

METALLOTHIONEIN AS A BIOMARKER OF HEAVY METALS POLLUTING OF ENVIRONMENT

METALOTHIONEIN JAKO BIOMARKER PŘÍTOMNOSTI TĚŽKÝCH KOVŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Diopan V.^{1,2)}, Húska D.¹⁾, Zítka O.¹⁾, Křížková S.¹⁾, Šobrová P.¹⁾, Beklová M.³⁾, Adam V.¹⁾, Svobodová Z.⁴⁾, Havel L.²⁾, Kizek R.¹⁾

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

E-mail: xdiopan@node.mendelu.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Heavy metals are important environmental pollutants. They come to environment, most of all, from anthropogenic sources. A determination of content of heavy metals has been obviously using for assessment of environmental polluting. On the other hand we found out that other way, determination of low molecular cysteine-rich protein called metallothionein (MT), could be used for the same purposes. This protein forms as specific protection against toxic metals in an organism. Here, we used earthworms as model organisms. MT was determined electrochemically by Brdicka reaction in the samples of interest. Earthworms have been treated by various doses of cadmium in soil for 7 days. Based on the results obtained the content of MT increased with increasing concentration of cadmium and length of treatment.

Key words: biomarker, electrochemistry, heavy metals, environment.

ABSTRAKT

Těžké kovy jsou významným polutantem v životním prostředí. Uvolňují se do něj především následkem průmyslové činnosti člověka. Pro posouzení stavu životního prostředí je možné určit obsah různých těžkých kovů. Zjistili jsme však, že je možné použít i jiný přístup a to sledovat obsah nízkomolekulárního na cystein bohatého proteinu metalothioneinu (MT) u organismů, které ve zkoumaném prostředí žijí. Tento protein se syntetizuje jako specifická obrana proti přítomnosti toxických kovů v organismu. V experimentu byly jako modelové organismy použity žížaly. MT se detekoval elektrochemicky pomocí Brdičkovy reakce po homogenizaci a denaturaci biologického vzorku. V experimentu se chovaly skupiny žížal v umělé půdě při různé koncentraci kadmia po dobu 7 dnů. Z obsahu MT vyplynulo, že se jeho koncentrace zvyšuje se zvyšující se koncentrací kovu a dobou působení.

Klíčová slova: biomarker, elektrochemie, životní prostředí, těžké kovy.

ÚVOD

Methalothioneiny jsou termorezistentní nízkomolekulární proteiny (6 - 10 kDa) bohaté na cystein, které byly objeveny v roce 1957. Na proteomickém serveru Expert Protein Analysis System (ExPASy) lze nalézt 4 skupiny methalothioneinových proteinů. Délka aminokyselinového řetězce u skupin MT 1, MT 2, MT 3 se pohybuje okolo 61 aminokyselin. U těchto proteinů převažují bazické aminokyseliny (pI = 8,3). Pouze MT 3 obsahuje 68 aminokyselin a má pI = 4,8 [1-3].

Hlavní úloha těchto proteinů pravděpodobně spočívá v detoxikaci organismu před kovy. Pro svůj vysoký obsah –SH skupin mají MT schopnost vytvářet stabilní komplexy s různými kovy a tím snižovat koncentraci toxicky působících iontů kovů v buněčných a mimobuněčných prostorech. Dále hraje důležitou roli i v dalších procesech jako buněčná proliferace, apoptóza a ochrana před oxidativním stresem [4]. Jeho vliv na chemorezistenci proti cytostatikům a radiologické terapii při léčbě nádorových onemocněních je studován [5-7].

Produkce MT je spouštěna v přítomnosti iontů kovů. Molekulární mechanismus zahrnuje účast transkripčního faktoru MTF-1 (metal-responsive transcription factor 1) nacházejícího se v cytoplazmě buňky, který vytváří komplex s MTI, což je represor a proto k transkripci nedochází (pouze bazální úroveň). Jakmile se v prostředí vytvoří dostatečná koncentrace kovů, ať již biogenních Cu, Zn, Fe nebo toxických Cd, Hg, Pb, interaguje iont kovů s MTI represorem a to má za následek rozpadnutí původního komplexu MTF-1 a represoru. Uvolněný transkripční faktor MTF-1 se váže k úseku DNA, který se nazývá MRE (metal-responsive element). Po této vazbě se zvýší transkripce. Výsledkem je zvýšená syntéza MT vázající nadbytečné ionty kovů. Pravděpodobně se tímto mechanismem reguluje homeostáza biogenních kovů, nicméně indukci vyvolávají i kovy toxické [8,9].

Předpoklad zvýšení syntézy MT toxickými kovy jsme využily v této práci k posouzení stupně znečištění životního prostředí těžkými kovy [10,11]. Běžně používané analytické metody jako jsou absorpční či emisní spektrometrie, popř. hmotnostní spektrometrie mohou stanovit koncentraci těžkých kovů. Nicméně tyto výsledky nám již nic neřeknou o celkovém dopadu těžkých kovů v prostředí na organismus a také o tom, jaké množství toxických iontů organismus považuje za škodlivé a brání se proti nim. Proto jsme využili metody elektrochemické pro stanovení MT, který lze použít jako biomarker znečištění těžkými kovy.

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).

Biologické vzorky

Skupiny žížal (*Eisenia fetida*) byly chovány v nádobách s pěti litry umělé půdy (OECD 207). V případě kontrolních skupin bylo do každé nádoby se žížaly přidáno 175 ml destilované vody, u ostatních skupin byly přidány různé koncentrace kadmnatých iontů. Bylo použito šest úrovní koncentrací Cd^{2+} (5, 10, 20, 30, 40 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Povrch půdy byl osvětlován světlem o intenzitě 450 luxu a žížaly byly chovány při pokojové teplotě. Experiment probíhal po dobu sedmi dnů. Každý den byla od všech koncentrací odebrána jedna žížala a analyzována na obsah MT.

Příprava biologických vzorků pro stanovení MT: Vzorky žížal o hmotnosti v rozmezí 0.1–0,5 g byli mechanicky homogenizovány v kapalném dusíku. Následně byl přidán čtyřnásobný objem fosfátového pufru 0,1 M o $\text{pH} = 7$. Poté se nechali třepat 15 minut (Vortex-2 Genie, Scientific industries, USA). Pro odstranění balastních proteinů se vzorek dále tepelně denaturoval při 99°C po dobu 15 minut v termomixeru (Eppendorf 5430, USA). Denaturovaný homogenát byl centrifugován (Eppendorf 5402, USA) při teplotě 4°C a 15000 g po dobu 30 minut.

Elektrochemická detekce MT

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodevém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky $0,4 \text{ mm}^2$; referenční elektrodou byla $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt ($1 \text{ mmol.dm}^{-3} \text{ Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ a 1 mol.dm^{-3} amonný pufr; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma Aldrich, ACS), $\text{pH} = 9,6$) byl po každých 3 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál $-0,6 \text{ V}$, konečný potenciál $-1,6 \text{ V}$, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok $1,05 \text{ mV/s}$, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0 \text{ V}$, teplota 5°C .

Vzorky po přípravě byly před vlastním měřením naředěny $1000 \times$. Pro stanovení MT byl vybrán třetí (CH_3) analytický signál. Měřící cela byla chlazená průtokovou celou připojenou k termostatu JULABO F12/ED (Labortechnik GmbH, Německo) na 5°C .

VÝSLEDKY A DISKUZE

Ionty těžkých kovů představují závažné zdravotní riziko pro živé organismy. Mezi velmi nebezpečné patří např. kadmium. Ionty tohoto kovu mají schopnost akumulace v biosféře a proto představují hrozbu pro všechny složky potravní pyramidy včetně člověka. Z tohoto důvodu je naprosto nezbytné monitorovat nejen koncentraci tohoto těžkého kovu v životním prostředí, ale také studovat jeho vliv na živé organismy a hledat nové způsoby hodnocení jeho toxicity.

Změny hladiny metalothioneinu u žížal vystavených kadmnatým iontům

O indukci MT u žížal bylo publikováno několik prací [12-14]. Navíc byla sledována distribuce isoformů pomocí speciálních technik [13,15,16]. Uvedené metody jsou vhodné pro stanovení MT, ale jsou náročné na instrumentaci. Pro určení MT jsou však velmi vhodné elektrochemické techniky, tak jak bylo ukázáno v řadě prací [5,6,17,18]. Obsah metalothioneinu byl analyzován pomocí naší upravené adsorptivní přenosové techniky ve spojení s diferenční pulsní voltametrií (Brdičkovy reakce) [8,18-20]. Pomocí uvedené velmi senzitivní elektroanalytické techniky bylo možno analyzovat MT v koncentracích pod $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ s chybou stanovení kolem 4-5%. Získaná kalibrační křivka při teplotě základního elektrolytu 5°C byla lineární ($y = 4.87x + 6.55$; $R^2 = 0.9946$). Na základě našich předešlých experimentálních dat byly homogenáty žížal před vlastní elektrochemickou analýzou naředěny ($10 \times$, $100 \times$ a $1000 \times$) [8]. Potvrdilo se, že ředění vzorku $1000 \times$ fosfátovým pufrům o pH 7.0 je velmi výhodné pro provedení elektrochemické analýzy. Díky uvedenému postupu se podařilo získat voltamogramy vzorků žížal s velmi dobře definovanými katalytickými signály MT (Cat1, Cat2 a Cat3). Pro naše účely byla studována změna signálu Cat3.

Průměrné výsledky analýzy MT u žížal vystavených účinkům Cd^{2+} a neexponovaných jsou uvedeny v tabulce 1. V obrázku číslo 1 jsou uvedeny výsledky, ukazující hodnoty „nově nesyntetizovaného“ MT v jednotlivých dnech u všech koncentrací toxického iontu. Tyto hodnoty byly získány odečtením obsahu MT exponovaných žížal od obsahu MT u kontrolní skupiny. U kontrolní skupiny byl obsah MT nízký pohyboval se mezi 19,8-48,5. Tyto rozdíly lze vysvětlit rozdílnou úrovní metabolismu případně genetickými odchylkami. Nejvyšší koncentrace MT byla podle předpokladů zjištěna u vzorků chovaných v prostředí 40 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ Cd^{2+} . Přičemž koncentrace 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ poskytovala největší odezvu a při vyšší dávce kadmia se již nezvyšovala, ale spíše klesala. Z tohoto usuzujeme, že rychlost exprese MT nad koncentrací 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ se již nezvyšuje a další dávky kadmia by vedly k vyčerpání detoxikační schopnosti organismu.

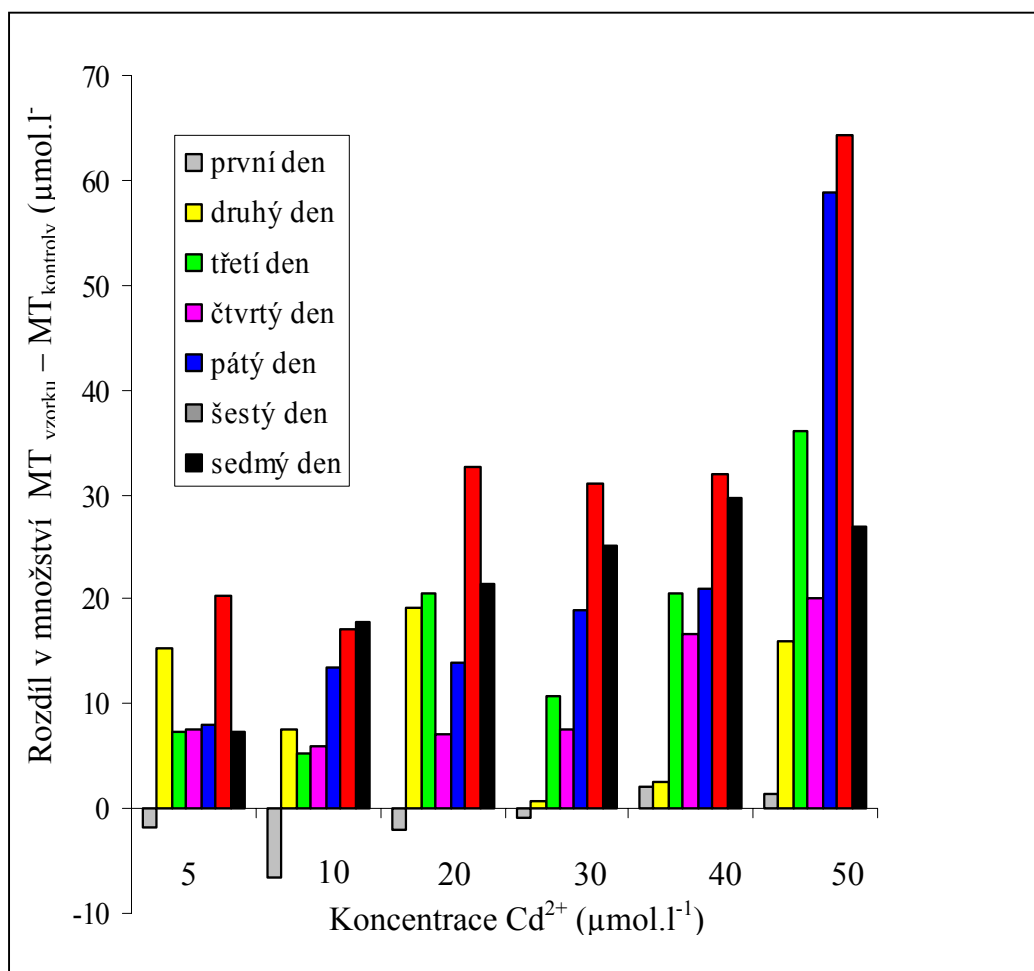
Tab. 1 Průměrné hodnoty množství metalothioneinu u žížal

Aplikované množství $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Koncentrace MT ^{a,b} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Standardní odchylka ^{a,b}	Koncentrace MT ^{a,b}	
			Maximum	Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)
0	31.6	10.3	48.5	19.8
5	38.0	15.0	56.1	17.9
10	39.1	13.3	52.6	13.1
20	45.4	15.5	68.2	17.8
30	48.3	16.3	64.7	20.5
40	53.3	25.1	95.6	21.9
50	53.5	26.2	99.9	21.2

^a ... počet analyzovaných vzorků: n = 5

^b ... objem vzorku (5 μl)

Obr. 1 Graf ukazuje nově nesyntetizovaný MT u jednotlivých koncentrací a dnech



V prvním dnu experimentu množství methalothioneinu u exponovaných žízář nevrstlo, ale lehce pokleslo proti kontrolní skupině. To mohlo být způsobeno interakcí přítomného methalothioneinu s Cd²⁺. Již druhý den (po 24 hodinách) se projevila syntéza MT a u všech koncentrací byl vzrůst patrný. Z grafu jasně vyplývá, že zvýšení množství MT je závislé na délce expozice a na koncentraci jakou byly žízář vystaveny.

ZÁVĚR

Provedli jsme experiment který měl ověřit použití metalothioneinu jako biomarkeru těžkých kovů v životním prostředí. Vystavili jsme žízář různým koncentracím kadmia, které bylo přidáno do půdy ve které se pěstovali. Sledovali jsme rychlost nástupu obrané reakce, její časovou závislost a závislost na koncentraci toxického iontu. Tak, že jsme měřili množství syntetizovaného MT. Výsledky jasně prokázali vzrůst detoxikačního proteinu v závislosti na čase působení tak i na koncentraci kademnatého iontu. Z těchto výsledků usuzujeme, že můžeme posoudit zátěž organismu těžkými kovy.

LITERATURA

- [1] J.G.R. Kagi and A. Schaffer Biochemistry of Metallothionein, *Biochemistry* 27 (1988) 8509-8515.
- [2] R. Kizek, L. Trnkova and E. Palecek Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 4801-4807.
- [3] 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.
- [4] L.S. Chubatsu and R. Meneghini Metallothionein Protects DNA from Oxidative Damage, *Biochemical Journal* 291 (1993) 193-198.
- [5] R. Prusa, J. Petrlova, J. Kukacka, V. Adam, B. Sures, M. Beklova and R. Kizek Study of interaction of glutathiones and metallothionein with cytostatics, *Clin. Chem.* 52 (2006) A175-A175.
- [6] R. Prusa, M. Svoboda, O. Blastik, V. Adam, O. Zitka, M. Beklova, T. Eckschlager and R. Kizek Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment, *Clin. Chem.* 52 (2006) A174-A175.
- [7] Y. Hishikawa, S. Abe, S. Kinugasa, H. Yoshimura, N. Monden, M. Igarashi, M. Tachibana and N. Nagasue Overexpression of metallothionein correlates with chemoresistance to platin and prognosis in esophageal cancer, *Oncology* 54 (1997) 342-347.
- [8] S. Krizkova, D. Huska, O. Blastik, O. Zitka, V. Adam, J. Kukacka, P. R., S. M., L. Trnkova, J. Zehnalek and R. Kizek Potential for metallothionein detection in blood serum and in full blood by using the Brdicka reaction, *Neuroendocrinol. Lett.* submitted (2006).
- [9] K. Hylland, O.O. Aspholm, J.A. Knutsen and A. Ruus Biomarkers in fish from dioxin-contaminated fjords, *Biomarkers* 11 (2006) 97-117.
- [10] R.P. Cosson Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: Limits and perspectives, *Cell. Mol. Biol.* 46 (2000) 295-309.
- [11] R.P. Cosson and J.A.J. Thompson Use of PAR model-303 electrode for the detection and quantification of metallothionein proteins in shellfish tissues, *Analisis* 11 (1983) 33-35.
- [12] M. Yamamura, T. Mori and K.T. Suzuki Metallothionein Induced in the Earthworm, *Experientia* 37 (1981) 1187-1189.
- [13] A.J. Morgan, S.R. Sturzenbaum, C. Winters, G.W. Grime, N.A. Abd Aziz and P. Kille Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57 (2004) 11-19.
- [14] J. Homa, E. Olchawa, S.R. Sturzenbaum, A.J. Morgan and B. Plytycz Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions, *Environ. Pollut.* 135 (2005) 275-280.

- [15] S.R. Sturzenbaum, P. Kille and A.J. Morgan The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein, *Febs Letters* 431 (1998) 437-442.
- [16] C.J. Langdon, C. Winters, S.R. Sturzenbaum, A.J. Morgan, J.M. Charnock, A.A. Meharg, T.G. Pearce, P.H. Lee and K.T. Semple Ligand arsenic complexation and immunoperoxidase detection of metallothionein in the earthworm *Lumbricus rubellus* inhabiting arsenic-rich soil, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 2042-2048.
- [17] R. Prusa, R. Kizek, L. Trnkova, J. Vacek and J. Zehnalek Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method, *Clin. Chem.* 50 (2004) A28-A29.
- [18] J. Petrlova, D. Potesil, R. Mikelova, O. Blastik, V. Adam, L. Trnkova, F. Jelen, R. Prusa, J. Kukacka and R. Kizek Attomole voltammetric determination of metallothionein, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5112-5119.
- [19] J. Kukacka, D. Vajtr, D. Huska, R. Prusa, L. Houstava, F. Samal, V. Diopan, K. Kotaska and R. Kizek Blood Metallothionein, Neuron Specific Enolase, And Protein S100B In Patients With Trauma Brain Injury, *Neuroendocrinol. Lett.* submitted (2006).
- [20] J. Kukacka, J. Petrlova, R. Prusa, V. Adam, B. Sures, M. Beklova, L. Havel and R. Kizek Changes of content of glutathione and metallothionein at plant cells and invertebrates treated by platinum group metals, *Faseb J.* 20 (2006) A75-A75.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty: 1M06030 a MSMT 6215712402.