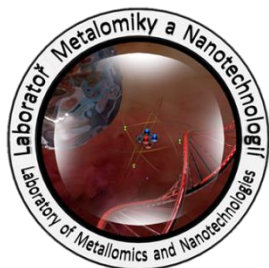




Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



## Monitorování hladiny metalothioneinu a thiolových sloučenin u biologických organismů vystavených působení kovových prvků a sloučenin

Ing. Kateřina Tmejová, Ph. D., Mgr. et Bc. Markéta Komínková, Mgr. Natalia Cernei, Ph. D., Mgr. Zbyněk Heger, Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký, Ph. D., Ing. Iva Blažková, MUDr. Jaromír Gumulec, Ing. et Ing. David Hynek, Ph. D., Mgr. Ondřej Zítka, Ph. D., Doc. RNDr. Pavel Kopel, Ph. D., Prof. Inf. René Kizek, Ph. D.

### ÚVOD

Metallothionein (MT) je nízkomolekulární protein (500-1400 Da, objevený v ledvinné kůře koní), jenž je bohatý na cysteiny a neobsahuje žádné aromatické aminokyseliny. Díky SH-skupinám ve své struktuře váže ionty kovů (např. Cu, Zn) a tak se aktivně zapojuje do homeostázi těchto iontů do organismu. Působí také při intoxikaci těžkými kovy (Hg, Pb, Cd) dokáže kovy navázat a tím zneškodnit pro buňku; následná detoxikace proběhne v ledvinách. MT má také antioxidační vlastnosti (regulace volných kyslíkových radikálů). Na základě pokusů se MT jeví jako vhodný rakovinový marker.

MT lze podle primární struktury a organismu, ze kterého byl MT izolován, lze MT rozdělit do 3 skupin: třída I (MT-I) – savčí MT, jedno-řetězcové polypeptidy, počet aminokyselin 61-68; třída II (MT-II) – MT přítomné u některých prokaryot, kvasinek a nižších rostlin; rozdíl mezi MT-I a MT-II – počet aminokyselin; třída III (MT-III) – rostlinné MT, tzv. fytochelatiny.

Hlavní funkcí MT v organismu je schopnost regulovat expresi. MT lze popsat jako zásobník Zn, proto dokáže přenášet esenciální kovy na transkripční faktory a tak je aktivovat. Aktivované transkripční faktory se váží na regulační sekvence DNA a spouští transkripci. Tohoto mechanismu se využívá např. při léčbě pacientů s otravou způsobenou těžkými kovy,



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



kdy se pacientům podává zinek (ten přes transkripci genu pro MT, který kromě zinku, váže také toxické ionty těžkých kovů a tím pomáhá detoxikaci organismu). Dále má MT antioxidační funkci. Pro zachování funkce buněčných aparátů je třeba zlikvidovat kyslíkové radikály; to se děje oxidací jiných látek - antioxidantů, které podléhají oxidaci na místo

důležitých buněčných komponentů; vedle specifických enzymů mají „ochrannou“ funkci také thioly (např. MT a glutatiol), což jsou neenzymatické látky, které dokážou vytvářet oxidačně redukční prostředí a za určitých podmínek jsou schopny se vzájemně oxidovat či redukovat. MT reguluje hladinu volných radikálů také nepřímo - navázáním iontů kovů (Cu), jež jsou potenciálními producenty těchto radikálů, a likvidací hydroxylových radikálů, které jsou pro buňku nebezpečné (zdroj radikálů např. RTG záření).

MT je také studován jako nádorový marker: u proliferujících buněk byla pozorována vyšší hladina MT (koncentrace je závislá na stupni diferenciaci nádoru, stádiu onemocnění i jiných charakteristikách tumorových buněk). Rozmnožující se buňky zřejmě potřebují Zn pro nově exprimované enzymy či pro regulační proteiny, což potvrzuje důležitost MT jako nádorového markeru. Při zvýšené koncentraci apo-MT může tento protein vyvázat Zn z tumor-supresorového proteinu (p53) a tím zhoršit schopnost navázat se na DNA a spustit signály pro apoptózu; MT chrání buňku proti potenciálním škodlivým látkám, což může výrazně snížit efektivitu protinádorové léčby cytostatiky; řada studií ukázala zvýšenou expresi MT v různých lidských tumorových buňkách (nádor jater, ledvin, močového měchýře, nosohltanu, plic, prostaty, prsu, slinných žláz, štítné žlázy, tlustého střeva, vaječnicků a varlat), ale u tumorů jako jsou hepatocelulární karcinom a jaterní adenokarcinom je hladina MT snižována. Proto není exprese MT všeobecná pro všechny lidské nádory, ale může záviset na jejich typu a stupni proliferace spolu s dalšími tkáňovými faktory a genovými mutacemi.

### PRAKTICKÁ ČÁST

Prvním krokem pro stanovení metalothioneinů je příprava vzorků a to např. z tkáně. Příprava vzorku zahrnuje několik níže popsaných kroků a jako roztok pro přípravu je používán fosfátový pufr o pH 7 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 M) nebo Tris-HCl. Vzorky jsou ředěny pufrům v množství ekvivalentním desetinásobku hmotnosti tkáně. Vzorek je homogenizován sonikací ultrazvukovým přístrojem, u celistvých tkání nebo pletiv je lepší použít mechanického rozrušování pomocí mixeru. Konkrétní postup je následující: Navážíme 100 mg vzorku (tkáně), následně se přidá 1 ml fosfátového pufru o pH 7. Vzorek se rozmixuje pomocí mechanického homogenizátoru ULTRA – TURBAX T8 (IKA – WERKE) po dobu 5 min. a pomocí mechanického homogenizátoru SCHUTT. Poté byl vzorek vortexován po dobu 15 min. Po celou dobu homogenizace se vzorky pracuje na ledu. Jako další krok je centrifugace vzorku po dobu 20 minut při 4°C, při 25000 g. Po centrifugaci odebereme 10 µl vzorku, ke kterému se přidá 990 µl fosfátového pufru. Jako poslední krok



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „in vivo“ zobrazovacích technik

[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/nanolabsys/](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/)

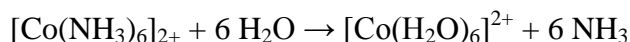
pro separaci metalothioneinu od ostatních proteinů je využito

skutečnosti, že MT je termostabilní, takže vzorek je denaturován v termobloku (99°C, 20 minut). Na konec je

centrifugován při 4°C, 16400 rpm po dobu 30 min, čímž je docíleno oddělení buněčných kompartmentů od cytoplazmy. Odebraný supernatant je použit pro analýzu MT. Výše popsaným způsobem mohou být na metallothionein analyzovány různé tkáně jako např. játra, svalová tkáň, sperma a další.

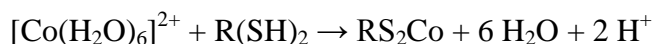
Jako další biologický vzorek může být analyzována např. krev a krevní plazma, které se odebere 10 µl vzorku, přidá se 990 µl fosfátového pufru. Vzorek je denaturován v termobloku (99°C, 20 minut) a poté zcentrifugován (4°C, 16400 rpm, 30 min). Pokud je po stočení ve zkumavce přítomen nějaký sediment, supernatant se přepipetuje do nové zkumavky a v takto připraveném vzorku lze stanovovat metallothionein. Všechny výše popsané postupy mohou být provedeny na automatické pipetovací stanici EP-Motion, jenž umožňuje rychlou a přesnou přípravu až 24 vzorků v jedné sadě.

Elektrochemická detekce metalothioneinu (MT) se provádí v Brdičkově roztoku, jenž je složen z 1mM  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  a 1mM amonného pufru  $\text{NH}_3$  (aq) s  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Typický voltamogram je zobrazen na **obrázku 1B**. Voltamogram obsahuje 3 píky označené Co (II), resp.  $\text{RS}_2\text{Co}$ , Cat1 a Cat2. Pík  $\text{RS}_2\text{Co}$  souvisí s redukcí kobaltitých kationtů v elektrolytu, Cat1 a Cat2 je signál vodíkový iontů generovaných použitým elektrolytem v přítomnosti MT. Stanovení metalothioneinu v Brdičkově elektrolytu se dáno katalytickou reakcí v Brdičkově roztoku. Zmíněný roztok je složen z amonného pufru (chlorid amonný a amoniak) a kobaltitého komplexu (chlorid hexaamminokobaltitý komplex). Chemické jevy popsané níže se zakládají na interakci  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  s  $-\text{SH}$  skupinou proteinu. Jako elektrolyt je použit již zmíněný amonný pufr s vysokým pH. Nejprve dochází redukci  $\text{Co}^{3+}$  na  $\text{Co}^{2+}$  za vzniku  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$  (**Obr. 1A**). Protože kobaltitý ion je zařazen mezi tzv. tvrdé kationty a amino skupina mezi tzv. tvrdé anionty, je vzniklý komplex stabilní. Po redukci vzniká kobaltnatý ion, který je již větší, má menší povrchovou hustotu náboje a je tudíž měkký. Stabilita komplexu měkkých a tvrdých kyselin a bází je nízká a produkt redukce (hexaamminkobaltnatý ion) je hydrolyzován podle následující reakce:

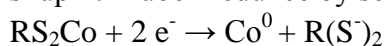


Vzniklý amoniak zvyšuje pH a tím vytváří podmínky pro katalytickou reakci, která by mohla proběhnout později s využitím  $\text{NH}_4^+$  kationtu. První redukce kobaltu z oxidačního čísla III na II vytvoří polarografickou vlnu v potenciálu přibližně  $E_p = -0,3 \text{ V}$ . Následná redukce nepříliš stabilního hexaaquakobaltnatého na čistý kobalt probíhá při potenciálu  $-1,2 \text{ V}$ . Jako výsledek redukce  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  v amonném pufru tedy vzniknou dvě polarografické vlny v potenciálu přibližně  $E_p = -0,3 \text{ V}$  ( $\text{Co}^{3+} \rightarrow \text{Co}^{2+}$ ) a  $E_p = -1,2 \text{ V}$  ( $\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Co}^0$ ).

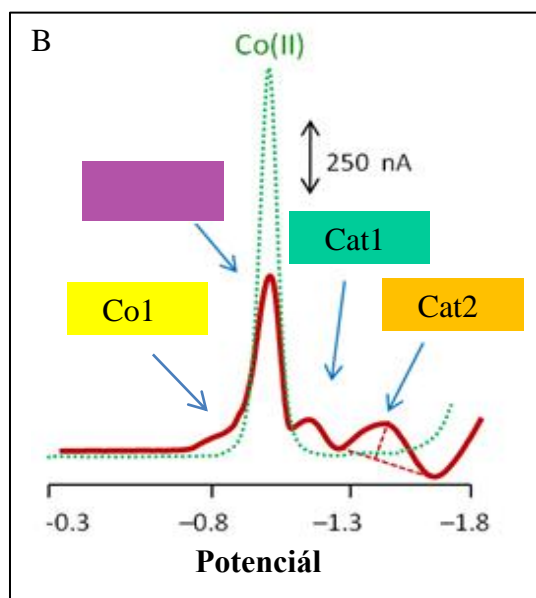
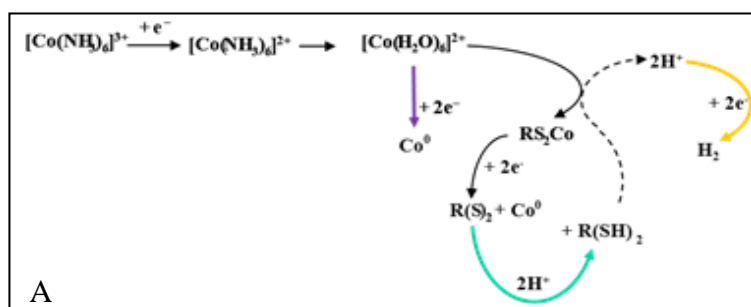
Pokud by ale přidaná látka obsahovala sulfhydrylové skupiny, následné reakce by po první redukci probíhaly následovně. První signál je opět signál redukce kobaltitého komplexu na kobaltnatý. Ale protože –SH skupiny (potažmo –S–) jsou měkké báze (díky velikosti a hustotě náboje), vzniká stabilní komplex  $RS_2Co$  podle rovnice:



Druhý signál není tedy redukcí  $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ , ale  $Co^{2+}$  navázaného v komplexu thiolových skupin. Průběh redukce by se dal popsat následovně:



Při vyšších koncentracích thiolových chelátů může být pozorován i pík Co1, který odpovídá redukci  $[Co(H_2O)_6]^{2+}$  a který se nalézá v kladnějším potenciálu než pík redukce  $RS_2Co$ . Vodíkové ionty, vzniklé záměnou ligandů vody za sulfhydrylové skupiny, jsou absorbovány molekulami amoniaku za vzniku amonných iontů.



Obr. 1. (A) Schéma vzniku jednotlivých piků při detekci MT v Brdičkově elektrolytu. (B) Elektrochemický záznam Brdičkova elektrolytu (zelená čára), elektrochemický záznam MT v Brdičkově elektrolytu (červená čára).





Po redukci  $\text{Co}^{2+}$  na  $\text{Co}^0$  je skupina  $\text{R(S}^-)_2$  okamžitě protonována  $\text{NH}_4^+$  skupinou a sloučenina je obnovena a schopna vázat další hexaakvokobaltnaté ionty. Poslední dva signály (Cat1 -  $E_p = -1,35 \text{ V}$  a Cat2 -  $E_p = -1,48 \text{ V}$ ) jsou po přidání sloučeniny s  $-\text{SH}$  skupinami katalytické

povahy. Cat2 je zřejmě výsledkem redukce  $\text{H}^+$  iontů vzniklých z reakce mezi  $\text{R(SH)}_2$  a  $[\text{Co(H}_2\text{O)}_6]^{2+}$ . Jedná se o katalytický jev, protože po zvýšení teploty byl pozorován úbytek signálu, což nasvědčuje závislosti na povrchové reakci. Reakce  $\text{R(SH)}_2$  s  $[\text{Co(H}_2\text{O)}_6]^{2+}$  probíhá na povrchu elektrody a  $\text{R(SH)}_2$  je katalyzátorem vývoje vodíku z elektrolytu.

Bylo zjištěno, že při použití Brdičkovy reakce je analyzována hladina MT, a výška posledního signálu ( $-1,48 \text{ V}$ ) na voltamogramu Brdičkovy reakce s reálným vzorkem je závislá na jeho koncentraci.

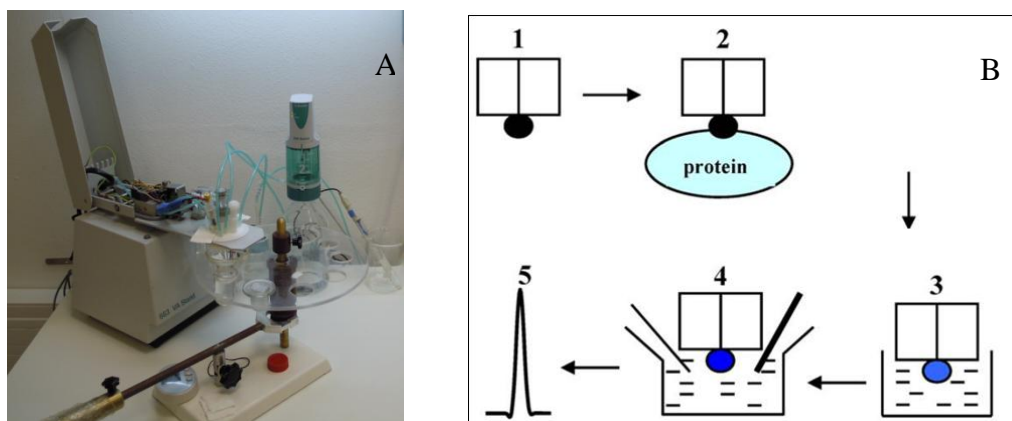
MT je možné elektrochemicky stanovit dvě způsoby: v elektrochemické cele nebo adsorptivní přenosovou technikou (AdTs). Dále se budeme zabývat pouze druhou variantou, jenž je citlivější metodou nevyžadující tak velkou spotřebu vzorku. Na každé měření (měření jednoho vzorku se provádí minimálně ve třech opakováních) je třeba  $5 \mu\text{l}$  vzorku. Jako pracovní elektroda je při elektrochemickém měření použita rtuťová elektroda (HMDE), jako pomocná glassy carbon a jako referenční elektroda je používána elektroda  $\text{Ag/AgCl/3 M KCl}$ .

Samotné měření je započato vnesením proudu argonu do elektrolytu (20 s) pro dostatečné promíchání vzorku v základním elektrolytu a odstranění přebytečného kyslíku. Měření je prováděno diferenční pulzní voltametrií (DPV). Parametry měření jsou následující: akumulace vzorku na povrchu pracovní elektrody ( $E = 0 \text{ V}$ , 120 s), začátek záznamu je nastaven na počáteční potenciál  $-0,70 \text{ V}$ , koncový potenciál je  $-1,75 \text{ V}$ , modulační čas  $0,057 \text{ s}$ , časový interval  $0,2 \text{ s}$ , potenciálový krok  $2 \text{ mV}$ , modulační amplituda  $-250 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{ads}} = 0 \text{ V}$ . Tento měřicí cyklus je opakován třikrát. Nutné je neustálé chlazení elektrolytu a měřených vzorků ( $5^\circ\text{C}$ ).

Samotné měření je prováděno na ručním standu (obr. 2A) a samotné měření probíhá v následujících krocích (obr. 2B):

- 1) zapnout potenciostat a PC
- 2) spustit program GPES a zapnout argon
- 3) dobře vymýt elektrochemickou nádobku
- 4) dát libovolné množství Brdičkova elektrolytu do nádobky
- 5) omýt kapiláru vodou
- 6) nadávkovat  $5 \mu\text{l}$  vzorku na parafilm
- 7) nechat vzorek 2 min inkubovat na HMDE (visící rtuťová kapková elektroda)

- 8) omýt pracovní elektrodu s naabsorbovaným vzorkem a pracovní elektrodu se vzorkem přenést do měřicí nádoby
- 9) po zapnutí programu GPES probíhá měření, které je nutné opakovat 3x
- 10) vyhodnocení naměřených dat v programu GPES; výstupem je v **obr. 1A**.



Obr. 2. (A) Ruční stand pro měření metodou AdTs nebo v elektrochemické cele. (B) Detailní schéma provedení adsorptivní přenosové techniky.