Monitorování hladiny metallothioneinu u biologických organismů vystavených působení kovových prvků a sloučenin

Kateřina Tmejová[a,b], David Hynek[a,b], Kristýna Číhalová[a], Renata Kenšová[a,b], René Kizek[a,b], Vojtěch Adam[a,b]

[a] Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

[b] Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Monitoring of metallothionein levels in biological organism exposed to the metal elements and compounds

In this study, the basic facts about the relationship between metallothionein and metals are summarized, determining the affinity of the interaction of metallothionein with different metals and the importance of this interaction for the functioning of organisms. In two described experiments there was presented significance of metallothionein determination in organism exposure to heavy metals.

Přijato k publikování: 9. 8. 2014
Klíčová slova: kovy; metalothionein; MT; nádorový marker; těžké kovy

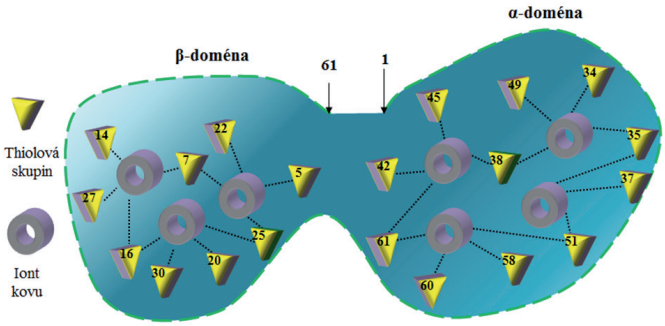
Úvod

Metalothionein (MT) je součástí skupiny nízkomolekulárních na cysteiny velmi bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6 – 10 kDa [1]. Ve své základní struktuře neobsahuje aromatické aminokyseliny. Molekula se skládá z 60 až 68 aminokyselinových zbytků včetně 20 cysteinů, které se v primární sekvenci vyskytují obvykle v těchto repeticích: Cys-**X**-Cys, Cys-Cys-**X**-Cys-Cys, Cys-**X**-Cys-Cys (**X** představuje jinou aminokyselinu než cystein) [2]. Všechny cysteiny jsou v redukované formě a koordinované s ionty kovu, přičemž vytvářejí metalothiolátové klastry. Jedna molekula savčího MT je schopna vázat 11 jednovazných nebo 7 dvouvazných kovových iontů [3]. Kovy jsou vázány do společných tetrahedrálních jednotek. Největší afinitou disponuje MT vůči Cu^{+} (konstanta stability 10^{19} - 10^{17}), dále pak Cd^{2+} (10^{17} – 10^{15}) a Zn^{2+} (10^{14} – 10^{11}) a není schopen vázat Cu^{2+}. Celkově je známo 18 iontů kovů, které MT dokáže vázat, ale pouze Cu^{+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+} a Bi^{2+} jsou schopny vytěsnit navázaný Zn^{2+} ze struktury MT. Jak již bylo zmíněno, terciární struktura MT je rozdělena na dvě domény, α a β, α-doména (C-terminální) je stabilnější a obsahuje 4 vazebná místa pro divalentní těžké kovy, β-doména (N-terminální) dokáže pojmout 3 divalentní kovové ionty [4].

V této práci jsou prezentovány podstatné výsledky studie zkoumající vliv působení iontů kovů (měď, olovo, zinek, stříbro a kadmium) na hladinu metalothioneinu v bakteriální kultuře *Staphylococcus aureus*. Dále je prezentován výstup z experimentu zabývajícím se změnou v hladině metalothioneinu v důsledku přítomnosti kadmia a olova v bakteriální kultuře *Escherichia coli* a *Escherichia coli* klonované genem exprimujícím gen MT-3.

Isoformy metalothioneinu

Metalothionein byl pozorován v celé živočišné říši a vyskytuje se také u eukaryotických mikroorganismů, řady prokaryot a u vyšších rostlin [3]. U savců jsou známy 4 isoformy (MT-1 – MT-4), u člověka bylo zjištěno dalších 13 metalothioneinu podobných proteinů [5]. Pro isoformu MT-1 existuje 11 genů (MT-1A, B, E, F, G, H, I, J, K, L a X), pro další isoformu po jednom genu [6]. Odlišnosti jednotlivých isoforem MT vycházejí zejména z post-translačních úprav, malých změn v primární struktuře a afinitě k jednotlivým těžkým kovům. Přestože jsou strukturně tyto isoformy podobné, plní jiné biologické funkce [7]. Tato skutečnost je zajištěna jejich odlišnou lokalizací v buněčných kompartmen-



Obr. 1: Struktura metalothioneinu

tech a jednotlivých tkáních. MT-1 a MT-2 jsou rozšířené téměř ve všech tkáních [8], MT-3 je exprimován v mozkové tkáni, v srdeční svalovině, ledvinách a v tkáních reprodukčních orgánů [9]. Nejméně známá je isoforma MT-4, která byla objevena v epiteliálních buňkách [2]. Forma MT bez navázaného iontu kovu (apo-MT) je přítomna v buňkách, které jsou vystaveny nedostatku Zn^{2+}. Bylo pozorováno, že apo-MT může díky vysoké afinitě odebrat Zn^{2+} z transkripčních faktorů (TFIIIA) a ze zinkových prstů (Sp-1) [10]. Popsaný mechanismus je pravděpodobně jedním z mnoha protiapoptotických a proliferačních nádorových mechanismů [11].

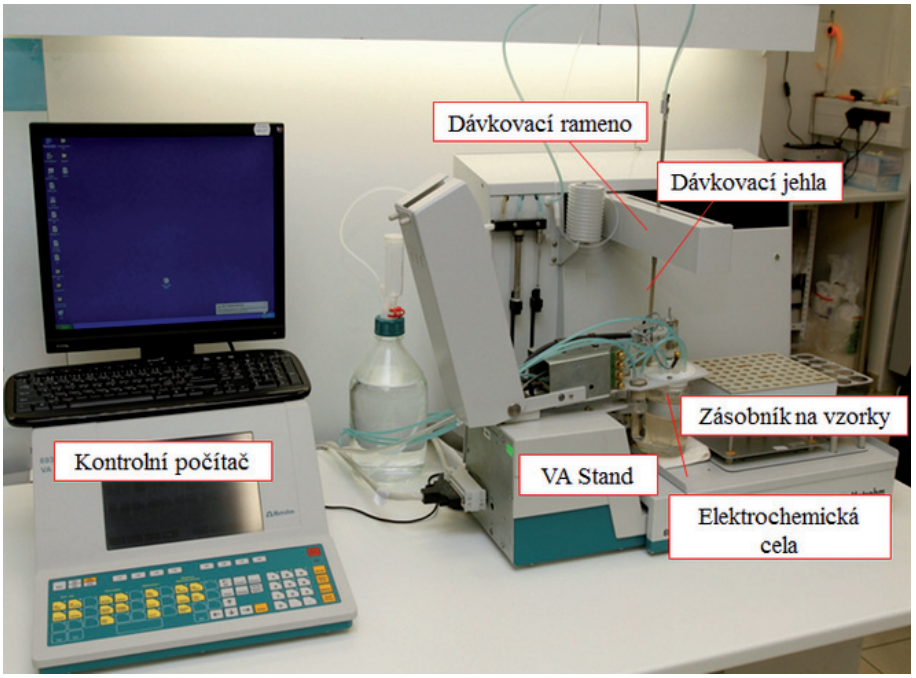
Funkce metalothioneinu v organizmu

O funkci MT není ještě úplně vše známo, ale pravděpodobně tento protein souvisí s transportem zinku v intracelulárním prostoru buňky [12]. Dále studium exprese MT na úrovni mRNA ukazuje na roli tohoto proteinu při ochraně buňky vůči vysoké koncentraci Zn^{2+} a při odchytu těchto iontů pro potřebu jednotlivých buněčných procesů [13]. MT může korigovat aktivitu zinkových prstů díky kompetici o vazbu zinku [14], slouží také jako rezervoár zinku pro zinek-dependentní proteiny a jako zdroj zinku pro nově syntetizované apo-MT, či regulátory vlastní exprese [13]. Navíc je známo, že MT vstupuje do oxidačně-redukční rovnováhy uvnitř buněk [15]. MT je dále zkoumán jako nádorový marker na základě skutečnosti, že exprese MT je závislá na stupni diferenciace nádoru, stádiu onemocnění a dalších charakteristikách nádorových buněk [16].

Elektrochemická detekce metalothioneinu

Stanovení metalothioneinu probíhalo pomocí přístroje 747 VA Stand ve spojení s 693 VA procesorem a 695 autosamplerem (Metrohm, Švýcarsko). Detailní vyobrazení analytického přístroje je na **Obr. 2**. Při měření bylo použito standardní tříelektrodové zapojení spolu s chlazením vzorků na 4°C (Julabo F25, JulaboDE). Jako pracovní elektroda byla zvolena rtuťová kapková elektroda s povrchem kapky 0,4 mm^2 (HMDE), argentchloridová (Ag/AgCl/KCl 3 M) elektroda sloužila jako referentní a platinová elektroda byla elektrodou pomocnou. Parametry stanovení jsou následující: počáteční potenciál -0,700 V, koncový potenciál -1,750 V, čas modulace 0,057 s, časový interval 0,200 s, krokový potenciál 0,020 V, amplituda -0,250 V, deoxygenace 99,9% argonem 120 s, celkový objem elektrolytu se vzorkem je 2 ml. Vzorek se standardně dávkuje v objemu 5 μl.

Brdičkův roztok používaný pro stanovení metalothioneinu jako elektrolyt je složen z 1 M amonného pufru a 1 mM chloridu hexaamminkobaltitého. V roztoku probíhá katalytická reakce, u níž dochází k interakci $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ s −SH skupinou proteinu, kdy se nejprve vytvoří hexaaminkobaltnatý iont. Stabilita tohoto komplexu je ale velmi nízká, proto podléhá hydrolýze za vzniku amoniaku. NH_3 zvyšuje pH elektrolytu a vytváří tak podmínky pro vznik katalytické reakce. Následuje redukce hexaaquakobaltnatého komplexu na čistý kobalt. Jako výsledek celé reakce vzniknou v amonném pufru dvě potenciálové vlny, a to při potenciálu přibližně -0,30 V ($Co^{3+} \rightarrow Co^{2+}$) a -1,20 V ($Co^{2+} \rightarrow Co^{0}$). Po přidání proteinu s thiolovou skupinou jsou na voltamogramu zaznamenány dvě další vlny při potenciálech -1,35 a -1,48 V, přičemž výška posledního signálu je závislá na koncentraci metalothioneinu v reálném vzorku [17, 18].



Obr. 2: Detailní popis elektrochemické aparatury použité pro detekci metalothioneinu

Efekt iontů kovů na *Staphylococcus aureus*

Vliv iontů těžkých kovů (Ag^{+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+} and Pb^{2+}) při působení na gram-pozitivní bakteriální kmen *S. aureus* byl elektrochemicky studován z pohledu změny v hladině termostabilního proteinu metalothioneinu v rezistentním, a vůči kovu nerezistentním kmeni. Rezistentní kmen byl připraven kultivací *S. aureus* s postupným přidáváním stejné koncentrace těžkých kovů (50 µM) k bakteriální kultuře až do koncentrace, kdy je *S. aureus* ještě schopný regenerace. V takto kultivovaných bakteriálních kmenech opatřených nezbytnou přípravou vzorku pro elektrochemickou detekci byl stanoven metalothionein. Bylo zjištěno, že hladina metalothioneinu je vyšší v kmeni rezistentním na kovy, a to zejména v rezistentním kmeni s mědí a olovem [19]. Zvýšení koncentrace MT může být důležitá pro homeostázi a detoxifikaci kovů pro získání rezistence na těžké kovy kmene *S. aureus*.

Efekt kademnatých a olovnatých iontů na *Escherichia coli* s genem pro MT-3

Escherichia coli a *Escherichia coli* s genem pro lidský MT-3 byly vystaveny působení kademnatých a olovnatých iontů (25, 50, 75 and 150 µM) a v těchto kondicích byla elektrochemicky stanovena hladina MT jako markeru určujícího působení těžkých kovů na organizmus. Ze získaných dat (hodnota MT klesá v obou bakteriálních kulturách se vzrůstající koncentrací kovů a nejvyšší hodnota MT byla detekována v kondicích bez přítomnosti kovu) lze říci, že byl detekován volný MT (volné thiolové skupiny přítomné ve struktuře metalothioneinu) v samotné *E. coli*. Získané výsledky ukazují na fakt, že kovové ionty jsou vyloučeny z buňky. Mechanizmus vylučování kovových iontů z buňky začíná navázáním kovových iontů do struktury metalothioneinu v cytoplazmě a dále se tento komplex vyloučí pomocí efluxu do média. Toto médium bylo v průběhu přípravy vzorku odejmuto, buněčná stěna rozrušena a bylo možno detekovat pouze malé množství

MT původně navázaného v buňce. Mezi další skutečnosti patří také fakt, že hodnota MT byla vyšší v případě E. coli s MT-3 ve srovnání s E. coli. Také z experimentálních dat vyplývá rozdílná afinita MT-3 ke kadmiu a olovu; přičemž olovo má větší afinitu k MT-3.

Závěr

V této studii byla shrnuta základní fakta o vztahu metalothioneinu a kovů, afinitě určující interakci metalothioneinu s jednotlivými kovy a významu této interakce pro fungování organizmů. Na dvou uvedených experimentech byl prezentován význam MT pro studium intoxikace organizmu ionty kovů.

Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform reguirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Kagi, J.H.R.; Schaffer, A. Biochemistry of metallothionein. Biochemistry. 1988, 27, 8509-8515.
2. Bamber, B.A.; Masters, B.A.; Hoyle, G.W.; Brinster, R.L.; Palmiter, R.D. Leukemia inhibitory factor induces neurotransmitter switching in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994, 91, 7839-7843.
3. Cobbett, C.; Goldsbrough, P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis, 2002.
4. Nath, R.; Kambadur, R.; Gulati, S.; Paliwal, V.K.; Sharma, M. Molecular aspects, physiological-function, and clinical-significance of metallothioneins Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1988, 27, 41-85.
5. Simpkins, C.O. Metallothionein in human disease. Cellular and Molecular Biology. 2000, 46, 465-488.
6. Ghoshal, K.; Jacob, S.T. Regulation of metallothionein gene expression. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 66. 2001, 66, 357-384.
7. Hamer, D.H. Metallothionein - an overview. Marine Environmental Research. 1988, 24, 171-171.
8. Masters, B.A.; Quaife, C.J.; Erickson, J.C.; Kelly, E.J.; Froelick, G.J.; Zambrowicz, B.P.; Brinster, R.L.; Palmiter, R.D. Metallothionein-III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. Journal of Neuroscience. 1994, 14, 5844-5857.
9. Moffatt, P.; Seguin, C. Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. DNA and Cell Biology. 1998, 17, 501-510.
10. Zeng, J.; Heuchel, R.; Schaffner, W.; Kagi, J.H.R. Metallothionein (apometallothionein) can modulate DNA-binding and transcription activation by zinc finger containing factor-SP1. Febs Letters. 1991, 279, 310-312.
11. Barnas, C.; MartelPlanche, G.; Furukawa, Y.; Hollstein, M.; Montesano, R.; Hainaut, P. Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. International Journal of Cancer. 1997, 71, 79-87.
12. Studer, R.; Vogt, C.P.; Cavigelli, M.; Hunziker, P.E.; Kagi, J.H.R. Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation. Biochemical Journal. 1997, 328, 63-67.
13. Davis, S.R.; Cousins, R.J. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function (Reprinted from vol 130, pg 1085, 2000). Journal of Nutrition. 2002, 132, 1085-1088.
14. Roesijadi, G.; Bogumil, R.; Vasak, M.; Kagi, J.H.R. Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. Journal of Biological Chemistry. 1998, 273, 17425-17432.
15. Sato, M.; Bremner, I. Oxygen free-radicals and metallothionein Free Radical Biology and Medicine. 1993, 14, 325-337.
16. Theocharis, S.E.; Margeli, A.P.; Klijanienko, J.T.; Kouraklis, G.P. Metallothionein expression in human neoplasia. Histopathology. 2004, 45, 103-118.
17. Petrlova, J.; Potesil, D.; Mikelova, R.; Blastik, O.; Adam, V.; Trnkova, L.; Jelen, F.; Prusa, R.; Kukacka, J.; Kizek, R. Attomole voltammetric determination of metallothionein. Electrochimica Acta. 2006, 51, 5112-5119.
18. Raspor, B.; Paic, M.; Erk, M. Analysis of metallothioneins by the modified Brdicka procedure. Talanta. 2001, 55, 109-115.
19. Waalkes, M.P.; Harvey, M.J.; Klaassen, C.D. Relative invitro affinity of hepatic metallothionein for metals. Toxicology Letters. 1984, 20, 33-39.

Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.