



CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

PILOTNÍ STUDIE

BIOMOLEKULA METALOTHIONEIN A JEJÍ VÝZNAM PRO NANOBIOTECHNOLOGIE

VÝZNAMEM TOHOTO PROTEINU V NÁDOROVÉ DIAGNOSTICE A LÉČBĚ S VÝHLEDEM VYUŽITÍ VÝSLEDKŮ V NANOMEDICÍNĚ

Ing. Kateřina Tmejová, Ph.D., Doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

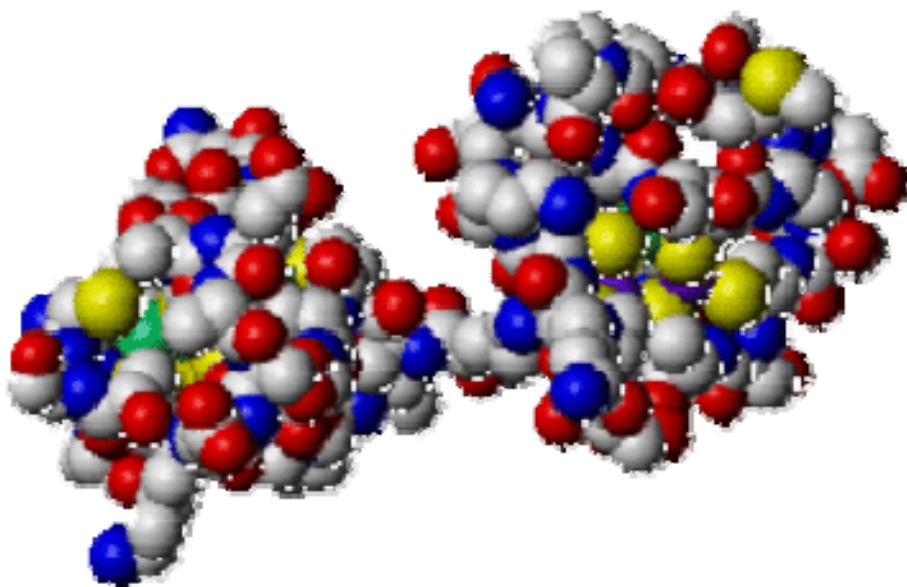


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1.1 Úvod

Metalothionein je nízkomolekulární protein o velikosti 6-10 kDa, který byl izolován v roce 1957 Margoshesem a Valeem z koňské ledviny. Tento protein obsahuje ve své základní struktuře cysteiny a naopak neobsahuje žádné aromatické aminokyseliny. U savců byly nalezeny čtyři hlavní izoformy (MT-1 až MT-4) [1]. Exprese a lokalizace jednotlivých izoform MT je variabilní jak na intracelulární úrovni, tak na úrovni jednotlivých tkání. MT-1 a 2 jsou přítomné zejména v tkáních jater, střev a ledvin, MT-3 v mozku a MT-4 v kůži [2]. MT-1 a MT-2 zajišťují především ochranu proti působení těžkých kovů, ale účastní se i udržování intracelulární homeostáze zinku [3]. Bylo zjištěno, že ztráta ochranných účinků MT vede ke stupňování patogenních procesů. MT má také antioxidační účinky. Hlavní funkcí MT v organismu je však zachování oxidačně-redukčních podmínek, transport iontů kovu a regulace exprese. V současné době je diskutována jeho role při nádorovém onemocnění.



1.2 Struktura MT

Savčí metalothioneiny jsou jedno-řetězcové nízkomolekulární proteiny s počtem aminokyselin pohybujícím se od 61 do 68. Až třetinu aminokyselinových zbytků tvoří cystein. K sulfhydrylovým skupinám cysteinů jsou vázány ionty kovů, které v případě divalentních iontů vytvářejí tetraedrické uspořádání thiolátových klastrů [4]. 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. Celkově lze koordinovat až 12 monovalentních nebo 7 divalentních iontů. Jeho terciární struktura 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 [5].

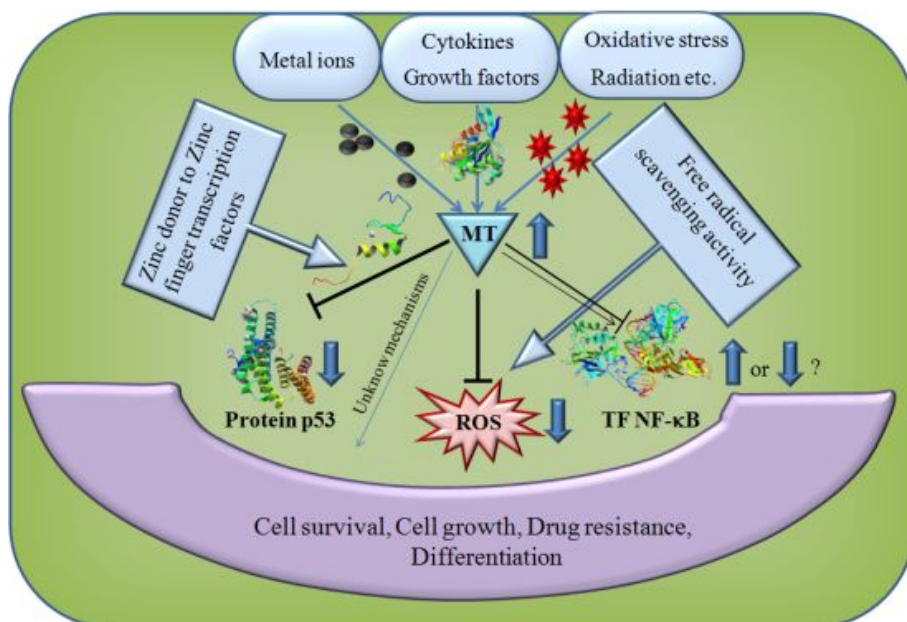
1.3 Exprese MT

Geny pro MT jsou seskupeny blízko sebe na chromozomálním lokusu 16q12-22 u člověka a na chromozomu 8 u myši [6]. Exprese jaterního MT je indukována mnoha vlivy jako cytokininy, ionty kovů, stresovými hormony a širokou škálou chemikálií, které aktivují expresi nepřímo skrze stresovou reakci buňky [7]. Mezi kovy indukující expresi MT patří především Cu, Hg, Zn, Au, Cd a Bi. Nicméně při fyziologických dějích takto vystupuje především Zn (ostatní kovy pocházejí většinou z vnějšího prostředí a vyvolávají patologickou odpověď [8]). Zinek je po železe nejrozšířenější kov v organismu a je zřejmé, že velké množství proteinů je zaměřeno na udržování homeostáze tohoto prvku. Dobře popsána je rodina transportních proteinů ZnT1-4, která se stará o příjem/výdej Zn^{2+} přes membrány buněk u savců. Méně je ovšem známo o transportu zinku v intracelulárním prostoru. Hlavním podstatným proteinem je pravděpodobně právě metalothionein. Zvýšená hladina MT byla zjištěna u proliferujících buněk, což může být způsobeno zvýšenou potřebou zinku [9]. Studium exprese metalothioneinu 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 [2]. MT dále slouží jako rezervoár zinku pro zinek-dependentní proteiny a jako zdroj Zn pro nově nesyntetizované apo-MT, či regulátory vlastní exprese [2]. I přes skutečnost, že MT má velkou afinitu k iontům zinku oproti ostatním Zn-dependentním proteinům, je MT schopen Zn^{2+} uvolnit v závislosti na redoxním potenciálu, koncentraci Zn^{2+} a případně dalších těžkých kovů. Vazbu MT-Zn je také možno narušit pomocí oxidace sulfhydrylových skupin. Za fyziologických podmínek se této oxidace účastní glutathion v oxidované formě (GSSG), jakožto součást oxidačně-redukčních buněčných regulačních mechanismů [10].

1.4 Metallothionein a oxidativní stres

Různé formy kyslíkových radikálů tvořených při intenzivní činnosti mitochondrií, jsou v buňkách likvidovány, aby nedošlo k poškození buněčných struktur. Z tohoto důvodu jsou syntetizovány látky tzv. antioxidanty, které podléhají oxidaci místo významných buněčných komponentů. Obrannou funkci zastávají také thioly, mezi které patří MT a glutathion. Tyto látky vytvářejí oxidačně-redukční prostředí a za určitých podmínek jsou schopny se vzájemně oxidovat či redukovat.



Metalothionein se účastní regulace hladiny volných radikálů také nepřímo a to navázáním iontů kovů, které jsou jejich potenciálními producenty (např. měď [11]). Předpokládá se, že MT funguje jako zhášec volných radikálů nebo jako donor zinku enzymům, které se účastní opravných procesů. Byla také prokázána indukce exprese MT chemickými látkami indukujícími kyslíkové radikály. Cytostatická léčiva (např. bleomycin, adriamycin, cisplatina a její deriváty) jsou také dobrými aktivátory syntézy MT, zřejmě kvůli jejich schopnostem generovat volné radikály [12].

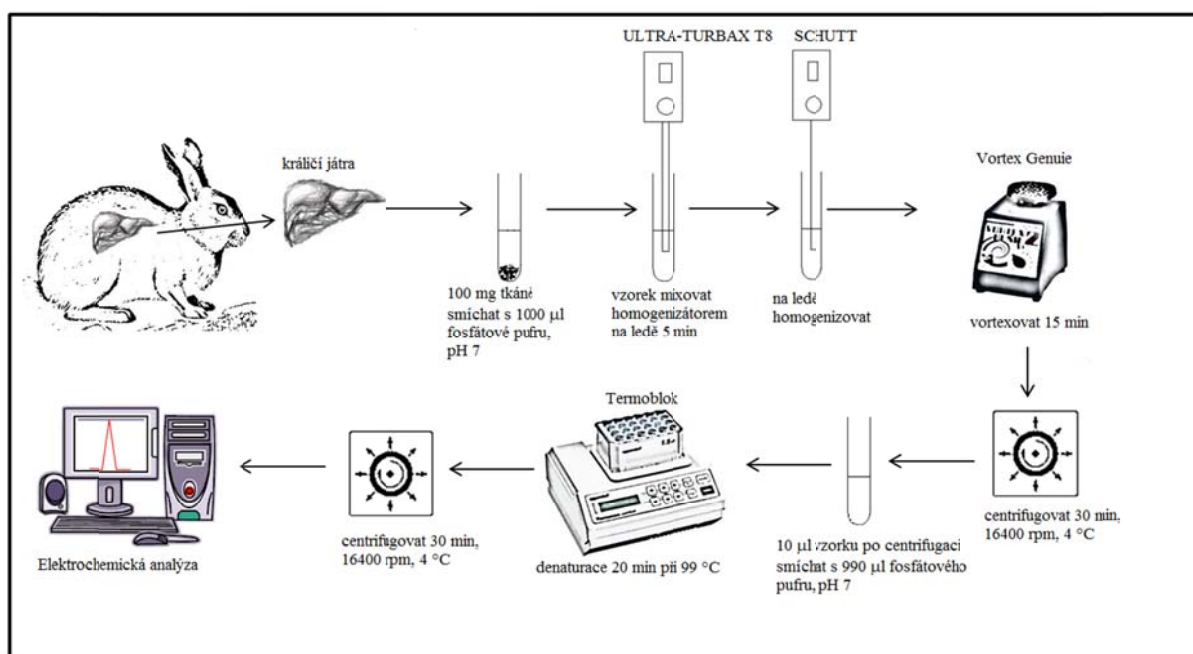
1.5 Metalothionein a nádorová onemocnění

Metalothionein byl již v dřívějších pracích asociován s buněčnou proliferací [11], kde má zřejmě funkci přenašeče a zásobníku Zn^{2+} . Zvýšená koncentrace MT byla pozorována rovněž u mnoha typů nádorových buněk. Přestože použití MT jako nádorového markeru není doposud díky nejednoznačné interpretaci příliš rozšířeno, je známo, že exprese MT je závislá na stupni diferenciaci nádoru, stádiu onemocnění a dalších charakteristikách nádorových buněk [13].

Je známo, že MT může buď přímo nebo přes vazbu Zn^{2+} (de)aktivovat celou řadu proteinů spojených s nádorovými onemocněními. Jako příklad lze uvést tumor-supresorový protein p53, jehož aktivní konformace je závislá na vazbě Zn^{2+} . Apo-MT je schopen vazby Zn^{2+} ze struktury proteinu p53 a tím jeho inaktivace, což se projeví jako snížení afinity proteinu p53 k DNA a znemožnění spuštění pro-apoptotických signálů [14]. Mimo to, že se MT stará o homeostázi kovů v buňce a udržuje hladinu volných radikálů, chrání buňku také proti cizím potenciálně škodlivým látkám. Tato skutečnost může výrazně snížit efektivitu protinádorové léčby [15]. Vztah MT k nádorovému bujení doposud není zcela objasněn a v současné době je proto téma v centru zájmu mnoha vědeckých skupin [16-20].

1.6 Závěr

Metalothionein (MT) je nízkomolekulární protein s vysokým obsahem cysteinu, který se vyskytuje ve všech organismech. Tento protein ovlivňuje homeostázu iontů kovů, které se váží do jeho struktury. Navíc je známo, že MT vstupuje do oxidačně-redukční rovnováhy uvnitř buněk, ovlivňuje transport iontů kovů a reguluje exprese řady významných genů. Zkoumání metalothioneinu s cílem jeho využití v nanotechnologiích pro diagnostiku nádorových onemocnění má jistě velký význam a lze pravděpodobně očekávat jeho využití jako nádorového markeru.



Obrázek 1: Jednotlivé kroky přípravy vzorku pro stanovení MT.

Seznam použité literatury

1. A. T. Miles, G. M. Hawksworth, J. H. Beattie and V. Rodilla, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (2000) 35.
2. S. R. Davis and R. J. Cousins, *Journal of Nutrition*, 130 (2000) 1085.
3. M. Sato and M. Kondoh, *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 196 (2002) 9.
4. D. H. Hamer, *Marine Environmental Research*, 24 (1988) 171.
5. R. Nath, R. Kambadur, S. Gulati, V. K. Paliwal and M. Sharma, *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27 (1988) 41.
6. M. Karin, R. L. Eddy, W. M. Henry, L. L. Haley, M. G. Byers and T. B. Shows, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 81 (1984) 5494.
7. I. Bremner, *Methods in Enzymology*, 205 (1991) 25.
8. R. J. Cousins, *Physiological Reviews*, 65 (1985) 238.
9. R. Studer, C. P. Vogt, M. Cavigelli, P. E. Hunziker and J. H. R. Kagi, *Biochemical Journal*, 328 (1997) 63.
10. R. X. Jin, J. X. Huang, P. H. Tan and B. H. Bay, *Pathology & Oncology Research*, 10 (2004) 74.
11. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes and V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, 2003.
12. N. R. Bachur, S. L. Gordon and M. V. Gee, *Cancer Research*, 38 (1978) 1745.
13. S. E. Theocharis, A. P. Margeli, J. T. Klijanienko and G. P. Kouraklis, *Histopathology*, 45 (2004) 103.
14. C. Meplan, M. J. Richard and P. Hainaut, *Oncogene*, 19 (2000) 5227.
15. R. P. Perez, *European Journal of Cancer*, 34 (1998) 1535.
16. M. Kremplova, L. Krejcova, D. Hynek, P. Barath, P. Majzlik, V. Horak, V. Adam, J. Sochor, N. Cernei, J. Hubalek, R. Vrba and R. Kizek, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 5893.
17. S. Takahashi, *Journal of Hematology & Oncology*, 5 (2012).
18. M. Namdarghanbari, W. Wobig, S. Krezoski, N. M. Tabatabai and D. H. Petering, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16 (2011) 1087.
19. S. Krizkova, M. Masarik, P. Majzlik, J. Kukacka, J. Kruseova, V. Adam, R. Prusa, T. Eckschlager, M. Stiborova and R. Kizek, *Acta Biochimica Polonica*, 57 (2010) 561.
20. A. Vasatkova, S. Krizova, O. Krystofova, V. Adam, L. Zeman, M. Beklova and R. Kizek, *Neuroendocrinology Letters*, 30 (2009) 163.