

USING OF ELECTROCHEMICAL TECHNIQUES FOR STUDY OF INTERACTIONS OF PLANT THIOLS WITH HEAVY METALS

ELEKTROCHEMICKÉ TECHNIKY JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM INTERAKCÍ ROSTLINNÝCH THIOLŮ S TĚŽKÝMI KOVY

Baloun J.^{1,2)}, Húska D.¹⁾, Stejskal K.^{1,3)}, Šupálková V.^{1,2)}, Adam V.¹⁾, Havel L.²⁾, Horna A.⁴⁾, Trnková L.⁵⁾, Kizek R.¹⁾

¹Ústav chemie a biochemie, a ²Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ³Katedra biochemie, a ⁵Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ⁴Radanal s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice

E-mail: xbaloun0@node.mendelu.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

An investigation of interaction of biologically important thiols such as glutathione with heavy metals and heavy metals based cytostatics can be one of the possible ways of studying of reasons how these substances can influence crucial biochemical pathways. The aims of this work were to study and identify the interactions of thiols (e.g. glutathione and phytochelatin2) with cadmium ions and Murashige and Skoog cultivation medium. Thus, we aimed primarily on investigation of basic electrochemical behaviour of the thiols. In the following experiments we studied the interaction between phytochelatin2 and cadmium ions. We found out that reductive signal of phytochelatin2 decreased and signal corresponding to phytochelatin - cadmium complex increased with increasing concentration of the heavy metal. After that, the interaction between reduced glutathione and the medium components has been investigated.

Key words: plant thiols, heavy metals, interaction, electrochemistry.

ABSTRAKT

Sledování interakcí biologicky důležitých thiolů (např. glutathionu) s těžkými kovy a cytostatiky založenými na těžkých kovech může být jednou z možných cest studia jak mohou thiolové látky ovlivnit životně důležité biochemické pochody. Cílem této práce bylo studovat a identifikovat interakce vybraných thiolů (např. glutathion a fytochelatin2) s ionty kadmia a kultivačním médiem Murashige a Skoog. Pro tyto účely jsme se nejprve zaměřili na studium základního elektrochemického chování studovaných thiolů. Následně jsme studovali interakce fytochelatinu2 a kadmiových iontů. Objevili jsme, že redukční signál thiolu klesal a signál odpovídající fytochelatin-kadmium(II) komplexu vzrůstal se vzrůstající koncentrací těžkého kovu. Dále jsme studovali interakce mezi redukovaným glutathionem a kultivačním médiem.

Klíčová slova: rostlinné thioly, těžké kovy, interakce, elektrochemie.

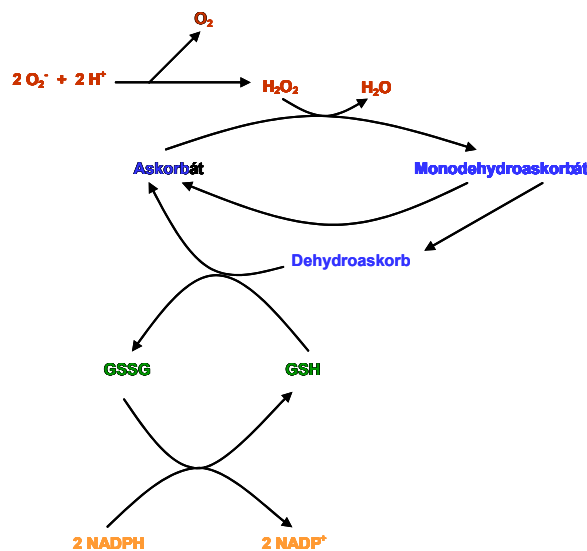
ÚVOD

Těžké kovy

Těžké kovy jsou v současné době neviditelnou hrozbou nejenom pro lidi, ale také i pro rostliny a mikroorganismy. Zdrojem těchto nebezpečných polutantů bývá nejčastěji těžký průmysl, ale mezi neopomenutelné zdroje může také zařadit autodopravu a různá hnojiva (<http://www.celostnimediceina.cz/tezke-kovy.htm>). Podle vlivu na živé organismy je můžeme rozdělit na skupinu i) esenciálních, mezi něž patří Zn, Cu, Cr a další, a ii) neesenciální (toxické), mezi něž patří Cd, Hg, Pb a další. Mezi nejvýznamnější toxické kovy patří Cd, které se hojně využívá při výrobě Ni-Cd akumulátorů a ještě dodnes je používán v elektronice. Jelikož je po strukturní stránce podobný Zn, může ho například nahrazovat při enzymatických reakcích. Organismy se proti působení vysoké hladiny iontů kovů velmi intenzivně brání tvorbou řady organických sloučenin (jako např. glutathion).

Glutathion

Glutathion (GSH) byl popsán v roce 1921 [1] a jeho přítomnost byla dokázána nejen u rostlin či živočichů, ale dokonce i u bakterií a kvasinek. Byla prokázána jeho významná role při udržování homeostázy těžkých kovů v organismu, jeho antioxidační a detoxikační účinky [2]. GSH vděčí za své redoxní vlastnosti aminokyselině cysteinu, který obsahuje thiolovou skupinu (-SH).



Cyklus kyseliny askorbové (Halliwell-Aschadova reakce). Převzato a upraveno dle [3].

Jestliže se v organismu vyskytnou volné kyslíkové radikály, které jsou produkovány buňkou samotnou anebo různými chemickými reakcemi katalyzovanými např. ionty těžkých kovů mohou být detoxikovány právě GSH [4]. Oxidací GSH vzniká dimer označený jako oxidovaný glutathion (GSSG) [5-9]. GSSG je pak v glutathionovém cyklu znovu redukován na GSH. Těžké kovy interagují kromě s GSH se specializovanými peptidy (fytochelatiny)

[10-12]. Cílem této práce bylo studovat a identifikovat interakce vybraných thiolů (např. glutathion a fytochelatin2) s ionty kadmia a složkami kultivačního média Murashige a Skoog.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Na kultivační media byly použity chemikálie dodané firmou Duchefa Biochemie BV (Nizozemí). Zkoumané thiolové sloučeniny se přidávali do dvou typů médií, jejichž složení bylo upraveno pro stanovení vlivu na setrvání thiolů v médiu. Základním a také kontrolním bylo standardní tekuté médium připravené podle Murashige a Skoog a modifikované dle Nagasawy [13,14]. Pozorovali jsme interakce média, thiolu a iontů těžkých kovů. Při přípravě média jsme přidali do plného (kompletního) média stanovovaný thiol a takto připravená směs obsahující $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ thiolu se ovlivnila přidávkou iontu těžkého kovu.

Brdičkova reakce

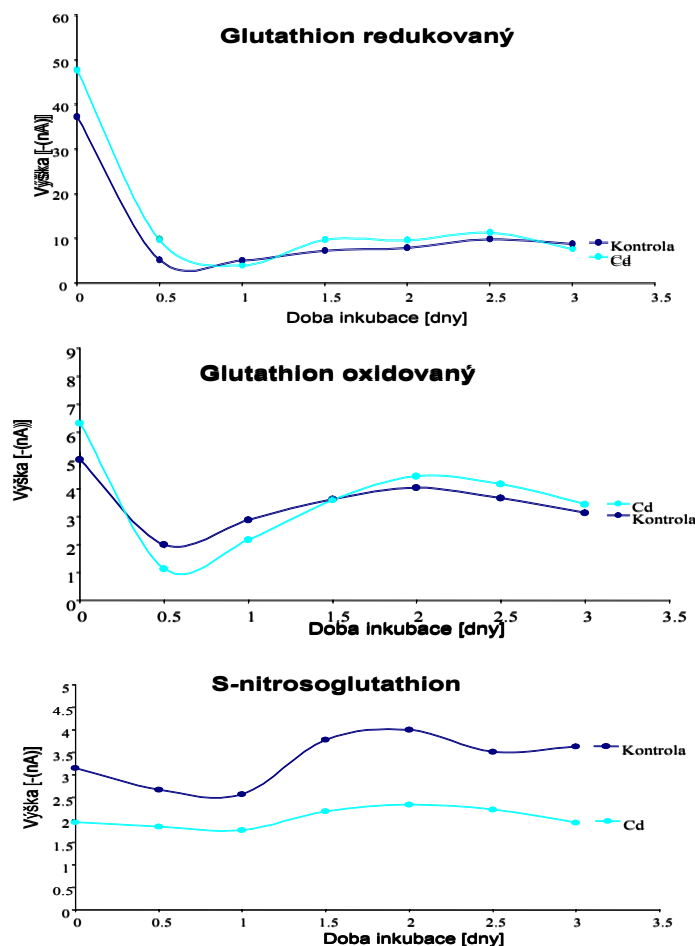
Analýza studovaných thiolů (redukovaného a oxidovaného glutathionu) byla provedena pomocí univerzálního elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (Eco Chemie, Nizozemí) v tříelektrodeovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), jejíž plocha byla $0,4 \text{ mm}^2$. Pomocná elektroda byla ze skelného uhlíku a referenční elektroda Ag/AgCl/ 3 M KCl. Elektrolyt, určený pro Brdičkovu reakci, se skládá ze dvou hlavních složek. První je amonný pufr. Ten se vytvoří smícháním 1 M roztoku chloridu amonného (NH_4Cl) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 1 M vodného roztoku čpavku (NH_3) (Fluka, Milano, Itálie) ve stejném poměru. Druhou složkou je hexaaminochlorid kobaltitý (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), jehož koncentrace v elektrolytu byla v rámci práce optimalizována. Výsledné pH elektrolytu bylo 9,6. Tato směs se uchovávala při 4°C . Jako způsob měření byl zvolen nepřenosový. Na rozdíl od přenosového u něho se vzorek mísí přímo s elektrolytem a je v něm také měřen. Při volení správné koncentrace vzorku je potřeba také počítat se zředěním analytu elektrolytem.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Elektrochemická analýza za využití Brdičkovy reakce

Elektrochemickými metodami lze rychle a citlivě stanovit anorganické a organické látky ve složité biologické matrici. Jejich podstatou je studium závislosti elektrochemického chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Brdičkova reakce je elektrochemická metoda využitelná ke stanovení převážně proteinů obsahující sulfhydrylovou skupinu či disulfidickou vazbu. Tato metoda má, na rozdíl od jiných DVP metod, přednost ve snížení přepětí vodíku a vytvoření velmi charakteristických limitních proudů. Ty lze pozorovat v roztocích solí kobaltu pufovaných chloridem a amoniakem po přidání nepatrného množství dané látky, obsahující SH skupiny. Tento druh katalýzy se projevuje na voltametrické křivce specifickou dvojnou, která vzniká za vlnou redukce dvojmocného kobaltu a přísluší vylučování vodíku,

jež je katalyzováno přítomností již zmíněných skupin v molekule bílkoviny. Výšky pozorovaných signálů jsou navíc závislé na koncentraci thiolové sloučeniny. Voltamogramy se zaznamenávají metodou DPV v redukčním směru posunu potenciálu (od kladných potenciálů směrem k záporným) [15].



Změny signálu thiolových sloučenin v přítomnosti kultivačního média.

Studium interakce v kultivačním médiu

Po přidání redukovaného a oxidovaného glutathionu do kontrolního média a média obsahující Cd^{2+} jsme pozorovali rychlý pokles odezvy. To si vysvětlujeme tím, že obě látky nejdříve reagují s nespécifickými komponenty média a vytváření dohromady komplex, čímž se snižuje i odezva SH skupin. Po dvanácti hodinách se odezva GSH ustaluje a jeho odezva se nadále více méně nemění jak u kontrolního tak i u média obsahující Cd^{2+} . Z toho usuzujeme, že GSH nemá velkou afinitu k těžkým kovům, určitě k Cd^{2+} . Tudíž můžeme říci, že hlavní funkcí GSH je spíše eliminace volných kyslíkových radikálů a v případě potřeby se z něj syntetizují fytochelatiny.

GSSG má v prvních dvanácti hodinách podobnou proudovou odezvu jako GSH. Nejspíše se u něj také tvoří také nespécifické komplexy s některými složkami média. Tyto komplexy, jak je patrné z grafu, jsou ale velmi nestabilní a rychle se rozpadají, což jde vidět

jako nárůst proudové odezvy téměř na původní hodnotu. Z grafu je také patrné, při porovnání kontrolního média a s Cd^{2+} , že GSSG má také nízkou afinitu k těžkým kovům. Náchylnost k tvorbě nespecifických komplexů s některými složkami média nevykazovalo GSNO, ale při porovnání média kontrolního a kontaminovaného Cd^{2+} , je vidět značný rozdíl při proudové odezvě. Z čehož vyplývá, že GSNO dokáže do své struktury navázat těžký kov již během prvních dvanácti hodin a v následných 60 hodinách ho ještě stále udržet ve své struktuře.

ZÁVĚR

Pomocí elektrochemických metod, mezi něž patří i Brdičkova reakce, lze stanovovat nejenom thiolové ochranné sloučeniny, ale také i jiné peptidy a bílkoviny obsahující sulfhydrylové a disulfidické skupiny. Kromě stanovení přítomnosti těchto látek lze také studovat jejich afinitu a interakce s jinými sloučeninami.

LITERATURA

- [1] F.G. Hopkins On an autoxidisable constituent of the cell, *Biochemical journal* 15 (1921) 286.
- [2] J. Vacek and L. Havel Glutathion: nezastupitelná molekula chránící rostliny před stresem, *Biologické listy* 70 (2005) 169-186.
- [3] R. Vykonalova Metody stanovení oxidativního stresu - lipidní peroxidace v rostlinách a rasách, Masarykova Univerzita, Brno, 2002.
- [4] R. Mittler Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science* 7 (2002) 405-410.
- [5] O. Blokhina, E. Virolainen and K.V. Fagerstedt Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Annals of Botany* 91 (2003) 179-194.
- [6] M.J. May, T. Vernoux, C. Leaver, M. Van Montagu and D. Inze Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development, *Journal of Experimental Botany* 49 (1998) 649-667.
- [7] A. Meister and M.E. Anderson Glutathione, *Annual Review of Biochemistry* 52 (1983) 711-760.
- [8] G. Noctor, A.C.M. Arisi, L. Jouanin, K.J. Kunert, H. Rennenberg and C.H. Foyer Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants, *Journal of Experimental Botany* 49 (1998) 623-647.
- [9] G. Noctor, L. Gomez, H. Vanacker and C.H. Foyer Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *J. Exp. Botany* 53 (2002) 1283-1304.
- [10] E. Grill, S. Löffler, E.L. Winnacker and M.H. Zenk Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, Are Synthesized from Glutathione by a Specific Gamma-

Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatase), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86 (1989) 6838-6842.

[11] E. Grill, E.L. Winnacker and M.H. Zenk Phytochelatins - the Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher-Plants, Science 230 (1985) 674-676.

[12] E. Grill, E.L. Winnacker and M.H. Zenk Phytochelatins, a Class of Heavy-Metal-Binding Peptides from Plants, Are Functionally Analogous to Metallothioneins, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (1987) 439-443.

[13] T. Murashige and F. Skoog A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum 15 (1962) 473.

[14] T. Nagata, Y. Nemoto and S. Hasezawa 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 (1992) 1-30.

[15] R. Kizek Uvod do teorie elektrochemickej detekcie, in: MZLU (Ed.), 1. letni skola elektrochemickej a coulochemickej detekcie ve spojeni s kapalinovou chromatografi, Brno, 2005.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, Radanal 1/2006, 1M06030 a INCHEMBIOL MSMT 0021622412.