

Stanovení metalothioneinu a thiolových sloučenin v transgenním tabáku vystaveném působení CdCl_2

METALLOTHIONEIN AND LOW-MOLECULAR THIOL COMPOUNDS DETERMINATION IN TRANSGENIC TOBACCO EXPOSED TO CdCl_2

Violetta Shestivska¹, Soňa Křížková¹, Ondřej Zítka¹, Martina Macková², Tomáš Macek^{2,3}, René Kizek¹

¹Mendelova univerzita v Brně; ²Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; ³Ústav organické chemie a biochemie AVČR

Těžké kovy (TK) mají cytotoxické, mutagení a karcinogenní účinky. Rozsáhlé půdní oblasti a vodní plochy jsou dnes zasaženy těžkými kovy, jedná se především o mangan, zinek, kobalt, olovo a kadmium. Jednou z metod odstraňování TK z půdy nebo vody je bioremediace, kdy jsou k přesunu TK využívány organismy se schopností jejich akumulace. Nezávisle na různých pracovištích byly transformovány rostliny tabáku, do nichž byl vnesen živočišný nebo mikrobiální gen pro syntézu proteinu metalothioneinu (MT), jehož hlavní role v organismu je regulace koncentrace a transport kovů, byla také prokázána schopnost tohoto MT vázat TK a detoxikovat volné radikály. Cílem této práce bylo stanovit metalothionein v rostlinách transgenního tabáku (*Nicotiana tabacum*) exponovaných působení CdCl_2 .

Materiál a metody

V rostlinném experimentu byly použity klony His CUP-X odvozené od *Nicotiana tabacum* L., var. Wisconsin 38. Klony nesly polyhistidinový gen ve fúzi s kvasinkovým metalothioneinem (gen CUP-X). Čtyři týdny staré rostliny tabáku TX-His CUP pěstované v agarovém Knopově živném médiu byly vystaveny $250 \mu\text{M CdCl}_2$ po dobu 24 hod. Po ukončení experimentu byly rostliny omyty v destilované vodě, osušeny a rozděleny na listovou, stonkovou a kořenovou část. Vzorky (průměrně 0,2 g svěží hmotnosti) byly dezintegrovány v třecí misce pomocí tekutého dusíku a poté homogenizovány v 1 ml 0,2M fosfátového pufru o pH 7,2, poté byly vzorky inkubovány 30 min při 99 °C a následně centrifugovány ($3\ 000\times g$) 30 min při 4 °C pomocí Universal 32 R centrifugy (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo).

Výsledky a diskuze

Během experimentu nebyly u experimentálních rostlin pozorovány příznaky toxicity Cd. V případě stanovení hmotnosti nadzemních a kořenových částí rostlin nebyl pozorován významný rozdíl mezi kontrolními rostlinami a rostlinami vystavenými $250 \mu\text{M Cd}_2^+$. V případě stanovení nízkomolekulárních thiolových sloučenin byl v kořenové části pozorován nárůst obsahu fytochelatinů PC5, PC4, PC3 a PC2. Obsah GSH byl o 10 % snížený ve srovnání s kontrolními rostlinami. Obsah cysteinu zůstal nezměněn. V případě stonkové části byl rovněž pozorován nárůst obsahu sledovaných fytochelatinů, s výjimkou PC 3, jehož obsah byl v porovnání s kontrolou o 30 % snížený. Obsah GSH byl ve stonkové části o 50 % nižší. V případě listů byl obsah fytochelatinů mírně zvýšený (7–15 %), kromě PC2, jehož obsah zůstal nezměněn, stejně jako obsah ostatních thiolů. Ve všech částech rostliny byla pozorována výrazná indukce MT. Změny byly nejvýraznější ve stonkové části. Indukce MT byla potvrzena

rovněž pomocí vazebné tečkovací imunoanalýzy. Změny v obsahu stanovených látek u rostlin tabáku je možno vysvětlit působením rostlinných detoxikačních mechanismů. Nejvýraznější změna v obsahu nízkomolekulárních thiolových sloučenin byla pozorována v kořenové části, v porovnání s mírnou indukcí MT. Zároveň byl stanoven zvýšený obsah GSSG, jakožto indikátoru oxidačního stresu způsobeného těžkými kovy. Naopak ve stonkové části byla indukce MT nejvýraznější oproti nižší indukcii nízkomolekulárních thiolových sloučenin. Nejmenší změny v indukcii thiolových sloučenin byly pozorovány v listech. To naznačuje, že většina přijatého kadmia byla detoxikována v dolních částech rostliny. Ve všech částech rostlin změny obsahu nízkomolekulárních thiolových sloučenin korespondují se změnami obsahu MT. MT je nejvíce indukován ve stonkové části, z čehož lze usoudit, že kadmium je transportováno z kořenové části, a že k největší akumulaci těžkého kovu dochází v nadzemní části rostliny. Z našeho experimentu vyplývá, že rostliny tabáku exprimují metalothionein, který se zapojuje do rostlinného systému pro detoxikaci těžkých kovů.

Poděkování: Tato práce byla financována ze zdrojů IGA TP 1/2010, GA ČR 522/09/0239 a MSMT 6215712402.

Shestivska V., Křížková S., Kryštofová O., Zítka O., Macková M., Macek T., Kizek R.: Metallothionein and low-molecular thiol compound determination in transgenic tobacco exposed to CdCl_2

Environmental pollution by heavy metals is an actual problem. Their cytotoxic, mutagenic and carcinogenic effects have been discovered recently. Phyto or bioremediation are environmental-friendly methods for metals removal from water and soils. Plant phytoremediation potential is limited by their tolerance to heavy metals, other benefits are metal accumulation in shoots and production of high amount of biomass. To increase the binding capacity of heavy metals transgenic plants expressing a fusion protein combining *CUP1* gene encoding yeast metallothionein and gene for polyhistidine tag from commercial plasmid *pTrc-HisA* (HisCUP), which was transformed via *A. tumefaciens* into tobacco plants. The aim of this article was to determine metallothionein content in transgenic tobacco plants exposed to $250 \mu\text{M CdCl}_2$. A marked MT induction was found in the whole plant, especially in stem. Change in MT content corresponded to change of low-molecular thiol compounds. The obtained results indicate that MT is in experimental plants induced by heavy metal and it is involved in plant detoxication mechanisms.

Key words: cadmium, tobacco, phytoremediation, transgenic, metallothionein.

Kontaktní adresa – Contact address:

doc. Ing. René Kizek, Ph.D., Mendelova univerzita, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika; e-mail: kizek@sci.muni.cz