

CHARACTERIZATION OF VARIOUS SPECIES OF BIRDS WITH RESPECT TO CONTENT OF METALLOTHIONEIN

CHARAKTERIZACE RŮZNÝCH DRUHŮ PTÁKŮ S OHLEDEM NA OBSAH METALOTHIONENINU

Šobrová P.¹⁾, Blašík O.¹⁾, Svoboda M.¹⁾, Diopan V.^{1,2)}, Adam V.¹⁾, Beklová M.³⁾, Pikula J.³⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾Ústav chemie a biochemie, ²⁾Ústav biologie rostlin a ⁴⁾Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ³⁾Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno

E-mail: papaya1@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Metallothionein (MT) belongs to group of intracellular, low-molecular and cysteine-rich proteins with molecular weight from 6 to 10 kDa. Owing to high affinity to heavy metals (Zn, Cd, As, etc.) their main role is homeostatic control and detoxification of metals ion in an organism. In the present work the content of metallothionein in tissues of various species of animals has been determined. Particularly, attention was paid to analysis of contents of MT in blood serum of birds' species as follows pheasant, quail, partridge, guineafowl and turkey. MT was detected by adsorptive transfer stripping technique in connection with differential pulse voltammetry - Brdicka reaction, whereas the results obtained were evaluated supported by artificial neural network. Based on the results obtained we can characterize of different species of birds according to contents of MT.

Keywords: metallothionein, electrochemical analysis, samples of birds blood serum.

ABSTRAKT

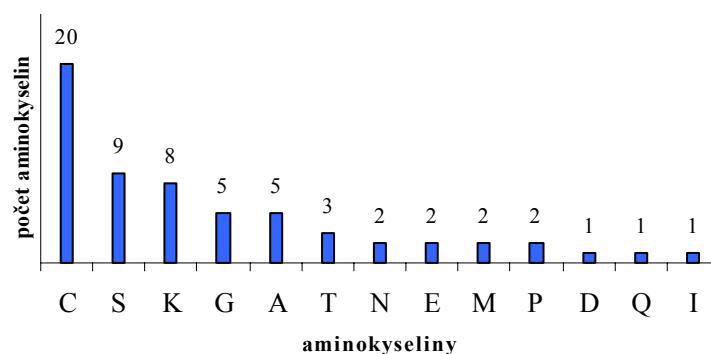
Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních, na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa. Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům (Zn, Cd, As, atd.) je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace iontů kovů. V naší práci byl studován obsah metalothioneinu u vybraných tkání různých druhů zvířat. Pozornost byla věnována analýze obsahu MT v krevním séru ptáků (bažant, křepelka, orebice, perlička a krocan). MT jsme detekovali adsorptivní přenosovou technikou ve spojení s diferenční pulzní voltametrií – Brdičkova reakce a získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí neuronové sítě. Z našich výsledků usuzujeme, že podle obsahu MT lze charakterizovat různé druhy ptáku.

Klíčová slova: metallothionein, elektrochemická analýza, vzorky krevního séra ptáků.

ÚVOD

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein bohatých proteinů (Obr. 1) o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa [1,2]. Ze strukturních modelů lze předpokládat, že molekula MT se skládá ze dvou vazebných domén α a β které jsou složeny z cysteinových klastrů. Kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů. N-terminální část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty a C-terminální část (α -doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem až 12 atomů. Klasifikačně byly MT rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého byly izolovány. MT-I zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené 61 až 68 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6–7 kDa. MT-I jsou rozděleny na jednotlivé isoformy, které se liší počtem aminokyselin avšak počet cysteinů je stejný. Ve II. třídě jsou zařazeny bakteriální MT, proteiny se vzdálenou podobností k I. třídě [3].

Obr. 1 Zastoupení aminokyselin v molekule metalothioneinu. (C – cystein, S – serin, K – lysin, G – glycin, A – alanin, T – threonin, N – asparagin, E – kyselina glutamová, M – methionin, P – prolin, D – kyselina asparagová, Q – glutamin, I – isoleucin).



Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům (Zn, Cd, As, atd.) je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace iontů kovů. Schopnost MT transportovat kov do regulačních proteinů má význam v procesu karcinogeneze. MT jsou také důležité látky z hlediska ochrany proti radiačnímu a oxidačnímu stresu. Poslední dobou jsou MT intenzivně zkoumány v tkáních nervového systému savců [4].

Ke stanovení MT jako proteinu vážící těžké kovy je využita řada metod. Vysoce citlivé, rychlé a selektivní jsou metody elektrochemické a elektroanalytické. Pro elektrochemické studium MT je významná přítomnost sirtých zbytků na molekulách cysteinu (R-SH) a cystinu (R-SS-R). Často používanou elektrochemickou metodou pro studium MT je voltametrie zapojená v diferenčním pulzním módu (DPV) nebo derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA) umožňují studium vazby kovů do

struktur MT [5-7]. Pomocí CPSA v kombinaci s technikou adsorptivního přenosu (AdTS) lze stanovovat koncentrace na úrovni femtomolů ve velmi malých objemech vzorku. Ke studiu fyziologických koncentrací MT u celé řady organismů se využívá Brdičkovy reakce stanovované pomocí DPP či DPV [8]. Kromě zmíněných elektrochemických metod, také square wave voltametrií (SWV), která umožnila sledovat schopnost peptidu vytvářet komplex s ionty zinku [9].

V naší práci byl studován obsah metalothioneinu u vybraných druhů ptáků. Pozornost byla věnována analýza obsahu MT v plazmě bažanta, křepelky, orebice, perličky a krocana. Výsledky získané z průběhu katalytických reakcí při stanovování metalothioneinu jsme podrobili vyhodnocení umělé neuronové sítě.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

$\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, MT a další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA). K přípravě pufrů a standardních roztoků MT byla použita voda ACS čistoty od Sigma Aldrich. Při přípravě pufrů byly pH hodnoty měřeny pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), řízeného počítačem se softwarem (MultiLab Pilot, Weilheim, Německo).

Příprava biologických vzorků pro stanovení metalothioneinu

Pro přípravu vzorku pro je nutné dbát profilu použitého biologického materiálu. Pro analýzu MT lze použít buňky, pletiva a tkáň, které bývají následně homogenizovány. Homogenizaci celistvých pletiv a tkání, která se nedá provádět přímou sonikací, je možno provést přímou dezintegrací v mixéru a nebo za použití kapalného dusíku. Dále jsou vzorky denaturovány 15 min. při 99°C. Zde se využívá termostabilita MT, kdy dojde k zdenaturování proteinů a MT zůstává nezdenaturovaný v supernatantu [10].

Elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ a 1 mol.dm⁻³ amonný pufr; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9,6) byl po každých 3 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0$ V, teplota 20 °C.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Metodu pro polarografické stanovení proteinů obsahujících –SH skupiny na rtuťové elektrodě publikoval Brdička [11,12] a dále ji vyvíjeli Paleček a kol. [13]. Jedná se o katalytické reakce proteinů v Brdičkově soluci, která se sestává z amoniakálního pufru ($\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$) a komplexu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ [14,15].

V námi modifikovaném stanovení MT pomocí Brdičkovy reakce byly pozorovány čtyři signály. Je pravděpodobné, že katalytické signály vylučování vodíku ze základního elektrolytu jsou pozorovány kolem potenciálu $-1,5$ V. Další signál, který se objevuje kolem potenciálu $-1,3$ V odpovídá redukci komplexu RS_2Co . Při 5 pmol MT je možné popsat výrazný katalytický signál při potenciálu $-1,5$ V, a méně vyvinutý signál komplexu RS_2Co , dále signály pravděpodobné redukce $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ kolem potenciálu $-1,2$ V (označeno jako Co_1) a $-0,8$ V (Co_2). Signál Co_2 se snižující koncentrací MT postupně snižuje a posouvá se směrem k negativním potenciálům. Od koncentrace $0,5$ pmol MT je signál již velmi málo rozlišitelný a byl pozorován kolem potenciálu $-1,1$ V. U ostatních pozorovaných signálů s klesající koncentrací roste rozlišitelnost jednotlivých signálů Brdičkovy reakce. V našem experimentu jsme také testovali vliv teploty na stanovení MT v rozmezí $5, 10, 18, 25$ a 30 °C. Ze získaných experimentálních výsledků jsme zvolili 5 °C, která je neoptimálnější pro stanovení MT. Navíc jsme studovali vliv koncentrace ($0,12; 0,25; 0,5; 0,7$ a 1 mM) kobaltové sluce $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ na pozorované AdTS DPV signály MT. Ze získaných výsledků bylo zřejmé, že zvyšující se koncentrace kobaltové sluce zvyšuje katalytický signál Cat. A signál Cat se s touto zvyšující koncentrací posouvá směrem k pozitivnějšímu potenciálu. V další části experimentů jsme sledovali závislost na koncentraci. Sledovali jsme signály RS_2Co a Cat. Oba sledované signály se s klesající koncentrací lineárně snižovaly ($y_{\text{RS}_2\text{Co}} = 0.9002x + 15.521$; $R^2 = 0.995$ a $y_{\text{Cat}} = 0.6616x + 10.211$; $R^2 = 0.9955$). Limit detekce byl určen jako $3S/N$ a pohyboval se kolem 500 amol (750 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 100 fM).

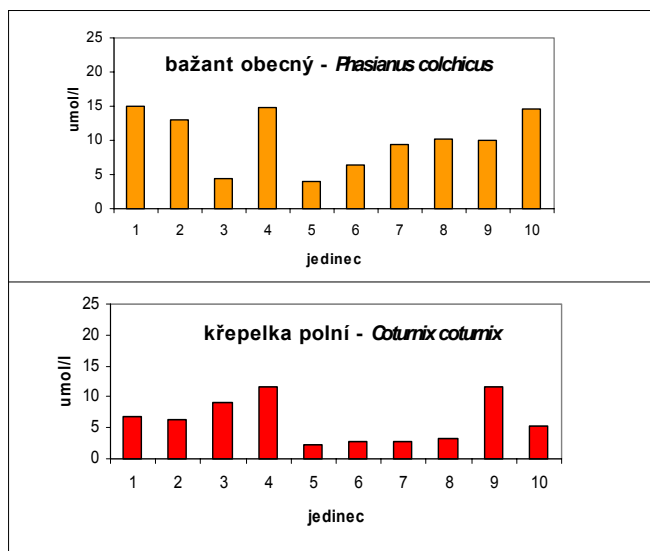
Využití navržených postupů pro stanovení metalothioneinu v krevní plazmě ptáků

V současnosti prakticky není známa žádná analytická metoda pro rutinní stanovení MT v tělních tekutinách. Proto byl námi navržený postup ověřen pro detekci MT v krevním séru ptáků (bažant, křepelka, orebice, perlička a krocan). Každý vzorek byl nejdříve pečlivě upraven. Získané homogenáty obsahují pouze termostabilní proteiny, mezi něž MT náleží. Vlastní analýza MT byla provedena modifikovaným elektroanalytickým postupem. Studovaný vzorek byl adsorbován z 5 μl kapky na povrch pracovní elektrody, poté je přebytečný roztok z povrchu elektrody omyt a modifikovaná elektroda je umístěna do měřicí nádoby. Množství obsaženého MT ve studovaných vzorcích bylo určeno metodou standardního přídatku.

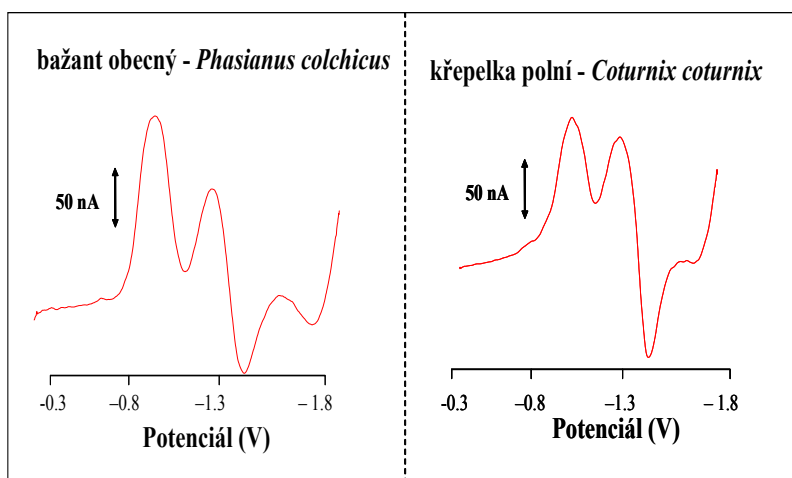
Na obrázku 2 jsou zobrazeny výsledky analýzy deseti vzorků krevní plazmy odebraných od bažantů obecných a křepelky polní. Z výsledků je jasně patrné, že se obsah MT u vzorků krevní plazmy bažanta obecného a křepelky polní liší. Průměrná hladina MT u vzorků bažantů byla v průměru o 30 vyšší než v případě křepelky. A navíc jsme během

analýzy zjistili velmi zajímavý jev a to, že se elektrochemické záznamy analýzy obsahu MT v krevní plazmě vybraných ptačích druhů liší (Obr. 3).

Obr. 2 Obsah MT u vzorků bažanta obecného a křepelky polní (n = 10).



Obr. 3 Typické AdTS DP voltamogramy analýzy krevní plazmy bažanta obecného a křepelky polní.



Umělá neuronová síť

Výsledky získané pomocí Brdičkovy reakce byly následně vyhodnoceny neuronovou sítí. Jedná se o distribuovaný výpočetní systém sestávající z dílčích podsystémů (neuronů), který je inspirován neurofyziologickými poznatky o struktuře a činnosti neuronů a nervových systémů živých organismů a který je ve větší či menší míře realizuje. Umělé neuronové sítě se snaží napodobit funkci biologické mozkové tkáně. Mají schopnost učit se a generalizovat své znalosti. Také mají schopnost extrahovat a reprezentovat závislosti v datech, které nejsou

zřejmé. Snažili jsme se prokázat souvislost mezi námi získanými hodnotami a druhem organismu, kterého jsme analyzovali, pomocí algoritmů neuronové sítě. Vyhodnocením výsledků získaných z analýzy obsahu metalothioneinu a matematických algoritmů jsme usilovali o přiřazení vzorku krve k danému druhu.

ZÁVĚR

Geny pro MT jsou již dlouhou dobu studovány, ale o vlastním obsahu MT u jednotlivých druhů organismů toho je známo velmi málo. Pomocí našich výsledků jsme zmapovali množství MT u vybraných druhů ptáků, což by mohlo v budoucnu sloužit jako porovnání ke genomovým studiím a k identifikaci jednotlivých druhů, ale i rodů a to nejen u ptáků ale i u všech savců.

LITERATURA

- [1] R. Kizek, J. Vacek, V. Adam and B. Vojtěšek Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě, *Klin. Biochem. Metab.* 12 (2004) 72-78.
- [2] J.H.R. Kagi and A. Schaffer *Biochemistry of Metallothionein*, *Biochemistry* 27 (1988) 8509-8515.
- [3] D.H. Hamer *Metallothionein*, *Annual Review of Biochemistry* 55 (1986) 913-951.
- [4] J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta and M. Vašák Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 133-145.
- [5] R. Kizek, L. Trnkova and E. Palecek Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4801-4807.
- [6] L. Trnkova, R. Kizek and J. Vacek Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 57-61.
- [7] V. Adam, J. Petrlova, D. Potesil, J. Zehnalek, B. Sures, L. Trnkova, F. Jelen and R. Kizek Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor, *Electroanalysis* 17 (2005) 1649-1657.
- [8] R.W. Olafson and P.E. Olsson Electrochemical detection of metallothionein, *Meth. Enzymol.* 205 (1991) 205-283.
- [9] F.A. Armstrong, H.A. Heering and J. Hirst Reactions of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry, *Chem. Soc. Review* 26 (1997) 169-179.
- [10] I.M. Kolthoff, K. Yamashita, T.B. Hie and A. Kanbe Characteristics of Polarographic Catalytic Waves Observed with Bovine Serum Albumin: Kinetic or Diffusion Control, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (1973) 2020-2024.

- [11] R. Brdička Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part XXXII. - Activation of Hydrogen in Sulphydryl Group of Some Thio-Acids in Cobalt Salts Solutions, Coll. Czech. Chem. Commun. 5 (1933) 148–164.
- [12] R. Brdička Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part XXXI. - A New Test for Proteins in The presence of Cobalt Salts in Ammoniacal Solutions of Ammonium Chloride, Coll. Czech. Chem. Commun. 5 (1933) 112–128.
- [13] E. Paleček and Z. Pechan Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse polarographic techniques, Anal. Biochem. 42 (1971) 59–71.
- [14] R. Brdička Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part LXI. - The Effect of buffer Solutions on the Reaction of Proteins, Coll. Czech. Chem. Commun. 8 (1936) 366–376.
- [15] R. Brdička, M. Březina and V. Kalous Polarography of proteins and its analytical aspects, Talanta 12 (1965) 1149–1162.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována grantem MSMT 6215712402.