

Genetické modifikace rostlin pro zvýšení akumulace těžkých kovů

GENETICAL MODIFICATIONS OF PLANTS TO INCREASE ACCUMULATION OF HEAVY METALS

Jan Fišer^{1,2}, Martina Macková^{1,2}, Martina Nováková^{1,2}, Tomáš Macek^{1,2}

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze a ²Ústav organické chemie a biochemie AV ČR

Těžké kovy jsou významnými environmentálními kontaminanty, mají vysokou toxicitu, organismy jsou snadno akumulovány a přítomností v potravním řetězci ohrožují i lidské zdraví. Fytořremediace půd, kontaminovaných těžkými kovy s využitím přirozených rostlinných hyperakumulátorů či připravených transgenních rostlin, je levný a ekologicky šetrný postup, oproti klasickým fyzikálně-chemickým metodám. Rostliny vhodné pro fytořremediaci by měly disponovat několika typickými znaky:

- schopností tolerovat a akumulovat kovy,
- rychlé růst a tvořit velké množství akumulující biomasy,
- být snadno sklíditelné a mít výhodné agrotechnické vlastnosti.

Populace rostlin tolerantních či hyperakumulujících kovy se přirozeně vyskytují na místech bohatých na kovy. Tyto rostliny však nejsou pro fytořremediaci ideální, protože obvykle nesplňují zmíněné podmínky, především pak podmínku rychlého růstu a množství biomasy. Z tohoto důvodu byly navrženy postupy přípravy transgenních rostlin založené na vlastnostech organismů, kdy hyperakumulace kovů bývá kontrolována několika klíčovými geny. Ty jsou přenášeny do rostlin s dobrými růstovými vlastnostmi. Metalothioneiny (MT) jsou proteiny vytvářené pomocí translačního aparátu a jsou charakterizovány jako nízkomolekulární, na cystein bohaté proteiny vážající kovy. Binz a Kāgi vytvořili klasifikaci, kde vzali v úvahu taxonomické parametry a vzor distribuce cysteinových zbytků v sekvenci metalothioneinového proteinu. Tak vzniklo celkem 15 rodin MT, z nichž patnáctá, připadající na rostlinné metalothioneiny, byla rozdělena na 4 typy podle distribuce jejich cysteinových zbytků a oblastí bez cysteinů. Dosud je jediným rostlinným metalothioneinem izolovaným z přirozeného zdroje metalothionein E_c z obilky rostliny *Triticum aestivum*. Všechny další aminokyselinové sekvence rostlinných metalothioneinů jsou odvozeny ze sekvencí mRNA nebo cDNA. Nadprodukce rekombinantních metalothioneinů zvyšuje v rostlinách rezistenci ke kovům, podporuje jejich akumulaci a může být považována za slibný přístup k vytvoření rostlin vhodných k fytořremediaci. Expres kvasničného metalothioneinu CUP1 zlepšila toleranci rostliny *Brassica oleracea* na Cd²⁺, ale tyto rostliny nevykazovaly zvýšenou akumulaci kovů. Rostlina *Nicotiana tabacum* s genem CUP1 akumulovala Cu²⁺ v listech, ale ne Cd²⁺. Rostliny *Nicotiana tabacum* byly také transformovány genem HisCUP, kde byl gen CUP1 spojen s histidinovou kotvou, a tyto rostliny měly zvýšený fytoextrakční potenciál pro Cd²⁺. Zvýšená akumulace Cu²⁺ byla zjištěna v rostlinách *Arabidopsis thaliana* exprimujících gen PsMTa z rostliny *Pisum sativum*. Fytochelatiny (PC) jsou syntetizovány v odpovědi na vystavení rostliny fyziologickým a nefyziologickým iontům kovů. Jsou to peptidy s obecnou strukturou (γ-Glu-Cys)_n-X (n = 2–11, X je Gly, Ser, β-Ala, Glu, Gln nebo beze zbytku). Na rozdíl od metalothioneinů

jsou fytochelatiny syntetizovány enzymaticky transpeptidasovou reakcí z glutathionu (γ-Glu-Cys-Gly) nebo jeho homologů (iso-PCs) γ-glutamylcysteinylpeptidyltranspeptidasou. Pro tento enzym se častěji používá triviální název fytochelatinosynthasa (PCS). Studie s buněčnou kulturou rostliny *Silene cucubalus* ukázala, že syntéza fytochelatinu je striktně závislá na přítomnosti kovu nebo metaloidu v analyzovaném pufru. Nejsilnějšími aktivátory PCS jsou ionty Cd²⁺ následované ionty Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Sb³⁺, Ag⁺, Hg²⁺ a AsO₄³⁻. V přítomnosti jejich nadbytku jsou tyto kovy efektivně vázány PC a poté ukládány ve vakuole. Nadprodukci PCS TaPCS1, původem z rostliny *Triticum aestivum*, v kořenech rostliny *Arabidopsis thaliana*, byl podpořen přenos Cd²⁺ do nadzemních částí, následovaný snížením akumulace kovu v kořenech v porovnání s kontrolou. Konstitutivní nadprodukce PCS TaPCS1 v rostlině *Nicotiana glauca* zvýšila toleranci k Pb²⁺ a Cd²⁺ a zlepšila akumulaci Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ a Cd²⁺ ve výhoncích. Naproti tomu, přímá nadprodukce PCS AtPCS1 v listech rostliny *A. thaliana* pouze zvýšila toleranci k Cd²⁺, ale akumulace v nadzemních částech nebyla ovlivněna. Nadprodukce AtPCS1 v rostlině *N. tabacum* zvýšila 14× hladinu fytochelatinů, zlepšila toleranci a kumulaci Cd²⁺, ale přenos z kořenů do nadzemních částí zůstal neovlivněn. Glutathion a jeho analogy přítomné v buňkách nejsou jen prekurzory fytochelatinů a iso-fytochelatinů, ale účastní se i dalších mechanismů zahrnutých v odpovědi na stres těžkými kovy. Glutathion přímo eliminuje reaktivní kyslíkové radikály indukované těžkými kovy v buňkách. Přízpusobení Cd hyperakumulující rostliny *Sedum alfredii* na kontaminované prostředí je závislé spíše na nadprodukci GSH než na fytochelatinech. GSH je syntetizován z aminokyselin ve dvou krocích, ATP-dependentní katalýzou prostřednictvím γ-glutamylcysteinylsynthetasy (γ-ECS) a poté glutathionsynthetasy (GS). Konstitutivní nadprodukce γ-ECS pocházející z bakterie *E. coli* a kódované genem *gsbI* v plastidech rostliny *B. juncea* zvýšila 3× úroveň GSH v hydroponicky pěstovaných transformantech. Množství PC2 ve výhoncích a PC2, PC3, PC4 v kořenech této rostliny při stresu způsobeném 200 μM Cd²⁺ bylo zvýšené o 30 % oproti kontrole, a vedlo k vyšší toleranci a akumulaci Cd²⁺ v nadzemních částech. Pěstování rostlin v hydroponických systémech je významným nástrojem výzkumu v oblasti fytořremediačních technik toxických kovů. Transport esenciálních kovů přes plazmatickou a organelovou membránu způsobem primárního a sekundárního aktivního transportu má hlavní význam v homeostazi kovů v rostlinách. Poměrně široká akumulace těžkých kovů při fytořremediaci. Nadprodukci přenašeče NtCBP4 v rostlině *Nicotiana tabacum*, který se v této rostlině přirozeně vyskytuje, vede ke zvýšení absorpce a přenosu Pb²⁺ do nadzemních částí, což se odrazilo ve vyšší citlivosti oproti kontrole. Zvýšená tolerance, akumulace (ve vakuolách) a translokace Cd²⁺ a Pb²⁺ do výhonků

bylo dosaženo v rostlině *A. thaliana* expresí kvasinkového vakuolárního přenašeče YCF1. Na regulaci membránových potenciálů se ale podílí např. i fytohormony brassinosteroidy, které zvyšují příjem draslíku a současně snižují příjem Cd, Zn, Pb, Cu, Cs a Sr ze spadů. Velké množství rostlinných druhů bylo použito pro přípravu transgenních rostlin schopných tolerovat či akumulovat těžké kovy. Často se jedná o modelové rostliny, ale některé jsou i druhy z exotických krajín. V naší laboratoři pracujeme s rostlinami lnu setého (*Linum usitatissimum*). Jedná se o rostlinu přirozeně pěstovanou v našich klimatických podmínkách, jak pro potravinářské, tak průmyslové účely. Právě využití technických odrůd pro zakoncentrování těžkých kovů z velkých ploch může být výhodné i s ohledem na oddělení od potravinářského průmyslu. Je tak zamezeno kontaminaci potravinářských surovin geneticky modifikovanými organismy. Při přípravě transgenních rostlin pracujeme s genem *HisCUP*, který kóduje kvasničný metalothionein a navíc obsahuje i histidinovou kotvu se šesti histidinovými zbytky v řadě. Tento motiv je další vazebnou doménou pro kovy. Jako promotor je použit promotor proteinu RUBISCO. Nejedná se o konstitutivní promotor, ale je regulovaný světlem a udává se, že je až 8× silnější než běžně používaný CaMV-35S promotor. Při selekci transgenních rostlin se dnes ustupuje od používání antibiotik. V naší laboratoři byl jako selekční marker zvolen gen pro fosfomannosaisomerasu, která umožňuje přeměnu mannosu-6-fosfátu, který je pro rostliny toxický, na fruktosu-6-fosfát. Rostlinný konstrukt s genem *HisCUP* pod promotorem proteinu RUBISCO byl vnesen do *Agrobacterium tumefaciens*, která bude použita pro transformaci lnu setého.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantovými projekty Centrum 1M06030, MSM 6046137305 účelové podpory MŠMT č. 21/2010.

Fišer J., Macková M., Nováková M., Macek T.: Genetical modifications of plants to increase accumulation of heavy metals

Phytoremediation is method which uses plants for absorption, accumulation and degradation of pollutants in the environment. Heavy metals present in soil or water are not degraded in comparison to organic contaminants. This is the reason, why the high efficiency of absorption and accumulation of heavy metals is required in shoots of these plants. There are plants naturally accumulating metals in high concentration on heavy metals contaminated soil in the nature called hyperaccumulators. Mostly these plants are small, create small amount of biomass and therefore they are not exploitable for phytoremediation. However the recognition of their mechanisms of heavy metal detoxification allows the preparation of transgenic plants, which growth quickly, accumulate heavy metals in shoots and simultaneously create enough of biomass. The sulphur-rich compounds participate in detoxification of heavy metals in plants. Overexpression of these compounds leads to the fact that heavy metals in plants are binded and transported to vacuole. The uptake of heavy metals can be enhanced by expression of membrane transporters. Many plants with the ability to accumulate heavy metals were prepared by these approaches. These plants could be the alternative to usual physico-chemical methods, which are very expensive.

Key words: transgenic plants, heavy metals, metallothioneins, phytochemicals, glutathione.

Kontaktní adresa – Contact address:

prof. Dr. Ing. Martina Macková, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika, e-mail: martina.mackova@vscht.cz