

STUDY OF COMPLEXES OF ANIMAL METAL-BINDING PROTEIN WITH PLATINUM CYTOSTATICS

STUDIUM KOMPLEXŮ ŽIVOČIŠNÝCH KOV-VAZNÝCH PROTEINŮ S PLATINOVÝMI CYTOSTATIKY

Šobrová P.¹, Zítka O.¹, Komínková M.¹, Skaličková S.¹, Škutková Š.³, Adam V.¹, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Kolejní 4, 612 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Papaya1@seznam.cz

ABSTRACT

The suggestion of interactions between heavy metals and biologic active molecules haven't been exactly estimated yet. However cadmium, lead or mercury are significant environment pollutants and platinum and arsenic are used as oncologic medicament, they have common characteristic. In organism these compounds are not volatile but they are bounded to other molecules. Interactions between heavy metals and proteins are important for range of physiologic processes like transpiration, photosynthesis or detoxification of organisms. In our experiment an electrochemical profile of interactions between 23 metallothionein fragments and cisplatin was studied. At first 23 MT fragments (decapeptides) were selected given by differences in aminoacids ordering. For the experiment amperometric detection implemented to flow injection analysis system (FIA-ED) was used. However a lot of results were estimated, we focused on complex formation between cisplatin and 23 MT fragments analyzed in various conditions. All the 23 MT fragments interacted with cisplatin, in the optional conditions as equimolar ratio, in physiological conditions of phosphate buffer (pH 7.5) in temperature of 37°C. Based on results obtained we determined an interaction constant which defines an ability of each peptide to make an interaction with cisplatin. The highest IC was found by fragments 18 and 22 and the lowest IC by 1, 15, 12 and 19. We found that the major influence of interaction was done not by the change of near neighbouring aminoacids with the conservative cysteines but these which were about 2 or 3 of positions far away from cysteiene.

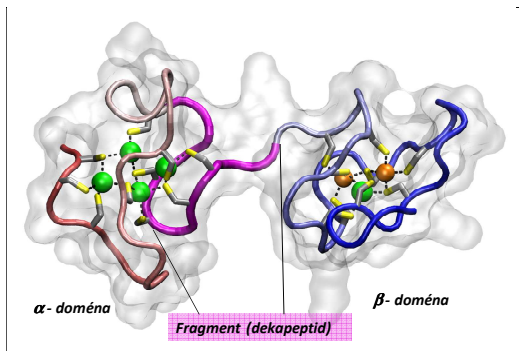
Key words: Metallothionein, cisplatin, FIA, electrochemical detection

Acknowledgments: The work has been supported by IGA FA MENDELU IP 23/2012.

ÚVOD

Problematika rezistence nádorových buněk na nádorová léčiva je velkým problémem v léčbě (Boehm, a kol., 1997) a není dodnes uspokojivě vysvětlena (Sakai, a kol., 2008). Její podstatou je mimo jiné i interakce cytostatik s biomolekulami syntetizovanými nádorovými buňkami (Higgins, 2007). Jeden z obecně uznávaných mechanismů rezistence je overexprese proteinu metalothioneinu (MT) v nádorových buňkách (Eckschlager, a kol., 2009). Ze strukturálního hlediska je metalothionein (Obr. 1) nízkomolekulární protein o velikosti (6-7 kDa) který je velmi bohatý na aminokyselinu cystein, která jej předurčuje pro jeho kov vazné vlastnosti. Terciární struktura je rozdělena na dvě domény, tvořící cysteinové clustery, kde do domény alfa se mohou vázat až 4 ionty dvojmocných kovů a do domény beta tři ionty dvojmocných kovů (Bell a Vallee, 2009), (Coyle, a kol., 2002). Vzhledem k četnému rozmístění cysteinů ve struktuře MT lze označit hned několik úseků řetězce, které významně přispívají k interakci s kovem. Pro účely studia interakcí *in vitro* jsme na základě vyhodnocení z databáze Expasy vybrali fragment proteinu metalothioneinu elektrochemickou detekcí. Vhodnost elektrochemické metody pro studium tvorby komplexu MT s kovem byla prokázána metodami katodické rozpouštěcí voltametrie (Sestakova a Mader, 2000), square wave voltametrie (Nieto a Rodriguez, 1996) nebo cyklické voltametrie (Harlyk, a kol., 1997, Marshall, a kol., 2009). Metoda FIA-ED byla zvolena právě díky zkušenosti z předchozího studia interakcí mezi thiolovou skupinou peptidu a cisplatinu (Zitka, a kol., 2007), (Zitka, submitted 2012). Cílem této práce bylo studium komplexů uměle nasyntetizovaných peptidových fragmentů proteinu MT s platinovými cytostatiky. Získané fragmenty pocházejí z různých živočišných organismů a liší se sekvencí aminokyselin při zachování konzervativních pozic s aminokyselinou cystein. Vzhledem k výrazné elektroaktivitě aminokyseliny cysteinu byla pro účely studia optimalizována metoda průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED).

Obr. 1: Struktura proteinu metalothioneinu, α - doména metalothioneinu obsahující čtyři atomy kadmia (zeleně), β - doména metalothioneinu obsahující dva atomy zinku (oranžově) a jeden atom kadmia. Růžově je vyznačen fragment metalothioneinu, který byl nasynthetizován pro následné *in vitro* studium interakce (Zdroj: www.expasy.org).



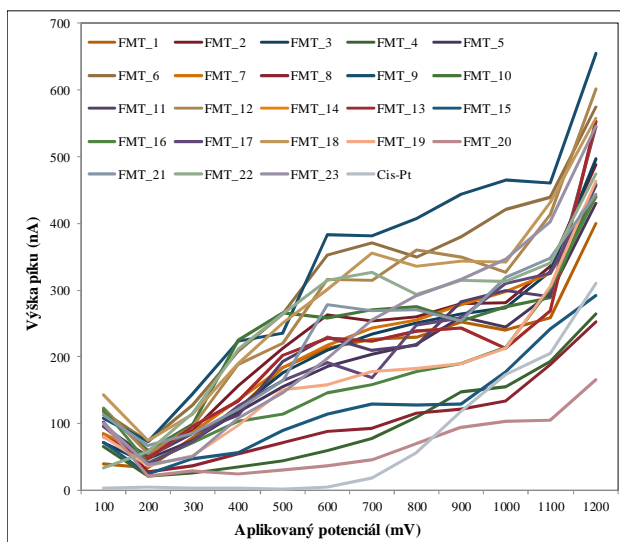
MATERIÁL A METODIKA

Uměle nasynthetizované peptidy FMT byly zakoupeny od firmy Clonestar (Česká republika). Veškeré chemikálie potřebné pro provedení analýz byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA). Dále byl zakoupen argon pro provoz HPLC od firmy Siad (Česká Republika) a také spotřební materiál pro HPLC od firmy Labicom (Česká Republika). Komplexy fragmentu metalothioneinu s cisplatinou byly připraveny v molárních poměrech Cis-Pt 100 μM : FMT 50, 100 a 150 μM v prostředí fosfátového pufru pH 7,5 (20 mM). Inkubace komplexů byla prováděna v celkovém objemu 400 μl směsi, která byla během inkubace neustále vortexována na termobloku při 400 rpm. FIA-ED systém byl složen z jedné chromatografické pumpy Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0,001-9,999 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) reakční smyčky (1 m) napojené na elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, USA) s amperometrickou průtokovou detekční celou (Model 5040, ESA, USA). Průtočná cela obsahuje planární elektrodu ze skelného uhlíku, hydrogen-paládiovou jako referenční a uhlíkovou jako pomocnou elektrodu. Vzorek (20 μl) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8 $^{\circ}\text{C}$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí FIA-ED systému byly nejprve analyzovány závislosti proudové odezvy na aplikovaném signálu – hydrodynamické voltamogramy (HDV). Ty charakterizují redoxní profil každé studované látky. Provedli jsme tedy analýzu všech 23 fragmentů metalothioneinu i samotných platinových cytostatik cisplatinu, oxaliplatinu a karboplatinu (Obr. 2). Z obrázků je patrné, že elektrochemické profily se pro jednotlivé FMT i platinová cytostatika poměrně liší. To vyplývá z odlišného chemického složení aminokyselin (v rámci FMT) a odlišné struktury cytostatika. Vzhledem k vysokému množství dat, která byla při studiu získána, jsme se s ohledem na detaily zaměřili pouze na studium tvorby komplexu mezi všemi 23 FMT a cisplatinou při variantních podmínkách které byly dále hodnoceny. Komplexy fragmentu metalothioneinu s cisplatinou byly připraveny v molárních poměrech Cis-Pt 100 μM : FMT 50, 100 a 150 μM v prostředí fosfátového pufru pH 7,5 (20 mM). Pro studium interakce byly takto připravené komplexy inkubovány při různých teplotách a časech. Tyto parametry byly zvoleny jako faktory, které nejvíce ovlivní interakci FMT a Cis-Pt *in vitro*. Inkubace komplexů byla prováděna v celkovém objemu 400 μl směsi, která byla během inkubace neustále vortexována na termobloku při 400 rpm. Pro každou z kombinací byl získán hydrodynamický voltamogram (HDV) v rozsahu potenciálu 100 - 1200 mV (n = 3) (RSD < 15 %).

Obr. 2: Hydrodynamické voltamogramy fragmentů FMT 1-23.

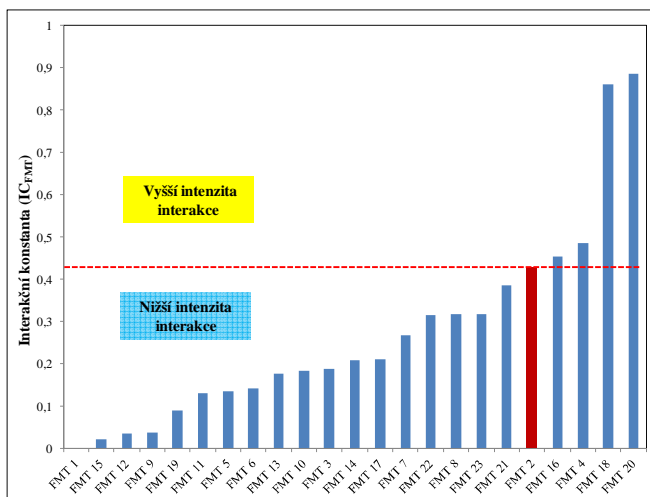


Nejprve byl studován vliv teploty 10, 15, 25, 35 a 45 °C. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při koncentraci FMT 100 µM a Cis-Pt 100 µM. Ihned po inkubaci proběhla analýza pomocí FIA-ED. Zjistili jsme, že nejvhodnější teplota byla 45 °C pro všechny studované FMT. Následně jsme testovali koncentraci přídatku Cis-Pt (50, 100 and 200 µM) k FMT (100 µM). Inkubace vzorků proběhla 1 hodinu při 45 °C. Po analýze všech variant jsme zjistili, že se jako nejvhodnější ukázal ekvimolární poměr čili koncentrace Cis-Pt 100 µM. Poslední testovaný parametr byla doba interakce. Zde jsme na základě zkušeností z předchozí práce testovali delší časové rozmezí tedy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 hodin při nejvhodnějších výše zmíněných podmínkách. Zjistili jsme, že jednohodinová inkubace je plně dostačující, a že při vyšších časech se již hodnoty směrnice nemění. Po analýze všech variant byl tedy nejvhodnější ekvimolární poměr FMT 100 µM a Cis-Pt 100 µM (1 h při 45 °C).

Pro vyhodnocení byly navrženy interakční konstanty (IC) (Obr. 3). Bylo zjištěno, že k maximálnímu zvýšení interakce (až o 106 % oproti průměru) došlo při záměně konzervativních aminokyselin nejčastěji o více než jednu pozici mimo cysteinový cluster. Naopak záměny aminokyselin v rámci cysteinových clusterů vedly ke snížení interakční konstanty (až o 10 - 100 % oproti průměru). Nejvyšší hodnoty IC byly zaznamenány u FMT 18 a 20, kde je zároveň patrná změna v aminokyselinách sousedících přímo s cysteiny. U FMT 18 se jednalo o výskyt P na pozici č 10 a u FMT 20 byla pozice 10 obsazena V a navíc velmi silně konzervativní pozice 1 obsahovala T místo K. Hodnoty IC pro oba FMT byly tak o více než 100 % zvýšené. Na druhou stranu u fragmentů FMT 2, 4, 16 byla schopnost interakce nižší i přes to, že vedle cysteinů byly stále konzervativní aminokyseliny S, S, P. Pouze v případě FMT 4 byly konzervativní cysteinové clusteru obklopeny P místo S ale současně byl konce peptidu výrazně odlišován záměnou N-terminálního D za G, což mělo za následek celkové zvýšení IC o 14 %. Dále bylo zaznamenáno zvýšení IC u FMT 16 a to o 6 %, které bylo způsobeno pouze záměnou M za S na pozici 10.

Z dosažených výsledků jasně vyplývá, že záměna aminokyselin v rámci peptidového řetězce velmi významně ovlivňuje možnosti interakce. Dále bylo ukázáno, že elektrochemická metoda FIA-ED je pro takovýto typ studia velmi přínosná.

Fig. 3: Hodnoty IC všech 23 studovaných fragmentů metalothioneinu vycházející z výpočtu vzhledem k testovaným parametrům (teplota, molární koncentrace, doba interakce). Hodnota ICFMT 2 (0,43) je červeně zvýrazněna.



ZÁVĚR

V tomto experimentu byl za pomoci zautomatizované metody FIA-ED studován vliv sekvence primární aminokyselinové struktury peptidového fragmentu pocházejícího z kov-vazného proteinu metalothioneinu na tvorbu interakce s cisplatinou. Zde byly získány vysoce unikátní a originální výsledky, které ukazují, že záměna aminokyselinové sekvence nerovnoměrně a velmi účinně ovlivňuje tvorbu interakce. Z dosažených výsledků vyplývá, že největší vliv na interakci FMT s Cis-Pt mají změny aminokyselin na pozici 1 a 10, které jsou vzdálené o více než jednu pozici od cysteinových clusterů, kde v rámci FMT 20 a 18 poměrně výrazně ovlivňuje celkovou interakci umístění aminokyselin P, T a V. V porovnání s těmito aminokyselinami pak s velkým odstupem ovlivňovaly interakci změny aminokyselin P a D na pozicích 6 a 11 u FMT 4 a následované záměnou M na pozici 10 u FMT 16.

LITERATURA

- Bell S. G., Vallee B. L. (2009): The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link. *Chembiochem*, 10(1): 55-62.
- Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M. S. (1997): Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658): 404-407.
- Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M. (2002): Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4): 627-647.
- Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J., Figova K., Kizek R. (2009): Metallothioneins and cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 10(4): 360-375.
- Harlyk C., Bordin G., Nieto O., Rodriguez A. R. (1997): Cyclic voltammetry study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I in the presence of cadmium. *Electroanalysis*, 9(8): 608-613.
- Higgins C. F. (2007): Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137): 749-757.
- Marshall N. M., Garner D. K., Wilson T. D., Gao Y. G., Robinson H., Nilges M. J., Lu Y. (2009): Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range. *Nature*, 462(7269): 113-U127.
- Nieto O., Rodriguez A. R. (1996): Complexation properties of the metallothionein fragment Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I with zinc using square wave voltammetry. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40(2): 215-222.
- Sakai W., Swisher E. M., Karlan B. Y., Agarwal M. K., Higgins J., Friedman C., Villegas E., Jacquemont C., Farrugia D. J., Couch F. J., Urban N., Taniguchi T. (2008): Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182): 1116-U9.
- Sestakova I., Mader P. (2000): Voltammetry on mercury and carbon electrodes as a tool for studies of metallothionein interactions with metal ions. *Cellular and Molecular Biology*, 46(2): 257-267.
- Zitka O., Huska D., Krizkova S., Adam V., Chavis G. J., Trnkova L., Horna A., Hubalek J., Kizek R. (2007): An investigation of glutathione-platinum(II) interactions by means of the flow injection analysis using glassy carbon electrode. *Sensors*, 7(7): 1256-1270.
- Zitka O. K., M.; Skalickova, S.; Skutkova, H; Provaznik, I.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Trnkova, L.; Adam, V.; Kizek, R. (submitted 2012): Changes of Single Amino Acid in Metal-Binding Cluster of Metallothionein Significantly Influences its Interaction with Cisplatin. *Scientific Reports*.