prokázáno, zda funguje také jako senzor buněčného stresu. Existuje však řada důkazů o přesunu některých proteinů, jež se účastní regulace apoptózy, z Golgiho komplexu a o jejich následné aktivaci při buněčném stresu. Lyzozomy jsou mimořádně citlivé k působení reaktivních kyslíkových radikálů nebo některých toxických látek (antibiotik), jež iniciují změnu propustnosti jejich membrány. Uvolněné lyzozomální proteázy pak mohou aktivovat apoptotickou buněčnou smrt. Detaily tohoto procesu však nejsou zcela prostudovány. Dominantní postavení při spouštění apoptózy a programované buněčné smrti vůbec má mitochondrie. Tato organela je nejen sběračem prvotních stimulů apoptózy, ale také přijímá druhotné signály z ostatních organel a buněčných struktur. Do mitochondrií směřují signální dráhy, které v konečném důsledku ovlivňují propustnost obou membrán. Vnější membrána začne propouštět proteiny a vnitřní ionty, což vede k zhroutilí transmembránového potenciálu.¹¹ Ačkoliv se stále diskutuje o tom, jestli je pro spuštění apoptózy důležitější porušení vnitřní či vnější membrány, je prokázáno, že uvolněné proteiny z mezimembránového prostoru mitochondrií přímo aktivují enzymy, jež se podílejí na destrukci buňky, zejména kaspázy a také endonukleázy. Mezi nejlépe prostudované mitochondriální aktivátory kaspáz patří cytochrom c.¹² Jestliže má buňka dostatek energie, tvoří uvolněný cytochrom c s dal-

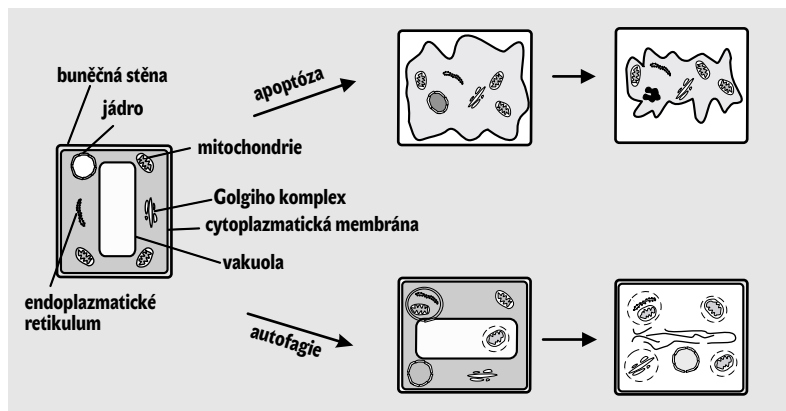
šími cytoplazmatickými bílkovinami složitý enzymový komplex, jenž aktivuje kaspázo-vé proteázy.

Programovaná smrt u rostlin

Přibližně před 340 lety pozoroval R. Ho-ok pod mikroskopem první eukaryotické buňky. Shodou okolností to byly jen buněčné stěny buněk korku, které při diferenciaci prošly programovanou buněčnou smrtí. Rostlinní badatelé se ale studiem programované buněčné smrti dlouho vůbec nezabývali, přestože se již záhy vědělo, že je programovaná buněčná smrt u rostlin nutná pro tvorbu cévních svazků. Tomuto tématu se začali věnovat až v sedmdesátých letech 20. století, kdy se hojně studovalo programované rozložení embryonálních buněk jejich vlastními enzymy neboli autolýza (viz práce R. Nagla a V. Villierse, kteří na základě morfologických a biochemických studií prokázali, že programovaná autolýza odpovídá do značné míry autofagii u živočišných buněk). Intenzivně se mechanismy programované buněčné smrti u rostlin zkoumají teprve v posledním desetiletí. Z hlediska morfologických změn lze u rostlin definovat nejméně dva typy programované buněčné smrti: apoptózu a autofagii (obr. 4), i když někteří autoři tuto klasifikaci odmítají a používají pouze termín programovaná buněčná smrt. Zmíněné typy programované buněčné smrti totiž u rostlin nemají vždy všechny morfologické i biochemické znaky charakteristické pro odpovídající typ v živočišných buňkách (někdy se vyskytují znaky pro apoptózu i autofagii zároveň).

■ Apoptóza je u rostlin indukována obdobnými fyziologickými nebo patologickými podněty jako u živočichů. Její výskyt byl popsán při působení stresu (například chladového šoku, vysoké teploty, těžkých kovů, chemických látek, vysokých dávek rostlinných hormonů apod.). Kromě toho byla apoptóza také popsána v souvislosti se somatickou embryogenezí u smrku.¹³ Jako samostatný typ buněčné smrti, jenž morfologicky a biochemicky rovněž odpovídá apoptóze, je nutné uvést hypersenzitivní reakci, což je komplexní obranná reakce rostliny proti patogenům. Provázena je značnou produkcí kyslíkových radikálů a aktivací řady „obrných genů“. Hypersenzitivní reakce se projevuje jako rychlá buněčná smrt v bezprostředním okolí infekce, což účinně brání šíření patogenu. Některé typy hypersenzitivní reakce se však podobají spíše nekróze u živočišných buněk. Experimentálně lze tuto reakci vyvolat bakteriálními toxiny nebo kyselinou salicylovou.

Je zřejmé, že se mitochondrie podílejí na regulaci apoptózy také u rostlin, i když detailní mechanismy zatím nejsou známy. Víme jen, že indukci apoptózy u rostlinných buněk předchází uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Jak (a zda vůbec) aktivuje cytochrom c uvolněný do cytoplazmy rostlinné proteázy, to zatím nevíme. Bylo již prokázáno, že také při apoptóze u rostlin



4. Klasifikace programované buněčné smrti u rostlin. U rostlinných buněk lze podle morfologických kritérií rozeznat nejméně dva typy programované buněčné smrti: apoptózu a autofagii. Apoptóza je charakterizována kondenzací cytoplazmy i jádra buňky (scvrknutím); jen výjimečně lze pozorovat útvary podobné apoptotickým váčkům typickým pro živočišné buňky. I u rostlin bývá jako nejvýznamnější biochemický znak uváděna aktivace nukleáz, jež degradují jadernou DNA na fragmenty o definované velikosti. Při autofagii je také část cytoplazmy nebo organela určená k likvidaci obalena dvojitou membránou. Po ukončení tohoto procesu vznikne váček, který splyne s vakuolou a po chvíli rozložený materiál.

jsou aktivovány specifické proteázy, které jsou odpovědné za smrt živého obsahu buňky. Dosud však není jasné, které proteázy hrají v tomto procesu hlavní úlohu. Spekuluje se nejméně o třech rozdílných typech: o cysteinových proteázách bez vyhraněného působení, o cysteinových proteázách odpovídajících biochemicky (nikoli geneticky) savcím kaspázovým proteázám a o serinových proteázách. Výrazným rozdílem mezi živočišnou a rostlinnou apoptózou je fakt, že u rostlinných buněk nejsou mrtvé buňky okolními buňkami pohlcovány, tj. neexistuje zde jev obdobný fagocytóze.

■ Autofagie se u rostlin morfologicky i biochemicky podobá autofagii živočišné. Také zde je část cytoplazmy nebo organela, která má být pohlčena, „obalena“ dvojitou membránou. Vzniklý útvar potom splyne s vakuolou,¹⁴ kde je hydrolyticky rozložen. Autofagie byla u rostlin popsána v souvislosti s hladováním nebo stárnutím. Nejnovější výzkumy ukázaly, že při zárodečném vývoji buněk smrku se autofagické a apoptotické morfologické znaky překrývají. Jako hlavní činitel v autofagii rostlin bývají nejčastěji uváděny cysteinové proteázy.

Co považují za nejzajímavější?

Výzkum buněčné smrti přinesl řadu významných objevů, jež svými důsledky překračují rámec biologie. Změnily náš pohled na úlohu mitochondrií. Ty byly do poloviny devadesátých let minulého století považovány za organely, bez nichž by byl život možný jen stěží, neboť kryjí svou produkcí adenosintri-fosfátu většinu energetických potřeb buňky. Od poloviny devadesátých let ale také víme, že mitochondrie aktivně rozhodují o smrti buňky a mají při tomto rozhodování „hlavní slovo“.

Dále se jasně ukázalo, že v říši mnohobuněčných organismů je smrt pro život naprosto nezbytná, a to nejen ve filozofické rovině. ☺

7) Glukoneogeneze je proces, při kterém je syntetizována glukóza z aminokyselin.

8) „Receptory smrti“ jsou bílkoviny, jež vedou napříč cytoplazmatickou membránou a předávají signály z vnějšího prostředí dovnitř do buněk. Po navázání příslušné signální molekuly na část „receptoru smrti“, jež je vně buňky, mění svoji strukturu uvnitř buňky a přes řadu mezistupňů aktivují kaspázové proteázy.

9) Proteinkinázy jsou enzymy, které přenášejí molekulu fosfátu na jiné proteiny, a tím ovlivňují jejich aktivitu.

10) Protein p53 patří mezi faktory, které se podílejí na regulaci transkripce, a je aktivován například při poškození DNA.

11) Transmembránový potenciál vzniká při oxidaci („spalování“) substrátu v mitochondriích a jeho energie se využívá zejména pro syntézu ATP. Molekula adenosintri-fosfátu je bohatá na energii a slouží v buňkách jako „energetická konzerva“.

12) Cytochrom c je bílkovina, která je součástí dýchacího řetězce.

13) Somatické embryo se vyvíjí ze somatických (nepohlavních) buněk na rozdíl od zygotických embryí vznikajících ze zygoty, která vznikla splynutím dvou gametických buněk (pohlavně).

14) Vakuola je obří rostlinná organela, jež plní rozličné funkce, jako je hospodaření s vodou a solemi, obsahuje zásobní látky, barviva rozpustná ve vodě, odpadní látky a v určitém ohledu má podobnou funkci jako živočišné lyzozomy.