

MECHANISMUS PŘÍJMU TĚŽKÝCH KOVŮ A ORGANICKÝCH LÁTEK ROSTLINAMI

1 Obecný mechanismus příjmu a distribuce látek rostlinami

Příjem minerálních živin z půdního roztoku rostlinami probíhá proti koncentračnímu gradientu. V kořeni živiny přechází přes plazmalemu pomocí transportních proteinů. Následně jsou transportovány xylémem do nadzemních částí rostlin. V listech znovu bílkovinovými přenašeči přeneseny do symplastu mezofylových buněk. Rostliny přijímají živiny ve formě iontů a většinou přijímají všechny živiny nacházející se v půdním substrátu. Příjem je omezen buněčnými membránami, které umožňují selektivní příjem živin, a tak způsobují, že koncentrace iontů je uvnitř rostlinné buňky větší nebo nižší než v okolním prostředí. Selektivní transport živin existuje také uvnitř buněk, kde bariéru pro vstup do jednotlivých kompartmentů představují jednotlivé membrány.

Uvnitř buňky v jednotlivých kompartmentech nebo v buněčné stěně jsou ionty transportovány difúzí. Tento přenos je dostačující pro přenos živin na krátké vzdálenosti, avšak pro selektivní přenos iontů na delší vzdálenosti mezi jednotlivé buňky a pro přenos i proti koncentračnímu gradientu je třeba přenos přes membrány. Obecně existuje několik mechanismů selektivního přenosu látek přes membránu.

Nespecifický transport zahrnuje prostou difúzi látek přes membránu nebo i buněčnou stěnu, která následuje po přenosu látek přes plasmalemu. Propustnost buněčné stěny je výrazně větší než propustnost plasmalemy. Druhou možností nespecifického transportu je usnadněná difuze. Tento transport probíhá za účasti transportních molekul, které usnadňují přenos látek přes membrány tím, že selektivně poutají ion. Vzniklý komplex projde membránou a na druhé straně se komplex opět rozpadne na ion a přenašeč. Usnadněná difuze může také probíhat pomocí kanálů v membráně, přes které mohou některé ionty difundovat. Velmi důležitý je transport látek tonoplastem, který probíhá jak prostou tak usnadněnou difúzí, protože vakuoly vyšších rostlin jsou důležitými zásobníky jak iontů přijatých z vnějšího prostředí, tak pro produkty metabolismu.

Dalším druhem transportu látek přes membránu je aktivní transport. Při primárním transportu jsou transportní procesy spojeny s hydrolýzou ATP nebo jinými procesy, při kterých se uvolňuje energie. Sekundární aktivní transport probíhá díky gradientu elektrochemického potenciálu, jímž se zajišťuje syntéza ATP.

Minerální živiny se v buňce nacházejí na dvou místech. V cytoplazmě nebo ve vakuole. Vakuola slouží jako zásobník pro běžné ionty, ale také pro ostatní látky, které by mohly mít nepříznivé účinky na rostlinnou buňku.

Samotné mechanismy transportu živin mezi jednotlivými orgány rostlin dosud nebyly plně popsány.¹

2 Příjem těžkých kovů rostlinami

Těžké kovy jsou přirozenou součástí půd, avšak díky lidským aktivitám se do půdy dostává mnohem větší množství těžkých kovů, než je přirozené. Do prostředí se dostávají například při těžbě a tavení železných rud, při výrobě a likvidaci kovových materiálů, z paliv, z odpadů různých průmyslových výroby a dalších lidských činnostech. Patří tak mezi jedny z hlavních kontaminantů v životním prostředí a díky své vysoké perzistenci přetrvávají v prostředí velmi dlouho.²

Ve vyšším množství nebo při dlouhodobém působení pak mohou mít tyto látky toxické účinky na živé organismy. Například rtuťnaté ionty se vyznačují vysokou afinitou k sulfhydrylové skupině a v důsledku toho mohou narušit téměř jakoukoliv funkci, ve které jsou zapojeny nechráněné proteiny se sulfhydrylovou skupinou.³ Olovo může mít nepříznivé účinky na klíčení semen, růst rostlin, na proces fotosyntézy nebo na aktivitu enzymů.

Některé těžké kovy, jinak označované také jako stopové prvky (Fe, Zn, Mn, Ni, Cu, a Mo) jsou nezbytné pro správný růst a vývoj rostlin, jelikož jsou součástí mnoha enzymů a jiných proteinů a rostliny vyvinuly vysoce specifické mechanismy pro příjem, translokaci a ukládání těchto prvků.

Aby rostliny mohly přijímat těžké kovy, musí být kovy biologicky dostupné. V půdě kovy existují jako škála chemických forem v dynamické rovnováze řízené fyzikálními, chemickými a biologickými procesy v půdě. Biologická dostupnost kovů závisí na jejich

rozpuštěnosti v půdním roztoku. Jen kovy, které jsou přítomny v půdním roztoku jako volné ionty a rozpustné kovové komplexy nebo kovy, které jsou adsorbovány na anorganických půdních částicích na místech iontové výměny jsou biologicky dostupné.⁴

2.1 Mechanismus příjmu těžkých kovů

Příjem těžkých kovů rostlinami zahrnuje záchyt iontů kovů kořeny, vstup iontů kovů do kořenů a jejich translokaci do nadzemních částí rostlin přes difúzi. Příjem iontů kovů je dosažen mobilizací kovů vázaných na půdní částice pomocí organických sloučenin, které chelatují kovy a jsou sekretovány rostlinami do rhizosféry. Kovy, které jsou vázány v komplexu kov-chelát, jsou přeneseny přes plasmatickou membránu pomocí řady specifických transportních mechanismů umístěných v plasmatické membráně. Elektrický náboj brání iontům kovů volně difundovat přes lipofilní buněčné membrány do cytosolu, a proto musí být transport iontů do buněk řízen membránovými proteiny s transportními funkcemi.⁵ Mechanismus vstupu iontů kovů do kořenů je specifický a závisí na jednotlivých typech kovů a druzích rostlin. Kovy vstupují do kořenů buď přes apoplast nebo symplast.

Apoplast kořenového epidermu a kortexu je snadno propustný pro roztoky. Cesta přes apoplast je poměrně neregulovaná, protože voda a rozpuštěné látky mohou plout a šířit se difúzí bez překročení membrány. Apoplastický transport je omezen vysokou kationtovou výměnnou kapacitou buněčné stěny. Jako bariéra proti vstupu iontů kovů do xylému apoplastickou cestou slouží endodermis, nebo spíše Caspariho proužky, které se nacházejí v buněčných stěnách endodermálních buněk.

Většinou tedy musí látky vstoupit do kořenů přes symplast předtím, než vstoupí do xylému. Při transportu symplastem se ionty pohybují přes plasmatickou membránu, která má obvykle velký záporný potenciál, a to přibližně 170 mV. Tento membránový potenciál poskytuje silný elektrochemický gradient pro vnitřní pohyb iontů kovů. Většina iontů kovů vstoupí do kořenových buněk rostlin pomocí specifických iontových přenašečů nebo kanálů.²

Část iontů navázaných na kořeny rostlin neprojde do buněk rostlin, ale je poutána na záporné náboje (COO^-) buněčných stěn.⁴

Poté, co kov vstoupí do kořenů, může být buď uložen v kořenových buňkách ve vakuolách, nebo je xylémem transportován do nadzemních částí rostlin. Primární transport v xylému, retranslokace ve floému a přenos z xylému do floému jsou důležité procesy pro redistribuci prvku uvnitř rostliny. Transport v xylému směřuje z kořenů do nadzemních částí rostlin v transpiračním proudu, zatímco transport floémem probíhá z horních částí směrem dolů a je více selektivní. Rozpuštěné látky mohou být selektivně převedeny z xylému do floému a odvedeny směrem dolů.⁶

Přenos iontů kovů do xylému je obvykle zprostředkován pomocí membránových transportních systémů. Byl popsán i mechanismus přenosu kovů do xylému řízený fytochelatiny. Do přenosu kovů může být zapojena také celá řada chelátorů.

Poté, co kovy transportované xylémem dosáhnou apoplastu listů, jsou polapeny různými typy rostlinných buněk a pohybují se z buňky do buňky přes plasmodesmu. K ukládání kovů dochází pravděpodobně přednostně v trichomech. Rozvod kovů probíhá uvnitř každé rostlinné buňky. Koncentrace kovů se tu udržuje v rámci specifického fyziologického rozmezí, a je řízena specifickými metalochaperony a transportéry lokalizovanými v endomembránách. Nadbytek kovů je sekvestrován ve vakuolách uvnitř buněk listů.⁷

2.2 Přenašeče kovů

V půdním roztoku se koncentrace volných iontů kovů pohybují od mikromolárního po nanomolární rozmezí. Vysoká afinita systémů pro příjem kovů v plasmatické membráně umožňuje vstup kovů do buněk především ze zásoby volných kationtů přechodných kovů v půdním roztoku.⁸

Kvůli svému náboji se ionty těžkých kovů nemohou volně pohybovat přes membrány, což jsou lipofilní struktury. Proto musí být transport iontů kovů řízen membránovými proteiny s transportními funkcemi, obecně označovanými jako přenašeče nebo transportéry. Transmembránové přenašeče vlastní extracelulární vazebnou doménu, ke které se ionty připojí těsně před transportem, a transmembránovou strukturu, která spojuje intracelulární a extracelulární prostředí. Vazebná doména je receptivní jen k určitým iontům, a tak je zodpovědná za specifitu přenašečů. Transmembránová

struktura usnadňuje převod navázaných iontů z extracelulárního prostoru přes hydrofobní prostředí membrány do buňky.⁴

Na základě dosud získaných údajů se uvádí několik proteinových transportních rodin, které se podílejí na transportu kovů uvnitř rostlin. Do největších rodin patří NRAMP (natural resistance associated macrophage protein), ZIP (zinc-regulated transporter, iron regulated-transporter protein), YSL (yellow-stripe 1-like subfamily of the OPT superfamily) proteiny, které patří do transportních rodin působících při influxu kovů do buněk rostlin a P_{1B}ATPázy, CDF (cation diffusion facilitater), CAX (cation exchanger) a ABC (ATP-binding cassette transporters) proteiny, patřící do proteinových rodin působících při efluxu iontů z rostlin. Každý transportní protein obvykle katalyzuje transport několika iontů, ovšem s rozdílnou afinitou ke každému iontu. Mezi transportními proteiny pro influx a eflux existuje rozdíl. Bylo zjištěno, že proteiny, které exportují kovy z cytoplazmy, mají vysokou specifitu, zatímco ty, které řídí influx, jako například ZIP a NRAMP, se zdají být méně specifické. To znamená, že import iontů je kontrolován méně, což pravděpodobně zajišťuje dodávku všech iontů nezbytných pro zajištění řady funkcí v různých buňkách a tkáních. Nicméně v důsledku toho jsou také snadněji absorbovány neesenciální prvky.⁹

2.2.1 Rodina ZIP transportních proteinů

ZIP transportéry jsou zapojeny v přenosu železa, zinku, manganu a mědi. Jednotliví členové této skupiny se liší v substrátovém rozpětí a specifitě. ZIP transportéry mohou být rozděleny do čtyř podskupin podle předpokládané sekvence aminokyselin, ale zdá se, že všechny geny vyšších rostlin spadají do jedné skupiny.¹⁰

Obecně je ZIP rodina proteinů jedna z nejdůležitějších skupin proteinů řídících příjem kationtů, převážně zinku a železa. Nicméně v případě několika proteinů z různých rostlinných druhů bylo prokázáno, že jsou schopny přijmout i kadmium. Například u rýže je identifikováno 17 ZIP-kódujících genů. Z nich ZIP1, ZIP3 a ZIP4 jsou spojeny převážně s transportem zinku.

Moreau a kol. ve své studii uvádí možnost zapojení ZIP proteinu z rostlinného druhu *Glycine max* převážně v transportu zinku a dále také kadmia. Ukázalo se, že GmZIP1 je

vysoce selektivní pro zinek a že kadmium je jediný kov schopný inhibovat příjem zinku u kvasinek.^{9, 11}

ZNT1 by mohl hrát důležitou roli v kořenových a listových transportních procesech. Bylo objeveno, že exprese ZNT1 je lokalizována v kořenovém kortexu, což dále podporuje teorii, že tento transportér hraje roli v absorpci kovů rostlinami z půdy. ZNT1, zřejmě hraje také významnou roli také v hyperakumulaci těžkých kovů v *T. caerulescens* a existence dalších příbuzných genů navíc zvyšuje pravděpodobnost, že další členové této rodiny jsou v hyperakumulaci kovů také zapojeni.

Přenašeče kovů, které jsou regulovány železem (IRT), mohou řídit přenos různých dvojmocných kovů včetně kadmia. Bylo zaznamenáno, že rostliny rostoucí v podmínkách s limitovaným obsahem železa přijímají a akumulují více kadmia. Studium rostliny *A. thaliana* odhalilo, že AtIRT1 regulovaný při nedostatku železa a primárně zodpovědný za příjem železa do kořenového epidermis, může také přenášet jiné ionty kovů, jako Mn^{2+} , Zn^{2+} a Cd^{2+} , a je zodpovědný za zvýšenou akumulaci kadmia. Podobně jako AtIRT1, tak i ZIP proteiny z rýže (Fe^{2+} přenašeče OsIRT1 a OsIRT2) jsou také zapojeny v příjmu a translokaci kadmia, zvláště při nedostatku železa. Studie distribuce a lokalizace v tkáních naznačuje, že OsIRT1 a OsIRT2 jsou zodpovědné za obojí, jak příjem tak distribuci kadmia v těle rostlin.¹⁰

Při studiu Zn/Cd příjmu přes plasmatickou membránu kořenových buněk se zjistilo, že Zn absorpce je řízena saturovatelným transportérem s vysokou afinitou k Zn^{2+} , zatímco pro Cd byly transportéry nesaturující.¹²

ZIP transportéry jsou považovány za jedny z hlavních proteinů zapojených v příjmu zinku rostlinami, a do dneška se jen u některých z nich prokázala schopnost přenášet také kadmium a ostatní těžké kovy.

2.2.2 Cu transportéry

COPT1 v *Arabidopsis* je potenciální transportér mědi, protože se podílí na příjmu mědi při jejím nedostatku. Nicméně mRNA není v kořenech detekovatelná, což naznačuje možnost, že při transportu mědi v kořenech působí jiný přenašeč, který zatím nebyl identifikován.¹³

COPT1 má velmi podobnou sekvenci jako CTR2, potenciální transportér mědi s nízkou afinitou, který byl objeven v kvasinkách. Oba jsou členy široké rodiny eukaryotických transportérů mědi – CTR transportérů. Kvasinky také obsahují dva vysoce afinitní transportéry mědi - CTR1 a CTR3. V *Arabidopsis* byla identifikována pětičlenná rodina potencionálních přenašečů mědi COPT1-5, které také obsahují již zmíněný COPT1. COPT1, 2, 3 a 5 byly schopny funkčně doplňovat transport mědi a vykazovaly transportní aktivitu.¹⁰

2.2.3 Rodina NRAMP transportních proteinů

NRAMP je rodina transportních proteinů, které se nacházejí v plasmatické membráně a jsou zapojeny v přenosu iontů přes membránu nejen u rostlin, ale i u zvířat, bakterií a hub.

Rodina NRAMP transportních proteinů, která byla nedávno popsána v rýži a *Arabidopsis* byla na základě porovnání sekvence rozdělena na dvě třídy transportérů. Jedna sestává z NRAMP1 a druhá z NRAMP2-5.^{11,13} V *A. halleri* a *T. caerulea* se NRAMP3 vyskytuje v kořenech, ale také v nadzemních částech rostlin. NRAMP1 a NRAMP5 se v *T. caerulea* vyskytují v nadzemních částech rostliny.⁸

Dosud provedené studie ukazují, že různí členové NRAMP rodiny mají různé fyziologické funkce a že přinejmenším některé jsou zapojeny v příjmu a homeostázi železa a kadmia. Důkazy získané z experimentů provedených u kvasinek a savců však naznačují, že NRAMP transportní proteiny u rostlin by mohly mít širší substrátovou specifitu, než je zatím potvrzeno.

NRAMP3 je zapojen v příjmu Cd^{2+} . U kvasinek byly identifikovány tři NRAMP transportéry, SMF1-3, které řídí příjem Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} a Fe^{2+} .¹⁰

2.2.4 ATPásy: P_{1B}ATPásy

P-typ ATPás tvoří rozmanitou rodinu transportérů, které čerpají řadu kationtů přes buněčné membrány. Patří sem H^+ -ATPásy rostlin a hub, Na^+/K^+ -ATPásy zvířat a Ca^{2+} -ATPásy, které byly nalezeny u mnoha organismů. Sdílejí společný enzymatický mechanismus, který zahrnuje tvorbu fosforylovaného meziproduktu, odtud tedy označení P-typ. ATPásová rodina transportérů P-typu je rozdělena do pěti dalších rodin, z nichž

každá je rozdělená do dvou nebo více podskupin, které jsou seskupené podle jejich transportní specifity.¹⁰

Velmi důležitá je P_{1B}ATPásová rodina transportérů, jinak nazývána CPx-ATPásy, řídící přenos různých přechodných kovů včetně Zn²⁺ a Cd²⁺. O funkci těchto proteinů se zatím příliš neví, ale v rýži byly objeveny tři tyto proteiny: OsHMA5, OsHMA6 a OsHMA9, které jsou regulovány zvýšenou koncentrací kadmia a zinku. Podrobnější výzkum OsHMA9 odhalil, že tento protein je lokalizován v plasmatické membráně a že je zapojen v Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ a pravděpodobně i Cd²⁺ transportu a detoxifikaci.⁹

Analýza provedená v *Arabidopsis* odhalila další HMA proteiny, HMA 5 a 8 přenášející Ag⁺ a Cu⁺, zatímco HMA1 - 4 pravděpodobně přenáší Zn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ a Pb²⁺. AtHMA4 je produkován v mnoha tkáních a nejvíce v kořenech a reguluje se v kořenech vystavených zvýšeným hladinám zinku a manganu. RAN1 (AtHMA7) pravděpodobně přenáší Cu⁺ přes membránu do Golgiho aparátu, aby se vytvořily funkční ethylenové receptory. PAA1 (AtHMA6) nejspíš přenáší měď přes membránu chloroplastů.¹⁰

HMA4 proteiny také mohou v *T. caerulescens* a *A. halleri*. přispívat k toleranci zinku a kadmia řízením cytoplasmatického efluxu kovů v buňkách kořenů a listů.⁸

2.2.5 Rodina CDF transportních proteinů

CDF rodina proteinů je zapojena v přenosu dvojmocných kationtů, hlavně zinku, ale přenáší i Cd²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ a Mn²⁺. V rostlinách byl poprvé CDF transportní gen charakterizován v *Arabidopsis* a byl pojmenován ZAT. ZAT je produkován uvnitř celé rostliny a je indukovan zvýšenými koncentracemi zinku. Předpokládá se, že ZAT je zapojen ve vesikulární/vakuolární sekvestraci zinku a tudíž je zapojen v toleranci a homeostázi zinku.

ZAT gen ZTP1 byl nalezen v hyperakumulátoru *Thlaspi caerulescens*. Vyskytuje se především v listech, ale i v kořenech. Nejvíce se vyskytuje v rostlinách rostoucích na půdách obohacených olohem, zinkem a kadmiiem v porovnání s rostlinami rostoucími na niklem obohacených půdách nebo půdách neobsahujících zvýšené množství těžkých kovů.

V hyperakumulátoru, *Thlaspi goesingense*, byl charakterizován MTP1, u něhož se předpokládá podíl na akumulaci iontů kovů ve vakuolách v nadzemních částech rostlin.

Tento CDF transportér byl objeven také v hyperakumulátoru *Stylosanthes hamata*, který roste v kyselých, na Mn^{2+} bohatých půdách.¹⁰ V *A. thaliana* je MTP1 lokalizován ve vakuolárních membránách buněk kořenů a listů, což naznačuje jeho roli v sekvestraci zinku ve vakuolách.⁹

Do skupiny CDF transportních proteinů patří také CzcD z *Ralstonia eutropha*, který řídí eflux Zn^{2+} iontů, a proteiny COT1 a ZRC1 z *S. cerevisiae*. Ty umožňují rostlinám, pokud jsou produkovány v nadbytečném množství, tolerovat kobalt a zinek/kadmium. Oba tyto proteiny jsou lokalizovány v tonoplastu a nabízí se tak jejich role v sekvestraci kovů.¹³

2.2.6 Kationt/ H^+ antiportéry

Tonoplast rostlin obsahuje vysoký počet kationt/ H^+ antiportérů. V *Arabidopsis* byly nalezeny dva geny pro CAX1 a CAX2. Předchozí studie přinesly myšlenku, že Cd^{2+}/H^+ antiportér by mohl být zapojen v akumulaci kadmia ve vakuolách, a existuje důkaz, že by to mohl být CAX2. Tabákové rostliny, které produkují CAX2 jsou schopné akumulovat zvýšená množství Ca^{2+} , Cd^{2+} a Mn^{2+} a to také vede ke zvýšenému transportu v kořenovém tonoplastu. Byly charakterizovány také další CAX geny a další charakterizace těchto transportérů by mohla odhalit jejich širší roli v homeostázi těžkých kovů. Nicméně dodnes byl potvrzen pouze CAX2 transportér schopný vakuolárního transportu Mn^{2+} .¹⁰

2.2.7 Rodina ABC transportních proteinů

HMT1 protein patřící do rodiny ABC transportérů je pravděpodobně zodpovědný za přenos fytochelatinů (PC) do vakuoly. Příjem PC vakuolárními váčky je, jak se zdá, poháněn energií přímo z hydrolýzy ATP, což se u ABC typu transportérů předpokládá. HMT1 je schopný přenášet jak apo-PC tak PC-Cd komplexy. HMW (vysokomolekulární) PC-Cd- S^{2-} komplex je také přijímán vakuolárními váčky obsahujícími HMT1, i když s menší účinností.

HMT1 nemusí být zapojen jen v mechanismech tolerance rostlin pro těžké kovy (Cd). Může přenášet také PC komplexy vytvořené s esenciálními prvky jako je měď nebo zinek. Pc-Cu a PC-Zn komplexy, které mohou aktivovat některé apo-metaloenzymy stejně účinně jako volné kovy, se ukázaly jako méně toxické kofaktory než volné ionty kovů.¹⁴

Dosud je známo jen velmi málo sekvencí HMT1 v rostlinách a za pravděpodobnější přenašeče PC-Cd komplexů přes tonoplast jsou považovány MRP transportéry.¹³

Výzkum genomu *Arabidopsis* odhalil, že obsahuje 53 domnělých ABC transportních genů. Nicméně lokalizace a funkce těchto genů nejsou zatím příliš známy. Většina dosud identifikovaných ABC transportérů byla lokalizována ve vakuolární membráně a jsou pravděpodobně zodpovědné za vakuolární sekvestraci cytotoxinů.

ABC transportéry v plasmatické membráně mohou být zapojeny v sekreci obranných metabolitů a jejich exprese může být regulována koncentrací těchto metabolitů. Avšak pro potvrzení této teorie jsou potřeba další důkazy.¹⁵

2.2.8 Další přenašeče těžkých kovů

V *Arabidopsis* bylo identifikováno dvacet genomických GNGC sekvencí. Tyto proteiny obsahují šest domnělých transmembránových domén a vazebné místo pro kalmodulin, které překrývá to pro cyklickou vazbu nukleotidu. Tyto kanály jsou zřejmě lokalizované v plasmatické membráně a jsou neselektivní, propustné jak pro jednomocné tak pro dvojmocné kationty.

NtCBP4 nalezený v tabáku vykazoval zvýšenou toleranci na Ni^+ a hypersenzitivitu k Pb^{2+} . Je však potřeba provést další studie, aby se objasnila celková substrátová specifita pro tento kanál. AtMHX transportér, objevený v *A. thaliana*, je lokalizován ve vakuolární membráně a zprostředkovává výměnu H^+ za Zn^{2+} nebo Mg^{2+} . V *Arabidopsis* byla dále objevena skupina transportérů AtMGT, které kódují domnělé Mg^{2+} přenašeče. AtMGT1 je umístěn v plasmatické membráně a vykazuje nejvyšší afinitu k Mg^{2+} . Ale existují důkazy, že i Ni^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} a Cu^{2+} jím mohou být také přenášeny, i když je potřeba, aby byly přítomny ve vyšší koncentraci. Další transportér s potenciální rolí v příjmu Ca^{2+} a Cd^{2+} je LCT1 nalezený v pšenici.¹⁰

YCF1 je vakuolární transportér poháněný energií z MgATP zodpovědný za sekvestraci směsí po jejich S-konjugaci s glutathionem v *S. cerevisiae*. Zvýšená exprese YCF1 genu v *A. thaliana* vyvolala čtyřnásobně vyšší příjem komplexu glutathion-Cd v YCF1 transgenních rostlinách než u divoce rostoucích rostlin. To naznačuje, že exprese YCF1 výrazně zvyšuje transport kadmia.¹³

3 Mechanismus detoxifikace těžkých kovů

Ačkoliv mikroživiny jako jsou zinek, mangan, nikl a měď jsou nezbytné pro správný růst a vývoj rostlin, vysoké koncentrace těchto iontů uvnitř buněk rostlin mohou být toxické. Aby se rostliny vyrovnaly s tímto rizikem, vyvinuly několik mechanismů, které kontrolují homeostázi těchto iontů uvnitř buněk. Tyto mechanismy zahrnují regulaci iontového influxu (stimulace transportérové aktivity při nízkém obsahu iontů uvnitř buněk a inhibici při vysokých koncentracích) a vytlačování iontů kovů přítomných uvnitř buněk zpět do vnějšího roztoku. Rostliny schopné přijímat větší množství kovů než je obvyklé, známé jako hyperakumulátory, vlastní ještě další detoxifikační mechanismy.

Je důležité poznamenat, že z celkového množství kovů přijatých kořeny rostlin, je jen část těchto kovů absorbována do buněk. Značná část iontů kovů je absorbována do buněčných stěn kořenů rostlin. Takto vázané ionty kovů nemohou být přeneseny do nadzemních částí rostlin.

Vazba do buněčných stěn ale není jediný rostlinný mechanismus zodpovědný za imobilizaci kovů v kořenech a následnou inhibici přenosu iontů kovů do nadzemních částí rostlin. Kovy mohou být také vázány do komplexů a sekvestrovány v buněčných strukturách jako jsou například vakuoly.⁴

Poté, co se ionty kovů dostanou do cytosolu jsou chelatovány různými chelátory jako jsou organické kyseliny, aminokyseliny, peptidy a proteiny. Mezi nejdůležitější ligandy, které, jak se zdá, hrají největší roli v toleranci a akumulaci těžkých kovů patří glutathion (GSH), fytochelatiny (PC), metalothioneiny (MT), histidin, nikotinamin a organické kyseliny jablečná a citrónová.⁹

3.1 Vakuolární sekvestrace

Kompartimentace kovů ve vakuole je proces, který zabraňuje volným iontům kovů, aby se volně vyskytovaly v cytosolu a zatlačuje je do omezeného prostoru. Bylo popsáno několik přenašečů řídicích přenos kovů přes buněčné membrány včetně tonoplastu. Komplexy fytochelatin-Cd jsou transportovány specifickými přenašeči proti koncentračnímu gradientu přes tonoplast. Akumulují se ve váčcích tonoplastu. Uvnitř rostlinných buněk jsou komplexy PC-kov nebo jen PC dopraveny do vakuol pomocí

ABC-typu transportních proteinů umístěných v tonoplastu. Dodnes nejlépe popsány vakuolární transportér a kanál zapojený v toleranci kovů je již výše popsány YCF1.²

Detailní informace o transportních systémech těžkých kovů v tonoplastu jsou omezené. Dva již zmíněné geny CAX1 a CAX2 izolované z *Arabidopsis*, jsou lokalizované ve vakuole a kromě přenosu Ca^{2+} byly nalezeny důkazy, že přenáší i Cd^{2+} . Domněnky, že přenáší také nikl se nepotvrdily a vakuola pravděpodobně nebude místem akumulace niklu.¹⁶

3.2 Fytochelatiny

Fytochelatiny vznikají z glutathionu působením γ -glutamylcysteinyltranspeptidasy, neboli fytochelatin syntázy. Fytochelatiny hrají roli v detoxifikaci kovů. Například mutanty *A. thaliana*, které mají buď nedostatek fytochelatinů nebo glutathionu, jsou citlivé na kadmium. Nicméně v přirozené toleranci zinku a kadmia je jejich role otázkou a například v *S. vulgaris* není zvýšená produkce fytochelatinů mechanismem, který tvoří základ pro přirozenou toleranci kadmia nebo zinku.⁹

V některých rostlinných druzích byly nalezeny další strukturní varianty fytochelatinů, jako $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ a $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$. Fytochelatiny jsou indukovány širokým rozmezím iontů těžkých kovů. Enzym fytochelatin syntáza je $\gamma\text{-Glu-Cys}$ dipeptididyl transpeptidáza a katalyzuje transpeptidaci $\gamma\text{-Glu-Cys}$ poloviny glutathionu buď na další molekulu glutathionu, která vytvoří fytochelatin (n+2), nebo na molekulu fytochelatinu, která vytvoří PC (n+1) oligomer. Fytochelatin syntáza je aktivována různými ionty těžkých kovů.

Mechanismus, kterým je PC syntáza aktivována se zdá být relativně nespecifický s ohledem na aktivující ionty kovů, ačkoli některé kovy jsou více účinné než jiné. Jeden model funkce PC syntázy je, že konzervovaná amino-terminální doména uděluje tomuto enzymu katalytickou aktivitu. Aktivace pravděpodobně vyplývá z interakce mezi rezidui v této doméně a volnými ionty kovů nebo komplexy kov-GSH. Je možné, že karboxy-terminální doména se chová jako lokální senzor tím, že váže ionty těžkých kovů a přivádí je do kontaktu s aktivačním místem v amino-terminální katalytické doméně. Ačkoli PC syntáza může vázat ionty kadmia v nepřítomnosti GSH, zajímavým a zatím nevyřešeným

problémem zůstává, zda jsou kadmínové ionty výhradně zapojeny v aktivaci enzymu nebo zda tvoří integrální složku substrátu.¹⁷

V rostlinách jsou vzniklé PC-Cd komplexy sekvestrovány do vakuol. V *S. cerevisiae* YCF1 a v *S. pombe* HMT1 kódují členy ABC skupiny membránových přenašečů, které přenášejí GSH-Cd a PC-Cd komplexy do vakuoly a hrají důležitou roli v detoxifikaci kadmia a dalších těžkých kovů.¹⁷

PC-Cd komplexy mohou být buď vysokomolekulární (s vysokou Mr(HMW)) nebo nízkomolekulární (s nízkou Mr (LMW)). Ve vakuole jsou nezbytnou součástí PC-Cd komplexů sulfidové ionty. Obecně je poměr $S^{2-}:Cd^{2+}$ vyšší v HMW komplexech v porovnání s LMW komplexy. Zabudování sulfidů do HMW komplexů zvyšuje jak množství kadmia na molekulu tak stabilitu komplexu.

Zatím neexistuje příliš důkazů, které by podporovaly teorii, že PC působí při detoxifikaci ještě jiných kovů než kadmia. Při provedených experimentech PC tvořilo komplexy s olovem, stříbrem a rtuť v *in vitro* podmínkách a jediné PC komplexy identifikované v *in vivo* podmínkách byly s ionty kadmia, stříbra a mědi. Je zřejmé, že mechanismus detoxifikace kovů je více komplexní než jen prostá chelatace iontů kovů fytochelatinu. Ionť kovu musí aktivovat PC syntázu, poté je chelátován pomocí syntetizovaných PC, a následně je pravděpodobně transportován do vakuol například se sulfidy nebo s organickými kyselinami. Zda ke stejnému sledu kroků dochází a zda je nutný i pro ionty jiných kovů není jasné.¹⁸

3.3 Metalothioneiny

Metalothioneiny jsou malé na cystein bohaté proteiny, které mohou účinně vázat kovy skrz thiolátové klastrové formace. Role metalothioneinů v hypertoleranci kadmia a zinku je pravděpodobně velmi malá. Metalothioneiny typu 1,2 a 3 mají zřejmě funkci v akumulaci mědi a transportu mědi ve floému.⁹

MT typicky obsahují dvě na cystein bohaté domény s vazebným místem na kov, které dávají těmto metaloproteinům konformaci ve tvaru činky. MT proteiny jsou klasifikovány na základě uspořádání cysteinových zbytků. Třída I obsahuje 20 vysoce konzervovaných cysteinových zbytků, vyskytuje se původně u savců a je velmi rozšířená i u obratlovců. MT bez tohoto přesného uspořádání cysteinů jsou označovány jako třída II

a jsou obsaženy jak u rostlin a hub, tak u bezobratlých živočichů. Třída II MT proteinů může být dále klasifikována na základě sekvence aminokyselin.

V pšenici nalezený MT protein Typu 4, který byl schopný vázat zinek, byl prvním důkazem, že rostliny obsahují nejen PC, ale i MT jako ligandy kovů obsahující cystein. Důkazy pro přítomnost několika dalších MT proteinů byly získány z *Arabidopsis*.

U zvířat MT fungují jako ochrana před toxickým kadmíem, ale u rostlin tuto funkci zastávají PC. Existující důkazy podporují hypotézu, že MT jsou v rostlinách zapojeny v toleranci a homeostázi mědi. PC navíc v *Arabidopsis* nejsou součástí mechanismů tolerance vůči mědi, což naznačuje možnost zapojení jiného mechanismu, pravděpodobně zahrnujícího MT.

Ačkoliv jsou MT v rostlinách produkovány a uchovávány, jejich funkce zatím zůstává téměř neznámá.¹⁹

3.4 Další chelátory působící při detoxifikaci těžkých kovů v rostlinách

Glutathion (γ Glu-Cys-Gly) je hlavní buněčný antioxidant, který může vázat několik kovů, a je hlavním prekursorem fytochelatinů. Glutathion je také kosubstrátem pro konjugaci mnoha organických xenobiotik. Nedávné výsledky studií s niklem a kadmíem ukazují, že by mohl být zapojen v hyperakumulaci, pravděpodobně díky své antioxidační aktivitě.

Histidin je nejdůležitější aminokyselinový ligand zapojený v hyperakumulaci a tvorbě komplexů s niklem, kadmíem a zinkem. Bylo zaznamenáno, že hyperakumulace niklu v *Alyssum lesbiacium* se uskutečňuje díky komplexaci niklu histidinem. Výsledky u ostatních druhů čeledi *Brassicaceae* nabízejí možnost, že přechod niklu do xylému se zapojením histidinu nemusí být univerzální.

Nikotinamin je syntetizován ze tří molekul S-adenosyl-L-methioninu nikotinamin syntázou a tvoří komplexy s většinou iontů přechodných kovů. Předpokládá se, že pomáhá pohybu mikroprvků uvnitř rostlin. Existuje nepřímý důkaz, že nikotinamin by mohl být zapojen v hyperakumulaci kovů v *A. halleri* a *T. caerulescens*.

Organické kyseliny a aminokyseliny mohou být potenciálními ligandy pro chelaci těžkých kovů, vzhledem k množství iontů kovů, které jsou schopny reagovat s S, N a O.

Citrát, malát a oxalát jsou zapojeny v řadě procesů, včetně tolerance rostlin k různým kovům, transportu kovů xylémem a vakuolární sekvestraci kovů. Kyselina citrónová je považována za hlavní Cd^{2+} ligand při nízkých koncentracích Cd^{2+} . Také tvoří komplexy s Ni^+ v Ni-akumulujících rostlinách a je možné, že přispívá k akumulaci zinku a toleranci. U malátu se předpokládá, že působí jako chelátor zinku v Zn-tolerantních rostlinách. U kyseliny salicylové byla zjištěna role v udržení homeostáze kovů v sazenicích *Medicago sativa* vystavených kadmium nebo železu.¹³

3.4.1 Transport chelátorů a chelátů kovů

FRD3 je produkován v kořenovém pericyklu a pracuje jako efluxér citrátu. Je možné, že FRD3 v *A. halleri* a *T. caerulescens* přispívá k homeostázi železa a částečně k jeho mobilitě v přítomnosti zinku v xylému v koncentracích podstatně vyšších než v neakumulujících druzích, jako je *A. thaliana*. Nelze vyloučit, že FRD3 přispívá k homeostázi dalších kovů včetně zinku.

Transportéry transportní rodiny YSL, které řídí buněčný příjem kov-nikotinamin komplexů, byly charakterizovány v *A. thaliana*. YSL6 byl identifikován v nadzemních částech *A. halleri* a YSL7 v kořenech *T. caerulescens*. Dosud byly YSL transportéry spojovány hlavně s homeostázi železa a je stále nejasné, zda přispívají také k homeostázi a akumulaci zinku a kadmia nebo k fyziologické rovnováze jiných dvojmocných kationtů kovů.⁸

4 Příjem organických sloučenin rostlinami

Existuje několik mechanismů, jak rostliny přijímají a přeměňují organické látky. Tato kapitola se věnuje příjmu kořeny. Když rostliny přímo absorbují látky kořeny, hydrofobní organické látky se váží na povrch kořenů. Pokud jsou rozpustnější, jsou akumulovány v kořenech a transportovány přes membrány do rostlinné tkáně. Látky mohou být v rostlinách skladovány buď v původní formě, nebo mohou být pomocí detoxifikačního mechanismu transformovány. Ty jsou uloženy na různých místech v buňce rostlin, například ve vakuolách. Kromě toho mohou být organické látky metabolizovány, rozloženy na oxid uhličitý a vodu nebo mohou být volatilizovány.

Aby mohly být organické látky přijímány a transformovány rostlinami, musí být biologicky dostupné. Jejich dostupnost závisí na lipofilitě látek, na typu půdy, ve které se látky vyskytují a na době, po kterou byly organické látky ve styku s půdou. Čím déle jsou látky v půdě, tím pevnější je jejich vazba na částice půdy a tím nižší je jejich biologická dostupnost.

Organické polutanty mohou vstoupit do kořenů rostlin buď pasivními a/nebo aktivními procesy, a poté se pohybovat v transpiračním proudu rostlin do jiných rostlinných částí. Hodnoty koncentrací látek, které nejsou v rostlinách ve formě iontů, ve vztahu k vnější koncentraci ve vodě (nebo půdním roztoku) ukazují, že většina těchto látek vstupuje do rostlin především díky pasivnímu transportu. K aktivnímu transportu, který může probíhat proti gradientu elektrochemického potenciálu, dochází u některých živin a u dalších (anorganických i organických) iontů. Rozsah a účinnost příjmu závisí na zdroji kontaminantu, na vlastnostech kontaminantu, na druzích rostlin, na době expozice a jiných systémových proměnných.

Předchozí studie ukázaly, že mírně rozpustné organické sloučeniny byly málo translokovány uvnitř rostlin a byly omezeny převážně do spodních částí rostlin. Například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a dioxiny se soustředily především ve slupce spíše než v jádře mrkve, rostoucí na kontaminovaných půdách. Při výzkumu příjmu a pohybu anthracenu a fenanthrenu z kontaminované půdy do nemodifikovaných živých kořenů kukuřice a pšenice byly PAU detekovatelné jak v buněčných stěnách, tak v buněčných vakuolách. Apoplastický tok přes více buněčných stěn ovládal translokaci PAU. Jen malá frakce sloučenin je transportována do buněčných vakuol přes symplastický pohyb. Nicméně u více rozpustných organických látek jako je atrazin je známo, že jsou uvnitř rostlin snadno translokovány. Obecně je potřeba počítat s různými transportními cestami organických látek v rostlinách.²⁷

Xenobiotika jsou absorbována kořeny přes cesty využívané živinami a jsou přenášena do nadzemních částí rostlin transpiračním proudem pohybujícím se skrz xylém. Když sloučenina vstoupí do kořene, může být přijata do cytoplasmy epidermálních buněk nebo může difundovat skrz prostor apoplastu do buňky. Ze symplastu jsou látky vedeny do xylému a transportovány do nadzemních částí.²⁸

Akumulace hydrofobních sloučenin v půdě rostlinami se odehrává ve čtyřech kritických krocích: (1) desorpce hydrofobních sloučenin z půdních částic do půdního roztoku, (2) absorpce do kořenů, (3) translokace do nadzemních částí rostlin a (4) metabolická stabilita v rostlinách. Provedené studie ukázaly, že volný dieldrin v křemenném písku byl snadno absorbován rostlinami japonské hořčice, špenátu, sójových bobů a rajčete, které obvykle nemohou akumulovat dieldrin v půdě. Tyto výsledky naznačují, že uvolnění hydrofobních sloučenin z půdních částic je klíčovým krokem pro absorpci.

Mezi málo akumulujícími a vysoce akumulujícími rostlinami mohou být rozdíly s ohledem na translokaci hydrofobních sloučenin. Za aktivní přenos hydrofobních sloučenin do nadzemních částí rostlin se zdají být odpovědné proteiny floému. Nicméně neexistují žádné zprávy o vztahu mezi vysokou akumulací vysoce akumulujících rostlin a specifickou existencí floémových proteinů.²⁹

Předpokládá se, že přenos xenobiotik z půdy do rostlin probíhá spontánně a je řízen difúzí pro sloučeniny s lipofilitou blízkou kořenům daných druhů. Příjem lipofilních a amfifilních sloučenin z různých prostředí byl intenzivně studován při výzkumu pesticidů. Kořenový koncentrační faktor (root concentration factor – RCF) popisuje potenciál daného xenobiotika akumulovat se v kořeni rostlin, bez rozlišování mezi povrchovou akumulací a příjmem do kořenových tkání. RCF je silně závislý na $\log K_{ow}$. Sloučeniny s nízkým K_{ow} (tj. < 1) budou stěží pronikat kořenovým epidermis, který obsahuje tuky, zatímco sloučeniny s $\log K_{ow} > 3$ v tučích kořenového epidermis a organické hmotě obklopující kořeny snadno zadrženy v důsledku jejich vzrůstající hydrofobity. V tomto případě by mohl být příjem mizivý, pokud by byl vůbec zjistitelný.

Příjem a translokace různých organických polutantů se také liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy. Příjem nezávisí jen na lipofilitě polutantů, ale také silně na vlastnostech samotných kořenů u různých druhů a na zapojených transportních mechanismech uvnitř tkání.

Dá se předpokládat, že metabolismus xenobiotik v rostlinách je omezen na tkáň kořenů a listů a jen stěží by probíhal během transportu v cévním systému rostlin.⁹

Provedené studie ukazují, že některé rostliny, jako například tykvovité druhy, mohou ve svých kořenových exudátech produkovat molekuly, které pomáhají desorbovat a rozpouštět hydrofobní látky z půdních částic a ponechávají je tak více dostupné pro

příjem rostlinami. Některé další studie ukázaly, že začlenění nízkomolekulárních organických kyselin jako je kyselina citrónová, které jsou uvolněny v kořenových exudátech, do půdy zvýšilo příjem perzistentních organických polutantů u rostlin tykvovitých druhů. Tyto výsledky naznačují, že nízkomolekulární organické kyseliny mohou být důležité látky rozpouštějící kontaminanty v kořenových exudátech tykvovitých rostlin. Byla zaznamenána korelace mezi koncentracemi nízkomolekulárních organických látek v exudátech z kořenů tykví a koncentracemi desorbovaného chlordanu v půdním roztoku. Tudíž se zdá, že nízkomolekulární organické látky hrají roli v desorpci kontaminantů z půdy.³⁰

Při studiu translokace insekticidu fipronilu do listů rostlin proběhla jeho akumulace v těchto rostlinných orgánech především přes transport xylémem. Transport floémem byl oproti xylému zanedbatelný. Výsledky tohoto experimentu tedy potvrzují scénář pasivního příjmu a transportu látek se střední lipofilitou.³¹

5 Mechanismus detoxifikace organických sloučenin

Metabolismus organických látek v rostlinách můžeme rozdělit na tři fáze: na transformaci (fáze I), konjugaci (fáze II) a ukládání (fáze III) organických látek. Během transformace jsou hydrofobní polutanty převedeny na méně hydrofobní metabolity pomocí N-, O- a S-dealkylace, aromatické a alifatické hydroxylace, epoxidace, peroxidace, oxidativní desulfurace, sulfoxidace nebo redukce cytochromem P450. Reakce katalyzované cytochromem P450 jsou počáteční nezbytné kroky vedoucí k detoxifikaci, inaktivaci a exkreci. Tato konverze obvykle poskytuje méně toxické metabolity. Při konjugaci jsou organické polutanty nebo jejich metabolity z fáze I přímo konjugovány s glutathionem, cukry nebo aminokyselinami a vznikají hydrofilní sloučeniny. Nakonec, ve fázi III, jsou konjugované metabolity uloženy ve vakuolách nebo buněčných stěnách.³² Rozpustné konjugáty se v rostlinných buňkách ukládají ve vakuolách, nerozpustné v buněčné stěně. Rostliny obsahují enzymy cytochrom P-450 monooxygenasy, glutathiontransferasy, UDP-glukuronyltransferasy, O-glukosyl a O-malonyltransferasy, N-glukosyl a N-malonyltransferasy se specifitou k chlorovaným xenobiotikům a karboxylesterasy, které působí při detoxifikaci organických xenobiotik.

Detoxifikace závisí na dostupnosti redukovaného glutathionu. Homeostáze glutathionu v rostlinách je udržována složitými regulačními procesy včetně syntézy, degradace a transportu.

Zatímco rostliny vlastní požadované třídy enzymů, specifické aktivity jednotlivých enzymů pro metabolismus odlišných chemických látek nemusí být přítomny v každém druhu. Příkladem je třeba selektivita herbicidů. Sulfonylmočoviny a triaziny jsou detoxifikovány pouze druhy, které vlastní správné izoformy P450 nebo glutathion S-transferázy schopných atakovat tyto pesticidy.³³

5.1 Fáze I: transformace

Fáze I zahrnuje konverzi/aktivaci (oxidace, redukce a hydrolýza) lipofilních xenobiotických sloučenin. Během fáze I molekuly některých xenobiotik podstoupí oxidativní nebo hydrolytickou transformaci, zatímco některé organické látky jako například nitroaromáty podléhají redukčním procesům. Metabolické dráhy xenobiotik v této fázi vedou k zavádění funkčních skupin do molekul polutantů, což vede k tvorbě více polárních, chemicky aktivních a více ve vodě rozpustných sloučenin. Reakce fáze I jsou důležité pro fytořemediaci hydrofobních chemicky stabilních organických polutantů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky a polychlorované alifatické a aromatické uhlovodíky. Fáze I je bioaktivační fáze metabolismu, během níž jsou v xenobiotikách vytvořena reaktivní místa přidáním nebo expozicí funkčních skupin (např. hydroxylových nebo karboxylových), které kontaminant připraví pro reakce ve fázi II. Oxidativní metabolismus ve fázi I je řízen různými skupinami enzymů. Jestliže kontaminant již má funkční skupinu vhodnou pro metabolismus fáze II, může být sloučenina přímo využita ve fázi II bez toho, aby vstupovala do fáze I.

Skupina enzymů monooxygenás, označovaných jako cytochrom P-450 tvoří rodinu hemových proteinů nezbytných pro oxidativní, peroxidativní a redukční metabolismus různorodé skupiny látek, včetně endobiotik, jako jsou steroidy, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, prostaglandiny a leukotrieny a xenobiotik, včetně většiny terapeutických léků a látek znečišťujících životní prostředí. Tyto enzymy jsou přítomny v téměř každém žijícím organismu ve více než jedné formě, a tudíž tvoří jednu z největších enzymových rodin.

Enzymový systém je umístěn v mikrozomech a sestává z několika izoforem cytochromu P450 a nespecifické NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktasy.

Ačkoli cytochrom P450 monooxygenasy hrají ve vyšších rostlinách důležitou roli v oxidativním metabolismu endogenních a exogenních lipofilních sloučenin, molekulární informace o druzích cytochromu P450 metabolizujících xenobiotika v rostlinách jsou poměrně omezené. Na druhou stranu byl detekován celý počet druhů cytochromu P450 v mikrozomech v lidských játrech, z nich bylo dosud identifikováno 11 druhů cytochromu P450 zapojených v metabolismu léčiv. Tyto cytochromy P450 oxidují uhlík a dusík. To obvykle vede k vytvoření hydroxylové skupiny a příležitostně k následnému odstranění alkylových skupin, což se podobá metabolickým procesům probíhajícím v rostlinách.³⁴

Cytochrom P450 monooxygenasy jsou lokalizovány v membránových částech buněk.

Peroxidázy jsou enzymy sekundárního metabolismu rostlin a je známo, že katalyzují oxidaci různých organických a anorganických sloučenin, což jim dává v rostlinách významnou funkci. Peroxidasy jsou v rostlinné tkáni schopny detoxifikovat fenol a aromatické aminy na volné radikály nebo na chinony a benzochinonové iminy. Jsou zapojeny v lignifikaci a katabolismu kyseliny indol-2-octové. Kromě toho se také mohou podílet na vzniku reaktivních kyslíkových druhů jako část hypersenzitivní reakce. Jejich aktivity byly obecně nízké v prozkoumaných tkáních, s vyššími hodnotami v rhizomech..³³ Peroxidázy se nacházejí v apoplastu a cytosolu.

Dalším enzymem zapojeným v transformaci xenobiotik v I fázi detoxifikačního mechanismu je nitroreduktáza, která se účastní degradace nitroaromátů a rozbíjí strukturu aromatického kruhu.³⁵

5.2 Fáze II: konjugace

Ve fázi II se aktivované metabolity xenobiotik vážou s cukrem nebo sulfhydrylovou skupinou glutathionu a tvoří se hydrofilní sloučeniny. Konjugace vede ke vzniku méně toxických a více polárních látek s vyššími molekulovými hmotnostmi v porovnání s původními látkami. S fázi II jsou spojeny enzymy jako glutathion S-transferáza, glukosyl transferáza a N-malonyl transferáza. Konjugace metabolitů fáze I se odehrává v cytosolu, ale je nežádoucí, aby se tyto sloučeniny v cytosolu akumulovaly.³⁵

Důležitým mechanismem pro detoxifikaci xenobiotik je konjugace s glutathionem. Glutathion S-transferasy jsou rodina multifunkčních enzymů zapojených v buněčné detoxifikaci a exkreci mnoha fyziologických a endogenních látek, které se nacházejí v rostlinách, zvířatech a mikroorganismech. Kromě toho studie glutathion S-transferáz dále charakterizují jejich roli v detoxifikaci xenobiotik. Za normálních podmínek je glutathion převážně přítomný ve své redukované formě, s jen malým množstvím přítomným ve svém plně oxidovaném stavu. Glutathion S-transferázy katalyzují v organických sloučeninách nukleofilní adici thiolu redukovaného glutathionu.

Glutathion nese dvě karboxylové skupiny, jednu amino skupinu a jednu thiolovou skupinu a má dvě peptidové vazby a tudíž je velmi hydrofilní. Konjugace glutathionu s hydrofobními elektrofilními sloučeninami povede ke ztrátě jejich lipofility převedením původních sloučenin na amfifilní reakční produkty, které vlastní objemné hydrofilní oblasti. Tato změna fyzikálně-chemických vlastností zabraňuje mobilitě cizích sloučenin a inhibuje další dělení do biomembrán stejně jako difúzi mezi buněčné kompartmenty.³⁴

Takto vytvořené glutathion konjugáty jsou více hydrofilní, což usnadňuje jejich vylučování. V dalším kroku jsou konjugáty glutathionu transportovány ABC transportním systémem umístěným v tonoplastu do vakuoly. Zde následuje další enzymatická degradace konjugátů glutathionu na příslušné γ -glutamyl cystein a cysteinyl konjugáty. Tyto cysteinyl konjugáty jsou často rozštěpeny pomocí cystein S-lyáz za vzniku pyruvátu, NH_3 a thiolu příslušného xenobiotika.²⁸ A tak je Glutathion S-transferázou katalyzovaná transformace jedním s prvních kroků, ve kterém jsou hydrofobní xenobiotika detoxifikována a odstraněna z organismu. Následuje ATP-dependentní efflux pumpa, která řídí export glutathion konjugátů z buněk.

Přítomnost širokého počtu izoenzymů glutathion S-transferáz s různou, překrývající se selektivitou poskytuje organismu možnost detoxifikovat široké spektrum reaktivních xenobiotik tím, že katalyzují jejich konjugaci s glutathionem a nebo jejich zachycení kovalentní nebo nekovalentní vazbou. Rozsah, do kterého detoxifikace a/nebo aktivace probíhá, závisí na počtu a množství specifických izoenzymů přítomných v tkáni.³²

Při konjugaci s cukry, poté co jsou vytvořeny aktivované molekuly s $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}$ a $-\text{SH}$ funkčními skupinami, následuje rychlá glykosylace. Nejběžnější skupiny konjugátů cukrů jsou odvozeny z UDP-glukózy jako kosubstrátu a představují je 0- β -D-

glukosidy, N-glukosidy a estery 1-O-glukózy. Tyto reakce jsou katalyzovány O-, S- a N-glukosyltransferázami, které jsou běžně zapojeny v biosyntéze různých rostlinných sekundárních produktů. Většina cukerných konjugátů je zřejmě transportována do apoplastu, kde jsou převedeny na řadu různých produktů, a poté sekvestrovány do částí buněčné stěny s hemicelulózou, pektinem a ligninem. Další glukosidy jsou ukládány v rostlinné vakuole podobně jako řada sekundárních sloučenin, které mají speciální úkoly ve vývoji rostlin.²⁸

Jednoduché glukózové konjugáty jsou často předmětem sekundárních konjugací a vznikají glukosylglukosidy nebo 6-O-malonylglykosidy. Předpokládá se, že tyto oligosacharidové konjugáty jsou ve vakuole stabilní. 6-O-malonylglykosidy jsou vytvořeny reakcí malonyltransferáz. Glutathion konjugáty jsou metabolizovány během několika dní na cysteinyl konjugáty. Tyto cysteinyl konjugáty mají klíčovou pozici v metabolismu glutathionových konjugátů, jelikož se zde větví několik metabolických drah. Obecně se předpokládá, že cysteinyl konjugáty jsou umístěny ve vakuole. S-glukosidy bývalých glutathion konjugátů zřejmě sdílejí svůj osud s glukosidy z jiných metabolických drah. Jestliže nejsou uloženy ve vakuole jsou vyvedeny pryč z cytosolu do apoplastu, kde mohou podstoupit dálkový transport nebo jsou zabudovány do buněčné stěny.²⁸

5.3 Fáze III: ukládání

Během fáze III jsou konjugovaná xenobiotika odstraněna ze slabých míst v cytosolu a jsou přenesena do vakuol nebo apoplastu transportéry vázanými na membránu tonoplastu, kde nebudou zasahovat do buněčného metabolismu. Vakuolární kompartmentalizace je hlavní krok při detoxifikaci konjugátů xenobiotik v rostlinách. Hlavními enzymy zapojenými v tomto kroku jsou ATP řízené vakuolární transportéry a další zpracování konjugátů může probíhat v matrixu vakuoly.³⁵

Akumulace konjugátů může vést k nepříznivé situaci, protože konjugáty by mohly zpětnými mechanismy nebo víceméně specifickými vazbami inhibovat enzymy. Ale při fyziologických podmínkách k tomuto ovlivnění metabolismu buňky nedochází, protože konjugáty jsou převáděny do vakuoly. Transportéry, které konjugáty přenášejí do vakuoly, jsou zřejmě specifické pro cukernou a glutathionovou složku, ale ne pro

xenobiotickou část molekuly. To vedlo k předpokladu, že glutathion a cukry fungují na molekule jako značky, označují ji pro vakuolární sekvestraci.

Někteří autoři popisují rostlinnou vakuolu jako konečné úložné místo v buňce, nicméně literatura o metabolismu herbicidů uvádí, že většina ne-li všechny glutathion konjugáty a celý počet glukosidů podstupují v buňce další metabolismus a končí nakonec v apoplastu, rhizosféře nebo dokonce atmosféře. Tudíž vakuola může být jen přechodným úložným místem, pravděpodobně aby ztlumila rozdíly mezi rychlou mírou konjugace detoxifikačních enzymů a pomalejším průběhem dalších metabolických kroků.²⁸

6 Závěr

Příjem a distribuce těžkých kovů a organických látek v rostlinách probíhá pomocí řady specifických mechanismů. Poté co jsou kovy přijaty kořeny jsou chelatovány působením různých chelátorů a jsou uloženy ve vakuolách v kořenech nebo v nadzemních částech rostlin. Organické látky jsou v rostlinách transformovány, konjugovány s glutathionem, cukry nebo aminokyselinami a opět uloženy ve vakuolách. Tyto mechanismy však dosud nebyly plně popsány a je potřeba jejich další studium.

Použitá literatura

- ¹ Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. : Fyziologie rostlin, 96-99, 111-112 (2003)
- ² Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M: Bot. Rev. , 75, 339–364 (2009)
- ³ Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A.: Environmental and Experimental Botany, 52, 199–223 (2004)
- ⁴ Lasat M.M.: Journal of Hazardous Substance Research, 2, 1-5 (2002)
- ⁵ Lasat M.M.: J. Environ. Qual. 31, 111-113 (2002)
- ⁶ Page V., Feller U.: Annals of Botany, 96, 425 (2005)
- ⁷ Clemens S., Palmgren M. G., Krämer U.: Trends in Plants Science, 7, 311, 313 (2002)
- ⁸ Krämer U., Talke I.N., Hanikenne M.: FEBS Letters, 581, 2263–2272 (2007)
- ⁹ Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D. M.: Environmental and Experimental Botany, 67, 10–22 (2009)
- ¹⁰ Hall J.L., Williams L.E.: Journal of Experimental Botany, 54, 2607 (2003)
- ¹¹ Moreau, S., Thomson, R.M., Kaiser, B.N., Trevaskist, B., Guerinot, M.L., Udvardi, M.K., Puppot, A., Day, D.A.: J. Biol. Chem. 277, 4738–4746 (2002)
- ¹² Kochian L. V., Pence N. S., Letham D. L.D., Pineros M. A., Magalhaes J. V., Hoekenga O. A., Garvin D. F.: Plant and Soil, 247, 114 (2002)
- ¹³ Shah K., Nongkynrih J.M.: Biologia Plantarum, 51, 618-634 (2007)
- ¹⁴ Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W.: The Journal of Biological Chemistry, 270, 4721-4728 (1995)
- ¹⁵ Walker T. S., Pal Bais H., Grotewold E, Vivanco J. M.: Plant Physiol., 132, 49 (2003)
- ¹⁶ Hall J.L.: Journal of Experimental Botany, 53, 8 (2002)
- ¹⁷ Cobbet Ch.S.: Current Opinion in Plant Biology, 3, 211–216 (2000)
- ¹⁸ Cobbet Ch.S.: Plant Physiol., 123, 830 (2000)
- ¹⁹ Cobbet Ch., Goldsbrough P.: Annu. Rev. Plant Biol. , 53, 170-177 (2000)
- ²⁰ Clemens C.: Biochemie, 88, 1715 (2006)
- ²¹ Baker A. J. M.: Journal of Plant Nutrition, 3, 643-654 (1981)
- ²² Baker A.J.M., Brooks R.R.: Biorecovery, 1, 81-126 (1989)
- ²³ Boominathan R., Doran P.M., Journal of Biotechnology, 101, 132 (2003)

-
- ²⁴ Kováčik J., Klejdus B., Hedvabny J., Bačkor M.: *Water Air Soil Pollut*, 202, 199 (2009)
- ²⁵ Hu P.J., Qiu R.L., Senthilkumar P., Jiang D., Chen Z.W., Tang Y.T., Liu F.J.: *Environmental and Experimental Botany*, 66, 317–325 (2009)
- ²⁶ Zeng X., Ma L.Q., Qiu R., Tang Y.: *Environmental and Experimental Botany*, 66, 242–248 (2009)
- ²⁷ Su Y.H., Zhu Y.G.: *Environmental Pollution*, 148, 94-100 (2007)
- ²⁸ Schröder P., Scheer Ch., Belford E.J.D.: *Minerva Biotec.*, 13, 85-91 (2001)
- ²⁹ Inui H., Wakai T., Gion K., Kim Y.S., Eun H.: *Chemosphere*, 73, 1605 (2008)
- ³⁰ Matsumoto E., Kawanaka Y., Yun S.J., Oyaizu H.: *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 205–216(2009)
- ³¹ Aajoud A., Raveton M., Aouadi H., Tissut M., Ravanel P.: *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5055-5060 (2006)
- ³² Abhilash P.C., Jamil S., Singh N: *Biotechnology Advances*, 27, 474–488 (2009)
- ³³ Schröder P., Daubner D., Maier H., Neustifler J., Debus R.: *Bioresource Technology*, 99, 7183–7191 (2008)
- ³⁴ Schröder P., Collins Ch.: *International Journal of Phytoremediation*, 4, 247–265 (2002)
- ³⁵ Eapen S., Singh S., D'Souza S.F.: *Biotechnology Advances*, 25, 442–451 (2007)